

肿瘤浸润淋巴细胞在小鼠体内生物分布研究

侯田田¹, 秦超¹, 王涛², 王月丹³, 张秀军⁴, 姚志伟⁵, 黄瑛^{1*}, 耿兴超^{1*} (1. 中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176; 2. 解放军总医院第五医学中心, 北京 100039; 3. 北京大学基础医学院, 国家卫生健康委员会医学免疫学重点实验室, 北京 100191; 4. 北京循生免疫医学转化研究院, 北京 102600; 5. 三卿(北京)生物科技有限公司, 北京 100176)

摘要:目的 评估肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)在NOG小鼠体内的分布及清除情况。方法 研究共使用84只NOG小鼠,分为溶媒对照组和受试物组,单次尾静脉注射给予小鼠TIL,在给药后不同时间点采血和解剖,取脏器,采用流式细胞术和实时定量聚合酶链反应(real-time quantitative PCR, qPCR)方法检测细胞在血液和不同脏器的分布情况。结果 给药后1~2 d,血液中CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺细胞数量达到峰值,同时qPCR检测结果显示,TIL主要分布于肺、血液、肝脏等组织,其他组织分布较少,给药后42 d,大部分组织基因拷贝低于定量下限。结论 NOG小鼠单次尾静脉注射TIL,主要在肺脏、血液、肝脏中分布,并且在体内存续时间不超过42 d。

关键词:肿瘤浸润淋巴细胞;生物分布;流式细胞术;实时定量聚合酶链反应

doi:10.11669/epj.2024.20.004 中图分类号:R979.1 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)20-1910-07

Biodistribution Study of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Mice

HOU Tiantian¹, QIN Chao¹, WANG Tao², WANG Yuedan³, ZHANG Xiujun⁴, YAO Zhiwei⁵, HUANG Ying^{1*}, GENG Xingchao^{1*} (1. Beijing Key Laboratory for Safety Evaluation of Drugs, National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China; 2. The Fifth Medical Center of the PLA General Hospital, Beijing 100039, China; 3. Key Laboratory of Medical Immunology, National Health Commission, School of Basic Medical Sciences Peking University, Beijing 100191, China; 4. Aeonvital Institute of Clinical and Translational Immunology, Beijing 102600, China; 5. SanQ (Beijing) Biotechnology Co., Ltd., Beijing 100176, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the distribution and clearance of tumor infiltrating lymphocytes (TIL) in NOG mice. **METHODS** Eighty-four NOG mice were used, divided into control group and test group. The mice were given a single tail vein injection. After administration blood was collected and organs were taken at different time points, flow cytometry and real-time quantitative PCR (qPCR) were used to detect the distribution of cells in the blood and different organs. **RESULTS** After 1-2 d of administration, the number of CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, and CD3⁺CD8⁺ cells in the blood reached their peaks. At the same time, qPCR showed that TIL was mainly distributed in tissues such as lungs, blood, and liver, with less distribution in other tissues. On day 42 after administration, gene copies of most tissues were below the lower limit of quantitation. **CONCLUSION** Single tail vein injection of TIL in NOG mice is mainly distributed in the lungs, blood, and liver, and its duration *in vivo* does not exceed 42 d.

KEY WORDS: tumor-infiltrating lymphocyte; biodistribution; flow cytometry; real-time quantitative polymerase chain reaction

肿瘤在包含多种细胞的复杂组织微环境中发展,包括先天免疫细胞和适应性免疫细胞,肿瘤细胞和免疫系统的细胞之间存在动态的相互作用,有效地抗肿瘤免疫才能清除肿瘤。然而,在某些情况下,肿瘤细胞可能会逃避免疫监测,同时不受控制地增殖。过继细胞疗法(adoptive cellular

therapy, ACT)可克服免疫系统对肿瘤的低反应性并增强抗肿瘤免疫,其中肿瘤浸润淋巴细胞为自然浸润实体肿瘤的异质性淋巴细胞群体,在黑色素瘤、乳腺癌等疾病中展现出较好的临床效果,是一种非常有前景的过继细胞疗法^[1-2]。肿瘤微环境中存在免疫抑制代谢产物(如腺苷、乳酸)、细胞

基金项目:中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金资助(2024C6);国家重点研发计划课题资助(2021YFA1101602)

作者简介:侯田田,女,硕士,助理研究员 研究方向:药物临床前安全性评价;秦超,男,本科,中级主管技师 研究方向:药物临床前安全性评价。侯田田和秦超为共同第一作者 * **通讯作者:**黄瑛,女,博士,副研究员 研究方向:药物临床前安全性评价
Tel: (010)67876255;耿兴超,男,博士,研究员 研究方向:药物临床前安全性评价 Tel: (010)53852138

因子(转化生长因子- β)和各类细胞(如调节性 T 细胞、肿瘤相关巨噬细胞等),能够共同增强肿瘤抗原特异性 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞的功能。从新鲜肿瘤样本中分离出自然产生的肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocyte, TIL),并在体外扩增和活化,通过改善 T 细胞表型、功能和肿瘤反应特性,重新激活 T 细胞,最后回输到病人体内用于杀伤肿瘤细胞^[3-4]。与其他 ACT 相比,TIL 疗法具有独特的优势,包括能够识别一系列肿瘤抗原的多种 T 细胞克隆性、较好的肿瘤归巢能力、低脱靶毒性、克服免疫抑制障碍诱导较强的免疫介导的肿瘤消退等优点,此外,肿瘤组织中较高水平的 TIL,尤其是 CD8⁺T 细胞,与多种实体瘤的抗肿瘤效果改善有关^[5-7]。

2024 年 2 月, Lovance Biotherapeutics 公司产品 Lifileucel(LN-144)获得美国食品药品监督管理局(FDA)加速批准上市,用于治疗 PD-1 抗体治疗后进展的晚期黑色素瘤,这是全球首款批准上市的 TIL 产品,具有里程碑的意义。该产品的 2 期临床研究数据显示,晚期黑色素瘤患者接受 TIL 治疗后,客观缓解率为 31.4%,其中 8 例完全缓解,40 例部分缓解,中位总生存期为 13.9 个月,疾病控制率为 79.3%,从注射药物到最佳疗效的中位时间为 1.5 个月,显示出非常好的治疗效果^[8]。目前,国内多家公司研发的 TIL 产品(如 BST02、GC101、GT101 等)也逐步进入临床阶段,竞争逐渐白热化。本研究产品为北京循生生物医学研究有限公司研发,为加速该产品临床转化,对其进行了体内生物分布的研究。本研究尾静脉给予 NOG 小鼠 TIL 细胞,采用流式细胞术和实时定量聚合酶链反应(qPCR)的方法,检测 TIL 在小鼠不同脏器内的分布和存续情况,为本产品进入临床试验提供数据参考。

1 材料

1.1 仪器

高速冷冻离心机(型号:D3024R,美国 SCIOGEX 公司);低速离心机(型号:SC-3612,安徽中科中佳科学仪器有限公司);Real-Time System(型号:CFX Connect 和 CFX 96,美国 BIO-RAD 公司);NanoReady(型号:FC-1100,杭州遂真生物技术有限公司)。

1.2 试剂

组织和血液基因组 DNA 提取试剂盒[天根生

化科技(北京)有限公司,货号:DP304-03];2 × T5 Fast qPCR MIX(Probe)(北京擎科生物科技股份有限公司,货号:TSE301);异氟烷(河北一品制药有限公司)。探针、上游引物、下游引物[通用生物(安徽)股份有限公司];GAPDH 质粒标准品(北京擎科生物科技股份有限公司合成);Ph PerCP mouse anti-human CD3(批号:020548)、Ph PE mouse anti-human CD4(批号:9172628)、PE FITC mouse anti-human(批号:0104976)(美国 BD 公司);注射用人白介素-2(IL-2)(批号:20210316-2,北京四环生物制药有限公司)。

本研究使用细胞注射液和溶媒由北京循生免疫医学转化研究院提供,细胞注射液主要成分为人肿瘤组织浸润淋巴细胞、体积分数 1% 人血白蛋白和体积分数 0.9% 氯化钠注射液,溶媒为体积分数 1% 人血白蛋白。在每次给药当天,用细胞注射液将 TIL 配制为每毫升 5×10^7 mL⁻¹,并在 6 h 内完成给药。

1.3 动物

研究共使用 84 只 SPF 级 NOG 小鼠,雌雄各半,6~7 周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,购入时动物体质量:雄性:18.2~21.1 g;雌性:15.2~17.3 g。在温度 20~26 °C、湿度 40%~70%、12 h 照明条件下饲养。提供经钴 60 放射灭菌的鼠全价颗粒饲料,自由摄食及饮水。本试验方案实施前已经动物管理与使用委员会伦理审查批准,动物的使用符合 3R 原则(Reduction, Replacement, Refinement),研究中所有实验动物相关的操作严格按照国际实验室动物伦理行为准则“Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”实施(伦理编号:IACUC-2022-014)。

2 方法

2.1 试验设计

研究使用 84 只 NOG 小鼠(雌雄各半),根据动物体质量使用 TOXSTA 2006 软件进行随机分组,分为溶媒对照组和受试物组,溶媒对照组和受试物组均为 42 只小鼠(7 个解剖时间点,每个时间点雌雄各 3 只小鼠),溶媒对照组动物尾静脉注射给予溶媒 1 次;受试物组动物尾静脉注射给予细胞注射液 1 次,后连续 7 d 腹腔给予 IL-2(每只动物给予 4 000 IU)。于给药后 30 min、1 h、3 h、1 d、4 d 眼后静脉丛采血,采用流式细胞术对 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺ 细胞进行分析。在给药后

3 h、2、7、14、28、42、59 d 等 7 个时间点对溶媒组以及受试物组小鼠使用异氟烷麻醉后,解剖取心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、脑、睾丸、附睾、子宫、卵巢、胃、十二指肠、结肠、骨髓、脂肪、骨骼肌,脏器-80 °C 冻存,留待后续进行 qPCR 试验,另取部分血液进行流式细胞分析,以研究受试物在外周血以及上述组织器官中的分布情况。

2.2 qPCR 方法学验证

本试验使用探针法检测产品中细胞的 *GAPDH* 基因拷贝数,该拷贝数可反映人源细胞的基因拷贝数。采用绝对定量的方法,以已知浓度的含有人 *GAPDH* 基因片段的质粒为标准品,建立标准曲线,计算待测样本中的 *GAPDH* 基因拷贝数试验使用引物信息见表 1。

参考《中国药典》2020 年版第四部通则 9012——生物样品定量分析方法验证指导原则和药用技术要求国际协调理事会(ICH)《M10:生物分析方法验证及样本分析》,在正式样本检测前,对 qPCR 进行充分的方法学验证,包括选择性、特异性、标准曲线(线性和扩增效率)、精密度和准确度、基因组 DNA 储存稳定性和质粒储存稳定性、标准曲线样本稳定性、方法适用性等。

表 1 qPCR 检测用引物信息

Tab. 1 Primer information for qPCR

Primer name	Nucleotide sequence (5' to 3')
Probe	AGGCTCCACCTTTCTCATCCAAGACTG
Forward primer	TATCGTGGAAGGACTCATGGTAT
Reverse primer	AAGGAAATTATGGGAAAGCCACTC

2.2.1 关键试剂制备 ①小鼠混合背景基因组 DNA:提取空白 NOG 小鼠肝脏、脾脏、肾脏、十二指肠的混合 DNA(m-gDNA),作为标准品、质控样本等反应体系中的背景 DNA 使用。m-gDNA 于 -80 °C 冰箱储存,备用,避免反复冻融。②小鼠个体基因组 DNA:取空白小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、脑、子宫、睾丸、卵巢、附睾、胃、十二指肠、脂肪、骨骼肌、结肠、骨髓、血液样本,进行 DNA 提取。将提取后 DNA 添加不同浓度的质粒标准品,用于选择性研究。③细胞基因组 DNA:受试细胞进行 DNA 提取,-80 °C 冰箱储存,避免反复冻融,用于特异性研究。④标准曲线的制备:将质粒 DNA 添加到小鼠基因组背景中制备而成。取 1×10^9 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 质粒作为工作液,梯度稀释,制备标准曲线范围为: $12.5 \sim 1.25 \times 10^9$ copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。⑤质控品制备:取

1×10^9 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 质粒作为工作液,梯度稀释,制备定量上限、高质控、中质控、低质控、定量下限分别为 1.25×10^6 、 6.25×10^5 、 6.25×10^3 、 6.25×10^1 和 12.5 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

2.2.2 选择性 取小鼠组织的基因组 DNA(心、肝、脾、肺、肾、脑、子宫、睾丸、卵巢、附睾、胃、十二指肠、脂肪、骨骼肌、结肠、骨髓、全血),以提取后 DNA 为背景,配制高浓度(6.25×10^5 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$)、低浓度(6.25×10^1 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$)质控品及不添加质控品的阴性对照,检测人 *GAPDH* 基因,考察不同组织基因组 DNA 对检测的干扰作用。可接受标准:80% 以上的高、低浓度质粒质控的回收率(RE%) 在 50% ~ 150% 内,同时不添加质控品的阴性对照无扩增。

2.2.3 特异性 考察该分析方法对扩增某一特定基因的能力。样本制备同“2.2.1”项下操作,并增加对细胞注射液细胞扩增的特异性考察,接受标准:①小鼠个体基因组背景的高、低质控均有 *GAPDH* 基因的特异性扩增;②小鼠个体基因组背景的阴性对照样本,无扩增或检测低于定量下限;③细胞样本,检测值高于定量下限。

2.2.4 标准曲线(线性和扩增效率) 线性和扩增效率通过将模板稀释成一系列浓度梯度进行 PCR 反应,来考察反应的线性范围和不同拷贝数的初始模板是否具有相同的扩增效率,以此判断方法是否为最优化。以 m-gDNA 基因组为背景,以含人 *GAPDH* 基因的质粒为标准品,配制 6 个浓度 $12.5 \sim 1.25 \times 10^6$ copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ *GAPDH* 基因进行检测。结果以 copies $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ DNA 为横坐标,以 Cq 值为纵坐标作图,绘制标准曲线。计算扩增效率、线性以及各点回收率。分析批数量:10。可接受标准:①扩增效率和线性:标准曲线扩增效率均值满足 90% ~ 110%, $r^2 > 0.980$;②准确度:质粒标准曲线定量范围内各点至少有 75% 的校正标样的 RE% 介于 50% ~ 150%。

2.2.5 精密度和准确度 ①批内精密度和准确度:设置 3 套质控,每套质控包括定量上限(1.25×10^6 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$)、高质控(6.25×10^5 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$)、中质控(6.25×10^3 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$)、低质控(6.25×10^1 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$)、定量下限(12.5 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$),每套质控随行标准曲线样本,设置 6 个分析批。可接受标准是各浓度质控样本平均拷贝数的准确度介于 50% ~ 150% 和各浓度质控样本平均拷贝数的精密度的小于 50%。②批间精密度和准确度:上述 5 个浓度质

控进行3 d检测,可接受标准同①。

2.2.6 基因组 DNA 储存稳定性 提取细胞基因组 DNA 与小鼠混合基因组 DNA 分别按高、低比例进行混合,进行不做处理、冻融 5 次、室温 4 h、-60 °C 以下长期放置 3 个月的稳定性考察,每个条件重复 3 个样本,将处理后 DNA 样本进行 GAPDH 基因扩增。可接受标准:67% 以上不同条件处理后样本与未处理样本相比,拷贝数偏差在 ±50% 内。

2.2.7 质粒储存稳定性 将质粒工作液 (1×10^9 copies · μL^{-1}) 进行室温 4 h 和 -60 °C 以下长期放置 4.5 个月的稳定性考察。处理完毕后,进行凝胶电泳检测纯度,重复 3 个样本。可接受标准:不同条件处理后质粒与未处理相比,凝胶电泳图显示质粒无明显降解。

2.2.8 标准曲线样本稳定性 以小鼠混合基因组为背景,以含人 GAPDH 基因的质粒为标准品,配制标准曲线。将标曲样本均分为 2 份,一份进行实验,另一份储存于 4 °C 冰箱,12 h 以上后再进行人 GAPDH 基因扩增。可接受标准:①4 °C 存放标曲样本的扩增效率均值满足 90% ~ 110%, $r^2 > 0.980$ 。②4 °C 存放标曲定量范围内各点至少有 75% 的校正标样的回收率 (RE%) 介于 50% ~ 150%。③将 4 °C 存放标曲样本的各浓度点的值代入新鲜标曲计算拷贝数,要求至少 75% 的校正标样的回收率 (RE%) 介于 50% ~ 150%。

2.2.9 方法适用性 使用小鼠混合基因组 DNA 将受试细胞基因组 DNA 梯度稀释 5 个点,对人 GAPDH 基因进行扩增,计算扩增效率和线性。可接受标准:扩增效率均值满足 90% ~ 110%, $r^2 > 0.980$ 。

2.3 样本检测

2.3.1 DNA 提取 按照组织和血液基因组 DNA 提取试剂盒操作说明进行 DNA 提取。

2.3.2 DNA 浓度和纯度检测 使用 NanoReady 测定提取的 DNA 的浓度及纯度。样本质量浓度需 $\geq 25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, OD 260/280 为 1.6 ~ 2.0。

2.3.3 PCR 反应条件 采用二步法进行荧光定量 PCR,反应条件程序为预变性:95 °C, 30 s; PCR 反应:95 °C, 5 s, 60 °C, 30 s, 循环数 40。

2.3.4 待测样本测定 每轮定量 PCR 检测时,均于 96 孔反应板设置 1 套标准曲线,2 套 3 水平的质控样本(低、中、高),每样本 3 复孔。每分批标准曲线扩增效率均值满足 90% ~ 110%,

$r^2 \geq 0.980$ 。

2.4 数据处理

使用 Bio-Rad CFX Manager 3.1 软件进行 Q-PCR 数据分析。以理论 copies · μg^{-1} DNA 为横坐标,以检测 Cq 值为纵坐标,进行线性拟合,绘制标准曲线。根据公式(1)计算样本浓度。

$$\text{copies} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ DNA} = 10^{\{[\text{Mean}(Cq) - \text{Intercept}]/\text{Slope}\}} \quad \text{公式(1)}$$

图片由 GraphPad Prism 8.0.2 软件处理生成。

3 结果

3.1 方法学验证

3.1.1 选择性 所有个体空白 DNA 样本添加高、低质控,均满足 RE% 在 50% ~ 150% 内,同时不添加质控品的阴性对照无扩增。

3.1.2 特异性 含小鼠个体基因组背景的高、低质控均有 GAPDH 基因的特异性扩增;含小鼠个体基因组背景的阴性对照样本,无扩增或检测低于定量下限;细胞样本检测拷贝数 ($104\ 401.7$ copies · μg^{-1} DNA) 高于定量下限。

3.1.3 标准曲线(线性和扩增效率) 10 个分析批,质粒标准品在 $12.5 \sim 1.25 \times 10^6$ copies · μL^{-1} 内,线性关系良好, r^2 介于 0.998 ~ 1.000 之间,扩增效率为 95.93% ~ 102.59%,满足线性和扩增效率要求。各浓度准确度介于 84.5% ~ 121.2% 之间。

3.1.4 精密度和准确度 批内:定量上限、高质控、中质控、低质控、定量下限样品批内准确度分别介于 81.5% ~ 111.7%、93.3% ~ 116.4%、82.1% ~ 111.7%、64.3% ~ 110.7%、59.9% ~ 107.5% 之间;批内精密度分别介于 3.5% ~ 17.3%、7.8% ~ 15.3%、6.1% ~ 18.8%、0.8% ~ 10.5%、2.8% ~ 17.3% 之间;批间:定量上限、高质控、中质控、低质控、定量下限样品批间准确度分别为 100.3%、102.0%、98.0%、87.6%、85.4%,批间精密度分别为 14.4%、13.0%、14.9%、16.8%、19.2%。

3.1.5 基因组 DNA 储存稳定性 与未处理样本相比,所有处理后 DNA 样本拷贝数偏差在 ±50% 内。

3.1.6 质粒储存稳定性 对质粒标准品工作液于室温 4 h 和 -60 °C 以下长期放置 4.5 个月处理样本进行琼脂糖凝胶电泳,结果见图 1,质粒样本无明显降解。

3.1.7 标准曲线样本稳定性 配制后立即检测标曲样本的扩增效率为 98.0%, r^2 值为 0.999; 4 °C

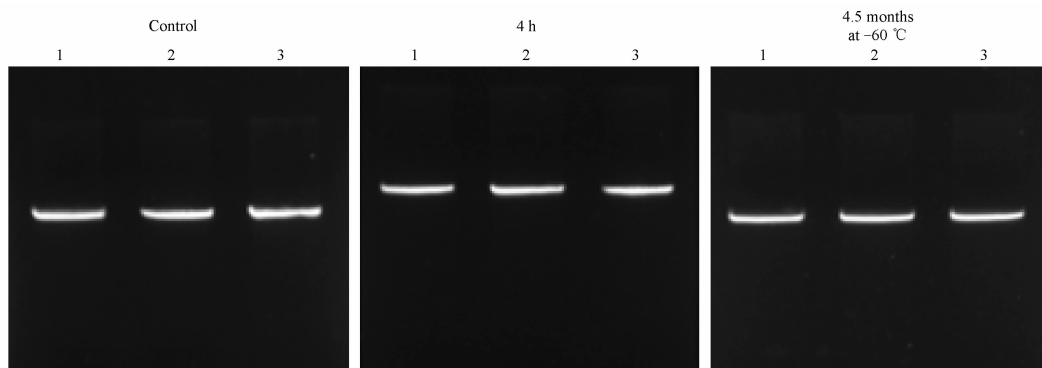


图1 不同时间点质粒电泳结果

Fig. 1 Electrophoretic results of plasmids at different time points

存放标曲样本的扩增效率为 102.1%, r^2 值为 0.999; 4 °C 存放标曲定量范围内各点 RE% 介于 91.6% ~ 115.8% 之间; 将 4 °C 存放标曲样本的各浓度点的值代入新鲜标曲计算拷贝数, 各浓度点 RE% 介于 76.4% ~ 110.8% 之间, 满足验证要求。

3.1.8 方法适用性 梯度稀释后标准曲线扩增效率为 91.57%, r^2 为 0.991, 满足方法适用性验证要求, 表明该方法适用于该品种 *GAPDH* 基因拷贝数检测。

3.2 qPCR 检测结果

TIL 在小鼠体内的生物分布情况见表 2, 根据 42 d 检测结果, 59 d 动物组织不再检测。NOG 小鼠

尾静脉给予细胞后, 主要分布于肺、血液、肝脏等组织, 其他组织组织分布较少。给药后 2 d 时, 肝脏、血液中目的拷贝数略有升高 (基因拷贝数均值分别为 2 304.2 和 6 009.5 copies · μg^{-1} DNA), 随后逐渐下降; 给药后 3 h 时, 肺组织中拷贝数达到最高 (基因拷贝数均值为 6 662.8 copies · μg^{-1} DNA), 随后逐渐下降。至给药 14 至 42 d, 仅有个别动物可检测到目的基因拷贝数, 多数组织均未检测到目的基因拷贝。肾、脂肪、肌肉、结肠、骨髓样本仅个别时间点检测到少量目的基因拷贝; 心脏、脑、生殖器官 (子宫、睾丸、卵巢、附睾)、胃、十二指肠于各时间点目的基因拷贝均低于定量下限。

表2 不同时间点动物组织中目的基因拷贝数。copies · μg^{-1} DNA

Tab. 2 Copy number of target genes in animal tissues at different time points. copies · μg^{-1} DNA

Organs	3 h		2 d		7 d		14 d		28 d		42 d	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Heart	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-
Liver	1 586.1	428.9	2 304.2	364.6	658.5	77.5	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-
Spleen	BLQ	-	1 176.8	268.0	1 042.5	-	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-
Lung	6 662.8	2 426.9	3 282.6	725.6	1 046.4	357.6	595.1	-	3 133.7	-	711.7	-
Kidney	812.5	198.9	755.5	223.8	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-
Brain	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-
Uterus	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-
Testis	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-
Ovary	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-
Epididymis	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-
Stomach	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-
Duodenum	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-
Fat	627.1	-	806.3	-	BLQ	-	473.1	-	BLQ	-	BLQ	-
Muscle	BLQ	-	515.4	-	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-
Colon	BLQ	-	744	-	BLQ	-	BLQ	-	1 294.1	-	BLQ	-
Bone marrow	899.4	-	760.3	17.1	592.9	80.6	BLQ	-	BLQ	-	BLQ	-
Blood	1 590.8	601.7	6 009.5	3 551.5	2 356	1 243.1	1 012.7	-	BLQ	-	BLQ	-

注: BLQ - 样本检测值低于定量下限; - - 无法计算。

Note: BLQ - the sample detection value is below the lower limit of quantification; - - it cannot be calculated.

3.3 外周血中 T 淋巴细胞表型流式检测结果

采用流式细胞术检测外周血中 5 000 个细胞中 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺ 细胞数量。在不同时间点检测 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺ 细胞,3 种细胞变化趋势一致。见图 2,给药后 30 min,即可检测到 3 种细胞,但与 CD3⁺ 和 CD3⁺CD4⁺ 细胞相比,CD3⁺CD8⁺ 细胞检出数量较少。与 1 h 时比,3 h 时 3 种细胞数量降低,给药后 1~2 d 时达到峰值(达到峰值细胞数量均值分别为 400、380 和 21),后逐渐降低,至给药后 28、42 和 59 d,3 种细胞数量接近于零。该结果与 qPCR 检测结果趋势一致,表 2 中血液检测结果显示,给药后 2 d,基因拷贝数最高,给药后 28 d 和 42 d,基因拷贝数均低于定量下限,提示流式检测结果可靠。

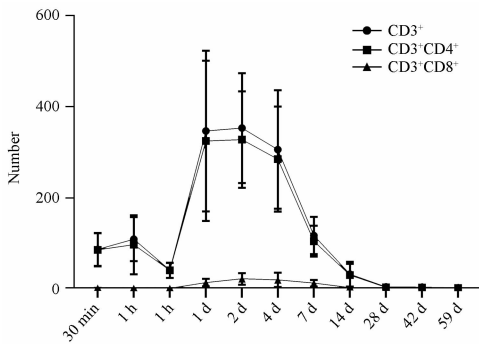


图 2 不同时间点动物外周血中细胞数趋势图。n=6, $\bar{x} \pm s$
Fig. 2 Trend of cell count in peripheral blood of animals at different time points. n=6, $\bar{x} \pm s$

4 讨论

美国国家癌症研究所在 20 世纪 80 年代便开始了 TIL 细胞治疗的开创性研究工作,研究中转移性黑色素瘤患者进行非骨髓淋巴细胞耗竭,后给予 TIL 和 IL-2,结果证实了 TIL 疗法的临床安全性和显著的疗效,高达 55% 的病人出现肿瘤消退^[9-10]。TIL 主要由 B 细胞 (CD19⁺CD20⁺)、T 细胞 (T cells TCR $\gamma\delta$ ⁺ 等) 和 NK 细胞组成,肿瘤微环境中的免疫抑制和免疫刺激作用由这种多样化的组成来表现,这是发挥抗肿瘤功能所必须的^[11]。有研究通过流式细胞术检测体外扩增的 TIL,发现 TIL 主要是以 CD8⁺T 或者 CD4⁺T 细胞为主,并且回输的 CD8⁺T 细胞大多数为效应记忆细胞,同时也发现含有少量的 CD3⁻CD56⁺NK 细胞^[12]。TIL 除用于肿瘤治疗外,也被认为是影响多种癌症疾病结果的预后因素,

可以用来预测患者的生存率,Shojaei 等^[13]收集乳腺癌患者肿瘤样本,经过临床组织病理学检查,确认肿瘤组织中淋巴细胞浸润的百分比,当淋巴细胞浸润超过 30%,采用免疫组化的方法检测 CD8⁺ 细胞毒性淋巴细胞,结果发现,CD8⁺ 细胞毒性淋巴细胞的存在与患者总生存期的改善密切相关。作为 TIL 细胞治疗方案的一部分,短疗程的 IL-2 给药为一种支持性治疗,用来增强回输后 T 细胞的活性和发育。不同于仅为治疗目的 IL-2 单药给药,通常在 TIL 重复给药治疗过程中给予高剂量 IL-2,因此治疗过程中极大可能出现与 IL-2 相关的毒性,如发热、低血压、肺水肿等,临床上需尽早监测和管理可能出现的不良反应^[14]。

本研究使用产品拟申报开展临床试验,细胞产品的生物分布和存续情况是影响其有效性和安全性的最重要因素,故按照相关指导原则要求,需开展细胞药动学研究,以评估细胞在体内的增殖情况以及分布、迁移、归巢和消除特征^[15]。因人源细胞无法在免疫系统功能正常小鼠中存活,故本研究使用重度免疫缺陷小鼠开展试验,并在单次给药后设置 6 个解剖点,动态观察单次给药后细胞在小鼠体内各个脏器的分布情况。流式细胞术是一种单细胞技术,根据细胞的复杂性和大小在混合悬浮液中分离出异质性细胞群,可以在单细胞水平上快速定量评估多种标志物的表达,能够高速检测 6~15 个参数^[16]。本研究采用流式细胞术检测该产品的主要成分 CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺ 细胞,可以反映细胞在血液中动态变化情况,同时使用 qPCR 方法检测小鼠血液和组织内的人 GAPDH 基因,经过方法学验证确认 qPCR 方法适用于本产品的检测。

本试验结果显示,小鼠血液中给药后 1~2 d CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺ 细胞数量达到峰值,均值分别为 400、380 和 21 个,与 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺ 细胞相比,CD3⁺CD8⁺ 细胞数量较少,且给药后 14 d 后,3 种细胞数量较低,均值分别为 31、29 和 2 个,给药后 28~42 d,细胞几乎检测不到。qPCR 检测结果也显示,在血液中,给药后第 2 天基因拷贝数最高,后逐渐降低,28 和 42 d 时,检测结果低于定量下限。在脏器中,除肺脏、血液、肝脏外,其他组织基因拷贝数均较少,且 42 d 解剖点时仅极个别动物个别脏器检测出目的基因拷贝数(考虑可能是动物个体差异造成的),其他动物脏器基因拷贝数均低于定量下限,提示该产品在重

度免疫缺陷小鼠体内存续时间可能不超过 42 d。生殖系统(子宫、卵巢、睾丸、附睾)各时间点检测值均低于定量下限,说明该产品出现生殖毒性风险较低。

TIL 传统的生产过程需要对特定的肿瘤识别能力进行检测,通常需要 6~8 周时间,然而 TIL 在体外长时间培养后容易耗竭,导致不能在病人体内存续较长时间,这可能是本产品在小鼠体内存续时间较短的原因。为提高 TIL 在体内的存活和功能,减少对高剂量 IL-2 的依赖,下一代基因修饰 TIL 正在研发中,通过病毒转导目的基因或者通过 CRISPR 或 TALEN 等技术敲除靶基因,例如插入 IL-2、IL-12 细胞因子或者敲除 PD-1 等^[17]。另外,也有研究表明,在 TIL 治疗过程中添加免疫检查点抑制剂(如伊匹木单抗和纳武单抗)联合给药,可以降低 IL-2 使用剂量,同时支持 TIL 在体外的最佳扩增,从而提高 TIL 疗法针对多种实体瘤的整体安全性和有效性^[18]。

综上,本研究采用流式细胞术和 qPCR 技术评估了 TIL 在重度免疫缺陷鼠体内的分布特征和存续情况。研究结果提示,TIL 在小鼠体内存续时间不超过 42 d,研究数据可支持其临床试验申请,目前该产品已通过国家药品监督管理局药品审评中心审评,进入临床试验阶段。

REFERENCES

- [1] GRANHJ J S, JENSEN A W P, PRESTI M, *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes for adoptive cell therapy: recent advances, challenges, and future directions [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2022, 22(5):627-641.
- [2] KUMAR A, WATKINS R, VILGELM A E. Cell therapy with TILs; training and taming T cells to fight cancer [J]. *Front Immunol*, 2021, 12:690499.
- [3] SIMPSON-ABELSON M R, D'ARIGO K, HILTON F, *et al.* 1053P Iovance generation-2 tumour-infiltrating lymphocyte (TIL) product is reinvigorated during the manufacturing process [J]. *Ann Oncol*, 2020, 31:S720.
- [4] OWENS G L, PRICE M J, CHEADLE E J, *et al.* *Ex vivo* expanded tumour-infiltrating lymphocytes from ovarian cancer patients release anti-tumour cytokines in response to autologous primary ovarian cancer cells[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2018, 67(10):1519-1531.
- [5] AMARIA R, KNISELY A, VINING D, *et al.* Efficacy and safety of autologous tumor-infiltrating lymphocytes in recurrent or refractory ovarian cancer, colorectal cancer, and pancreatic ductal ade-

nocarcinoma [J]. *J Immunother Cancer*, 2024, 12(2):e006822. DOI:10.1136/jitc-2023-006822.

- [6] MOROTTI M, ALBUKHARI A, ALSAADI A, *et al.* Promises and challenges of adoptive T-cell therapies for solid tumours[J]. *Br J Cancer*, 2021, 124(11):1759-1776.
- [7] VARGAS G M, SHAFIQUE N, XU X, *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes as a prognostic and predictive factor for Melanoma [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2024, 24(4):299-310.
- [8] CHESNEY J, LEWIS K D, KLUGER H, *et al.* Efficacy and safety of lifileucel, a one-time autologous tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) cell therapy, in patients with advanced melanoma after progression on immune checkpoint inhibitors and targeted therapies; pooled analysis of consecutive cohorts of the C-144-01 study[J]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(12):e005755. DOI:10.1136/jitc-2022-005755.
- [9] ROSENBERG S A, PACKARD B S, AEBERSOLD P M, *et al.* Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma[J]. *N Engl J Med*, 1988, 319(25):1676-1680.
- [10] TOPALIAN S L, SOLOMON D, AVIS F P, *et al.* Immunotherapy of patients with advanced cancer using tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant interleukin-2; a pilot study[J]. *J Clin Oncol*, 1988, 6(5):839-853.
- [11] LIN B, DU L, LI H, *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes: warriors fight against tumors powerfully[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 132:110873.
- [12] HIRAI I, FUNAKOSHI T, KAMIJUKU H, *et al.* Adoptive cell therapy using tumor-infiltrating lymphocytes for melanoma refractory to immune-checkpoint inhibitors[J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(8):3163-3172.
- [13] SHOJAEI S, AZNAB M, RAHIMI A, *et al.* Evaluation of the role of tumor-infiltrating lymphocytes and CD8⁺ cytotoxic lymphocytes in the survival of patients with breast cancer[J]. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*, 2023, 17(1):9-17.
- [14] BETOF WARNER A, HAMID O, KOMANDURI K, *et al.* Expert consensus guidelines on management and best practices for tumor-infiltrating lymphocyte cell therapy [J]. *J Immunother Cancer*, 2024, 12(2):e008735. DOI: 10.1136/jitc-2023-008735.
- [15] Center for drug evaluation. Guideline for Research and Evaluation of Cell Therapy Products (Trial). [EB/OL]. (2017-12-22) [2024-06-24]. <https://www.cde.org.cn/zdylz/domesticinfo?zdyldCODE=452c529b299638297210fe4a1294eb31>.
- [16] DELMONTE O M, FLEISHER T A. Flow cytometry: surface markers and beyond [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2019, 143(2):528-537.
- [17] WANG S, SUN J, CHEN K, *et al.* Perspectives of tumor-infiltrating lymphocyte treatment in solid tumors [J]. *BMC Med*, 2021, 19(1):140.
- [18] KVERNELAND A H, CHAMBERLAIN C A, BORCH T H, *et al.* Adoptive cell therapy with tumor-infiltrating lymphocytes supported by checkpoint inhibition across multiple solid cancer types [J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(10):e003499. DOI: 10.1136/jitc-2021-003499.

(收稿日期:2024-06-27)