

Ю.А. Гриневич
Н.Н. Храновская

Институт онкологии
АМН Украины, Киев, Украина

Ключевые слова:

иммунотерапия,
противоопухолевые вакцины,
дендритные клетки, рак
яичника, эффективность.

ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩИХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК В ИММУНОТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ

Резюме. Приведен аналитический обзор данных научной литературы по проблеме, а также результаты собственных исследований эффективности применения вакцин на основе антигенпрезентирующих дендритных клеток в комплексном лечении больных распространенным раком яичника.

Классическими методами лечения при опухолевых заболеваниях считаются хирургические вмешательства, химиотерапия и лучевая терапия. Однако в течение последних десятилетий отдаленные результаты применения этих методов в целом остаются без значительных изменений. Сегодня прогресс в лечении пациентов с онкологическими заболеваниями может быть связан с существенным прорывом в молекулярной биологии, иммунологии, биотехнологии, понимании причин возникновения опухолевого перерождения и закономерностей патогенетических механизмов развития опухолевого процесса. В организме существует целый ряд механизмов и систем, позволяющих ему противостоять появлению и развитию опухоли. К ним прежде всего относят иммунную систему, работа которой направлена на распознавание и элиминацию клеток, несущих признаки антигенного отличия от нормальных тканей человека. Следует отметить, что попытки стимуляции иммунной системы для лечения при

раке предпринимались давно и неоднократно. Однако лишь в последнее время на основе результатов изучения основных противоопухолевых реакций, механизмов их формирования и регуляции, возможных причин неэффективности иммунного ответа, идентификации опухолеассоциированных антигенов (АГ) удалось добиться определенных положительных результатов применения иммуностропных препаратов различной природы [1, 2]. Их применение наиболее эффективно при высокоиммуногенных опухолях: меланоме, раке мочевого пузыря и раке почки.

Современная классификация методов противоопухолевой иммунотерапии (ИТ) включает две категории воздействий: активные, индуцирующие иммунные реакции на клетки опухолей, и пассивные, при которых переносят в организм иммунологически активные субстанции, опосредующие противоопухолевый эффект. Активные и пассивные методы ИТ в свою очередь подразделяют на специфические и неспецифические (рис. 1).

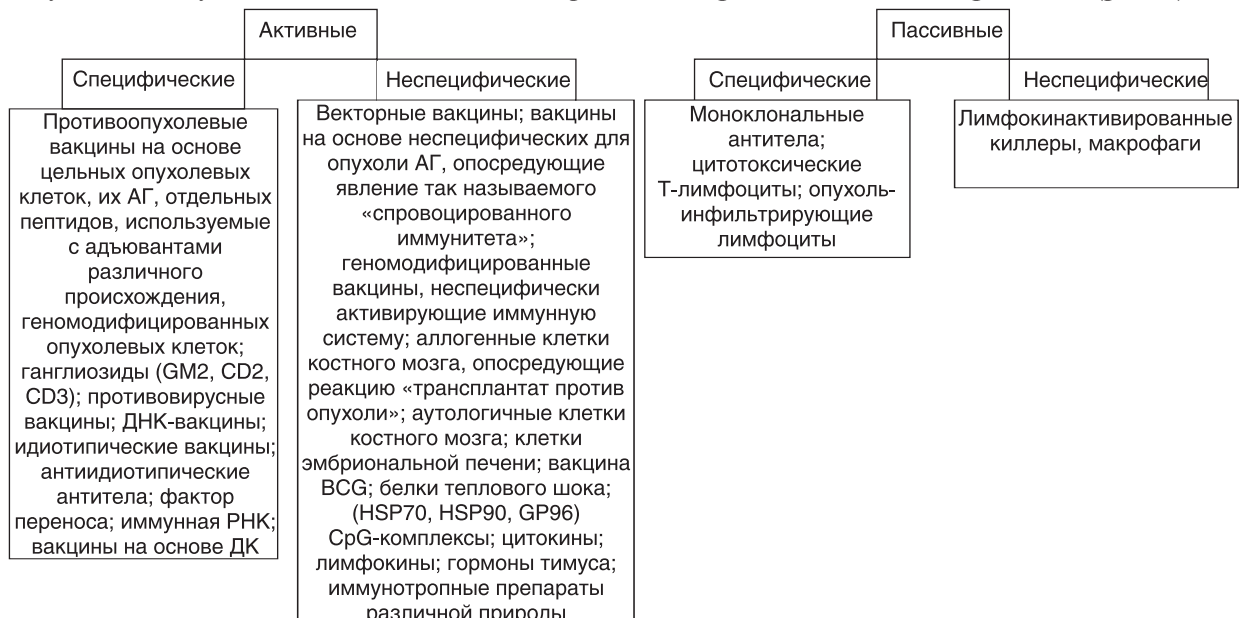


Рис. 1. Классификация методов противоопухолевой ИТ

ВЗГЛЯД НА ПРОБЛЕМУ

В отдельную группу выделяют методы адоптивной ИТ, принцип которой заключается в переносе клеточно-опосредованного иммунного ответа на АГ при помощи живых иммунокомпетентных клеток (лимфоцитов) или их субклеточных фракций [3]. В настоящее время в клинике используют методику активации собственных клеток иммунной системы вне организма с последующей реинфузией больному. Примером может служить введение цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), дендритных клеток (ДК), нагруженных опухолевым АГ, вызывающих индукцию ЦТЛ в организме, фактора переноса (диализованные экстракты лимфоцитов).

Перспективы существенного повышения эффективности противоопухолевой ИТ в настоящее время связывают с пассивной специфической ИТ моноклональными антителами и активной ИТ специфической ИТ противоопухолевыми вакцинами, основной целью которой является индукция и поддержание длительного иммунного ответа, направленного на распознавание и элиминацию опухолевых клеток [4, 5, 6]. Клинические исследования эффективности противоопухолевых вакцин у больных с опухолями различных локализаций проводятся в настоящее время во всех онкологических центрах мира.

ДК в составе противоопухолевых вакцин используют совместно с опухолевыми АГ в качестве мощного эндогенного адьюванта, который вызывает индукцию специфического иммунного ответа, опосредованного ЦТЛ, в организме реципиента. ДК-вакциноterapia относится к методам специфической активной ИТ, на которую в настоящее время возлагают большие надежды.

Стандартная процедура получения вакцины включает генерацию незрелых аутологических ДК путем инкубации их предшественников (CD34⁺-клеток, моноцитов) с цитокинами в различных комбинациях. Наиболее часто используют: ГМ-КСФ + ИЛ-4 и ГМ-КСФ + ФНО- α . Проходят испытания такие факторы как лиганд

Flt3, лиганд c-kit, TGF- β 1 и CD40L. Затем незрелые ДК нагружают опухолевыми АГ, инкубируют с факторами, индуцирующими их созревание (ЛПС, цитокины ИЛ-1, ГМ-КСФ и ФНО- α и др.), затем функционально полноценные клетки реинфузируют пациенту [7, 8].

Основные свойства ДК представлены на рис. 2. ДК принадлежат к уникальным АПК, которые поглощают АГ, процессируют их и представляют в комплексе с молекулами МНС I или II во вторичных лимфоидных органах для «ознакомления» (прайминга) «наивных» Т-клеток или активации Т-клеток со свойствами натуральных киллеров (НКТ) и НК-клеток. ДК — очень важное связующее звено между естественным и адоптивным иммунитетом, способны активировать первичный и вторичный иммунный ответ, индуцировать развитие иммунологической памяти [9–12]. В отличие от других АПК, ДК обладают несколькими дополнительными механизмами, позволяющими им представлять АГ в комплексе не только с молекулами МНС II класса, но и МНС I класса, что является ключевым моментом для мощной генерации ЦТЛ, способных инактивировать опухолевые клетки. Это так называемое перекрестное представление, когда АГ, обычно представляемые молекулами МНС II класса, могут быть представлены также и молекулами I класса [13, 14]. Схемы активации Т-лимфоцитов ДК представлены на рис. 3. Одновременно запускается цитокиновый каскад и включается второй активационный сигнал, опосредованный молекулами костимуляции B7, которые экспрессируются в большом количестве на поверхности зрелых ДК. Два сигнала существуют для того, чтобы избежать ответа на свои АГ. В случае злокачественных новообразований именно отсутствие второго сигнала зачастую делает невозможным формирование противоопухолевого ответа клетками иммунной системы.

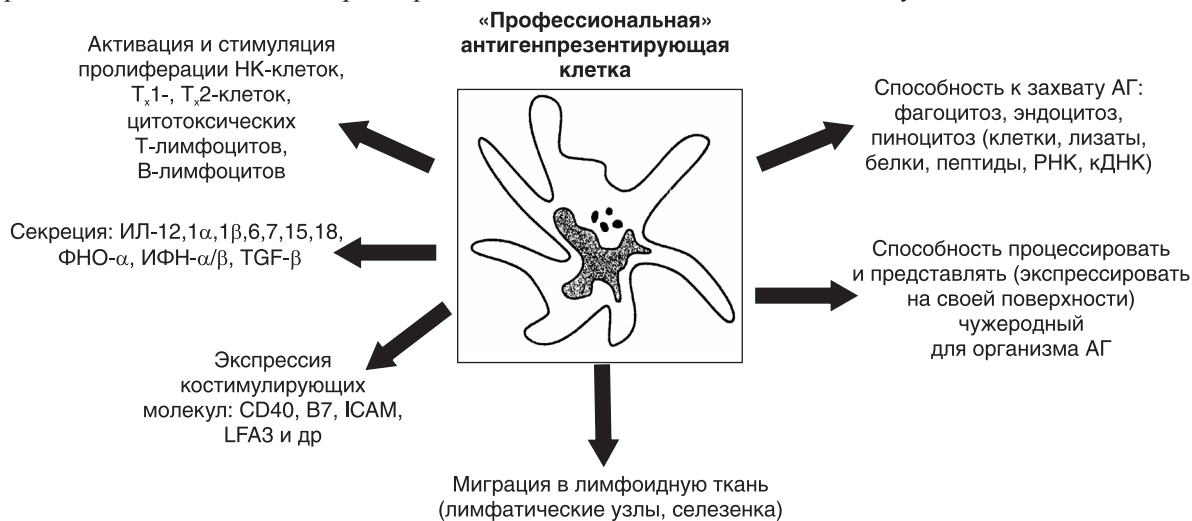


Рис. 2. Свойства ДК

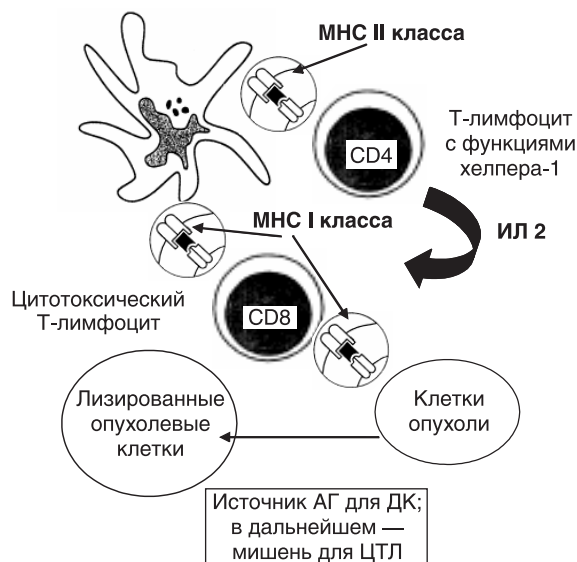


Рис. 3. Активация Т-лимфоцитов ДК

Исходя из вышеизложенного, можно предположить, что возможными механизмами реализации эффекта ДК-вакцинотерапии может быть обеспечение достаточной иммуногенности опухолевых АГ; создание условий для их эффективной презентации; преодоление местной или системной иммуносупрессии [15, 16].

Существуют разные методы получения ДК-вакцин [17, 18, 19]: нагрузка ДК пептидами АГ опухолей; рецепторопосредованное поглощение макромолекулярного АГ; трансфекция ДК РНК опухоли, кодирующее АГ, плазмидной ДНК, вирусными векторами; обеспечение взаимодействия с некротизованными опухолевыми клетками или их отдельными фракциями, с апоптотическими опухолевыми клетками; образование химер ДК с опухолевыми клетками; использование экзосом.

Все еще не прекращаются попытки получения универсальной ДК-вакцины против широкого спектра опухолей. Для этих целей необходимо осуществить выбор подходящего опухолевого АГ для «нагрузки» ДК. Интерес исследователей в этом плане привлек опухолеассоциированный АГ MUC-1, экспрессирующийся на клетках многих эпителиальных опухолей (рак поджелудочной, молочной железы, рак почки и др.) и антигены, кодируемые такими генами, как *MAGE*, *BAGE* и *GAGE*, экспрессируемые клетками опухолей различных гистологических типов, но отсутствующие в клетках нормальных тканей; полипептидный компонент теломеразы — ее каталитическая субъединица — обратная транскриптаза (TERT), так как теломераза не активна в нормальных тканях, но реактивируется более чем в 85% типов опухолей.

ДК уже достаточно широко используют для индукции и получения большого количества антигенспецифических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) не только *in vivo*, но и *in vitro* [20, 21, 22]. При этом

сообщается о довольно высокой частоте стабилизации или регрессии опухоли или метастатических узлов, повышении продолжительности жизни больных онкологического профиля после их введения.

Первые попытки экспериментальной вакцинации ДК животных с опухолями были проведены в конце 1980 г. Успешно проведенные исследования способствовали дальнейшему развитию технологии вакцинотерапии ДК и ее использованию в клинике. Первые результаты клинических попыток использования ДК, нагруженных опухолевым АГ, для терапии больных злокачественными новообразованиями были описаны в 1996 г. у пациентов с неходжкинской В-клеточной лимфомой. У всех больных отмечали усиление специфического противоопухолевого иммунного ответа. Из четырех исследованных случаев у одного пациента определяли полную регрессию опухоли, у другого — частичную. В этом же году вакцинацию ДК получили больные метастатическим раком простаты, а в 1998 г. — меланомой.

В настоящее время клиническая эффективность противоопухолевых вакцин на основе ДК уже показана на большой группе больных, в частности с неходжкинской В-клеточной лимфомой, при локализованной и метастатической меланоме, при раке различной локализации, в том числе при раке яичника и миеломной болезни [23, 24, 25]. При этом использовались ДК различного происхождения (аутологичные и аллогенные), полученные из мононуклеаров периферической крови или костного мозга, различные способы нагрузки АГ. Для достижения эффекта вводилось от 2,6 до 37,6 млн зрелых ДК однократно или за несколько раз (от 3 до 15) с различными временными интервалами (от 3 нед до нескольких месяцев) [26]. ДК, нагруженные АГ, вводили в метастатические лимфоузлы, перитуморально, внутривенно, внутрикожно или подкожно [27]. Показано, что способ введения ДК существенно влияет на их распределение в лимфоидной ткани, и это необходимо учитывать в каждой конкретной клинической ситуации [28].

В большинстве случаев ДК-вакцинотерапия не сопровождается развитием серьезных побочных эффектов, однако в единичных случаях у больных меланомой все же имело место развитие аутоиммунной патологии. Еще одной достаточно серьезной проблемой ДК-вакцинотерапии является возможность индукции толерантности к опухоли в случае использования ДК с толерогенными свойствами, особенно велик риск при использовании клеток недостаточной степени зрелости [29, 30]. Остается также много нерешенных проблем, связанных с методами изготовления ДК-вакцин, выбором опухолевого АГ, конструированием наиболее эффективных протоколов их применения с учетом режимов и способов введения,

ВЗГЛЯД НА ПРОБЛЕМУ

качества и количества используемых клеток. Остаются актуальным поиск методов мониторинга, в частности иммуномониторинга проводимой ДК-вакцинотерапии, что позволило бы подходить к данному методу биотерапии опухолей на объективной основе и прогнозировать успех или неудачу планируемого вида лечения.

Как показывает накопленный клинический опыт, для достижения эффективности ДК-вакцинотерапии необходимы максимальное уменьшение размеров опухоли (циторедуктивные операции, химио-, лучевая терапия), достаточная иммунокомпетентность организма-опухоленосителя и одновременная активная неспецифическая иммунотерапия: введение FLT-3L, ГМ-КСФ, низких доз ИЛ-1,2,7,12, интерферона- γ , антител к CTLA-4, что позволит усилить противоопухолевый иммунитет и предотвратить рецидив либо отдалить его.

Между тем следует отметить, что в процессе клинических испытаний противоопухолевые вакцины применяли больным лишь на запущенной стадии заболевания и зачастую при отсутствии успеха от стандартной терапии, то есть фактически в клинике эти вакцины до сих пор полноценно не апробировались. Многие испытания пока прошли лишь первую фазу и не включали контрольные группы. Можно предположить, что применение противоопухолевых ДК-вакцин будет более эффективно у больных со злокачественными новообразованиями на ранних стадиях процесса после проведения циторедуктивного лечения и адекватных иммунокорректирующих мероприятий [31].

Нами разработаны технологии генерации зрелых ДК из моноцитов периферической крови и раневого экссудата пациентов распространенным раком яичника (РРЯ), основой которой является культивирование предшественников в присутствии ГМ-КСФ в течение 6 сут с последующей нагрузкой лизатом аутологических опухолевых клеток в течение 2 сут и индукцией конечного созревания с помощью ФНО- α . Схема генерации ДК представлена на рис. 4.

Выбирая лизат опухолевых клеток в качестве источника опухолевых АГ для нагрузки ДК, мы руководствовались тем, что такая многокомпонентная смесь наряду с неспецифическими со-

держит и специфические (уникальные) опухолевые АГ, которые экспрессируются конкретной опухолью, а следовательно, являются более иммуногенными и могут обеспечить формирование стойкого противоопухолевого иммунитета.

Степень зрелости ДК является важным параметром для определения клинической эффективности терапии такого типа, поскольку предопределяет индукцию иммунного ответа [16, 32]. Известно, что у больных онкологического профиля функциональная активность и генерация ДК из предшественников, как правило, осложнена, а взаимодействие опухолевых клеток и ДК может обусловить гибель последних вследствие апоптоза [33]. Проводимая противоопухолевая химиотерапия также может быть причиной снижения генерации и степени зрелости ДК у больных с РРЯ, что может лимитировать применение ДК ИТ у данной группы пациентов. Поэтому одним из основных моментов генерации ДК была оптимизация их дозревания. В результате проведенных предварительных исследований мы пришли к выводу, что клетки достаточно высокой степени зрелости и функционально активные у больных с РРЯ можно получить между проведением первых 3 курсов полихимиотерапии (ПХТ); в последующем не менее чем через 3 мес после окончания ее последнего курса (всего больные получают 6 курсов ПХТ).

Использование данной технологии позволяет получать ДК, характеризующиеся следующими свойствами: экспрессия CD86, HLA-DR-АГ; отсутствие экспрессии CD3, CD16, CD20, CD14-АГ; высокий уровень экспрессии BCL-2; после нагрузки опухолевым АГ сохраняют пролиферативную активность и обладают высоким уровнем активности в аллогенной смешанной культуре лейкоцитов.

ДК-вакцинотерапия проведена 27 больным с РРЯ, которые находились на лечении в отделении онкогинекологии Института онкологии АМН Украины (проф. Л.И. Воробьева, к.м.н. Н.П. Цип, к.м.н. В.С. Свинцицкий), по разработанному нами протоколу (рис. 5). Внутривенный путь введения ДК, нагруженных лизатом опухолевых клеток, выбрали в результате проведенных экспериментальных исследований как самый эффективный в отношении торможения развития ме-

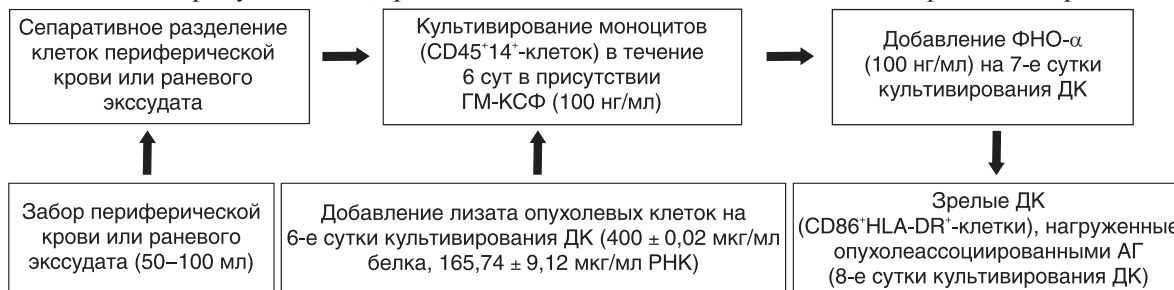


Рис. 4. Схема получения ДК-вакцины

тастазов. Учитывая, что у большинства больных выявлена III–IV стадия заболевания, ДК-вакциноterapia начинали как можно раньше после проведения хирургического вмешательства, между курсами ПХТ. Пациенты получили 2–11 вакцинаций (в среднем 5). Серьезных побочных эффектов не отмечали, только кратковременное повышение температуры тела и озноб.

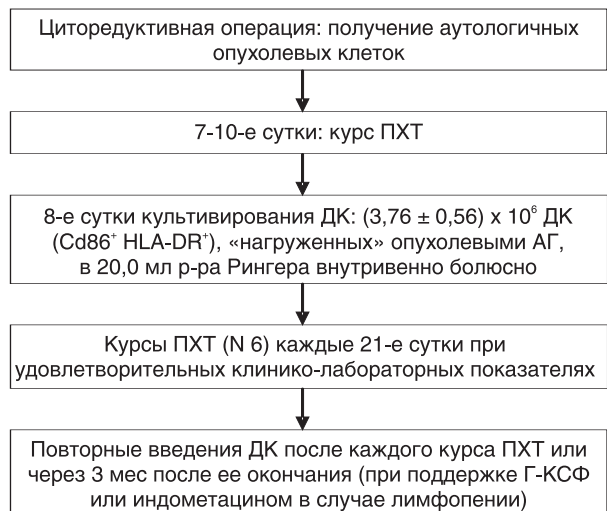


Рис. 5. Протокол использования ИТ аутологичными ДК в лечении больных РРЯ

Проведение ДК-вакциноterapia пациентам с РРЯ сопровождалось существенным иммунологическим эффектом, в частности увеличением общего количества лимфоцитов в периферической крови и их отдельных субпопуляций — CD8⁺, CD4⁺, CD16⁺-лимфоцитов, количества активированных лимфоцитов, то есть HLA-DR⁺, CD38⁺.

ДК-вакциноterapia улучшила показатели 1- и 2-летней выживаемости больных. Так, выживаемость пациенток, получивших ДК-вакциноterapia, в течение года составила 89%, а в группе сравнения — 81%, 2-летняя выживаемость соответственно — 46 и 10% ($p = 0,01$).

Таким образом ДК-вакциноterapia сопровождается определенным иммунологическим и клиническим эффектом, что открывает перспективы применения данного метода при лечении других злокачественных низкоиммуногенных новообразований. Мы предполагаем, что более высокая эффективность может быть достигнута при ее применении у больных с менее распространенными стадиями заболевания.

Сегодняшнее состояние специфической активной противоопухолевой ИТ, основанной на применении ДК, можно определить как завершение начального этапа, когда необходимо было доказать целесообразность применения этого метода в онкологии. ДК-вакциноterapia сочетает эффективность и относительную безопасность метода, что контрастирует с выраженными побочными эффектами химиотерапии.

Безусловно, в дальнейшем фундаментальные исследования, направленные на раскрытие меха-

низмов регуляции противоопухолевого иммунного ответа, а также новые биотехнологические решения позволят разработать более эффективные и универсальные средства специфической ИТ. Прогресс вакциноterapia связан с расширением спектра идентифицированных опухолевых АГ, созданием их иммуногенных форм. Перспективы этого метода зависят и от создания новых, более мощных адъювантов, изучения их механизма действия. Можно предположить, что уже в недалеком будущем специфическая активная ИТ станет частью комплексного лечения при раке, обеспечивающей существенное повышение выживаемости и безрецидивного периода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коростелев СА. Противоопухолевые вакцины. Современная онкология 2003; 5 (4): 15–9.
2. Балдуева ИА. Противоопухолевые вакцины. Практическая онкология. Биотерапия злокачественных опухолей 2003; 4 (3): 157–66.
3. Гриневич ЮА. Адоптивная иммунотерапия и ее влияние на эффективность лечения больных онкологического профиля. Онкология 2003; 5 (2): 90–5.
4. Biragyn A, Kwak LW. Designer cancer vaccines are still in fashion. Nat Med 2000; 6 (9): 966–8.
5. Моисеенко ВМ. Моноклональные антитела в лечении злокачественных опухолей. Практическая онкология. Биотерапия злокачественных опухолей 2003; 4 (3): 148–56.
6. Finn OJ. Cancer vaccines: between the idea and the reality. Nat Rev Immun 2003; 3: 630–41.
7. Москалева ЕЮ, Северин СЕ. Перспективы создания противоопухолевых вакцин с использованием дендритных клеток человека. Иммунология 2002; 1: 8–15.
8. Птушкин ВВ. Дендритические клетки и роль цитокинов в их дифференцировке и функционировании. В: Клиническая онкогематология. Руководство для врачей. Москва, 2001: 72–6.
9. Пашенков МВ, Пинегин БВ. Основные свойства дендритных клеток. Иммунология 2001; 4: 7–16.
10. Fujii S, Liu K, Smith C, et al. The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. J Experim Med 2004; 199 (12): 1607–18.
11. Zitvogel L. Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity. J Experim Med 2002; 195 (3): 9–14.
12. Broeke LT, Daschbach E, Thomas EK, et al. Dendritic cell-induced activation of adaptive and innate antitumor immunity. J Immun 2003; 171: 5842–52.
13. Heath WR, Belz GT, Behrens GMN, et al. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. Immun Rev 2004; 199: 9–26.
14. Ackerman AI, Cresswell P. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. Nat Immun 2004; 5 (7): 678–84.
15. Zhang S, Wang Q, Li W-F, et al. Different antitumor immunity roles of cytokine activated T lymphocytes from naïve murine splenocytes and from dendritic cells-based vaccine primed splenocytes: implications for adoptive immunotherapy. Exp Oncol 2004; 26 (1): 55–62.
16. Whiteside T, Odoux C. Dendritic cell biology and cancer therapy. Cancer immun 2004; 53 (3): 240–8.

17. **Strome SE, Voss S, Wilcox R, et al.** Strategies for antigen loading of dendritic cells to enhance the antitumor immune response. *Cancer Res* 2002; **62**: 1884–9.

18. **Sauter B, Albert ML, Francisco L, et al.** Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 2000; **191** (3): 423–33.

19. **Iyoda T, Shimoyama S, Liu K, et al.** The CD8⁺ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J Experim Med* 2002; **195** (10): 1289–302.

20. **Kurokawa T, Oelke M, Mackensen A.** Induction and clonal expansion of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes from renal cell carcinoma patients after stimulation with autologous dendritic cells loaded with tumor cells. *Int J Cancer* 2001; **91** (6): 749–56.

21. **Fonteneau J-F, Larsson M, Somersan S, et al.** Generation of high quantities of viral and tumor-specific human CD4⁺ and CD8⁺ T-cells clones using peptide pulsed mature dendritic cells. *J Immun Methods* 2001; **258** (1–2): 111–28.

22. **Shibagaki N, Udey MC.** Dendritic cells transduced with protein antigens induce cytotoxic lymphocytes and elicit antitumor immunity. *J Immun* 2002; **168**: 2393–401.

23. **Гриневич ЮА, Храновская НН.** Дендритные клетки и перспективы их использования в иммунотерапии больных со злокачественными новообразованиями. *Журн АМН Украины* 2003; **9** (4): 736–53.

24. **Byrne SN, Hallyday GM.** Dendritic cells: making progress with tumor regression? *Immun Cell Biol* 2002; **80**: 520–30.

25. **Cranmer LD, Trevor K, Hersh EM.** Clinical applications of dendritic cell vaccination in the treatment of cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2004; **53** (4): 275–306.

26. **Rains N, Cannan PJ, Chen W, Stubbs RS.** Development of a dendritic cell (DC) — based vaccine for patients with advanced colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2001; **48** (38): 347–51.

27. **Gilliet M, Kleinhans M, Lantelme E, et al.** Intranodal injection of semimature monocyte-derived dendritic cells induces T helper type 1 responses to protein neoantigen. *Blood* 2003; **9** (1): 3093–5.

28. **Morse MA, Coleman RE, Akabani G, et al.** Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. *Cancer Res* 1999; **59** (1): 56–8.

29. **Moser M.** Dendritic cells in immunity and tolerance — do they display opposite functions? *Immunity* 2003; **19**: 5–8.

30. **Steinman RM, Nussenzweig MC.** Avoiding horror autotoxicus: The importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Nat Acad Sci USA* 2002; **99** (1): 351–8.

31. **Lake RA, Robinson BWS.** Immunotherapy and chemotherapy — a practical partnership. *Nat Rev Cancer* 2005; **5**: 397–405.

32. **McIlroy D, Gregoire M.** Optimizing dendritic cell-based anticancer immunotherapy: maturation state does have clinical impact *Cancer Immunol. Immunother* 2003; **52**: 583–91.

33. **Севко АЛ.** Аналіз властивостей дендритних клітин кістково-мозкового походження при розвитку експериментальної лімфоми. [Автореф дис ... канд біол наук] Київ, 2004. 20 с.

VACCINES ON THE BASE OF ANTIGEN PRESENTING DENDRITIC CELLS FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER PATIENTS

Yu.A. Grinevich, N.N. Khranovskaya

Summary. *Analytical review of the data of literature concerning the problem, and the results of own studies on the efficacy of the use of vaccines on the base of antigen presenting dendritic cells for combined therapy of the patients with advanced ovarian cancer are presented.*

Key Words: immunotherapy, cancer vaccines, dendritic cells, ovarian cancer, efficacy.

Адрес для переписки:

Гриневич Ю.А.
03022, Киев, ул. Ломоносова, 33/43
Институт онкологии АМН Украины,
отдел клинической иммунологии
E-mail: ioamsu@ukr.net