



(51) МПК  
*A61K 35/17* (2015.01)  
*C07K 14/47* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

*A61K 35/17 (2023.01); C07K 14/4703 (2023.01); C07K 14/4747 (2023.01); C07K 16/2803 (2023.01); C07K 16/2896 (2023.01); A61P 35/00 (2023.01)*

(21)(22) Заявка: 2022115338, 06.06.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
06.06.2022

Дата регистрации:  
07.04.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 06.06.2022

(45) Опубликовано: 07.04.2023 Бюл. № 10

Адрес для переписки:

634028, г. Томск, пр. Ленина, 3, НИИФиРМ  
 им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ,  
 патентоведу Малюгиной Н.Л.

(72) Автор(ы):

Скурихин Евгений Германович (RU),  
 Першина Ольга Викторовна (RU),  
 Ермакова Наталия Николаевна (RU),  
 Пахомова Ангелина Владимировна (RU),  
 Жукова Мария Андреевна (RU),  
 Пан Эдгар Сергеевич (RU),  
 Сандрикина Любовь Александровна (RU),  
 Дыгай Александр Михайлович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
 научное учреждение "Томский национальный  
 исследовательский медицинский центр"  
 Российской академии наук ("Томский  
 НИМЦ") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
 о поиске: WO2014195852 A1, 11.12.2014.  
 RU2521506 C1, 27.06.2014. VERMA V. et al.  
 MEK inhibition reprograms CD8+ T lymphocytes  
 into memory stem cells with potent antitumor  
 effects. Nat Immunol. 2021. Vol. 22. No. 1. Pp. 53-  
 66. WO2021025177 A1, 11.02.2021.

(54) Способ усиления противоопухолевого Т-клеточного иммунитета при раке легкого

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к иммунологии и клеточной биотехнологии, в частности к способу усиления противоопухолевого Т-клеточного иммунитета при раке легкого. Изобретение позволяет подавить рост опухоли легкого за счет

повышения специфичной цитотоксичности и устойчивости к действию опухолевых клеток CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, индуцированных метаболическим репрограммированием. 3 ил., 6 табл., 2 пр.

RU 2 793 914 C1

RU 2 793 914 C1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A61K 35/17* (2015.01)  
*C07K 14/47* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*A61K 35/17 (2023.01); C07K 14/4703 (2023.01); C07K 14/4747 (2023.01); C07K 16/2803 (2023.01); C07K 16/2896 (2023.01); A61P 35/00 (2023.01)*

(21)(22) Application: **2022115338, 06.06.2022**

(24) Effective date for property rights:  
**06.06.2022**

Registration date:  
**07.04.2023**

Priority:

(22) Date of filing: **06.06.2022**

(45) Date of publication: **07.04.2023** Bull. № 10

Mail address:

**634028, g. Tomsk, pr. Lenina, 3, NIIFiRM im. E.D. Goldberga, Tomskij NIMTS, patentovedu Malyuginoj N.L.**

(72) Inventor(s):

**Skurikhin Evgenij Germanovich (RU),  
Persina Olga Viktorovna (RU),  
Ermakova Nataliya Nikolaevna (RU),  
Pakhomova Angelina Vladimirovna (RU),  
Zhukova Mariya Andreevna (RU),  
Pan Edgar Sergeevich (RU),  
Sandrikina Lyubov Aleksandrovna (RU),  
Dygaj Aleksandr Mikhajlovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe nauchnoe uchrezhdenie "Tomskij natsionalnyj issledovatel'skij meditsinskij tsentr" Rossijskoj akademii nauk ("Tomskij NIMTS") (RU)**

(54) **METHOD FOR ENHANCING ANTITUMOR T-CELL IMMUNITY IN LUNG CANCER PATIENTS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; immunology; cellular biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates in particular to a method for enhancing antitumor T-cell immunity in lung cancer.

EFFECT: invention makes it possible to suppress

the growth of a lung tumour by increasing specific cytotoxicity and resistance to the action of CD8<sup>+</sup> T-lymphocyte tumour cells induced by metabolic reprogramming.

1 cl, 3 dwg, 6 tbl, 2 ex

**RU 2 793 914 C1**

**RU 2 793 914 C1**

Изобретение относится к медицине, а именно к иммунологии и онкологии, клеточным биотехнологиям, способам усиления противоопухолевого Т-клеточного иммунитета при раке легкого.

Одна из важнейших функций иммунной системы заключается в том числе, в  
5 уничтожении опухолевых клеток. Несмотря на то, что каждый тип опухолей имеет существенные особенности развития, в патогенезе многих, особенно злокачественных видов опухолей, отмечен такой общий механизм развития и прогрессии как подавление  
10 противоопухолевой активности иммунной системы. В частности, под влиянием опухоли и опухолевого микроокружения снижается функциональная активность и количество Т-лимфоцитов. Так, у больных раком легкого количество и пролиферативная активность CD8+ Т-лимфоцитов обычно снижены по сравнению со здоровыми людьми [Sathaliyawala T., et al., 2013]. В этой связи, повышение уровня CD8<sup>+</sup> Т-клеток после лечения  
15 рассматривается как потенциальный предиктор лучшей выживаемости у пациентов с раком легкого [Liu Q. et al., 2021]. Кроме того, у CD8 Т-лимфоцитов при взаимодействии с опухолью снижается активность метаболических путей, и они приобретают гипореактивные фенотипы, которые не могут быть восстановлены простой стимуляцией [Speiser D.E. et al., 2016].

Итак, истощение эффекторных Т-лимфоцитов с одновременным снижением их  
20 цитостатической активности лежит в основе снижения противоопухолевого иммунного ответа при раке легкого. Для повышения его эффективности необходима разработка подходов, которые могут преодолеть ограничения, возникающие у Т-лимфоцитов.

Адекватного прототипа в проанализируемой нами литературе не обнаружено.

Новый технический результат - повышение противоопухолевого иммунитета и  
25 подавление роста опухоли легкого за счет увеличения специфичной цитотоксичности и устойчивости к действию опухолевых клеток CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, индуцированных метаболическим репрограммированием.

Для достижения нового технического результата в способе усиления  
30 противоопухолевого Т-клеточного иммунитета при раке легкого, реципиенту внутривенно вводят репрограммированные CD8 позитивные Т-лимфоциты, которые готовят *in vitro* следующим образом: к наивным CD8 позитивным Т-лимфоцитам в концентрации  $1 \times 10^8$ /мл добавляют ингибитор протеинкиназ MEK дозе 1  $\mu$ M совместно с 50 мкл антигенпрезентирующей смеси, полученной на основе лизата опухолевых  
35 клеток, культивируют в течение 48 часов, далее добавляют ингибитор контрольных точек PD1 в концентрации 10 мкг/мл и культивируют в течение 2 часов.

Новым в предлагаемом изобретении является то, что предварительно до  
внутривенного введения проводят *in vitro* репрограммирование популяции наивных CD8 позитивных Т-лимфоцитов, для этого к культуре наивных CD8 позитивных Т-  
40 лимфоцитов с концентрацией  $1 \times 10^8$  /мл добавляют смесь ингибитора протеинкиназ MEK в дозе 1  $\mu$ M и 50 мкл антигенпрезентирующей смеси, полученной на основе лизата опухолевых клеток, культивируют в течение 48 часов, далее CD8 позитивные Т-лимфоциты культивируют с ингибитором контрольных точек PD1 в концентрации 10 мкг/мл в течение 2 часов.

Отличительные признаки проявили в заявляемой совокупности новые свойства  
45 явным образом не вытекающие из уровня техники в данной области и неочевидные для специалиста.

Идентичной совокупности признаков не обнаружено в проанализированной патентной и научно-медицинской литературе. Способ апробирования в

экспериментальной практике.

Использование предлагаемого способа позволило обеспечить более высокую устойчивость формирующегося фенотипа CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов к цитотоксическому действию самой опухоли и целевую элиминацию опухолевых клеток.

Исходя из вышеизложенного, заявляемое изобретение соответствует критериям патентоспособности изобретения «Новизна» и «Изобретательский уровень» и «Промышленная применимость».

Рак легкого является вторым наиболее распространенным видом рака и основной причиной смертности от рака во всем мире: в 2020 году было диагностировано 2,2 миллиона новых случаев и 1,8 миллиона случаев смерти [Петрова Г.В. и др., 2019]. Высокая смертность онкологических больных обусловлена невосприимчивостью метастатических опухолевых клеток, в том числе популяции стволовых опухолевых клеток, к современным методам лечения. Поэтому необходимы новые методы лечения больных раком легкого, чтобы снизить смертность и улучшить качество их жизни.

Известно, что опухоли содержат небольшую субпопуляцию стволовых опухолевых клеток, которые поддерживают первичные опухоли и метастазы [Hochmair M., et al., 2020]. Обычная химиотерапия уничтожает большую часть опухолевых клеток, но стволовые опухолевые клетки выживают и восстанавливают опухоль, а также они ответственны за метастазы [Hochmair, M, et al., 2020]. Таким образом, возможно терапевтическое влияние на стволовые опухолевые клетки в сочетании со стандартной химиотерапией может улучшить исходы у онкологических больных и обеспечить долгосрочный ответ. Стволовые опухолевые клетки были идентифицированы в большинстве солидных опухолей. Для большинства солидных опухолей в качестве селективных маркеров была предложена экспрессия CD44, CD117, EGR, Ax1, Sox2 [Hochmair M., et al., 2020].

Популяция CD8 Т-лимфоцитов является неоднородной и состоит из популяций клеток, различающихся по продолжительности жизни, функциям и анатомическому расположению. Популяции CD8 Т-лимфоцитов различают по экспрессии поверхностных маркеров, в частности, CCR7 [Sallusto F. et al., 2004]. CD8 Т-лимфоциты, относящиеся к клеткам «центральной» Т-памяти, характеризуются повышенной экспрессией CCR7 и продукцией большого количества IL-2, устойчивым пролиферативным ответом на вторичную инфекцию, большей способностью к самообновлению и гомеостатической пролиферации (базальная пролиферация) по сравнению с клетками «эффекторной» Т-памяти [Jung Y.W. et al., 2016].

Ингибирование MEK (mitogen-activated protein kinase/митоген-активируемая протеинкиназа) представляет собой фармакологически осуществимый метод, который можно использовать для улучшения различных иммунных терапевтических подходов, включая комбинацию с праймирующими агентами, иммуномодуляторами или повышение эффективности клеточной терапии. Ингибирование пути MEKi (mitogen-activated protein kinase inhibition/ингибирование митоген-активируемой протеинкиназы) одобрено Федеральным управлением по лекарственным средствам США и используются для лечения рака (NCT02407405) [Verma, V., et al. 2021]. Признается, однако, недостаточная специфичность и частые побочные эффекты, наблюдаемые после системного введения ингибитора MEK [Herrick W.G., et al., 2021].

Одним из представителей препаратов ингибиторов контрольных точек PD1 является ниволумаб, который представляет собой иммуноглобулин G4 (IgG4) с молекулярной массой 146 кДа, он блокирует взаимодействие между рецептором программированной смерти (PD-1) и его лигандами (PD-L1 и PD-L2). PD-1 рецептор является негативным

регулятором активности Т-лимфоцитов. Связывание PD-1 с лигандами PD-L1 и PD-L2, которые экспрессируют клетки опухоли или клетки микроокружения опухоли, приводит к ингибированию пролиферации Т-лимфоцитов и секреции цитокинов. Для повышения противоопухолевой активности Т-клеток нами предложено использовать

5 моноклональные антитела к PD1 рецептору.

Способ может быть использован для создания популяции репрограммированных CD8 позитивных Т-лимфоцитов, обладающих противоопухолевой и антиметастатической активностью. Исходя из вышеизложенного, заявляемое изобретение соответствует критериям патентоспособности изобретения «Новизна» и «Изобретательский уровень»

10 и «Промышленная применимость».

Предлагаемый способ был изучен в экспериментах на 8-10 недельных мышах линии C57BL/6 в количестве 100 штук. Животные первой категории, инбредные мыши, получены из питомника отдела экспериментального биомедицинского моделирования НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ РАН. Содержание животных и

15 дизайн экспериментов были одобрены биоэтическим комитетом НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ.

Изобретение будет понятно из следующего описания и приложенных к нему фигур 1, 2, 3 Приложения.

На фигуре 1 изображены Т-лимфоциты, полученные с использованием клеточного мультиридера Cyation 5 и окрашенных: Hoechst (синий) для идентификации ядер клеток;

20 CD8 FITC (зеленый) для идентификации CD8+ лимфоцитов; CCR7 AF555 (красный); (Hoechst+CD8+CCR7) составное изображение с использованием всех трех цветов.

Определение процента клеток CD8+CCR7+ производят по отношению клеток, подсчитанных по зеленому и красному каналам, к общему количеству клеток,

25 подсчитанных по синему (DAPI) каналу. Все масштабные линейки имеют размер 1000 мкм. Увеличение  $\times 4$ .

На фигуре 2 изображены наивные (А) и репрограммированные (Б) CD8+ Т-лимфоциты костного мозга (CD8 КМ) и селезенки (CD8 С) в культуре клеток карциномы легкого Льюис (LLC) в соотношении 2,5:1, окрашенных: Hoechst (синий) для идентификации

30 ядер клеток; CD8<sup>+</sup> CFSE (зеленый) для идентификации CD8+ Т-лимфоцитов; 7AAD (красный); (Hoechst+CFSE+7AAD) составное изображение с использованием всех трех цветов. Определение процента погибших Т-клеток Hoechst+CFSE+производят по отношению клеток, подсчитанных в синем и зеленом каналах, к общему количеству клеток. Все масштабные линейки имеют размер 1000 мкм. Увеличение  $\times 4$ .

На фигуре 3 изображена гистологическая картина легкого мыши интактного контроля (А, Д), мышцы с карциномой легкого Льюис (Б, Е), мышцы с карциномой легкого Льюис, леченные репрограммированными CD8+ Т-лимфоцитами, изолированными из костного мозга мышей-доноров (В, Ж) и мышцы с карциномой легкого Льюис, леченные CD8 репрограммированными Т-лимфоцитами, изолированными из селезенки мышей-

40 доноров (Г, З). Окраска гематоксилином и эозином, ув.  $\times 100$  (А, Б, В, Г) и  $\times 400$  (Д, Е, Ж, З). Окраска гематоксилином и эозином, ув.  $\times 100$ . Препараты изготовлены на 7-е сутки эксперимента.

Способ осуществляют следующим образом:

45 Проводят репрограммирование CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, выделенных из костного мозга. Для подтверждения полученного результата проводят анализ стабильности экспрессии маркера CCR7 на CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитах в культуре Т-лимфоцитов *in vitro*. Исследуют выживаемость и цитотоксическую активность репрограммированных CD8<sup>+</sup> Т-

лимфоцитов в культуре клеток карциномы легкого Льюис *in vitro*. Наконец, *in vivo* оценивают противоопухолевую и антиметастатическую активности репрограммированных CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов.

Для достижения наиболее оптимального результата более выраженной цитотоксичности и повышения выживаемости репрограммированных Т-лимфоцитов используют предварительную подготовку лимфоцитов для репрограммирования.

Для получения мононуклеаров костный мозг выделяют из бедренной кости мыши 0,5 мл препаровочной среды, следующего состава: 95% RPMI-1640, 5% эмбриональной телячьей сыворотки, ресуспендируют. Полученную суспензию наслаивают на градиент плотности HISTOPAQUE-1077 («Sigma», США) в соотношении суспензия-градиент 2:1 и центрифугируют в течение 25 минут при 1500 об/мин. Клетки интерфазного кольца собирают и разбавляют 5-кратным объемом фосфатного буфера Хэнкса с 2% инактивированной эмбриональной телячьей сывороткой и дважды отмывают центрифугированием при 1500 об/мин в течение 7-10 мин.

Для выделения мононуклеаров из селезенки, предварительно селезенку выделяют из брюшной полости мыши, помещают в чашку Петри диаметром 90 мм с фосфатным буфером Хэнкса («Sigma», США) и измельчают, используя одноразовые скальпели, до получения однородной клеточной взвеси. Полученную клеточную взвесь собирают в центрифужные пробирки и фильтруют через нейлоновый фильтр диаметром 70 мкм для удаления стромы и крупных агрегатов. После центрифугирования взвеси клеток в течение 10 мин при 1500 об/мин надосадочную жидкость сливают. Осадок клеток осторожно ресуспендируют, используя 2 мл холодной среды следующего состава: 90% DMEM-LG («Sigma», США), 10% инактивированной эмбриональной телячьей сывороткой («Sigma», США), 2 мМ L-глутамина («Sigma», США), раствора антибиотиков (пенициллин/стрептомицин 100 Ед/мл и 100 мкг/мл («Sigma», США)). Полученный аспират переносят в пробирку с равным объемом фосфатного буфера Хэнкса с 2%, инактивированной эмбриональной телячьей сывороткой и далее наслаивают на градиент плотности Histopaque-1077 («Sigma», США) в соотношении суспензия-градиент 2:1, после чего центрифугируют в течение 25 минут при 1500 об/мин. Клетки интерфазного кольца собирают и разбавляют 5-кратным объемом фосфатного буфера Хэнкса с 2% инактивированной эмбриональной телячьей сывороткой и дважды отмывают центрифугированием при 1500 об/мин в течение 7-10 мин. Количество мононуклеаров подсчитывают в камере Горяева

Проводят обогащение клеточной суспензии, полученной из мононуклеаров костного мозга или селезенки, Т-лимфоцитами заданного иммунофенотипа, используя магнитную сепарацию. Обогащение проводят по стандартному протоколу с использованием набора для мышей (EasySep™ Mouse Naïve CD8<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit) в соответствии с инструкцией производителя (Stemcell Technologies, Ванкувер, Канада). В результате популяция мононуклеаров костного мозга или селезенки обогащается наивными CD8 позитивными Т-лимфоцитами (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>). Далее клеточную суспензию, обогащенную наивными CD8 позитивными Т-лимфоцитами, инкубируют в течение 2-3 ч в рекомендуемой для Т-лимфоцитов среде, содержащей: раствор фосфатно-солевого буфера, 2% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки и 1 мМ EDTA без Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> и биотина, при температуре 37°С и 5% CO<sub>2</sub>. По окончании культивирования проводится оценка количества CD8 позитивных Т-лимфоцитов и оценка чистоты полученной субпопуляции на проточном цитофлюориметре FACS Canto II (BD Biosciences, США).

Для активации Т-лимфоцитов готовят антигенпрезентирующую смесь, представляющую собой лизат опухолевых клеток (смесь опухолевых антигенов). Лизат опухолевых клеток карциномы легкого Льюис получают с использованием цикла замораживания-оттаивания в 0,85% растворе NaCl. Цикл повторяют пять раз в быстрой последовательности, от -70°C до 37°C, а затем повторно замораживают и хранят при -70°C до использования [Dong V. et al., 2014]. Для усиления иммунного ответа в лизат опухолевых клеток добавляют адъювант. Адъювант для антигенпрезентирующей смеси готовят по стандартному протоколу производителя, в нашем случае это полный адъювант Фрейнда («Sigma», США). Раствор адъюванта Фрейнда смешивают с лизатом опухолевых клеток ( $3 \times 10^4$ /мл) в соотношении 1:1 с образованием густой эмульсии.

Для репрограммирования CD8 позитивных Т-лимфоцитов во флакон с Т-лимфоцитами в концентрации  $1 \times 10^8$ /мл и объемом среды во флаконе не менее 5 мл вносят 50 мкл антигенпрезентирующей смеси с 1 мМ ингибитора MEK. MEK представляет собой MAPK/ERK киназу, фермент сигнального пути ERK (ERK - extracellular signal-regulated kinase). Полученную клеточную взвесь инкубируют 48 ч при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. В целях защиты от гуморального действия опухолевых клеток (в нашем случае клеток карциномы легкого Льюис) репрограммированные Т-лимфоциты, инкубируют в течение 2 ч в присутствии человеческого моноклонального антитела (МАТ) ниволумаб в концентрации 10 мкг/мл. По окончании цикла инкубации проводят 2-х кратную отмывку рекомендуемой для Т-лимфоцитов средой. Репрограммированные Т-лимфоциты готовы к использованию.

Для подтверждения устойчивости и эффективности полученной популяции репрограммированных CD8 позитивных Т-лимфоцитов проводят исследования *in vitro* и *in vivo*.

Для оценки устойчивости полученной популяции проводится процедура истощения репрограммированных Т-лимфоцитов *in vitro* [Dunsford L.S., et al., 2020].

Репрограммированные Т-лимфоциты в количестве  $1-3 \times 10^6$ /мл в рекомендованной для Т-лимфоцитов культуральной среде с добавлением IL-2 (30 МЕ/мл) («Stemcell Technologies», Канада) стимулируют T-Activator CD3/CD28 Dynabeads® («Thermo Fisher Scientific Baltics», Литва) в соотношении частиц и клеток 1:1. Далее каждые 48 ч проводят ре-стимуляцию, суммарно 3-4 раза. После чего Dynabeads удаляют. Определяют иммунофенотип, проводят анализ стабильности и цитотоксичности репрограммированных Т-лимфоцитов *in vitro*.

Анализ стабильности экспрессии CCR7 на CD8+ Т-лимфоцитах проводят в культуре Т-лимфоцитов *in vitro*. Культивирование наивных, репрограммированных и репрограммированных истощенных Т-лимфоцитов проводят в среде RPMI 1640 («Sigma», США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, «Sigma», США), 2 мМ L-глутамин («Sigma», США), 10 мМ HEPES («Sigma», США) и 55 мкМ β-меркаптоэтанола («Thermo Scientific», США) при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 1 ч. Концентрация Т-лимфоцитов -  $1 \times 10^8$ /мл. Объем среды во флаконе - не менее 5 мл. Далее проводят окрашивание Т-лимфоцитов: добавляют первичные антитела CCR7 в концентрации 100 мкл на лунку, окрашивают 60 мин при 37°C, убирают надсадок, промывают фосфатным буфером 3 раза, далее инкубируют со вторичным антителом AF555 в течение 60 мин при 37°C, убирают надсадок, промывают фосфатным буфером 3 раза, добавляют красители Hoechst 34580 для идентификации ядер и CD8 FITC для идентификации CD8 позитивных Т-лимфоцитов по 1 мкл на 1 мл среды каждого,

инкубируют 30 мин при 37°C, убирают надосадок, промывают фосфатным буфером 3 раза. После завершения окрашивания планшеты помещают в мультимодальный ридер клеточного имиджинга Cytation 5. С помощью Cytation 5, оснащенного кубами: DAPI

(синий), GFP (зеленый), RFP (желтый), оценивают количество CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Подсчитывают количество CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в культуре наивных, репрограммированных, истощенных репрограммированных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, выделенных из костного мозга или селезенки. Изображения, полученные на мультиридере Cytation 5 (увеличение 4× или 20×), анализируют с использованием программного обеспечения для анализа данных Gen5™ (Biotek, Bad Friedrichshall, Германия). Все изображения предварительно обрабатывают для выравнивания фона перед выполнением анализа. Определение процента клеток CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> производят по отношению клеток, подсчитанных по зеленому и красному каналам, к общему количеству клеток, подсчитанных по синему (DAPI) каналу.

Анализ цитотоксичности и выживаемости репрограммированных и наивных Т-лимфоцитов *in vitro* проводят на культуре клеток карциномы легкого Льюис (LLC). На первом этапе готовят культуру клеток карциномы легкого Льюис. Для этого 2×10<sup>3</sup> клеток карциномы легкого Льюис вносят в 0,2 мл культуральной среды, состоящей из RPMI 1640 с добавлением 2 мМ L-глутамин и 10% эмбриональной телячьей сыворотки, и высевают в 96-луночные планшеты с оптическим дном и в течение 24 ч дают возможность клеткам прикрепиться к пластику.

На втором этапе готовят Т-лимфоциты. Т-лимфоциты переносят в коническую пробирку на 15 мл и добавляют витальный краситель сукцинимидиловый эфир карбоксифлуоресцеина (CFSE) в концентрации 1 мкМ. Взвесь Т-лимфоцитов с CFSE инкубируют при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 45 минут. Затем пробирки центрифугируют в течение 15 минут при 2000 об/мин. Среду, содержащую избыток красителя, удаляют и заменяют свежей культуральной средой (RPMI 1640 с добавлением 2 мМ L-глутамин и 10% ЭТС). Окрашенные CFSE Т-лимфоциты разводят в среде RPMI, содержащей 10 мкл/мл красителя 7AAD.

На третьем этапе окрашенные CFSE Т-лимфоциты вносят в 96-луночные планшеты к клеткам-мишеням (клетки карциномы легкого Льюис). Соотношение Т-лимфоцитов к клеткам-мишеням и компоновка клеток в культуральной планшете указано в таблице 1.

Таблица 1 – Формирование групп в культуральной планшете для анализа выживаемости и цитотоксичности репрограммированных и наивных Т-лимфоцитов в культуре клеток карциномы лёгкого Льюис

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0:1	0:1	0:1	0:1	0:1	0:1	0:1	0:1	0:1	0:1	0:1	0:1
B	0,25:1	0,25:1	0,25:1	0,25:1	0,25:1	0,25:1	0,25:1	0,25:1	0,25:1	0,25:1	0,25:1	0,25:1
C	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
D	2,5:1	2,5:1	2,5:1	2,5:1	2,5:1	2,5:1	2,5:1	2,5:1	2,5:1	2,5:1	2,5:1	2,5:1
E	5:1	5:1	5:1	5:1	5:1	5:1	5:1	5:1	5:1	5:1	5:1	5:1
F	10:1	10:1	10:1	10:1	10:1	10:1	10:1	10:1	10:1	10:1	10:1	10:1
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	1:0	1:0	1:0	1:0	1:0	1:0	1:0	1:0	1:0	1:0	1:0	1:0

Группа отрицательного контроля (ряд G, лунки с культуральной средой); группа положительного контроля (ряд A, лунки с клетками карциномы легкого Льюис); группа с Т-лимфоцитарным контролем (ряд H), с 1 по 6 столбец к клеткам-мишеням добавляются репрограммированные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, а с 7 по 12 столбец - наивные

CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты соответственно.

После завершения цикла культивирования планшеты переносят в Cytation 5 для светлопольного и флуоресцентного изображения тестовых лунок через 24 часа. Для культур клеток карциномы легкого Льюис в лунках было сделано одно изображение с 4-х кратным увеличением для каждого канала, чтобы захватить репрезентативную популяцию клеток на лунку. Изображения CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и клеток карциномы легкого Льюис получают с помощью системы визуализации клеток Cytation 5 (4-кратное или 20-кратное увеличение). Анализ клеток проводят с использованием программного обеспечения для анализа данных Gen5™. (Biotek, Bad Friedrichshall, Германия). Перед анализом изображения предварительно обрабатывают для выравнивания фона.

Выживаемость наивных и репрограммированных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов костного мозга или селезенки в культуре клеток карциномы легкого Льюис оценивают, анализируя составное изображение с использованием всех трех цветов. Определение процента погибших Т-лимфоцитов Hoechst+CFSE+производят по отношению клеток, подсчитанных в синем и зеленом каналах, к общему количеству клеток.

Цитотоксичность наивных и репрограммированных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов костного мозга или селезенки в культуре клеток карциномы легкого Льюис оценивают, анализируя по отношению клеток, подсчитанных в синем и красном каналах, к общему количеству клеток карциномы легкого Льюис (процент погибших клеток карциномы легкого Льюис Hoechst+7AAD+). Определяют количество апоптотических опухолевых клеток карциномы легкого Льюис после совместного культивирования с CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами костного мозга или селезенки (% от добавленных клеток).

В экспериментах *in vivo* и *in vitro* используется линия клеток карциномы легкого Льюис, штамм C57BL (CLS Cell Lines. Service, Германия).

Для оценки противоопухолевой и антиметастатической активности мышам-реципиентам с карциномой легкого Льюис репрограммированные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, выделенные из костного мозга или селезенки, вводят внутривенно в дозе  $1 \times 10^6$  клеток/мышь в 0,1 мл стерильного фосфатного буфера на 4-й и 6-й дни эксперимента.

Противоопухолевую активность репрограммированных CD8 Т-лимфоцитов исследуют в ортотопической модели карциномы легкого Льюис [Justilien V., Fields A.P., 2013]. Перед введением опухолевых клеток карциномы легкого Льюис мышь наркотизируют, используя для анестезии изофлуран, вводимый ингаляционно с помощью аппарата для ингаляционного наркоза UGO BASIELE модель 21050 (Италия). Далее животным под наркозом в стерильных условиях удаляют волосяной покров на левой половине грудной клетки выше нижней линии ребер и чуть ниже нижней границы лопатки. 50 мкл суспензии опухолевых клеток карциномы легкого Льюис штамма C57BL ( $1,5 \times 10^6$  клеток) вводят инсулиновым шприцом, снабженным иглой для подкожных инъекций 30G, на глубину 5 мм в левое легкое между 6-м и 7-м ребром.

Рост опухоли контролируют после эвтаназии животных на 7-е сутки после введения клеток карциномы легкого Льюис. Проводят исследование размера опухоли, морфологическое и гистологическое исследование легких.

Для оценки роста опухоли у животных исследуют линейные размеры опухолевых узлов в ортогональных плоскостях и рассчитывают их объем в эллиптическом приближении [Tomayko M.M., Reynolds C.P., 1989]. Опухоль измеряют с помощью штангенциркуля и объем опухолей рассчитывают по формуле:  $V = \pi/6 \times \text{длина} \times \text{ширина} \times \text{высота}$ .

Специфическое влияние клеточной терапии на опухолевый процесс изучают по росту опухоли. Влияние клеточной терапии на рост карциномы легкого Льюис оценивают путем статистического сравнения объема опухолевых узлов в контрольных и подопытных группах при разных сроках наблюдения, по длительности задержки роста опухоли и индексу торможения роста опухоли (ТРО):

$$\text{ТРО} = (\text{VK} - \text{VO}) / \text{VK} \times 100\%;$$

где VK и VO - средние объемы узлов в контрольной и опытной группах.

Для гистологического исследования легкие фиксируют в 10% растворе нейтрального формалина, проводят через спирты восходящих концентраций до ксилола и заливают в парафин по стандартной методике [Cardiff R.D. et al., 2014]. Депарафинизированные срезы толщиной 5 мкм окрашивают гематоксилином и эозином.

Для оценки экспрессии маркеров стволовых опухолевых клеток выделяют мононуклеары из легких. Для этого легкие промываются стерильным фосфатно-солевым буфером (PBS, «Sigma», США) через правый желудочек сердца и после удаления трахеи тщательно измельчаются стерильными ножницами до получения однородной клеточной взвеси. Клеточная взвесь инкубируется в растворе 0,2% коллагеназы 2 типа («Sigma», США), разведенной стерильным фосфатно-солевым буфером при 37°C в течение 30 мин с периодическим перемешиванием. Для удаления стромы и крупных агрегатов клеточную взвесь фильтруют через нейлоновый фильтр диаметром 70 мкм («BD Falcon», США). После центрифугирования в течение 10 мин при 1500 об/мин надосадочную жидкость сливают. Осадок клеток осторожно ресуспендируют, используя 2 мл холодной среды следующего состава: 90% DMEM-LG («Sigma», США), 10% инактивированной ЭТС («Sigma», США), 2 mM L-глутамина («Sigma», США), раствора антибиотиков (пенициллин/стрептомицин 100 Ед/мл и 100 мкг /мл («Sigma», США)). Полученный аспират переносят в пробирку с равным объемом PBS с 2% инактивированной ЭТС и далее наслаивают на градиент плотности Histopaque-1077 в соотношении суспензия-градиент 2:1 и центрифугируют в течение 25 минут при 1500 об/мин. Клетки интерфазного кольца собирают и разбавляют 5-кратным объемом фосфатно-солевого буфера с 2% инактивированной ЭТС и дважды отмывают центрифугированием при 1500 об/мин в течение 7-10 мин. Количество мононуклеаров подсчитывают в камере Горяева.

Влияние репрограммированных CD8 Т-лимфоцитов на содержание стволовых опухолевых клеток исследуют, оценивая экспрессию мембранных и внутриклеточных рецепторов стволовых и прогениторных клеток с использованием мышиных моноклональных антител по стандартному протоколу для проточной цитометрии. Суспензию клеток преинкубируют с CD16/CD32 мыши (BD FcBlock™) в течение 5 минут.

Затем полученные суспензии клеток суспендируют в концентрации  $1 \times 10^6 / 100$  мкл в фосфатно-солевом буфере, содержащем 1% ЭТС, и инкубируют в течение 30 минут при 4°C с соответствующими антителами: CD8 FITC, CD44 APC-Cy™7, CD117 FITC, EGR Alexa Fluor® 647, Ax1 BV421. После инкубации образцы дважды отмывают при 300 g в течение 5 мин. После окрашивания поверхностными маркерами для окрашивания внутриклеточным антителом Sox2 образцы инкубируют со свежеприготовленным рабочим раствором фиксирующего пермеабилизирующего буфера (Fix/Perm Buffer, «BD Biosciences»), США) при 4°C в течение 40 минут в защищенном от света месте. Далее образцы дважды отмывают специализированным промывающим буфером (Perm/Wash Buffer, «BD Biosciences»), США) при 350 g при 4°C в течение 6 минут.

Внутриклеточное окрашивание Sox2 проводят при инкубации образцов в течение 40 минут в защищенном от света месте при 4°C. Затем образцы дважды отмывают при

350 g в течение 6 минут. Добавляют 500 мкл фосфатного буфера и анализируют при помощи прибора FACS Canto II с программным обеспечением FACS Diva («BD Biosciences»), США).

Математическую обработку результатов производят с применением стандартных методов вариационной статистики. Достоверность различий оценивают с использованием параметрического t критерия Стьюдента или непараметрического U критерия Манна-Уитни.

#### Пример 1.

Для оценки эффективности проведенного репрограммирования *in vitro* изучают экспрессию хемокинового рецептора CCR7 CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами костного мозга или селезенки (Фигура 1 Приложения). Репрограммированные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, выделенные из костного мозга или селезенки, показывают большую экспрессию хемокинового рецептора CCR7, чем наивные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, независимо от места их выделения, в культуре CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (Таблица 2). В целях проверки стойкости изменений, вызванных ингибитором MEK и ниволумабом, проведена процедура истощения репрограммированных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Истощение не вызывает изменений в экспрессии CCR7 репрограммированными CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами, что говорит о стабильности индуцированных MEK и ниволумабом изменений (Таблица 2). Сравнение экспрессии CCR7 клетками костного мозга и селезенки не выявляет тканевых различий параметра.

Таблица 2 – Количество наивных, репрограммированных, и репрограммированных истощенных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, выделенных из костного мозга или селезенки мышей линии C57BL/6, экспрессирующих маркер CCR7 (M±m)

Группа	Количество CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоцитов, выделенных из костного мозга	Количество CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоцитов, выделенных из селезенки
Наивные Т-лимфоциты	93,33±5,49	114,33±10,17
Репрограммированные Т-лимфоциты	685,00±60,92 <sup>A</sup>	713,33±31,89 <sup>A</sup>
Репрограммированные и истощенные Т-лимфоциты	699,33±54,85 <sup>A</sup>	695,67±49,24 <sup>A</sup>

Примечание: Отмечена достоверность различия: <sup>A</sup> – с наивными Т-лимфоцитами (соответствующей группы) (p<0,05).

Таким образом, использование ингибиторов протеинкиназ MEK, ингибиторов контрольных точек PD1 и предварительное обучение антигенпрезентирующей смесью вызывают повышение экспрессии хемокинового рецептора CCR7 CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами.

Исследование апоптоза репрограммированных и наивных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, выделенных из костного мозга или селезенки, в культуре клеток карциномы легкого Льюис показывает, что в сравнении с наивными лимфоцитами наиболее стойкой к цитотоксическому действию опухолевых клеток является популяция репрограммированных лимфоцитов, независимо от места выделения (Фигура 2, Таблица 3). По окончании цикла культивирования наивных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в стандартной среде процент мертвых клеток от общего числа клеток составляет 1,92% у Т-лимфоцитов, выделенных из костного мозга, и 2,48% у Т-лимфоцитов, выделенных из селезенки.

Репрограммированные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты более стабильны при культивировании: в

состоянии апоптоза находится 0,69% Т-лимфоцитов, выделенных из костного мозга, и 0,79% Т-лимфоцитов, выделенных из селезенки (Таблица 3).

Таблица 3 – Процент мертвых наивных и репрограммированных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, выделенных из костного мозга или селезенки мышей линии C57BL/6, от их общего числа при совместном культивировании с клетками карциномы легкого Льюис (M±m)

Разведение Т-лимфоцитов и опухолевых клеток	Выделенные из костного мозга		Выделенные из селезенки	
	Наивные CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоциты + опухолевые клетки	Репрограммированные CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоциты + опухолевые клетки	Наивные CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоциты + опухолевые клетки	Репрограммированные CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоциты + опухолевые клетки
Контроль лимфоцитов 1:0	1,92±0,19	0,69±0,09 <sup>B</sup>	2,48±0,25	0,79±0,08 <sup>B</sup>
0,25:1	5,00±0,82 <sup>A</sup>	3,24±0,59 <sup>A B</sup>	6,72±0,83 <sup>A</sup>	6,60±0,91 <sup>A</sup>
1:1	2,26±0,25	0,33±0,19 <sup>B</sup>	2,25±0,27	1,89±0,19 <sup>A B</sup>
2,5:1	2,31±0,12	1,27±0,20 <sup>A B</sup>	2,56±0,11	1,59±0,24 <sup>A B</sup>

Примечание: Отмечена достоверность различия: <sup>A</sup> – с группой контроль лимфоцитов (1:0) (p<0,05); <sup>B</sup> – с группой наивные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты (соответствующей группы) + опухолевые клетки (p<0,05).

При разведении Т-лимфоциты и опухолевые клетки 0,25:1 мы наблюдаем увеличение апоптоза наивных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в культуре клеток карциномы легкого Льюис. Уровень апоптоза выше в группе наивных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов более чем в 2 раза.

Повышение концентрации наивных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в культуре клеток карциномы легкого Льюис вызывает снижение уровня апоптоза до уровня группы «контроль» лимфоцитов. Репрограммированные CD8<sup>+</sup> лимфоциты костного мозга или селезенки более устойчивы к цитотоксическому действию опухолевых клеток по сравнению с наивными CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами. На это указывает снижение уровня апоптоза репрограммированных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, выделенных из костного мозга, по сравнению с наивными CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами в разведении 0,25:1; 1:1 и 2,5:1 (Таблица 3). При сравнении уровня апоптоза репрограммированных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, выделенных из селезенки, в культуре клеток карциномы легкого Льюис выявляется большая гибель клеток лимфоцитами в разведении 1:1 и 2,5:1 (Таблица 3).

Таким образом, *in vitro* репрограммированные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты демонстрируют большую устойчивость к цитотоксическому действию клеток карциномы легкого Льюис, чем наивные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты.

Исследование цитотоксичности репрограммированных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов проводят при совместном культивировании с клетками карциномы легкого Льюис. В культуре клеток карциномы легкого Льюис соотношение между CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами и опухолевыми клетками составляет 0:1, 0,25:1, 1:1, 2,5:1, 5:1 и 10:1. Наивные и репрограммированные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, независимо от места выделения, вызывают апоптоз опухолевых клеток уже в соотношении 0,25:1. Максимальный уровень апоптоза опухолевых клеток наблюдается в соотношении клеток 10:1 (CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты : опухолевые клетки). Цитотоксичность репрограммированных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов

превосходит таковую у наивных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (Таблица 4). Достоверных различий в цитотоксичности между репрограммированными клетками костного мозга и селезенки не выявляется.

Таблица 4 – Процент мертвых опухолевых клеток от общего количества клеток карциномы легкого Льюис при совместном культивировании с наивными и репрограммированными CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами, выделенными из костного мозга или селезенки мышей линии C57BL/6 (M±m)

Разведение Т-лимфоцитов и опухолевых клеток	Культура клеток карциномы легкого Льюис			
	Наивные CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоциты, выделенные из костного мозга, + опухолевые клетки	Репрограммированные CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоциты, выделенные из костного мозга, + опухолевые клетки	Наивные CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоциты, выделенные из селезенки, + опухолевые клетки	Репрограммированные CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоциты, выделенные из селезенки, + опухолевые клетки
Контроль лимфоцитов 1:0	2,15±0,54	1,33±0,22	2,04±0,40	1,70±0,37
0,25:1	6,56±1,56 <sup>A</sup>	10,63±1,48 <sup>AB</sup>	4,74±0,50 <sup>A</sup>	7,46±1,14 <sup>A</sup>
1:1	25,60±2,13 <sup>A</sup>	37,08±2,68 <sup>AB</sup>	19,82±1,91 <sup>A</sup>	29,97±1,57 <sup>AB</sup>
2,5:1	37,96±2,35 <sup>A</sup>	69,59±1,37 <sup>AB</sup>	35,25±2,62 <sup>A</sup>	69,78±1,63 <sup>AB</sup>
5:1	42,36±5,37 <sup>A</sup>	97,48±0,56 <sup>AB</sup>	38,02±4,84 <sup>A</sup>	97,38±0,61 <sup>AB</sup>
10:1	57,87±2,67 <sup>A</sup>	100,00±1,00 <sup>AB</sup>	53,62±3,92 <sup>A</sup>	100,00±0,00 <sup>AB</sup>

Примечание: Отмечена достоверность различия: А – с контролем опухолевых клеток (0:1) (p<0,05); В – с группой наивные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты (соответствующей группы) + опухолевые клетки (p<0,05).

Таким образом, в культуре карциномы легкого Льюис репрограммированные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, выделенные из костного мозга или селезенки, демонстрируют большую цитотоксическую активность, чем наивные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты.

Пример 2.

Морфологическое и гистологическое исследование легких мышей-реципиентов линии C57BL/6 с карциномой легкого Льюис после клеточной терапии репрограммированными CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами проводят на 7-е сутки после моделирования ортотопической модели. В легких мышей с карциномой легкого Льюис без лечения выявляются хорошо васкуляризированные крупные опухолевые узлы, состоящие из атипичных клеток. Для этой группы клеток был характерен клеточный и ядерный полиморфизм. В общей популяции атипичных клеток выявляются гигантские многоядерные клетки, множество клеток в состоянии митоза. В опухолевой ткани встречаются многочисленные мелкие очаги некроза (Фигура 3 Б, Е Приложения). Клеточная терапия репрограммированными CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами, выделенными из костного мозга или селезенки, не изменяет общую гистологическую картину легких мышей с карциномой легкого Льюис (Фигура 3 В, Г, Ж, З Приложения). На фоне терапии отмечается уменьшение количества опухолевых эмболов в сосудах, периваскулярных и перибронхиальных метастазов.

Индекс торможения роста опухоли (ТРО) на модели карциномы легкого Льюис после клеточной терапии репрограммированными CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами костного мозга или селезенки составляет 57% и 54,7% соответственно (таблица 5). Индекс ингибирования процесса метастазирования составляет после клеточной терапии репрограммированными CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами костного мозга 91,665% и селезенки

98%. На фоне введения репрограммированных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов выявляются уменьшение объема опухоли, частоты метастазирования, степени поражения легких метастазами и среднего числа метастазов.

5 Таблица 5 – Влияние клеточной терапии репрограммированными CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами, выделенными из костного мозга или селезенки мышей-доноров, на рост опухоли у мышей-реципиентов с карциномой легкого Льюис на 7-е сутки эксперимента (M±m)

Показатели	Интактный контроль	Патологический контроль (карцинома легкого Льюис)	Репrogramмированные CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоциты костного мозга	Репrogramмированные CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоциты селезенки
Объем опухоли, мм <sup>3</sup>	0	4,62±3,85 <sup>A</sup>	1,95±2,33 <sup>A B</sup>	2,09±0,09 <sup>A B</sup>
Степень поражения легких метастазами	0	2,50±0,25 <sup>A</sup>	0,33±0,21 <sup>A B</sup>	0,17±0,17 <sup>A B</sup>
Среднее число метастазов	0	2,50±0,25 <sup>A</sup>	0,50±0,34 <sup>A B</sup>	0,17±0,17 <sup>A B</sup>
Частота метастазирования, %	0	80,00±8,22 <sup>A</sup>	33,33±3,16 <sup>A B</sup>	16,67±2,01 <sup>A B</sup>

10 Примечание: различия достоверны по сравнению: А – с интактным контролем (p<0,05); В – с патологическим контролем (p<0,05).

20 Таким образом, репрограммированные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, выделенные из костного мозга или селезенки оказывают, противоопухолевое и антиметастическое действие на модели карциномы легкого Льюис.

На фоне развития карциномы легкого Льюис в легких мышей на 7-е сутки эксперимента наблюдается увеличение количества опухолевых и стволовых опухолевых 25 клеток с различными фенотипами: Ax1<sup>+</sup>, Ax1<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>, EGF<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>Sox2<sup>+</sup>, EGF<sup>+</sup>Sox2<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>Sox2<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup>Sox2<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup>EGF<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>Sox2<sup>+</sup> (Таблица 6). Введение репрограммированных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, как из костного мозга, так и из селезенки, уменьшает количество всех исследованных популяций опухолевых и стволовых 30 опухолевых клеток в легких мышей-реципиентов.

Таким образом, метаболическое репрограммирование CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, основанное на совместном применении ингибиторов протеинкиназ MEK и антигенпрезентирующей смеси, ингибитора контрольных точек PD1, приводит к 35 формированию популяции репрограммированных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, устойчивых к действию опухолевых клеток, обладающих цитотоксической активностью *in vitro*, противоопухолевым и антиметастическим действием. Следует отметить, активность репрограммированных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов не зависит от места их выделения, что в перспективе предполагает возможность использования для выделения Т-лимфоцитов 40 периферическую кровь пациентов.

Таблица 6 – Влияние клеточной терапии репрограммированных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов на содержание опухолевых и стволовых опухолевых клеток (% от всех окрашенных мононуклеаров) в легких мышей с карциномой легкого Льюис на 7-е сутки эксперимента (M±m)

Иммунофенотип клеток	Интактный контроль	Патологический контроль (карцинома легкого Льюис)	Клеточная терапия репрограммированными Т-лимфоцитами костного мозга	Клеточная терапия репрограммированными Т-лимфоцитами селезенки
Axl <sup>+</sup>	2,321±0,245	42,076±4,124 <sup>A</sup>	3,390±0,352 <sup>AB</sup>	5,032±0,528 <sup>AB</sup>
Axl <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup>	1,866±0,146	18,665±2,129 <sup>A</sup>	2,491±0,236 <sup>B</sup>	4,431±0,493 <sup>AB</sup>
EGF <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> Sox2 <sup>+</sup>	4,017±0,396	10,137±1,009 <sup>A</sup>	1,191±0,121 <sup>AB</sup>	4,261±0,389 <sup>B</sup>
EGF <sup>+</sup> Sox2 <sup>+</sup>	6,778±0,628	17,194±1,528 <sup>A</sup>	2,634±0,225 <sup>AB</sup>	5,598±0,455 <sup>B</sup>
CD44 <sup>+</sup> Sox2 <sup>+</sup>	6,350±0,612	14,404±1,332 <sup>A</sup>	1,433±0,122 <sup>AB</sup>	5,369±0,495 <sup>B</sup>
CD117 <sup>+</sup> Sox2 <sup>+</sup>	17,112±1,662	30,009±2,328 <sup>A</sup>	7,507±0,722 <sup>AB</sup>	10,573±1,223 <sup>AB</sup>
CD117 <sup>+</sup> EGF <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> Sox2 <sup>+</sup>	3,450±0,332	11,129±1,066 <sup>A</sup>	1,036±0,008 <sup>AB</sup>	3,493±0,332 <sup>B</sup>

Примечание: результаты представлены от 3 независимых серий экспериментов. Различия достоверны по сравнению: <sup>A</sup> – с интактным контролем (p<0,05); <sup>B</sup> – с патологическим контролем (p<0,05).

Источники информации, принятые во внимание при составлении описания:

1. Liu, Q., Zhao, C., Jiang, P., Liu, D. Circulating tumor cells counts are associated with CD8<sup>+</sup> T cell levels in programmed death-ligand 1-negative non-small cell lung cancer patients after radiotherapy: A retrospective study. // *Medicine*. - 2021. - 100(29), e26674.

2. Sathaliyawala, T., Kubota, M., Yudanin, N., Turner, D., Camp, P., Thome, J. J., Bickham, K. L., Lerner, H., Goldstein, M., Sykes, M., Kato, T., Farber, D. L. Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. // *Immunity*. - 2013. - 38(1), 187-197.

3. Speiser DE, Ho P-C, Verdeil G. Regulatory circuits of T cell function in cancer. // *Nat. Rev. Immunol.* - 2016. - 16, 599. doi: 10.1038/nri.2016.80

4. Петрова Г.В., Грецова О.П., Старинский В.В. Сравнение данных государственной онкологической статистики и ракового регистра России // *Сибирский онкологический журнал*. - 2019. - Т. 18, №5. - С. 5-17.

5. Hochmair, M., Rath, B., Klameth, L., Ulsperger, E., Weinlinger, C., Fazekas, A., Plangger, A., Zeillinger, R., Hamilton, G. Effects of salinomycin and niclosamide on small cell lung cancer and small cell lung cancer circulating tumor cell lines. // *Investigational new drugs*. - 2020. - 38(4), 946-955.

6. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance // *Annu. Rev. Immunol.* - 2004. - Vol. 22. P. 745-763. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702Sallusto F et al., 2004

7. Jung Y.W., Kim H.G., Perry C.J., Kaech S.M. CCR7 expression alters memory CD8 T-cell homeostasis by regulating occupancy in IL-7- and IL-15-dependent niches // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 2016. - Vol. 113, No. 29. P. 8278-8283. doi: 10.1073/pnas.1602899113

8. Verma, V., Jafarzadeh, N., Boi, S. et al. MEK inhibition reprograms CD8<sup>+</sup> T lymphocytes into memory stem cells with potent antitumor effects. // *Nat Immunol.* - 2021. - 22, 53-66. doi: 10.1038/s41590-020-00818-9

9. Herrick, W.G., Kilpatrick, C.L., Hollingshead, M.G., Esposito, D., O'Sullivan Coyne, G., et al. Isoform- and Phosphorylation-specific Multiplexed Quantitative Pharmacodynamics of Drugs Targeting PI3K and MAPK Signaling in Xenograft Models and Clinical Biopsies. // *Molecular cancer therapeutics*. - 2021. - 20(4), 749-760. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-20-0566

10. Dong B., Minze L.J., Xue W., Chen W. Molecular insights into the development of T cell-based immunotherapy for prostate cancer // *Expert Rev. Clin. Immunol.* - 2014. - Vol. 10, No. 11. P. 1547-1557. doi: 10.1586/1744666X.2014.962515

11. Dunsford L.S., Thoires R.H., Rathbone E., Patakas A. A Human In Vitro T Cell Exhaustion Model for Assessing Immuno-Oncology Therapies // *Immuno-Oncology. Methods in Pharmacology and Toxicology.* - 2020. - P. 89-101. doi: 10.1007/978-1-0716-0171-6\_6

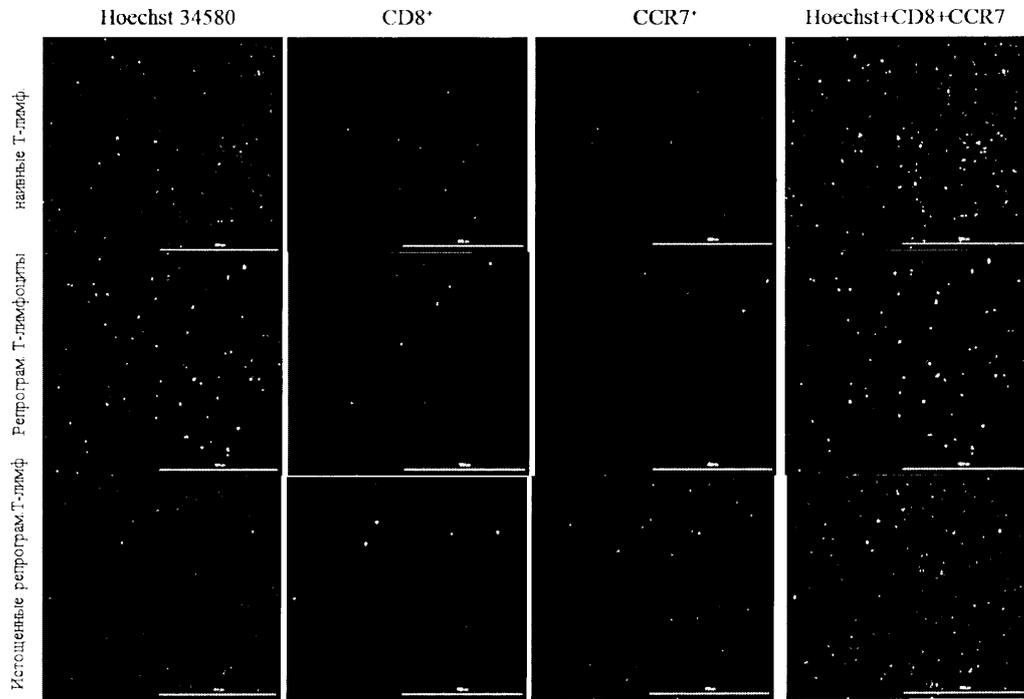
12. Justilien V., Fields A.P. Utility and applications of orthotopic models of human non-small cell lung cancer (NSCLC) for the evaluation of novel and emerging cancer therapeutics // *Curr. Protoc. Pharmacol.* - 2013. - Vol. 62. P. 14.27.1-14.27.17. doi: 10.1002/0471141755.ph1427s6

13. Tomayko M.M., Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice // *Cancer Chemother. Pharmacol.* - 1989. - Vol. 24, No. 3. P. 148-154. doi: 10.1007/BF00300234

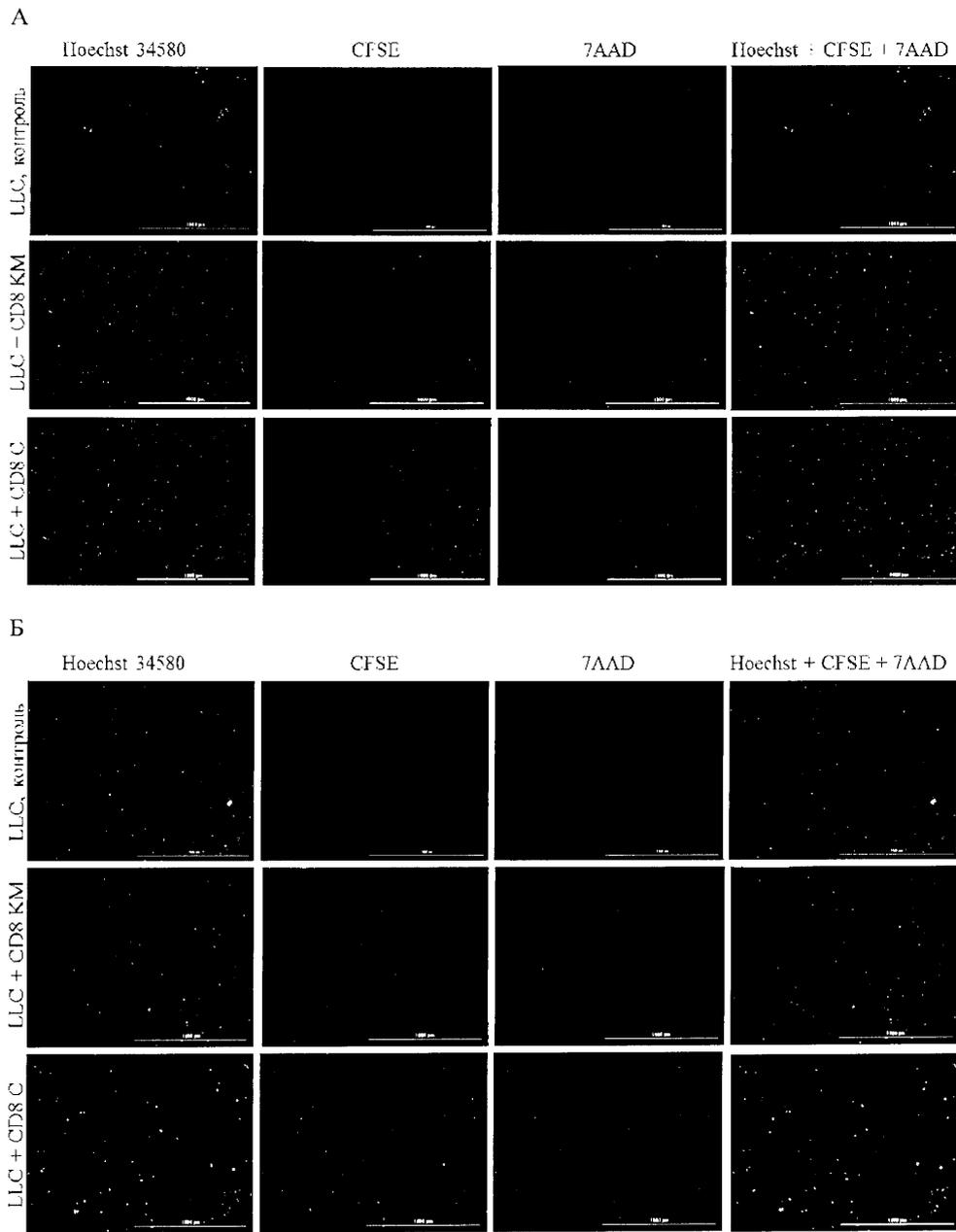
14. Cardiff R.D., Miller H., Munn R.J. Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections // *Cold Spring Harb. Protoc.* - 2014. - Vol. 6. P. 655-658. doi: 10.1101/pdb.prot073411

(57) Формула изобретения

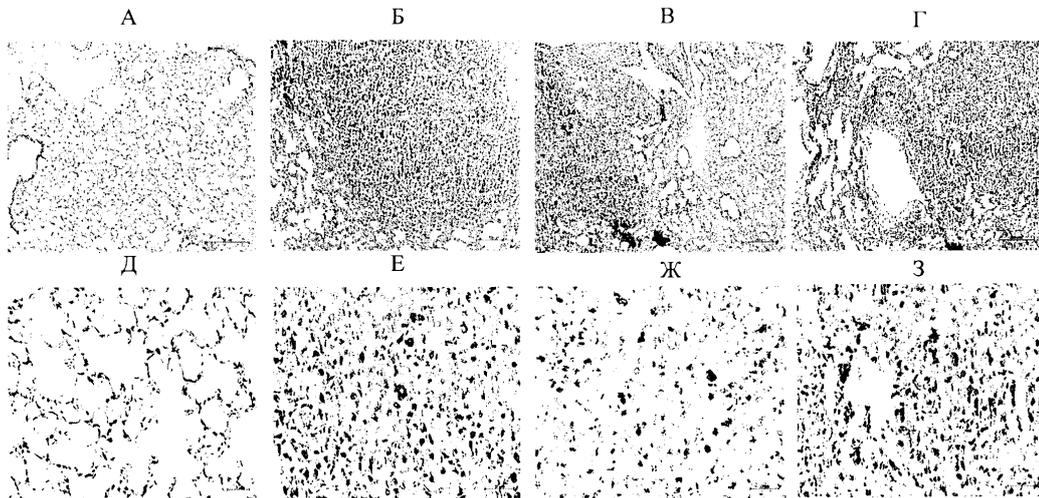
Способ усиления противоопухолевого Т-клеточного иммунитета при раке легкого, характеризующийся тем, что реципиенту внутривенно вводят репрограммированные CD8 позитивные Т-лимфоциты, которые готовят in vitro следующим образом: к наивным CD8 позитивным Т-лимфоцитам в концентрации  $1 \times 10^8$ /мл добавляют ингибитор протеинкиназ MEK в дозе 1  $\mu$ M совместно с 50 мкл антигенпрезентирующей смеси, полученной на основе лизата опухолевых клеток, культивируют в течение 48 часов, далее добавляют ингибитор контрольных точек PD1 в концентрации 10 мкг/мл и культивируют в течение 2 часов.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3