УДК 57.085.23

Получение клеточных продуктов на основе опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов для противоопухолевой иммунотерапии: текущее состояние и вызовы

Д. В. Кузнецова*, Т. В. Петрова
Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. академика Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, 119435 Россия
*E-mail: dashakuz23@gmail.com
Поступила в редакцию 26.11.2024
Принята к печати 11.02.2025
DOI: 10.32607/actanaturae.27559

РЕФЕРАТ **Опухоль-инфильтрирующие Т-лимфоциты (ОИЛ) – это популяция Т-лимфоцитов, присутствующая в ткани опухоли и обогащенная клонами, специфичными к опухолевым антигенам. ОИЛ участвуют в адаптивном противоопухолевом иммунном ответе, что делает их перспективными для иммунотерапии рака. Концепция данного вида терапии предполагает извлечение Т-лимфоцитов из опухоли пациента, их экспансию *ex vivo* и последующее введение в организм того же пациента в большом количестве. Такой подход позволяет усилить противоопухолевый иммунный ответ и воздействовать на опухолевые клетки, устойчивые к другим видам лечения. В 2024 году был одобрен первый препарат на основе ОИЛ, предназначенный для лечения меланомы. Изучается возможность использования ОИЛ при других солидных опухолях, разрабатываются новые методики, направленные на увеличение эффективности получения культур ОИЛ из опухолевых тканей *ex vivo*. Тем не менее, несмотря на значительный прогресс в данной области, существуют нерешенные вопросы и проблемы, в том числе отсутствие стандартизированных протоколов получения, экспансии и криоконсервации ОИЛ, сложность и длительность процесса их выделения, недостаточная эффективность. В представленном обзоре мы обсудим концепцию иммунотерапии с использованием ОИЛ, основные этапы производства клеточного продукта на основе ОИЛ, сопутствующие проблемы, а также дальнейшие шаги в производстве культур ОИЛ, направленные на улучшение эффективности их получения и более широкое применение данной терапии.**

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА **опухоль-инфильтрирующие Т-лимфоциты, иммунотерапия, ОИЛ-терапия.**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ **ОИЛ – опухоль-инфильтрирующие Т-лимфоциты (Т-клетки); CTLA-4 – гликопротеин цитотоксических Т-лимфоцитов 4; PD-1 – мембранный белок запрограммированной клеточной гибели; PD-L1 – лиганд белка запрограммированной клеточной гибели; CAR – химерный антигенный рецептор; CAR-T – Т-лимфоциты, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (англ. – himeric antigen receptor T-cell); CAR-NK – NK-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор; ТКР – Т-клеточный рецептор; FDA – управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов; pre-REP – процедура получения культур ОИЛ из опухолевой ткани (англ. pre-rapid expansion protocol); REP – вторичная экспансия ОИЛ (англ. rapid expansion protocol); ПГЕ2 – простагландин Е2; IL-2 – интерлейкин-2; IL-2Ra/β – альфа- и бета-цепи рецептора интерлейкина-2; ortho-hIL-2 – ортогональный генно-инженерный интерлейкин-2 человека; ortho-hIL-2Rβ – ортогональный генно-инженерный рецептор интерлейкина-2 человека; IL-7 – интерлейкин-7; IL-12 – интерлейкин-12; IL-12Rb1 – рецептор интерлейкина 12, субъединица бета 1; IL-15 – интерлейкин-15; mbIL15 – мембраносвязанный IL-15; IL-21 – интерлейкин-21; 4-1BB (CD137 или TNFRSF9) – мембранный белок, член надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли; IFN-γ – интерферон-гамма; ПМК – мононуклеарные клетки периферической крови; ДМСО – диметилсульфоксид; Treg – регуляторные Т-лимфоциты; NK-клетки – естественные киллерные клетки (тип лимфоцитов); MHC – главный комплекс гистосовместимости (англ. major histocompatibility complex); pMHC – пептид-MHC.**

ВВЕДЕНИЕ

Иммунотерапия опухолей является одним из наиболее инновационных и перспективных направлений современной онкологии. По мере появления новых данных о взаимодействии иммунной системы с опухолью иммунотерапия в разных формах (терапия с помощью ингибиторов контрольных точек иммунной системы, в том числе антител к молекулам CTLA-4, PD-1, PD-L1 и др.; CAR-T, CAR-NK-терапия, терапия дендритными клетками, *in vitro* культивирование и последующее введение обратно пациенту аутологичных опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов (ОИЛ), вакцинация неоантигенными пептидами, полученными путем химического синтеза) стала оцениваться как перспективный новый метод лечения различных видов злокачественных опухолей, поскольку позволила персонализировать и улучшить эффективность лечения опухолей, даже неконтролируемых и метастатических.

В настоящее время иммунотерапия опухолей представляет собой активно развивающееся поле для исследований и создания новых лекарственных препаратов.

Опухоль-инфильтрирующие Т-лимфоциты представляют собой популяцию Т-лимфоцитов, присутствующих в ткани опухоли и обогащенных опухоль-специфичными клонами. Однако наличие иммуносупрессивных факторов в микроокружении опухоли, активно подавляющих противоопухолевый иммунный ответ, снижает способность ОИЛ уничтожать опухолевые клетки. Концепция ОИЛ-терапии заключается в том, что противоопухолевый иммунный ответ можно восстановить путем выделения ОИЛ из фрагмента опухоли, культивирования *ex vivo* для увеличения их общего количества (минимум до 10^9 клеток) и последующего введения пациенту. В отличие от других методов клеточной иммунотерапии, ОИЛ получают от самого пациента без генетической модификации [1].

Исследования 1950-х годов, направленные на возможность использования Т-лимфоцитов для подавления роста опухолевых клеток, были вдохновлены работами, показавшими, что отторжение солидного трансплантата опосредовано клеточным иммунитетом [2]. Работы на животных моделях показали, что Т-лимфоциты иммунизированных доноров, перенесенные сингенным реципиентам, способны опосредовать регрессию опухоли, а IL-2 может использоваться для увеличения их количества [3]. Позднее на мышиной модели установили, что одновременное введение IL-2 и Т-лимфоцитов *in vivo* усиливает противоопухолевую эффективность Т-лимфоцитов. Однако потребность в иммунизированном сингенном доноре в качестве источника опухоль-специфичных Т-лимфоцитов оставалась препятствием для реализации этого подхода у людей, у которых нет такого источника ОИЛ.

В 1986 году этот барьер был преодолен, когда Розенберг и его коллеги из хирургического отделения Национального института онкологии (США) впервые продемонстрировали на мышиной модели, что комбинация аутологичных ОИЛ и циклофосфамида может вызывать регрессию метастазов [4]. За этим последовала знаменательная публикация 1988 года – первого исследования, показавшего, что введение ОИЛ пациентам с метастатической меланомой может приводить к регрессии опухоли [5]. На октябрь 2024 года на ресурсе Clinicaltrials.gov зарегистрировано 266 клинических исследований по тематике ОИЛ-терапии. Из них 26 имеют статус «активно», 103 – «в процессе набора пациентов», а 82 завершены [6]. Ежегодно в течение последних 5 лет регистрируются 15–30 новых клинических исследований ОИЛ-терапии солидных опухолей разных нозологий с превалированием меланомы (40% от всех клинических исследований) [7].

Выборочный перечень клинических исследований, находящихся в настоящий момент на стадии I/II, охватывающих практически все виды солидных опухолей, приведен *в табл. 1*.

16 февраля 2024 года FDA одобрило полученный в итоге 30-летней работы лифилеуцел (Амтагви) как препарат для первого вида терапии, в котором используются ОИЛ. Препарат одобрен для взрослых пациентов с неоперабельной или метастатической меланомой кожи, ранее получавших стандартное лечение. Лифилеуцел производится путем *ex vivo* культивирования опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов, выделенных из хирургически удаленных аутологичных фрагментов опухоли [8].

Стоит отметить, что метастатическая меланома кожи считается высокоиммуногенной злокачественной опухолью. Частота объективного ответа на ОИЛ-терапию составляет 36–56%, выживаемость без прогрессирования – 3.7–7.5 месяцев, а общая выживаемость – 15.9–21.8 месяцев [9]. Более низкоиммуногенные («холодные») опухоли хуже реагируют на ОИЛ-терапию, что, с одной стороны, является препятствием, с другой, открывает простор для поиска решений по оптимизации ОИЛ-терапии.

ПОЛУЧЕНИЕ И ЭКСПАНСИЯ ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ *EX VIVO*

Экспансию опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов *ex vivo* можно разделить на два этапа: получение культур ОИЛ из опухолевой ткани (этап pre-REP) и масштабная экспансия Т-лимфоцитов (этап REP) (*рис. 1*).

Таблица 1. Избранные клинические исследования ОИЛ-терапии, зарегистрированные в Clinicaltrials.gov по состоянию на октябрь 2024 г.

Нозология	Номер клинического испытания	Стадия испытания	Количество пациентов	Доза введения
Меланома, IIIb, IIIc или IV стадии	NCT03374839	I/II	11	Когорта 1: 5×10^8 ОИЛ (три пациента)/ Когорта 2: $1–20 \times 10^9$ ОИЛ на 14 и 18 неделях
Меланома, IV стадия	NCT03475134	I	10	Не указано
Измеримая метастатическая меланома	NCT03166397	II	30	Не указано
Неоперабельная меланома III/IV стадии или рак яичников, резистентный к платине	NCT03158935	Ib	24	$1 \times 10^{10}–1.6 \times 10^{11}$ ОИЛ
Неоперабельная меланома кожи или слизистых оболочек III/IV стадии	NCT02652455	Пилот	12	Не уточнено, рост клеток через 4–8 недель при использовании антитела, активирующего CD137
Измеримая метастатическая меланома	NCT02621021	II	170	Не указано, молодой ОИЛ
Неоперабельная метастатическая меланома	NCT02360579	II	60	Не указано
Метастатическая меланома или транзиторное, подкожное или регионарное узловое заболевание III стадии	NCT01740557	Пилот	15	До 1.5×10^{11} ОИЛ
Неоперабельная меланома, III/IV стадии	NCT02354690	I/II	12	$1 \times 10^9–2 \times 10^{11}$ ОИЛ
Неоперабельная меланома, III/IV стадии	NCT02278887	III	168	Не указано
Метастатическая меланома или транзиторное, подкожное или регионарное узловое заболевание III стадии	NCT01955460	Пилот	15	До 1.5×10^{11} ОИЛ
Метастатическая меланома	NCT01993719	II	64	Не указано
Неоперабельная меланома, III или IV стадии	NCT01946373	I	10	До 5×10^{10} ОИЛ
Неоперабельная меланома, III/IV стадии	NCT01883323	II	12	$1 \times 10^{10} –1.6 \times 10^{11}$ ОИЛ
Метастатическая меланома, увеальная меланома или транзиторная стадия III или поражение регионарных узлов	NCT00338377	II	189	Когорта 1–3: до 1.5×10^{11} ОИЛ. Когорта 4: 5.0×10^9 ОИЛ на 1-й день, 10×10^{10} ОИЛ на 15-й день
Метастатическая увеальная меланома	NCT03467516	II	59	$1 \times 10^9–2 \times 10^{11}$ ОИЛ
Метастатическая меланома	NCT01995344	II	90	Не указано
Неоперабельная меланома, III/IV стадии	NCT02379195	I/II	12	Не указано
Меланома, III/IV стадии	NCT01807182	II	13	Не указано
Неоперабельная меланома, III/IV стадии	NCT01701674	Пилот	13	Не указано
Неоперабельная метастатическая меланома IV стадии или интранзитное или регионарное узловое заболевание III стадии	NCT01659151	II	17	Не указано
Метастатическая меланома	NCT01319565	II	102	Когорта 1 + 2: $1 \times 10^9 –2 \times 10^{11}$ молодых ОИЛ
Неоперабельная меланома, III/IV стадии	NCT01005745	I/II	19	Не указано
Местно-распространенным, рецидивирующим или метастазирующим заболеванием. Рак желчевыводящих путей	NCT03801083	II	59	2×10^{11} ОИЛ (минимум 1×10^9 клеток)
Метастатическая увеальная меланома	NCT03467516	II	47	2×10^{11} ОИЛ (минимум 1×10^9 клеток)
Рак молочной железы	NCT05142475	I	50	$1 \times 10^9–5 \times 10^{10}$ ОИЛ
Злокачественные солидные опухоли	NCT05649618	I	42	$2.5 \times 10^9–5 \times 10^{10}$ ОИЛ
Прогрессирующие солидные опухоли	NCT03935893	II	240	2×10^{11} ОИЛ (минимум 1×10^9 клеток)
Злокачественные солидные опухоли	NCT05902520	I	18	Не указано
Уротелиально-клеточная карцинома (UCC) и немышечно-инвазивный рак мочевого пузыря (NMIBC)	NCT05768347	I	12	Не указано
Поздняя стадия меланомы	NCT05098184	I	50	$1 \times 10^9–5 \times 10^{10}$ ОИЛ
Меланома III и IV стадии с метастазами	NCT01883323	II	12	1.0×10^6 клеток/мл и размножали максимум в течение 28 дней перед криоконсервацией
Меланома	NCT02360579	II	66	26.1×10^9 (диапазон 3.3–72) ОИЛ
Немелкоклеточный рак легкого	NCT04614103	II	170	$1 \times 10^9–150 \times 10^9$ ОИЛ
Карцинома шейки матки	NCT03108495	II	27	28×10^9 ОИЛ

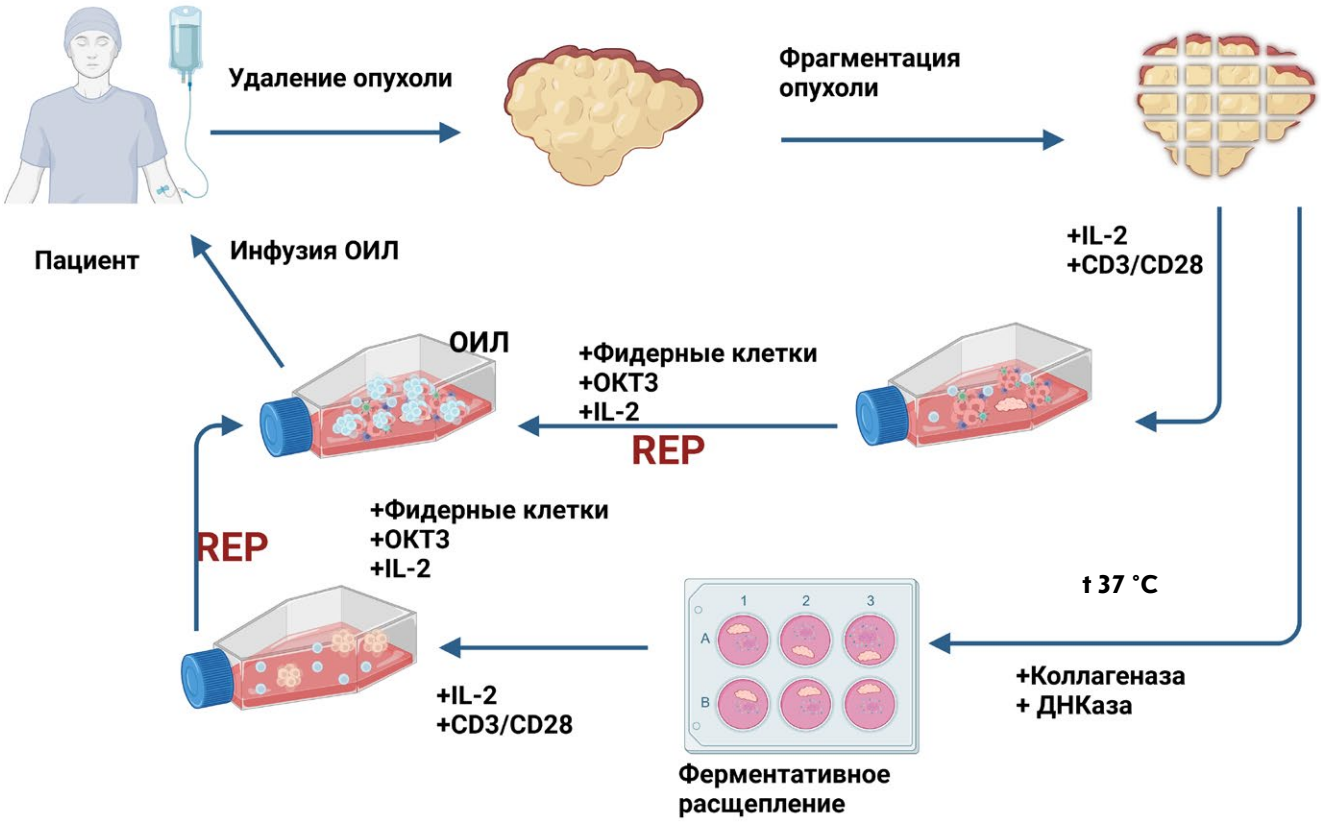

Рис. 1. Процесс подготовки и инфузии ОИЛ, полученных из свежей опухолевой ткани. Показаны два самых распространенных варианта получения ОИЛ из фрагментов опухоли и путем ферментативного расщепления. Вне зависимости от типа pre-REP-этапа получения ОИЛ, на втором этапе (REP) для масштабной экспансии перед инфузией клеточного продукта пациенту необходимо добавление фидерных клеток

Свежеиссеченную опухолевую ткань, полученную после хирургического вмешательства, быстро (в течение нескольких часов после операции) доставляют в лабораторию в стерильном сосуде в среде для транспортировки, состоящей из среды культивирования клеток с антибиотиком. Полученный биоматериал сразу же разрезают на небольшие фрагменты примерно 1.5 × 1.5 мм^2 и помещают в среду для культивирования с добавлением IL-2 (500–6000 МЕ/мл). Другим способом получения культур ОИЛ является предварительное переваривание фрагментов опухоли в коктейле ферментов с добавлением коллагеназы и ДНКазы в течение 30–60 мин при температуре 37°C. Полученную клеточную суспензию также помещают в среду для культивирования с добавлением IL-2 (500–6000 МЕ/мл) [10–13]. Для дополнительной активации ОИЛ вносят не только IL-2, но иногда добавляют также антитела к CD3/CD28 [14–18]. Стоит отметить, что поскольку в клинических исследованиях изучают возможность получения ОИЛ из опухолей разных локализаций, в том числе кожи и кишечника, необходимо учитывать возможность бактериального обсеменения опухолевых фрагментов и предусмотреть дополнительную отмывку опухолевых фрагментов и/или проводить культивирование *ex vivo* с антибиотиком и антимикотиком. Некоторые методики предусматривают также предварительную инкубацию опухолевого фрагмента в среде с 10% антибиотиком при комнатной температуре в течение 30 мин перед дальнейшими манипуляциями, например, при работе с колоректальным раком или меланомой [19]. Когда количество клеток в первичной культуре ОИЛ достигает примерно 1 млн/мл суспензии, первый этап считается завершенным. ОИЛ далее могут подвергаться криоконсервации или использоваться на втором этапе: масштабной экспансии (REP) для получения клинически значимого количества клеток. Согласно клиническим исследованиям, а также инструкции по применению зарегистрированного препарата лифилеуцел, необходимое количество ОИЛ для введения составляет от 1 × 10^9

до 2 × 10^{11} клеток, а общий объем инфузии может составлять 100–400 мл [12, 20]. Для масштабной экспансии ОИЛ на втором этапе используют фидерные клетки (мононуклеарные клетки периферической крови здоровых доноров (аллогенные) или пациента (сингенные), облученные предварительно дозой 40 Гр), которые культивируют вместе с ОИЛ до достижения последними клинически значимых количеств в среде с IL-2 (500–6000 МЕ/мл) [19]. Поскольку успех экспансии ОИЛ в условиях *ex vivo* во многом зависит от количества фидерных клеток, в основных протоколах рекомендуется использовать соотношение фидерных клеток : ОИЛ = 100 : 1 или даже 200 : 1 [21]. Принято считать, что использование меньшего количества фидерных клеток может привести к значительному снижению выхода ОИЛ, что подчеркивает их важность для эффективной экспансии ОИЛ [15]. Стоить отметить, что в связи с необходимостью использования большого количества фидерных клеток часто прибегают к использованию фидерных клеток донора и пулированию биоматериала от нескольких доноров [12]. Этот метод является уникальным для ОИЛ-терапии в сравнении с более распространенным методом получения CAR-T, в котором для масштабной экспансии Т-лимфоцитов фидерные клетки не используют, а добавляют в культуральную среду не только высокие дозы IL-2, но и антитела к CD3/CD28, активирующие Т-лимфоциты [22, 23].

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОЛУЧЕНИЯ ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Как уже упомянуто, краеугольным камнем в успехе ОИЛ-терапии является получение культур ОИЛ из фрагментов опухолей. Изучение работ разных авторов (*см. табл. 2*) показало, что вероятность получения жизнеспособных культур ОИЛ из фрагментов опухоли пациента слабо зависит от типа солидной опухоли и варьирует в зависимости от исследовательского центра, где проводились такие работы. Культуры ОИЛ удавалось получать от 18–100% пациентов, взятых в конкретное исследование. Анализируя данные, представленные в *табл. 2*, можно заключить, что отчасти подобные вариации могут быть объяснены отсутствием стандартизации процедуры получения культур ОИЛ, отчасти тем, что для некоторых нозологий (колоректального рака, меланомы) большую угрозу представляет микробиологическая контаминация. Кроме того, не последнюю роль играют количество стартового биоматериала опухоли и степень его инфильтрации иммунными клетками (как в увеальной меланоме и глиобластоме). К сожалению, небольшой размер выборок в большинстве работ негативным образом влияет на надежность и обоснованность приведенных данных и может искажать оценку эффективности получения культур ОИЛ как в большую, так и в меньшую сторону. Нам удалось найти только одну работу, где была проанализирована эффективность получения культур ОИЛ для большого количества пациентов (более 1000). Из результатов этой работы следует, что эффективность получения ОИЛ из опухолей пациентов варьировала от года к году и, в среднем, за 11 лет культуры ОИЛ удалось получить у менее чем 70% пациентов [33].

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Эффективность получения культур ОИЛ, несмотря на значительный прогресс, далека от 100%. Кроме того, для получения оптимального противоопухолевого ответа *in vivo* желательно обогащение культур ОИЛ цитотоксическими CD8+ Т-лимфоцитами. В то же время, если обратиться к *табл. 2*, то можно заметить, что доля CD8+ Т-лимфоцитов сильно варьирует и, вероятно, зависит как от исходного соотношения Т-лимфоцитов в опухолевой ткани, так и от условий культивирования.

На данный момент ведутся исследования, направленные на оптимизацию протоколов получения культур ОИЛ путем добавления в среду культивирования различных коктейлей интерлейкинов; на использование генной инженерии на разных этапах получения Т-лимфоцитов; а также на работу с иммуносупрессивным микроокружением опухоли, способным нивелировать весь потенциал противоопухолевой клеточной терапии.

Как один из способов повышения эффективности получения культур ОИЛ из опухолевой ткани *ex vivo* рассматривают добавление в среду культивирования модуляторов контрольных точек иммунной системы. В работах нескольких исследовательских групп было показано, что добавление агонистического антитела анти-4-1BB к культивируемым фрагментам меланомы способствовало сокращению времени экспансии и повышало процентное соотношение CD8+ Т-лимфоцитов в культуре ОИЛ по сравнению с классической средой культивирования, содержащей только IL-2 [35, 36]. Аналогичные эффекты данного антитела показаны на 16 образцах немелкоклеточного рака легкого. Добавление IL-2 в сочетании с агонистическими антителами к молекулам CD3 и 4-1BB (Урелумаб) в среду культивирования ОИЛ приводило к уменьшению времени до получения культур ОИЛ и увеличивало долю CD8+ Т-клеток как в ходе pre-REP, так и в ходе REP-этапов культивирования ОИЛ [37]. Таким способом удалось достичь 100% эффективности полу-

Таблица 2. Особенности и эффективность получения культур ОИЛ из солидных опухолей

Нозология	Состояние исходного образца опухолевой ткани	Количество образцов опухолевой ткани в исследовании	Особенности получения культур ОИЛ	Эффективность получения культур ОИЛ, %	Доля популяций CD4+, CD8+ Т-лимфоцитов от общего числа клеток в культуре ОИЛ, %	Доля контаминированных культур ОИЛ	Ссылка
Меланома	Свежий материал	90 опухолей, 710 отдельных культур	1) ОИЛ из фрагментов опухоли. Среда для культивирования ОИЛ: RPMI 1640, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 ммоль/ *L*-глутамина, 10% человеческой сыворотки, IL-2 (6000 МЕ/мл). 2) ОИЛ из ферментативно диссоциированных фрагментов опухоли. Раствор для ферментативного расщепления: коллагеназа, гиалуронидаза, ДНКаза в RPMI 1640. Инкубация фрагментов 18 ч на орбитальном шейкере. Культивирование полученной клеточной суспензии в среде для ОИЛ.	1) 69.9 2) 94.1	CD4+ 31.4 (0.3–70) CD8+ 62.4 (37.2–97.6)	Не указано	[12]
Рак молочной железы	Свежий материал	42 опухоли	Не указано	100	CD4+ 55.6 (9.1–94.0)	Не указано	[24]
Колоректальный рак, рак желудка	Свежий материал	33 опухоли колоректального рака, 8 опухолей рака желудка	ОИЛ из ферментативно диссоциированных фрагментов опухоли. Культивирование фрагментов опухоли в течение 4 недель.	64 колоректальный рак, 43 рак желудка	Не указан	Не указано	[25]
Колоректальный рак	Свежий материал	12 опухолей	ОИЛ из фрагментов опухоли. Среда культивирования: CellGenix GMP DC, 10% человеческой сыворотки, 1% раствора антибиотика – антимикотика, IL-2 (1000 МЕ/мл). Добавка 10 нг/мл IL-12 при переносе культуры ОИЛ в перфузионный биореактор для масштабной экспансии.	100	Первая фаза экспансии 28.8 (0.6–55.3) CD4 + 64.6 (325–84.5) CD8 + Во вторую фазу экспансия CD8+ 85, CD4+ 12.4 (1.7–40.5).	Не указано	[26]
Увеальная меланома	Свежий материал	30 опухолей	1) ОИЛ из фрагментов опухоли (22 опухоли). Культивирование 1–4 фрагментов опухоли в 2 мл среды для ОИЛ с IL-2. Смена половины среды каждые 2–3 дня. 2) ОИЛ из ферментативно диссоциированных фрагментов опухолей (12 опухолей). Состав раствора для ферментативного расщепления: коллагеназа D 10 мг/мл, ДНКаза I 3 мг/мл. Время инкубации – 30 мин с использованием гомогенизатора gentleMACS. 3) ОИЛ из ферментативно диссоциированных фрагментов опухолей с дополнительной положительной селекцией по маркеру CD3 магнитными бусами Dynabeads (25 опухолей).	1) 18 2) 42 3) 68	CD4 + 25 (0–91) CD8 + 39 (6–84)	Не указано	[27]
Саркома мягких тканей	Свежий материал	64 опухоли	1) ОИЛ из фрагментов опухоли. Культивирование по одному фрагменту опухоли в лунке 24-луночного планшета в культуральной среде, содержащей IL-2 (6000 МЕ/мл). 2) ОИЛ из ферментативно диссоциированных фрагментов опухоли. Состав раствора для ферментативного расщепления: ДНКаза IV (30 000 ед./л), гиалуронидаза V (100 мг/л), коллагеназа IV (1000 мг/л), гентамицин (500 мг/л), пенициллин-стрептомицин (5000 ед./мл), *L*-глутамин (292 мг/л), амфотерицин B (62.5 мкг/л). Культивирование суспензии клеток в среде, содержащей IL-2 (6000 МЕ/мл).	91%	CD8 + 54.2 (3–95.4), CD4+ 2.5 (0.03–44.73)	1.60	[28]

Нозология	Состояние исходного образца опухолевой ткани	Количество образцов опухолевой ткани в исследовании	Особенности получения культур ОИЛ	Эффективность получения культур ОИЛ, %	Доля популяций CD4+, CD8+ Т-лимфоцитов от общего числа клеток в культуре ОИЛ, %	Доля контаминированных культур ОИЛ	Ссылка
Первичный рак поджелудочной железы и метастатическая меланома	Свежий и замороженный материал	31 рак поджелудочной железы и 32 метастатические меланомы	ОИЛ из фрагментов опухоли. Среда культивирования: X-Vivo 15 или RPMI 1640, антибиотик, 2% человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), либо 10% аутологичной сыворотки.	80	Не указано	Не указано	[19]
Плоскоклеточный рак головы и шеи	Свежий материал	47 образцов	ОИЛ из фрагментов опухоли. Среда культивирования: RPMI 1640, 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 1× ZellShield, 400 мкг/мл гентамицина, 50 нМ 2-меркаптоэтанола, IL-2 (1000 МЕ/мл).	36.20	ОИЛ показали преобладание CD4 + Т-клеток в 9 случаях (69.2) и CD8 + Т-клеток в 4 случаях (30.7)	27.60	[29]
Метастатический немелкоклеточный рак легкого	Свежий материал	34 образца	ОИЛ из фрагментов опухоли. Длительность 22 дня с соблюдением GMP. Среда культивирования: IL-2, OKT3 и фидерные клетки.	82.3	CD4+ 44.5 (6–88) CD8+ 46 (1–92)	Не указано	[30]
10 различных видов солидной опухоли	Свежий материал	25 образцов	ОИЛ из фрагментов опухоли. Среда культивирования: RPMI 1640, 10% фетальной бычьей сыворотки, 1% пенициллина/стрептомицина и 0.5% Фунгизона, IL-2 (6000 МЕ/мл).	97	CD4+ 59.1 (2–95.8) CD8+ 32 (2.5–65.6) (У 10 пациентов преобладающим подмножеством Т-клеток был CD8+ (> 50%), тогда как подмножество CD4+ доминировало у 14 пациентов)	Не указано	[31]
Метастазы колоректального рака в печени	Свежий материал	15	ОИЛ из фрагментов опухоли	66.7	CD4+ 69.4 CD8+ 32.5	Не указано	[32]
Метастатическая меланома	Свежий материал	1135	1) ОИЛ из фрагментов опухоли. Среда культивирования: 6000 МЕ/мл IL-2. 2) ОИЛ из фрагментов опухоли. Среда культивирования: 30 нг/мл OKT3, 10 мкг/мл агонистического антитела 4-1BB и 6000 МЕ/мл IL-2.	50–80 (среднее – 62 за 11 лет, 68 за последние 5 лет)	1)CD8+ 74.7 ± 28.1, 2)CD8+ 84.9 ± 9.6	Не указано	[33]
Глиобластома, рак легкого, метастатический колоректальный рак, метастазы меланомы в печень	Свежий	Глиобластома (7 пациентов), рак легкого (2 пациента), метастатический колоректальный рак (2 пациента)	ОИЛ из фрагментов опухоли	100	CD8+ аденокарцинома (16–36), глиобластома (2–20)	Не указано	[34]

чения культур ОИЛ для 12 образцов увеальной меланомы [33]. Поскольку увеальная меланома характеризуется слабой инфильтрацией иммунными клетками, получение культур ОИЛ из опухоли этого типа представляет собой сложную задачу. Количество ОИЛ, полученное в этой работе всего из пяти фрагментов размером менее 3 мм^3, было эквивалентным или превышало количество, полученное из 20 фрагментов стандартным методом (только с IL-2) [33].

Другой подход к взаимодействию с микроокружением опухоли представила группа ученых, показавшая эффективность ингибирования сигнального пути простагландина E2 (ПГЕ2) для стимуляции противоопухолевого ответа *in vivo* [38]. Опираясь на результаты этой работы, Morotti и соавт. обнаружили, что повысить эффективность получения культур ОИЛ из образцов меланомы (NCT03475134) можно путем ингибирования сигнального пути ПГЕ2. Ингибирование этого сигнального пути повышало восприимчивость ОИЛ к действию IL-2, снижая воздействие окислительного стресса на Т-лимфоциты и их гибель путем ферроптоза [39].

Добавление в среду культивирования различных коктейлей интерлейкинов является еще одним перспективным способом увеличения эффективности получения культур ОИЛ, в том числе с заданными свойствами, например, культур ОИЛ с преобладающей долей CD8+ Т-лимфоцитов или ОИЛ, в которых преобладают клетки памяти, а не эффекторные Т-клетки. Применение коктейлей интерлейкинов подразумевает отход от классического использования исключительно IL-2 для активации Т-лимфоцитов и позволяет изучить влияние различных цитокинов (IL-4, IL-7, IL-15 и IL-21) и их комбинаций на конечный клеточный продукт. Стоит отметить, что применение коктейлей интерлейкинов изначально широко применялось при получении другого клеточного продукта – CAR-T [40–42]. В дальнейшем показали, что CAR-T-клетки, культивируемые в среде с добавлением IL-7 и IL-15, имеют более высокую скорость пролиферации и повышенную противоопухолевую активность по сравнению с клетками, культивируемыми в среде, содержащей только IL-2 [43]. Кроме того, установили, что при добавлении комбинации IL-2, IL-15, IL-21 увеличивается соотношение CD8+/CD4+ Т-лимфоцитов [44], что имеет важное значение для CAR-T-терапии.

Благодаря успешному использованию различных комбинаций интерлейкинов в CAR-T-терапии подобные подходы стали применять и для получения Т-клеточных продуктов с использованием ОИЛ. На PD-1+CD8+ Т-лимфоцитах, выделенных из крови здоровых доноров и пациентов с подтвержденным онкологическим диагнозом, был показан эффект добавления в среду культивирования коктейля из двух цитокинов IL-7 и IL-15 и антител к CD3/CD28. Использование такого коктейля способствовало увеличению пролиферации Т-лимфоцитов в суспензии [45]. Комбинированное воздействие антитела к анти-CD3, панобиностата, IL-2 и IL-21 способствовало увеличению доли CD62L+CD28+CD8+ Т-лимфоцитов в культуре ОИЛ по сравнению с ОИЛ, которые были культивированы без данного коктейля [46].

На этом работы в области применения интерлейкинов для улучшения экспансии Т-лимфоцитов не останавливаются, активно разрабатываются модифицированные формы интерлейкинов. Так, на стадии разработки находится генно-модифицированный IL-2 (STK-012), первый в своем классе частичный агонист альфа- и бета-цепей рецептора IL-2 (IL-2Ra/β), необходимый для селективной активации CD25+ антиген-активированных Т-клеток в отсутствие неспецифической активации NK-клеток и наивных Т-лимфоцитов. Доклинические испытания *in vivo* на мышах с использованием mSTK-012 (мышиный сурогат STK-012) продемонстрировали значительное снижение ОИЛ с истощенным фенотипом и увеличение системной и внутриопухолевой экспансии CD25+PD-1+CD8+ популяции Т-лимфоцитов, специфичных к опухолевому антигену. При этом наблюдалось снижение количества внутриопухолевых регуляторных Т-лимфоцитов (Treg), то есть противоопухолевые свойства mSTK-012 были лучше, чем у IL-2 [47, 48].

При изучении модификаций интерлейкинов были разработаны ортогональные пары цитокин-рецептор IL-2 человека, обеспечивающие взаимодействие только между собой. Важно отметить, что эти пары не взаимодействуют со своими природными аналогами – цитокином IL-2 и рецептором IL-2. Введение orthoIL-2Rβ в суспензию Т-лимфоцитов позволило осуществить селективное воздействие orthoIL-2 на генетически модифицированные CD4+ и CD8+ Т-клетки как *in vitro*, так и *in vivo*. Этот подход может обеспечить снижение побочных эффектов и минимизировать токсичность по сравнению с каноничной формой IL-2 [49].

Следующим потенциальным кандидатом, модифицирующим противоопухолевую активность Т-лимфоцитов, является IL-12, провоспалительный цитокин, играющий важную роль в активации CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов и NK-клеток. Клиническое применение IL-12 сдерживается его высокой токсичностью. Согласно результатам доклинических

испытаний, токсичность IL-12 связана с активацией NK-клеток. Преодолеть эту проблему попытались с помощью частичного агониста IL-12 (STK-026), обладающего более низкой способностью к связыванию с β1-субъединицей рецептора интерлейкина-12 (IL-12Rb1). STK-026 воздействовал на активированные Т-лимфоциты, характеризующиеся повышенной экспрессией рецептора IL-12Rb1, в то время как NK-клетки или покоящиеся Т-лимфоциты с умеренными уровнями IL-12Rb1 не подвергались значимому влиянию STK-026 [50]. В настоящее время компания «Синтекин» проводит доклинические испытания STK-026, в которых, как полагают, будет продемонстрирована способность STK-026 активировать опухоль-инфильтрирующие CD8+ Т-клетки и миелоидные клетки, его противоопухолевая активность и фармакодинамика.

Одним из возможных решений проблемы эффективного получения культур ОИЛ и повышения их функциональности, как уже сказано, является генная модификация Т-лимфоцитов.

Недавно показали перспективность создания Т-лимфоцитов, несущих индуцируемый мембраносвязанный IL-12. Такие Т-лимфоциты обладали превосходной цитотоксической активностью *in vitro* с выраженной продукцией IFN-γ [51].

Компанией Obsidian Therapeutics в настоящий момент ведется многоцентровое клиническое исследование, в котором изучается возможность использования генно-модифицированных ОИЛ OBX-115, экспрессирующих мембраносвязанный IL-15 (mbIL15). Это позволяет избежать введения высоких доз IL-2 *in vivo*, снизить токсичность и расширить возможность применения ОИЛ у большего числа пациентов [52].

«Омоложение» опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов представляет собой еще одну интересную стратегию усиления их противоопухолевой активности с использованием методов генной инженерии. Этот подход позволяет «омолодить» ОИЛ, восстанавливая их первоначальную функциональность и потенциал, путем частичного репрограммирования с использованием транзиентной экспрессии набора транскрипционных факторов. «Омоложенные» ОИЛ сохраняют разнообразие своих Т-клеточных рецепторов (ТКР), что обеспечивает широкий спектр антигенной специфичности. Ключевые преимущества «омоложения» ОИЛ состоят в снижении эпигенетического возраста Т-лимфоцитов, повышении скорости экспансии, приобретении фенотипа, сходного с фенотипом стволовых клеток, и повышении секреции цитокинов при активации целевыми антигенами. Важно отметить, что положительные результаты получены не только с «омоложенными» ОИЛ, но и с «омоложенными» периферическими мононуклеарными клетками крови (ПМК), ТКР и CAR-Т-клетками, что указывает на широкую применимость технологии «омоложения» в иммунотерапии опухолей [51].

Последним из рассмотренных здесь направлений генной инженерии, направленных на оптимизацию ОИЛ-терапии, является разработка векторов для доставки генов для модификации опухоль-специфичных Т-лимфоцитов *in vivo*. Современные исследования в области создания вирусных векторов для *in vivo* доставки генов фокусируются на ограничении тропизма вируса к определенным маркерам Т-лимфоцитов, в частности к CD3, CD8, CD4, CD62L и CD5 [53–55]. Так, в опубликованной недавно в виде нерецензированного препринта работе изучали эффективность ретровирусов, нацеленных на комплекс пептид-MHC (pMHC), для доставки генов (в том числе интерлейкина-12) в антигенспецифичные Т-лимфоциты и их *in vivo* экспансии. Предварительные результаты, полученные в опытах на мышах, показывают эффективность вирусов, нацеленных на pMHC, как векторов для перепрограммирования и экспансии популяций опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов *in vivo*.

Таким образом, как можно судить по рассмотренным исследованиям, ведутся разнонаправленные работы по оптимизации производства Т-клеточных продуктов, что позволит расширить возможности их применения [56].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ В ПРОЦЕССЕ ПРОИЗВОДСТВА ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Упомянутая ранее криоконсервация ОИЛ является крайне желательной, а в некоторых случаях и необходимой процедурой как в производственном процессе, так и в случае возникновения потребности в повторной инфузии ОИЛ пациенту через некоторый промежуток времени. Под криоконсервацией понимают медленную заморозку (со скоростью 1°C/мин) клеточных продуктов в культуральной среде, содержащей криопротекторы, наиболее популярным из которых является ДМСО, и хранение таких криоконсервированных клеточных продуктов в жидком азоте до востребования. Однако криоконсервация негативно влияет на все клеточные продукты, в том числе и на ОИЛ, внося изменения в продукцию ими цитокинов, цитотоксическую активность, пролиферацию и выживаемость [17].

В то же время терапевтическая эффективность клеточных продуктов напрямую зависит от способности клеток восстанавливать жизнеспособность и функциональность после разморозки.

Несмотря на то, что принятые FDA на данный момент протоколы как ОИЛ-терапии [57], так и CAR-T-терапии [58] включают возможность использования не только свежих клеточных продуктов, но и вышедших из криоконсервации, продолжается изучение активности Т-клеточных продуктов, поскольку выживаемость и активность Т-лимфоцитов после разморозки далеки от 100%. Следует отметить, что, в отличие от CAR-T, количество антигенспецифичных Т-лимфоцитов в Т-клеточном продукте невелико и составляет от 0.1 до 9% [59], поэтому любое уменьшение количества живых клеток после цикла заморозки-разморозки может критично сказаться на качестве Т-клеточного продукта. В связи с новизной ОИЛ-терапии данных по влиянию криоконсервации на качество клеточных продуктов ОИЛ чрезвычайно мало. Существуют три одобренных патента, предметом которых является оптимизация процесса криоконсервации ОИЛ [60–62]. Криоконсервированные после этапа pre-REP ОИЛ использовали также для получения клеточного продукта в клиническом исследовании 1-й фазы NCT03215810 ОИЛ-терапии рака легкого [63]. Кроме того, как уже сказано, одобренный препарат лифилеуцел поставляется, согласно рекомендациям производителя, в криоконсервированном виде.

Если обратиться к данным по влиянию криоконсервации на CAR-T-терапию, применяющуюся в течение достаточно длительного времени, то результаты выглядят несколько разнородными. Так, по данным, представленным одними из производителей CAR-T-клеток, жизнеспособность после размораживания составила 47.2–68.9% [64]. В то же время согласно результатам другой научной группы средняя жизнеспособность ранее размороженной фракции CAR-T составила 97 ± 17.4%. Проанализировано 79 готовых инфузионных продуктов CAR-T-клеток, в которых CAR-T-клетки были экспансированы в среднем до 1×10^6 клеток на 1 кг массы тела (диапазон от 1×10^5 до 1×10^7 клеток/кг). Медианная продолжительность криоконсервации составила 9 дней (диапазон 1–408). Несмотря на высокую выживаемость, обнаружили, что в размороженных CAR-T увеличена экспрессия ранних маркеров апоптоза [65]. Еще одно исследование показало, что криоконсервация во время фазы экспансии не препятствует пролиферации клеток после разморозки. В 86% случаев CAR-T-клетки продолжали делиться [66]. Также в исследовании, изучающем стабильность криоконсервированных контролей CAR/TCR Т-клеток, показано, что криоконсервированные клетки стабильны в течение не менее 1 года, после размораживания. Через 12 месяцев жизнеспособность размороженных клеток составляла около 80% и оставалась стабильной как минимум в течение 6 ч после [67].

Изучение устойчивости лимфоцитов периферической крови к криоконсервации после масштабной экспансии в присутствии высоких доз IL-2 показало, что такие Т-лимфоциты теряют сразу после размораживания способность реагировать на неспецифическую стимуляцию фитогемагглютинином, однако их реактивность восстанавливается в течение 48 ч. Жизнеспособность клеток при этом остается высокой (> 80%), хотя при каждом новом раунде криоконсервации образцов наблюдается потеря около 10–15% клеток [68].

Сравнение с другими типами иммунных клеток показывает, что криоконсервацию плохо переносят также Treg- и NK-клетки. Спустя сутки после выхода из заморозки доля жизнеспособных NK-клеток уменьшается с 64–91% до 34% [69]. Такая же тенденция наблюдается для Treg: при выходе из заморозки доля живых клеток составляет 58–75%, а через 24 ч снижается до 20–48% [70].

В качестве возможного решения проблемы выживаемости Т-лимфоцитов после криоконсервации было предложено криоконсервировать непосредственно сами фрагменты опухоли [71–75]. В недавней работе по выделению опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов из замороженных фрагментов колоректального рака было показано, что эффективность получения культур ОИЛ из отдельных аликвот криоконсервированных частей одной и той же опухоли была схожа при разморозке и анализе, производимом в разные моменты времени, что указывает на достоверность полученных данных. Также отмечено сходное соотношение CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов в культурах ОИЛ, полученных как из замороженных, так и из свежих фрагментов [76]. Сравнение получения ОИЛ из образцов «свежей» и замороженной опухоли показало, что, несмотря на первоначально более быструю экспансию ОИЛ из свежей ткани, общее количество жизнеспособных клеток выравнивалось примерно через неделю культивирования [77]. В австралийском исследовании, в ходе которого свежие и криоконсервированные фрагменты меланомы, полученные от одних и тех же пациентов, транспортировали в течение 4 дней в лабораторию для дальнейшей экспансии ОИЛ, показано, что только из замороженных фрагментов можно получить культуры ОИЛ в 100% случаев [78]. Наряду с этим, в одном из патентов сообщается об отсутствии различий в фенотипе свежих ОИЛ и замороженными [59]. Таким образом, использование крио-

консервированных фрагментов опухолей является жизнеспособной стратегией, которая позволяет сохранять источник ОИЛ для последующей их экспансии, решает логистические задачи по передаче биоматериала из больницы, где была иссечена опухоль, в производственный центр, в том числе и удаленный. В то же время требуется стандартизация как криоконсервации уже прошедших экспансию ОИЛ, так и фрагментов опухолей, а также, возможно, новых криосред, которые будут способствовать улучшению выживаемости ОИЛ и более эффективному получению клеточного продукта на основе ОИЛ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммунотерапия с использованием опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов демонстрирует значительный потенциал в борьбе с различными видами рака. ОИЛ, обладающие уникальной специфичностью к опухолевым антигенам, могут эффективно уничтожать опухолевые клетки, особенно в случае меланомы, где данная терапия уже зарекомендовала себя.

Несмотря на многообещающие результаты, ОИЛ-терапия в настоящее время находится на ранних стадиях клинического развития. Существуют нерешенные вопросы, касающиеся эффективности этой терапии для различных типов опухолей, а также отсутствует единый стандарт протоколов получения, экспансии и криоконсервации ОИЛ. Для повышения эффективности терапии необходимо продолжать исследования, направленные на разработку унифицированных протоколов и оптимизацию процессов, касающихся всех нерешенных на данный момент вопросов.

Важен также поиск новых стратегий усиления противоопухолевого иммунного ответа, направленных на преодоление иммуносупрессивной среды микроокружения опухоли. Достижение этих целей обеспечит более широкое применение ОИЛ-терапии и улучшит прогноз для пациентов с различными видами рака. ●

Данная работа выполнена в рамках государственного задания «Т-клетки», номер государственного учета НИОКТР 123032900030-7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lee S., Margolin K. // Curr. Oncol. Rep. 2012. V. 14. № 5. P. 468–474. doi: 10.1007/s11912-012-0257-5.
2. Mitchison N.A. // J. Exp. Med. 1955. V. 102. № 2. P. 157–177. doi: 10.1084/jem.102.2.157.
3. Tang Y., Zhang A.X.J., Chen G., Wu Y., Gu W. // Mol. Ther. Oncolytics. 2021. V. 22. P. 410–430. doi: 10.1016/j.omto.2021.07.006.
4. Rosenberg S.A., Spiess P., Lafreniere R. // Science. 1986. V. 233. № 4770. P. 1318–1321. doi: 10.1126/science.3489291.
5. Rosenberg S.A., Packard B.S., Aebersold P.M., Solomon D., Topalian S.L., Toy S.T., Simon P., Lotze M.T., Yang J.C., Seipp C.A., et al. // New Engl. J. Med. 1988. V. 319. № 25. P. 1676–1680. doi: 10.4049/jimmunol.1490019.
6. Search for: TIL, Active, not recruiting studies | Card Results | ClinicalTrials.gov [Electronic resource]. URL: https://clinicaltrials.gov/search?intr=TIL&aggFilters=status:act (accessed: 13.11.2024).
7. Qiu X., Li S., Fan T., Zhang Y., Wang B., Zhang B., Zhang M., Zhang L. // Discover Oncol. 2024. V. 15. № 1. P. 1–18. doi: 10.1007/s12672-024-01410-5.
8. FDA grants accelerated approval to lifileucel for unresectable or metastatic melanoma | FDA [Electronic resource]. URL: https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-lifileucel-unresectable-or-metastatic-melanoma (accessed: 13.11.2024).
9. Matsueda S., Chen L., Li H., Yao H., Yu F. // Cancer Immunol. Immunother. 2024. V. 73. № 11. P. 1–20. doi: 10.1007/s00262-024-03793-4.
10. Zhao Y., Deng J., Rao S., Guo S., Shen J., Du F., Wu X., Chen Y., Li M., Chen M., et al. // Cancers. 2022. V. 14. № 17. P. 4160. doi: 10.3390/cancers14174160.
11. Wu R., Forget M.A., Chacon J., Bernatchez C., Haymaker C., Chen J.Q., Hwu P., Radvanyi L.G. // Cancer J. 2012. V. 18. № 2. P. 160–175. doi: 10.1097/PPO.0b013e31824d4465.
12. Dudley M.E., Wunderlich J.R., Shelton T.E., Even J., Rosenberg S.A. // J. Immunother. 2003. V. 26. № 4. P. 332–342. doi; 10.1097/00002371-200307000-00005.
13. Hall M.L., Liu H., Malafa M., Centeno B., Hodul P.J., Pimiento J., Pilon-Thomas S., Sarnaik A.A. // J. Immunother. Cancer. 2016. V. 4. № 1. P. 61. doi: 10.1186/s40425-016-0164-7.
14. Kongkaew T., Thaiwong R., Tudsamran S., Sae-jung T., Sengprasert P., Vasuratna A., Suppipat K., Reantragoon R. // J. Immunol. Methods. 2022. V. 503. P. 113229. doi: 10.3390/vaccines10030457.
15. Nijhuis E.W.P., v/d Wiel-van Kemenade E., Figdor C.G., van Lier R.A.W. // Cancer Immunol. Immunother. 1990. V. 32. № 4. P. 245–250. doi: 10.1007/BF01741708.
16. Flens M.J., Mulder W.M.C., Bril H., von Blomberg van de Flier M.B.E., Scheper R.J., van Lier R.A.W. // Cancer Immunol. Immunother. 1993. V. 37. № 5. P. 323–328. doi: 10.1007/BF01518455.
17. Wickström S., Lövgren T. // Meth. Mol. Biol. 2019. V. 1913. P. 105–118. doi: 10.1007/978-1-4939-8979-9_7.
18. Poch M., Hall M., Joerger A., Kodumudi K., Beatty M., Innamarato P.P., Bunch B.L., Fishman M.N., Zhang J., Sexton W.J., et al. // Oncoimmunology. 2018. V. 7. № 9. doi: 10.1080/2162402X.2018.1476816.
19. Poschke I.C., Hassel J.C., Rodriguez-Ehrenfried A., Lindner K.A.M., Heras-Murillo I., Appel L.M., Lehmann J., Lovgren T., Wickstrom S.L., Lauenstein C., et al. // Clin. Cancer Res. 2020. V. 26. № 16. P. 4289–4301. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3845.
20. Rohaan M.W., van den Berg J.H., Kvistborg P., Haanen J.B.A.G. // J. Immunother. Cancer. 2018. V. 6. № 1. P. 102. doi: 10.1186/s40425-018-0391-1.
21. Turcotte S., Gros A., Hogan K., Tran E., Hinrichs C.S., Wunderlich J.R., Dudley M.E., Rosenberg S.A. // J. Immu-

nol. 2013. V. 191. № 5. P. 2217–2225. doi: 10.4049/jimmunol.1300538.
22. Levine B.L., Miskin J., Wonnacott K., Keir C. // Mol. Ther. Methods Clin. Dev. 2017. V. 4. P. 92–101. doi: 10.1016/j.omtm.2016.12.006.
23. Ghorashian S., Kramer A.M., Onuoha S., Wright G., Bartram J., Richardson R., Albon S.J., Casanovas-Company J., Castro F., Popova B., et al. // Nat. Med. 2019. V. 25. № 9. P. 1408–1414. doi: 10.1038/s41591-019-0549-5.
24. Zacharakis N., Huq L.M., Seitter S.J., Kim S.P., Gartner J.J., Sindiri S., Hill V.K., Li Y.F., Paria B.C., Ray S., et al. // J. Clin. Oncol. 2022. V. 40. № 16. P. 1741–1754. doi: 10.1200/JCO.21.02170.
25. Beatty M., Rodriguez-Valentin M., Hall M., Khambati F., Hall A., Pikor L., Langer T.J., Sennino B., Teer J., Fleming J., et al. // J. Immunother. Cancer. 2023. V. 11. № Suppl 1. P. A395–A395. doi: 10.1136/jitc-2023-SITC2023.0346.
26. Albrecht H.C., Gustavus D., Schwanemann J., Dammermann W., Lippek F., Weylandt K.H., Hoffmeister H., Gretschel S. // Cytotherapy. 2023. V. 25. № 5. P. 537–547. doi: 10.1016/j.jcyt.2023.01.009.
27. Gezgin G., Visser M., Ruano D., Santegoets S.J., de Miranda N.F.C.C., van der Velden P.A., Luyten G.P.M., van der Burg S.H., Verdegaal E.M., Jager M.J. // Ophthalmol. Sci. 2022. V. 2. № 2. P. 100132. doi: 10.3390/biomedicines12081758.
28. Mullinax J.E., Hall M., Beatty M., Weber A.M., Sannasardo Z., Svrdlin T., Hensel J., Bui M., Richards A., Gonzalez R.J., et al. // J. Immunother. 2021. V. 44. № 2. P. 63–70. doi: 10.1097/CJI.0000000000000355.
29. Choi S., Hossain M., Lee H., Baek J., Park H.S., Lim C.L., Han D.Y., Park T., Kim J.H., Gong G., et al. // Cancer Immunol. Immunother. 2024. V. 73. № 6. P. 1–14. doi: 10.1007/s00262-024-03691-9.
30. Schoenfeld A.J., Lee S.M., Doger de Spéville B., Gettinger S.N., Häfliger S., Sukari A., Papa S., Rodríguez-Moreno J.F., Graf Finckenstein F., Fiaz R., et al. // Cancer Discov. 2024. V. 14. № 8. P. 1389–1402. doi: 10.1158/2159-8290.CD-23-1334.
31. Kverneland A.H., Chamberlain C.A., Borch T.H., Nielsen M., Mørk S.K., Kjeldsen J.W., Lorentzen C.L., Jørgensen L.P., Riis L.B., Yde C.W., et al. // J. Immunother. Cancer. 2021. V. 9. № 10. P. e003499. doi: 10.1136/jitc-2021-003499
32. Baek J., Lee H., Gong G., Lim C.-L., Lee H.J. // J. Immunother. Cancer. 2022. V. 10. № Suppl 2. P. A209–A209. doi: 10.1136/jitc-2022-SITC2022.0196.
33. Tavera R.J., Forget M.A., Kim Y.U., Sakellariou-Thompson D., Creasy C.A., Bhatta A., Fulbright O.J., Ramachandran R., Thorsen S.T., Flores E., et al. // J. Immunother. 2018. V. 41. № 9. P. 399–405. См. ссылку 39 doi: 10.1097/CJI.0000000000000230.
34. Yusubalieva G.M., Maratovna Y.G., Petrichuk S.V., Valentinivna P.C., Krivoshapkin A.L., Leonidovich K.A., Kedrova A.G., Genrihovna K.A., Ivanov Yu.V., Viktorovich I.Y., et al. // Клиническая практика. 2020. V. 11. № 1. P. 49–58. doi: 10.17816/clinpract33974.
35. Hernandez-Chacon J.A., Li Y., Wu R.C., Bernatchez C., Wang Y., Weber J.S., Hwu P., Radvanyi L.G. // J. Immunother. 2011. V. 34. № 3. P. 236–250. doi: 10.1097/CJI.0b013e318209e7ec.
36. Chacon J.A., Sarnaik A.A., Chen J.Q., Creasy C., Kale C., Robinson J., Weber J., Hwu P., Pilon-Thomas S., Radvanyi L. // Clin. Cancer Res. 2015. V. 21. № 3. P. 611–621. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1934.
37. Shah P., Forget M.A., Frank M.L., Jiang P., Sakellariou-Thompson D., Federico L., Khairullah R., Neutzler C.A., Wistuba I., Chow C.W.B., et al. // J. Immunother. Cancer. 2022. V. 10. № 2. P. e003082. doi: 10.1136/jitc-2021-003082.
38. Bonavita E., Bromley C.P., Jonsson G., Pelly V.S., Sahoo S., Walwyn-Brown K., Mensurado S., Moeini A., Flanagan E., Bell C.R., et al. // Immunity. 2020. V. 53. № 6. P. 1215–1229.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2020.10.020.
39. Morotti M., Grimm A.J., Hope H.C., Arnaud M., Desbuisson M., Rayroux N., Barras D., Masid M., Murgues B., Chap B.S., et al. // Nature. 2024. V. 629. № 8011. P. 426–434. doi: 10.1038/s41586-024-07352-w.
40. Golubovskaya V., Wu L. // Cancers. 2016. V. 8. № 3. P. 36. doi: 10.3390/cancers8030036 36.
41. Gust J., Ponce R., Liles W.C., Garden G.A., Turtle C.J. // Front. Immunol. 2020. V. 11. P. 577027. doi: 10.3389/fimmu.2020.577027.
42. Quintarelli C., Orlando D., Boffa I., Guercio M., Polito V.A., Petretto A., Lavarello C., Sinibaldi M., Weber G., Del Bufalo F., et al. // Oncoimmunology. 2018. V. 7. № 6. P. e1433518. doi: 10.1080/2162402X.2018.1433518.
43. Zhou J., Jin L., Wang F., Zhang Y., Liu B., Zhao T. // Protein Cell. 2019. V. 10. № 10. P. 764–769. doi: 10.1007/s13238-019-0643-y.
44. Simpson-Abelson M.R., Mosychuk C., Frank I., Ritthipichai K., Chartier C. // J. Immunotherapy Cancer. 2017. V. 5. Suppl. 2. P. 87. doi: 10.1186/s40425-017-0288-4.
45. Qiu C., Wang J., Zhu L., Cheng X., Xia B., Jin Y., Qin R., Zhang L.X., Hu H., Yan J., et al. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2022. V. 10. P. 1027619. doi: 10.3389/fbioe.2022.1027619
46. Ni J., Griffiths T., Forget M.-A., Sakellariou-Thompson D., Bernatchez C. // Summer Experience. 2021. V. 3. P. 57. doi.org/10.52519/00004 https://doi.org/10.52519/00004
47. https://www.synthekine.com/news/synthekine-presents-positive-initial-results-from-phase-1a-1b-clinical-trial-of-%CE%B1-%CE%B2-biased-il-2-stk-012-for-treatment-of-advanced-solid-tumors/. (Accessed November 14, 2024)
48. Izar B., Zamarin D., Spigel D.R., Hoimes C.J., McDermott D.F., Sehgal K., Najjar Y.G., Schoenfeld A.J., Garon E.B., Sullivan R.J., et al. // Cancer Res. 2024. V. 84. № 7_Supplement. P. CT183–CT183. doi: 10.1158/1538-7445.AM2024-CT183
49. Sockolosky J.T., Trotta E., Parisi G., Picton L., Su L.L., Le A.C., Chhabra A., Silveria S.L., George B.M., King I.C., et al. // Science. 2018. V. 359. № 6379. P. 1037–1042. doi:10.1126/science.aar3246.
50. Koliesnik Z., Totagrande M., Burgess R., Tran K.Q., Bauer M., Jayaraman B., Buffone C., Balasubrahmanyam P., Emmerich J., Chaturvedi D., et al. // J. Immunother. Cancer. 2023. V. 11. Suppl 1. P. A1160–A1160. https://jitc.bmj.com/content/11/Suppl_1/A1160
51. Vizcardo R., Huang Y., Fioravanti J., Maeda T., Tamaoki N., Yamazaki Y., Kutlu B., Bahl K., Wang B., Zhong Z., et al. // Cancer Res. 2024. V. 84. № 6_Suppl. P. 6593–6593. doi: 10.1158/1538-7445.AM2024-6593
52. Schoenfeld A.J., Betof Warner A., Chesney J.A., Thomas S.S., Hamid O., In G.K., Shoushtari A.N., Samhouri Y., Hari P.N., Ramsingh G., et al. // J. Clin. Oncol. 2024. V. 42. № 16_suppl. P. TPS9599–TPS9599. doi: 10.1200/JCO.2024.42.16_suppl.TPS959.
53. Agarwal S., Hanauer J.D.S., Frank A.M., Riechert V., Thalheimer F.B., Buchholz C.J. // Mol. Ther. 2020. V. 28. № 8. P. 1783–1794. doi: 10.1016/j.ymthe.2020.05.005
54. Strebinger D., Frangieh C.J., Friedrich M.J., Faure G., Macrae R.K., Zhang F. // Nat. Commun. 2023. V. 14. № 1. P. 1–18. doi: 10.1038/s41467-023-40788-8.
55. Hamilton J.R., Chen E., Perez B.S., Sandoval Espinoza C.R., Kang M.H., Trinidad M., Ngo W., Doudna J.A. // Nat. Biotechnol. 2024. V. 42. № 11. P. 1684–1692. doi: 10.1038/s41587-

023-02085-z.
56. Xu E.J.K., Smith B.E., Alberto W.D.C., Walsh M.J., Lim B., Hoffman M.T., Qiang L., Dong J., Garmilla A., Zhao Q.H., et al. // bioRxiv [Preprint]. 2024. 2024.09.18.613594. doi: 10.1101/2024.09.18.613594
57. https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/approved-blood-products/amtagvi. (Accessed December 17, 2024)
58. https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/kymriah. (Accessed December 17, 2024)
59. Lowery F.J., Krishna S., Yossef R., Parikh N.B., Chatani P.D., Zacharakis N., Parkhurst M.R., Levin N., Sindiri S., Sachs A., et al. // Science. 2022. V. 375. № 6583. P. 877–884. doi: 10.1126/science.abl5447.
60. Ryan GuestJoanne McCaffrey; WO2021123832A1; United States; Devices and methods for isolating tumor infiltrating lymphocytes and uses thereof; C12N5/0636; awaiting approval
61. Ian FRANKMichael T. Lotze. WO2018081473A1; United States; Restimulation of cryopreserved tumor infiltrating lymphocytes, A61K35/17; awaiting approval.
62. Ian FrankMichael T. Lotze. Patent; US10517894B2. United States;. Restimulation of cryopreserved tumor infiltrating lymphocytes; A61K35/17; 2019.
63. Creelan B.C., Wang C., Teer J.K., Toloza E.M., Yao J., Kim S., Landin A.M., Mullinax J.E., Saller J.J., Saltos A.N., et al. // Nat. Med. 2021. V. 27. № 8. P. 1410. doi: 10.1038/s41591-021-01462-y.
64. Hanley P.J. // Mol. Ther. 2019. V. 27. № 7. P. 1213–1214. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.06.001.
65. Panch S.R., Srivastava S.K., Elavia N., McManus A., Liu S., Jin P., Highfill S.L., Li X., Dagur P., Kochenderfer J.N., et al. // Mol. Ther. 2019. V. 27. № 7. P. 1275–1285. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.05.015.
66. Brezinger-Dayan K., Itzhaki O., Melnichenko J., Kubi A., Zeltzer L.A., Jacoby E., Avigdor A., Shapira Frommer R., Besser M.J. // Front. Oncol. 2022. V. 12. P. 1024362. doi: 10.3389/fonc.2022.1024362.
67. Cai Y., Prochazkova M., Jiang C., Song H.W., Jin J., Moses L., Gkitsas N., Somerville R.P., Highfill S.L., Panch S., et al. // J. Transl. Med. 2021. V. 19. № 1. P. 1–14. doi: 10.1186/s12967-021-03193-7.
68. Sadeghi A., Ullenhag G., Wagenius G., Tötterman T.H., Eriksson F. // Acta Oncol. (Madr.). 2013. V. 52. № 5. P. 978–986. doi: 10.3109/0284186X.2012.737020.
69. Saultz J.N., Otegbeye F. // Front. Immunol. 2023. V. 14. P. 1304689. doi: 10.3389/fimmu.2023.1304689.
70. Kaiser D., Otto N.M., McCallion O., Hoffmann H., Zarrinrad G., Stein M., Beier C., Matz I., Herschel M., Hester J., et al. // Front. Cell. Dev. Biol. 2021. V. 9. P. 750286. doi: 10.3389/fcell.2021.750286.
71. Kuznetsova D., Petrova T., Sharova E., Astrelina T., Varlamova S., Lazarev V. // Ann. Oncol. 2024. V. 35. P. S226. doi: 10.1016/j.annonc.2024.08.047.
72. Poschke I.C., Hassel J.C., Rodriguez-Ehrenfried A., Lindner K.A.M., Heras-Murillo I., Appel L.M., Lehmann J., Lovgren T., Wickstrom S.L., Lauenstein C., et al. // Clin. Cancer Res. 2020. V. 26. № 16. P. 4289–4301. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3845.
73. Donlin L.T., Rao D.A., Wei K., Slowikowski K., McGeachy M.J., Turner J.D., Meednu N., Mizoguchi F., Gutierrez-Arcelus M., Lieb D.J., et al. // Arthritis Res. Ther. 2018. V. 20. № 1. P. 1–15. doi: 10.1186/s13075-018-1631-y.
74. Crookes H., McCaffrey J., Hawkins R., Guest R. // Cytotherapy. 2020. V. 22. № 5. P. S142. doi: 10.1016/j.jcyt.2020.03.284.
75. Kobayashi T., Kumagai S., Doi R., Afonina E., Koyama S., Nishikawa H. // STAR Protoc. 2022. V. 3. № 3. P. 101557. doi: 10.1016/j.xpro.2022.101557.
76. Liang F., Rezapour A., Falk P., Angenete E., Yrlid U. // Cancers (Basel). 2021. V. 13. № 10. P. 2428. doi: 10.3390/cancers13102428.
77. Anand Veerapathran Kenneth ONIMUS; WO2020061429A1; WIPO (PCT); Expansion of tils from cryopreserved tumor samples; A01N1/0221; 2019.
78. Onimus K., Wells A., Herman C., Tawashi A., Long G.V., Scolyer R.A., Velickovic R., Saw R.P., Pennington T.E., Menzies A.M., et al. // Transplant. Cell. Ther. 2022. V. 28. № 3. P. S226–S227. doi: 10.1016/S2666-6367(22)00447-X