

СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ  
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК

УДК

№ госрегистрации

Инв.№

УТВЕРЖДАЮ  
Директор ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН,  
академик РАМН  
\_\_\_\_\_ В.А. Козлов  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 2012 г.

ОТЧЕТ  
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ  
по Государственному контракту от 01 сентября 2010 г. № 14.740.11.0007

по теме:  
РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ СОЗДАНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ВАКЦИН НА БАЗЕ  
ИННОВАЦИОННЫХ ПОДХОДОВ ГЕНЕРАЦИИ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК С  
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНТЕРФЕРОНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ И  
ИНФЕКЦИОННЫХ (ВИРУСНЫХ) ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

Наименование этапа:  
ОЦЕНКА ПЕРЕНОСИМОСТИ И КЛИНИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИН НА  
ОСНОВЕ ИФН-ДК В ЛЕЧЕНИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО  
МОЗГА  
(итоговый, 6 этап)

Руководитель работ  
Член-корр. РАМН, проф., д.м.н.

\_\_\_\_\_ Е.Р. Черных  
подпись

Новосибирск 2012

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

<b>Руководитель работ</b> Член-корр. РАМН, проф., д.м.н.	_____	Е.Р. Черных (все разделы отчета)
	подпись	
<b>Исполнители</b>		
гл.н.с., проф., д.м.н.	_____	А.А. Останин (все разделы отчета)
	подпись	
вед.н.с., д.м.н.	_____	Н.А. Хонина (раздел 2.1)
	подпись	
с.н.с., д.м.н.	_____	О.Ю. Леплина (разделы 1, 2.1, 2.2, 3)
	подпись	
с.н.с., к.м.н.	_____	Е.Я. Шевела (раздел 2.2)
	подпись	
с.н.с., к.м.н.	_____	М.А. Тихонова (разделы 2.1, 2.2)
	подпись	
с.н.с., к.б.н.	_____	Л.В. Сахно (разделы 2.1, 2.2)
	подпись	
зав. отделением Клиники иммунопатологии, к.м.н.	_____	Н.М. Старостина (разделы 2.1, 2.2)
	подпись	
врач-ординатор Клиники иммунопатологии, к.м.н.	_____	О.И. Желтова (разделы 2.1, 2.2)
	подпись	
врач-ординатор Клиники иммунопатологии	_____	М.В. Шипунов (разделы 2.1, 2.2)
	подпись	
м.н.с., к.б.н.	_____	Т.В. Тыринова (разделы 2.1, 2.2)
	подпись	
м.н.с.	_____	Е.В. Баторов (раздел 2.1)
	подпись	
студент НГМУ	_____	А.Е. Горбачева (раздел 2.1)
	подпись	
студент НГМУ	_____	О.М. Павлова (раздел 2.1)
	подпись	
студент НГМУ	_____	С.Э. Сланова (раздел 2.1)
	подпись	
студент НГМУ	_____	С.И. Ворошилов (раздел 2.1)
	подпись	
нормоконтролер	_____	Н.В. Сычева
	подпись	
<b>Соисполнители</b>		
Руководитель темы в Институте цитологии и генетики СО РАН, зав. лабораторией, д.б.н.	_____	С.С. Богачев (разделы 2.3, 2.4, 2.5)
	подпись	
н.с., к.б.н.	_____	А.С. Проскурина (разделы 2.4, 2.5)
	подпись	

н.с., к.б.н.	_____	К.Е. Орищенко (разделы 2.3, 2.5)
	подпись	
аспирант	_____	Е.А. Алямкина (разделы 2.4, 2.5)
	подпись	
аспирант	_____	Е.В. Долгова (разделы 2.4, 2.5)
	подпись	
аспирант	_____	А.В. Прокопенко (разделы 2.4, 2.5)
	подпись	
студент НГМУ	_____	Т.С. Гвоздева (разделы 2.4, 2.5)
	подпись	
студент НГУ	_____	Т.Б. Маланханова (разделы 2.4, 2.5)
	подпись	
студент КарГУ	_____	Е.А. Лебедева (разделы 2.4, 2.5)
	подпись	
студент НГУ	_____	А.М. Минкевич (разделы 2.4, 2.5)
	подпись	

## Реферат

Отчет 73 с., 12 таблиц, 8 рисунков, 42 источника, 2 приложения.

Ключевые слова – дендритные клетки, интерферон- $\alpha$ , двуцепочечная ДНК человека, иммунотерапия, вакцины, злокачественные опухоли головного мозга.

Объектом исследования являются дендритные клетки человека.

Целью настоящего этапа явилось завершение и анализ результатов пилотных клинических исследований по оценке переносимости и клинической эффективности вакцин на основе интерферон-альфа-индуцированных дендритных клеток (ИФН-ДК) в лечении злокачественных опухолей головного мозга. В рамках тематики этапа предполагалось решить следующие задачи: 1) Завершение пилотных клинических испытаний; 2) Формирование отчетной документации по лечению злокачественных опухолей головного мозга; 3) Оценка переносимости и безопасности ДК-вакцин; 4) Оценка изменения цитокинового баланса у больных с онкопатологией, участвующих в исследованиях препарата Панаген на II фазе Клинических испытаний; 5) Определение соотношения некоторых поверхностных маркеров у больных с онкопатологией, участвующих в исследованиях препарата Панаген на II фазе Клинических испытаний.

Было установлено, что иммунотерапия на основе ИФН-ДК у больных со злокачественными опухолями головного мозга сопровождается индукцией специфического иммунного ответа (усилением пролиферативного ответа мононуклеарных клеток и появлением реакции гиперчувствительности замедленного типа в ответ на опухолевые антигены). Отсутствие выраженных побочных реакций, улучшение показателей качества жизни и выживаемости свидетельствует о безопасности и клинической эффективности ДК вакцин в лечении больных с онкопатологией.

Также была проведена оценка изменения цитокинового баланса у больных с онкопатологией, участвующих в исследованиях препарата «Панаген», характеризующегося специфическим воздействием на ДК,

которое приводит к активации иммунных свойств этих клеток. Оценка полученных данных на настоящем этапе исследования свидетельствует о следующих тенденциях в изменении цитокинового профиля у исследуемых больных. У всех больных, находящихся в испытании, базовый уровень цитокинов многократно выше, чем у здоровых доноров. Это факт связан с активацией иммунной системы развитием основного заболевания. При спонтанной индукции мононуклеаров периферической крови наблюдается существенное увеличение продукции ИЛ-10 и ФНО- $\alpha$  при использовании препарата «Панаген» на фоне трех непрерывных химиотерапий по схеме FAS. При этом умеренно возрастает продукция таких цитокинов как ИЛ-6, MCP, ИЛ-18, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-1RA. На продукцию VEGF и ИЛ-8 препарат «Панаген» действия не оказывает. Митогенактивированная продукция цитокинов мононуклеарами крови пациентов имеет дополнительные характеристики по сравнению со спонтанной. Проведенный анализ демонстрирует существенное увеличение продукции таких цитокинов как ИЛ-10 и ИФН- $\gamma$ . Умеренно увеличивается продукция цитокинов ФНО- $\alpha$ , ИЛ-8, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-18, ИЛ-6, MCP, ИЛ-1RA. На продукцию цитокинов VEGF и ИЛ-8 препарат «Панаген» действия не оказывает.

Была проведена оценка соотношения CD34+/45+ поверхностных маркеров, характерных для клеток предшественников гемопоэза, у больных с онкопатологией, участвующих в клинических исследованиях второй фазы препарата Панаген. Показано, что у 50% пациентов в группе «Панаген» количество гемопоэтических стволовых клеток в периферической крови на 7 сутки после 1 химиотерапии достоверно больше, чем в группе «Плацебо».

В целом, проведенные исследования обосновывают новые подходы в лечении инфекционных (вирусных) и онкологических заболеваний с использованием аутологичных ДК-вакцин.

Степень внедрения – разработана необходимая регламентирующая документация – протокол клинических исследований, форма информированного согласия, стандарты операционных процедур (SOPs)

получения дендритноклеточных вакцин, проведения вакцинотерапии, оценки антиген-специфического иммунного ответа.

Рекомендации по внедрению результатов НИР – требуется подготовить и утвердить новую медицинскую технологию по использованию дендритноклеточных вакцин в лечении хронической и часто рецидивирующей герпесвирусной инфекции, а также в лечении злокачественных опухолей.

Область применения – клиники и специализированные медицинские центры по борьбе с хроническими вирусными инфекциями; онкологические центры, диспансеры.

Результаты проведенной работы научно обосновывают целесообразность использования ИФН-ДК в качестве клеточной основы при создании индивидуальных лечебных вакцин, которые могут быть использованы в комплексной терапии больных со злокачественными опухолями головного мозга для индукции/усиления противоопухолевого иммунного ответа.

Экономическая эффективность или значимость работы заключается в том, что результаты работы могут быть использованы для создания новой медицинской технологии применения индивидуальных дендритноклеточных вакцин для лечения онкологических и инфекционных (вирусных) заболеваний человека, которая после регистрации в Росздравнадзоре может быть внедрена в практическое здравоохранение.

Результаты, полученные в ходе реализации проекта, используются в виде разделов курса иммунологии, читающегося на кафедре иммунологии Новосибирского государственного медицинского университета, и курса клинической иммунологии, читающегося студентам 4 курса медицинского факультета Новосибирского государственного университета, а также в виде лекционного материала в обучении клинических ординаторов и аспирантов НИИ клинической иммунологии СО РАМН.

Предусмотренные календарным планом задания выполнены полностью.

## Содержание

Определения, обозначения и сокращения .....	8
Введение .....	9
Основная часть .....	14
1 Литературный обзор .....	14
2 Результаты и обсуждение .....	18
2.1 Завершение пилотных клинических испытаний.....	18
2.1.1 Оценка антигенспецифического иммунного ответа у больных злокачественными глиомами.....	24
2.1.2 Оценка клинического эффекта иммунотерапии у больных ЗОГМ .....	27
2.1.3 Клинический пример.....	32
2.2 Формирование отчетной документации по лечению злокачественных опухолей головного мозга.....	35
2.2.1 Протокол клинических испытаний «Специфическая иммунотерапия в комплексном лечении злокачественных опухолей головного мозга».....	35
2.2.2 Стандарты операционных процедур (SOPs) .....	38
2.3 Оценка переносимости и безопасности ДК-вакцин .....	41
2.4 Оценка изменения цитокинового баланса у больных с онкопатологией, участвующих в исследованиях препарата Панаген на II фазе Клинических испытаний.....	42
2.5 Определение соотношения некоторых поверхностных маркеров у больных с онкопатологией, участвующих в исследованиях препарата Панаген на II фазе Клинических испытаний .....	48
3 Обобщение результатов по итогам всего проекта .....	52
Заключение .....	62
Список использованных источников .....	65
ПРИЛОЖЕНИЕ А .....	71
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	72

## Определения, обозначения и сокращения

ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа

ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

ДК – дендритные клетки

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЗОГМ – злокачественные опухоли головного мозга

ИЛ – интерлейкин

ИЛ4-ДК – дендритные клетки, полученные в присутствии интерлейкина-4

ИФН – интерферон

ИФН-ДК – дендритные клетки, полученные в присутствии интерферона- $\alpha$

МНК – моноклеарные клетки

ППД – туберкулиновый очищенный белковый дериват

ФНО $\alpha$  – фактор некроза опухоли- $\alpha$

CD – кластер дифференцировки

Th0, Th1, Th2 – субпопуляции Т-хелперных клеток

## Введение

Дендритные клетки (ДК) являются высокоспециализированными антигенпрезентирующими клетками, способными индуцировать иммунный ответ против различных антигенов, включая опухолевые и вирусные антигены. Соответственно технологии генерации ДК и использования их в качестве индивидуальных вакцин рассматриваются в качестве перспективных клеточных технологий, направленных на усиление противоопухолевого и противовирусного иммунитета.

Тем не менее, ДК представляют собой гетерогенную популяцию клеток, различающихся по степени зрелости (незрелые, частично-зрелые или зрелые ДК) и соответственно, по уровню функциональной активности. Кроме того, ДК в культуре *in vitro* могут быть получены с использованием различных протоколов, например, либо в присутствии ГМ-КСФ и ИЛ-4 (ИЛ4-ДК) или в присутствии ГМ-КСФ и ИФН- $\alpha$  (ИФН-ДК). Важнейшим отличием применения ИФН- $\alpha$  для активации и получения ДК *in vitro* от классического индуктора ИЛ-4, является более физиологичный путь генерации ДК, поскольку ИФН- $\alpha$  является ранним медиатором врожденного иммунитета, тогда как продукция ИЛ-4 в высоких дозах *in vivo* представляется маловероятной.

По нашим данным, полученным в ходе выполнения предыдущих этапов работы, ИФН-ДК имеют ряд преимуществ:

- 1) генерируются быстрее по времени;
- 2) характеризуются высокой способностью к захвату антигена (поскольку имеют фенотип «частично зрелых» клеток), сохраняя при этом антиген-презентирующую активность (т.к. экспрессируют костимуляторные молекулы [CD86] и молекулы главного комплекса гистосовместимости [HLA-DR]);
- 3) обладают цитотоксическим потенциалом, поскольку экспрессируют молекулы B7-H1 и TRAIL, и отличаются повышенным содержанием плазмацитоидных CD123+ ДК;

4) сохраняют функциональную стабильность и способны эффективно индуцировать реакции клеточного и гуморального иммунитета, поскольку активно секретируют Th1/провоспалительные (ИФН- $\gamma$ , ИЛ-2, ИЛ-17, ИЛ-1 $\beta$ ) и Th2/противовоспалительные цитокины (ИЛ-10, ИЛ-5), а также ростовые гемопозитические факторы (Г-КСФ) и хемокины (MCP-1);

5) ИФН-ДК обладают схожей с ИЛ-4-ДК способностью активировать Т-клетки к продукции Th1/провоспалительных (ИЛ-2, ИЛ-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$ , ИЛ-12p70, ИЛ-17) и Th2/противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-13), ростовых факторов гемоиммунопоза (ИЛ-7, Г-КСФ, ГМ-КСФ), а также СХС и СС хемокинов (ИЛ-8, MCP-1);

6) ИФН-ДК оказывают более выраженный стимулирующий эффект на Th1 и Th2-клетки, что проявляется достоверно более высоким уровнем продукции ИФН- $\gamma$  и ИЛ-5, а также СС хемокина – MIP-1 $\beta$ ;

7) ИФН-ДК обладают более выраженной способностью активировать Th1-клетки и индуцируют 10-кратный прирост количества CD3+ИФН- $\gamma$ + Т-клеток в смешанной культуре лимфоцитов;

8) ИФН-ДК характеризуются наличием умеренной Th2-стимуляторной активности (индуцируют увеличение количества CD3+ИЛ-4+ Т-клеток в смешанной культуре лимфоцитов), которая практически отсутствует у ИЛ4-ДК;

9) ИФН-ДК характеризуются способностью к активации цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов, экспрессирующих внутриклеточно перфорин, при этом данная функциональная активность ИФН-ДК может быть дополнительно усилена при использовании в качестве дозревающего стимула дц фрагментированную ДНК человека (препарат «Панагегн»).

Таким образом, результаты проведенной работы научно обосновывают целесообразность использования ИФН-ДК в качестве клеточной основы при создании индивидуальных лечебных вакцин, которые могут быть использованы в комплексной терапии больных с онкопатологией или

хроническими вирусными заболеваниями для индукции/усиления противоопухолевого или противоинфекционного иммунного ответа.

При этом исследования, выполненные на 3 этапе работы, показали принципиальную возможность генерации *ex vivo* из моноцитов крови больных с онкопатологией (злокачественными глиомами, гемобластомами) и инфекционными заболеваниями (гепатиты В и С, туберкулез легких) популяции ИФН-ДК в количествах, достаточных для проведения иммунотерапии с использованием индивидуальных лечебных вакцин.

Было установлено также, что ИФН-ДК, генерируемые у пациентов с онкопатологией и инфекционными заболеваниями, характеризуются некоторой задержкой дифференцировки/созревания, что проявляется в увеличении доли клеток с фенотипом моноцитов (CD14+) и ДК промежуточной степени зрелости (CD1a, CD83+CD1a+, CD11+CD123+), а с другой стороны – снижением доли клеток, экспрессирующих молекулы зрелых и активированных ДК (CD83+, CD83+CD1a–, CD25+). Среди больных с онкопатологией эти признаки были наиболее выражены в группе больных со злокачественными лимфомами, в меньшей степени – в группе пациентов со злокачественными глиомами и минимальны – у больных с множественной миеломой. Среди больных с инфекционными заболеваниями наиболее выраженные нарушения дифференцировки/созревания ДК регистрировались у пациентов с хроническими вирусными гепатитами с исходом в цирроз печени, а также у больных туберкулезом легких с туберкулиновой анергией (сниженным пролиферативным ответом Т-клеток на ППД).

Изменения фенотипа ИФН-ДК, как правило, ассоциируются с нарушениями функциональной (цитокин-секреторной и Th1/Th2-стимуляторной) активности ИФН-ДК, которые в зависимости от вида патологии имеют различную степень выраженности – от выраженных дисфункций до их минимальных проявлений или отсутствия таковых.

В целом, полученные данные четко свидетельствуют, что у отдельных групп больных (например, у пациентов с хроническими вирусными

гепатитами с исходом в цирроз; туберкулезом легких с туберкулиновой анергией; злокачественными лимфомами) проведение клеточной иммунотерапии с использованием ДК-вакцин должно предусматривать поиск путей коррекции возможных дисфункций генерируемых ДК, а также возможность комбинации с адьювантной цитокинотерапией (например, с использованием препаратов рекомбинантного ИЛ-2 и/или ИФН- $\alpha$ ), которая позволит активировать *in vivo* дополнительное количество ДК и цитотоксических Т-лимфоцитов. В то же время, у больных злокачественными глиомами, множественной миеломой, хроническими вирусными гепатитами (не осложненными развитием цирроза печени), туберкулезом легких (с сохраненным антиген-специфическим ответом на ППД) генерируемые *in vitro* ИФН-ДК в целом сохраняют свою функциональную активность (в частности, способность активировать эффективный Th1 ответ), что обосновывает принципиальную возможность их клинической апробации в качестве индивидуальных лечебных вакцин.

Изменение свойств генерируемых *in vitro* ДК при патологии свидетельствуют о необходимости коррекции нарушенных функций ДК с целью их последующего более эффективного использования в качестве аутологичных лечебных вакцин. Исследования, проведенные в ходе реализации 4 этапа работы, показали, что иммуномодулирующие препараты («Полиоксидоний», «Суперлимф»), препарат двуцепочечной ДНК человека («Панаген»), а также гормон ДГЭАС характеризуются выраженным стимулирующим эффектом на процесс дифференцировки/созревания ИФН-ДК. Так, например, Панаген по своему стимулирующему действию на ДК был сопоставим с «классическим» дозревающим стимулом – липополисахаридом стенки бактерий. В свою очередь, стимулирующий эффект ДГЭАС проявлялся не только в отношении ДК здоровых доноров, но и в модели «толерогенных» ДК, полученных от женщин с физиологической беременностью. При этом было установлено, что стимулирующий эффект ДГЭАС на созревание ИФН-ДК во многом обусловлен усилением

эндогенной продукции ФНО $\alpha$  – цитокина, который является одним из мощных «созревающих» стимулов для ДК.

При исследовании влияния биоактивных препаратов на функциональные свойства ДК, полученных от больных с онкопатологией – злокачественные опухоли головного мозга (ЗОГМ) и лимфомы, и туберкулезом легких, была показана принципиальная возможность восстановления сниженной функциональной активности ДК у больных с тяжелыми онкологическими и инфекционными заболеваниями с помощью различных биоактивных препаратов («Полиоксидоний», «Суперлимф», «Ронколейкин», «Панаген»), добавление которых на этапе конечного созревания ДК позволяет значительно повысить аллостимуляторную и цитотоксическую активность генерируемых *in vitro* ИФН-ДК.

Целью настоящего этапа явилось завершение и анализ результатов пилотных клинических исследований по оценке переносимости и клинической эффективности вакцин на основе ИФН-ДК в лечении ЗОГМ.

Кроме того, были проведены исследования по оценке изменения цитокинового баланса и по определению соотношения некоторых поверхностных маркеров (CD34+/45+) у больных с онкопатологией, участвующих в клинических исследованиях второй фазы препарата Панаген.

## Основная часть

### 1 Литературный обзор

Способность ДК индуцировать и регулировать иммунный ответ вызвала большой интерес к использованию данного типа клеток в качестве вакцин. Поскольку ДК способны презентировать опухолевые антигены и запускать противоопухолевый иммунный ответ, преодолевая при этом толерантность к опухолевым антигенам, иммунизация ДК, нагруженными опухолевыми антигенами (ДК-вакцины), рассматривается как один из новых подходов в иммунотерапии злокачественных опухолей [1, 2]. Клинической апробации иммунотерапии ДК во многом способствовала разработка технологий получения больших количеств ДК из периферической крови [3]. Источником опухолевых антигенов могут быть синтетические пептиды [4]; пептиды, выделенные из комплекса с молекулами первого класса главного комплекса гистосовместимости [5]; опухолевая РНК, лизаты опухолевых клеток [6], а также гибриды дендритных и опухолевых клеток [7]. Важным моментом при использовании ДК-вакцин является оптимальный выбор типа ДК. В качестве вакцин используются как зрелые, так и незрелые ДК [8], однако какие из них являются более предпочтительными, остается спорным вопросом. Незрелые ДК лучше захватывают антиген, но слабо мигрируют и стимулируют Т-клетки, в то время как зрелые ДК обладают высокой миграционной и стимуляторной активностью, однако способность к захвату антигена у них снижена. Возможно, наиболее оптимальным путем является нагрузка антигеном незрелых ДК с последующей индукцией их созревания, поскольку зрелые ДК индуцируют все таки более выраженный Т-клеточный противоопухолевый иммунный ответ [9].

Первоначально переносимость и эффективность ДК в лечении глиом была исследована на моделях экспериментальных животных. В этих работах использовались различные источники опухолевых антигенов – опухолевые белки или пептиды, лизат опухолевых клеток, мРНК или апоптотические тельца опухолевых клеток, а также гибриды опухолевых и дендритных

клеток. ДК в большинстве случаев получали из костного мозга [10, 11].  
Данные по этим исследованиям приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Исследования вакцин на основе ДК в лечении внутримозговых опухолей у экспериментальных животных.

Тип опухоли	Антиген	Источник ДК/ путь введения	Эффект	Ссылка
9L-глио-саркома	Поверхностные белки	Костный мозг; п/к (подкожно)	Индукция иммунного ответа, увеличение выживаемости	12
560 глиома	Лизат опухолевых клеток	Костный мозг; и/п (интраперитонеально)	Индукция иммунного ответа, увеличение выживаемости	13
GL261 глиома	Лизат опухолевых клеток (липосомальная форма)	Костный мозг; и/п	Индукция иммунного ответа, уменьшение размера опухоли	14
GL261 глиома	Лизат опухолевых клеток (липосомальная форма)	Линия ДК DC2.4; и/п	Индукция иммунного ответа, увеличение выживаемости	15
GL261 глиома	RNA опухолевых клеток	Костный мозг; и/п	Индукция иммунного ответа, увеличение выживаемости	16
SR-B10.A глиома	Гибриды (опухолевые клетки +ДК)+ИЛ-12	Костный мозг; п/к	Индукция иммунного ответа, увеличение выживаемости	17
9L-глио-саркома	Апоптотические опухолевые клетки	Костный мозг; п/к	Увеличение выживаемости	18
203 глиома	SVF-опухолевая ДНК	Костный мозг; и/п	Индукция иммунного ответа, увеличение выживаемости	19
G244 глиома	РНК, лизат	Костный мозг; и/п	Индукция иммунного ответа, увеличение выживаемости	20
CNS GL261 глиома	GAA-антиген	Костный мозг; п/к	Индукция ЦТЛ, CXCL10-хоуминга, увеличение выживаемости	15

Проведенные на экспериментальных животных исследования существенно различаются по моделям, используемым антигенам, дозам,

путям введения и схемам вакцинации. Тем не менее, можно выделить три группы фактов, которые получены практически во всех исследованиях. Во-первых, вакцинация ДК сопровождается индукцией иммунного ответа, который может проявляться усилением/появлением реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), возрастанием продукции Th1 цитокинов (ИФН- $\gamma$ ), генерацией цитотоксических лимфоцитов, инфильтрацией опухоли Т-клетками. Во-вторых, развитие иммунного ответа не сопровождается признаками воспаления и/или аутоиммунных реакций в мозговой ткани. И, в-третьих, клиническая эффективность проявляется в уменьшении размера опухоли (в ряде случаев до полного ее исчезновения) и достоверным увеличением выживаемости животных.

Эти факты послужили основанием для начала проведения клинических испытаний иммунотерапии ДК в лечении больных ЗОГМ (таблица 2). Во всех этих испытаниях ДК получали из периферической крови путем культивирования прилипающей фракции моноклеарных клеток (МНК) в присутствии ГМ-КСФ и ИЛ-4. В качестве антигена для нагрузки ДК использовались поверхностные белки, лизат или гомогенат опухолевых клеток, РНК опухолевых клеток, либо же гибриды опухолевых и дендритных клеток. Вакцинацию ДК проводили внутривожно поблизости к цервикальным лимфоузлам после хирургического удаления опухоли и завершения радиотерапии. Проведение этих клинических испытаний проводилось в дизайне пилотных нерандомизированных исследований, как правило, с историческим контролем, и преследовало целью оценить переносимость иммунотерапии ДК, развитие противоопухолевого иммунного ответа и клиническую эффективность.

Таблица 2 – Результаты клинических испытаний иммунотерапии ДК больных злокачественными глиомами. ГБ – глиобластома, АА – астроцитомы.

Антиген	Диагноз	Путь введения	Эффект	Ссылка
Пептиды аллогенных	ГБ	в/к	Внутриопухолевая Т-	12

опухолевых клеток		(внутри- кожно)	клеточная инфильтрация, усиление Т-клеточного ответа на аллоантигены	
Пептиды аутологичных опухолевых клеток	ГБ, АА	в/к	Внутриопухолевая Т- клеточная инфильтрация, увеличение выживаемости	21
Лизат аутологичных опухолевых клеток	ГБ, АА	в/к	Увеличение выживаемости	22
Лизат аутологичных опухолевых клеток	ГБ, АА		Усиление активности и количества ЦТЛ, увеличение выживаемости	23
Гибриды ДК и аутологичных опухолевых клеток	ГБ, АА	в/к	Частичный ответ у 25% пациентов, увеличение CD56 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> клеток и продукции ИФН- $\gamma$	24
Лизат аутологичных опухолевых клеток	ГБ, АА	в/к	Появление реакции ГЗТ на опухолевые антигены, безрецидивное выживание – 35 и 36 мес.	25
Лизат аутологичных опухолевых клеток	ГБ, АА	в/к	Минимальный ответ у 2 и стабилизация у 4 пациентов, индукция реакции ГЗТ, АГ- специфического ответа Т- клеток, увеличение CD56 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	26
Лизат аутологичных опухолевых клеток	ГБ, АА	в/к или в/к + в/о	Усиление реакции ГЗТ, активности лизат-реактивных CD8 <sup>+</sup> Т-клеток и выживаемости	27

Таким образом, иммунотерапия ДК во всех клинических испытаниях сопровождалась значимым увеличением медианы выживаемости и сопровождается развитием системного и локального иммунного ответа, что проявляется усилением пролиферации Т-клеток и продукции ими ИФН- $\gamma$  в ответ на стимуляцию опухолевыми антигенами (т.е. активацией Th1), развитием положительной кожной реакции ГЗТ на опухолевые антигены, увеличением количества и активности цитотоксических CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, увеличением количества активированных NK-клеток (CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) и инфильтрацией опухоли Т-клетками. Развитие иммунных реакций наблюдается не у всех больных. При этом имеются противоречивые данные о корреляции системных и локальных иммунных реакций с выживаемостью

больных. Так, Yamanaka и соавторы выявили большую выживаемость у больных с глиобластомами с развитием ГЗТ или увеличением количества CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-клеток [26, 27], тогда как в исследованиях Liau и соавторов не обнаружено взаимосвязи между цитотоксической активностью Т-клеток периферической крови и уровнем выживаемости. В то же время, они выявили прямую корреляцию выживаемости с лимфоидной инфильтрацией опухоли и обратную – с экспрессией в опухоли TGF- $\beta$  [12].

Таким образом было показано, что иммунотерапия ДК безопасна и не вызывает побочных реакций (воспалительных, аллергических, аутоиммунных), стимулирует развитие системного и локального противоопухолевого иммунного ответа и приводит к увеличению показателей выживаемости у больных с впервые выявленными и рецидивирующими формами злокачественных глиом.

## **2 Результаты и обсуждение**

### **2.1 Завершение пилотных клинических испытаний**

Клинические испытания иммунотерапии с использованием ИФН-ДК были проведены в соответствии с разработанным протоколом, утвержденным Ученым советом Института и одобренным локальным этическим комитетом (протокол № 1, апрель 2003 г). Отбор больных в исследование проводился согласно критериям включения и исключения после получения письменного информированного согласия. Целью клинических испытаний, которые проводились в дизайне открытых пилотных контролируемых исследований, являлась оценка переносимости и эффективности комбинированной иммунотерапии в комплексном лечении ЗОГМ.

Критериями включения являлись: наличие гистологически подтвержденного диагноза анапластической астроцитомы III степени анаплазии (Grade III) или глиобластомы (Grade IV), возраст не старше 65 лет, способность подписать информированное согласие.

Критериями исключения являлись: декомпенсированные заболевания легких и сердца, аутоиммунные заболевания в анамнезе, острые инфекции на момент исследования, неспособность подписать информированное согласие.

В исследование было включено 32 человека (основная группа), из них – 20 человек с верифицированным диагнозом – глиома высокой степени злокачественности (GradeIII) и 12 пациентов с глиомой (GradeIV), которым оперативное лечение и радиотерапия были дополнены комбинированной иммунотерапией с использованием ДК. Больные находились на лечении в нейрохирургическом отделении ФГБУ НИИТО Росмедтехнологий. Группу сравнения (исторический контроль) составил 91 пациент, которым проводилось оперативное удаление опухоли в пределах видимых границ и лучевая терапия в стандартной дозе на область удаленной опухоли (55-60 Грэй).

Иммунотерапия с использованием ДК включала курс адаптивной иммунотерапии и курс вакцинаций ДК согласно разработанному патенту «Способ комбинированной иммунотерапии злокачественных опухолей головного мозга» (патент на изобретение № 2262941 от 27.10.2005). Курс адаптивной иммунотерапии заключался в 2-кратном локорегиональном введении лимфокинактивированных киллерных клеток и цитотоксических Т-клеток в ложе удаленной опухоли. Для генерации лимфокинактивированных киллерных клеток МНК культивировали с рекомбинантным ИЛ-2 (50 МЕ/мл, «Ронколейкин», Биотех, С-Пб) в течение 48 ч, после чего вводили через катетер в ложе удаленной опухоли в дозе  $0,5-1,2 \times 10^6$  /на введение в комбинации с Ронколейкином в дозе 250000 Ед. Цитотоксические Т-клетки получали путем культивирования МНК больных с ДК, нагруженными опухолевыми антигенами, в присутствии Ронколейкина (50 Ед/мл) в течение 5 дней, после чего вводили в ложе удаленной опухоли в комбинации с Ронколейкином в дозе 250000 Ед. Антигенный материал (лизат опухолевых клеток) для загрузки ДК получали из фрагмента аутологичной опухоли больного, в результате 5-кратного замораживания/размораживания суспензии

опухолевых клеток, и использовали в концентрации 0,1 мг/мл по белку. МНК периферической крови выделяли центрифугированием цельной, гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколла-верографина ( $\rho=1,078$ , фиколл-Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Швеция; верографин-Spofa, ЧССР).

ДК генерировали из прилипающей фракции МНК периферической крови больного. Для этого МНК в концентрации  $3 \times 10^6$ /мл инкубировали в течение 2 ч при  $37^\circ\text{C}$  в стерильных флаконах площадью 75 или 150  $\text{cm}^2$  (Falcon) с последующим удалением неприлипших к пластику клеток. Для получения незрелых ДК во флакон добавляли полную культуральную среду RPMI-1640, дополненную 1,5% аутоплазмы, 40 нг/мл ГМ-КСФ (Sigma-Aldrich) и 1000 Ед/мл ИФН- $\alpha$  (Роферон-А, Roche, Швейцария) и культивировали в течение 3 сут при  $37^\circ\text{C}$  в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при 5%  $\text{CO}_2$ . Конечное созревание незрелых ДК проводили в присутствии полиоксидония (НПО ПетроваксФарм, Москва) в дозе 2 нг/мл в течение дополнительных 24 ч. Полученные в результате зрелые ДК нагружали лизатом опухолевых клеток в концентрации 0,1 мг/мл при  $37^\circ\text{C}$  с последующим криоконсервированием аликвот в растворе 10% DMSO и 90% альбумина в концентрации  $6,0 \times 10^6$ /мл в программном замораживателе (Planer Крюо 560-16, USA) и хранением при  $-80^\circ\text{C}$  до последующего использования.

Курс вакцинотерапии включал 6 подкожных инъекций ДК, нагруженных опухолевыми антигенами, в дозе  $5-10 \times 10^6$ /введение (в 4-6 точек) с кратностью вакцинаций – 1 раз в 2 недели в сочетании с подкожным введением Ронколейкина в дозе 250000 Ед.

Исследование общего состояния включало изучение общемозговой симптоматики, которая оценивалась по пятиступенной «шкале оценки тяжести состояния нейроонкологического больного» (таблица 3), разработанной в нейроонкологическом отделении РНХИ им. А.Л.Поленова (Марченко С.В., 1997).

Таблица 3 – Шкала оценки тяжести состояния нейроонкологического больного.

Критерии	Компенсированное	Субкомпенсированное	Декомпенсированное	Крайне тяжелое	Терминальное
Социальная адаптация	Не нарушена или преходящие нарушения	Преходящие или стойкие умеренные нарушения	От умеренных до грубых нарушений	-	-
Нарушение сознания	Ясное	Ясное/ легкое оглушение	От легкого до глубокого оглушения	От глубокого оглушения до комы	Кома
Гипертензионный синдром	Отсутствует/ умеренно выражен	Умеренный/ выраженный	Выражен	Резко выражен	Ярко выражен
Дислокационный синдром	Не отмечается	Отсутствует /минималь-ные проявления	Умеренный/ выраженный	Грубый дислокационный синдром	Последние стадии
Витальные функции	Не нарушены	Не нарушены	Не стабильны	От нестабильности до грубых нарушений	Грубые нарушения, требующие реанимации

Для объективизации эффективности лечения пациентов с ЗОГМ особое внимание уделяли исследованию качества их жизни. Индекс качества жизни определяли по шкале Карновского с некоторыми дополнениями (Karnofsky D.A., Borchenal J.H., 1949) до операции, во время иммунотерапии и после выписки (таблица 4).

Таблица 4 – Шкала оценки качества жизни Карновского с дополнениями.

90	Нормальная активность, минимальная симптоматика; периодически головная боль, метеочувствительность.
80	Нормальная активность с усилием, некоторые симптомы; Стойкий церебрастенический синдром.
70	Заботится о себе, не способен вести нормальную жизнь; Рефлекторные парезы, негрубые расстройства ВНД, негрубая афазия, редкие Джексоновские эпилепсии по типу petit mal.
60	Нуждается в периодической помощи; Генерализованные эпилепсии, существенные расстройства ВНД, парезы в конечностях с сохраненной возможностью передвигаться без посторонней помощи.

50	Нуждается в значительной помощи и уходе; Грубая очаговая симптоматика, негрубые расстройства сознания. Субкомпенсация.
40	Беспомощен, нуждается в специальной помощи и уходе; Преобладание общемозговой симптоматики над очаговой, грубые расстройства сознания. Декомпенсация.
30	Серьезно недееспособен, нуждается в госпитализации; Декомпенсация неврологического статуса. Субкомпенсация витальных функций (нуждаются в зондовом кормлении, трахеостомии). Стабильная гемодинамика и самостоятельное дыхание.
20	Очень болен, необходим активный поддерживающий уход; Глубокая кома, нарушение витальных функций, их поддержание (ИВЛ).
10	Умирающие; Полиорганный недостаточность. Терминальные состояния, отказ от активной реанимации.

Реакцию ГЗТ *in vivo* оценивали по выраженности кожной пробы в ответ на введение лизата опухолевых клеток (0,1 мг/мл) в объеме 0,5 мл. Проба оценивалась через 48 ч по наличию папулы и гиперемии в месте введения.

Реакцию ГЗТ *in vitro* оценивали в модифицированном тесте миграции лейкоцитов в ответ на аналогичную стимуляцию клеток лейкоцезиса. В качестве контрольного антигена использовали комплекс антигенов из мозговой ткани человека в аналогичной концентрации.

Для оценки антигенспецифического пролиферативного ответа МНК пациентов в концентрации  $0,1 \times 10^6$  на лунку культивировали 72 часа при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>, в 96-луночных круглодонных планшетах для иммунологических исследований в полной культуральной среде RPMI-1640 (Sigma USA), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 10% инактивированной сыворотки доноров АВ(IV) группы в присутствии лизата опухолевых клеток 0,1 мг/мл или комплекса антигенов из мозговой ткани человека 0,1 мг/мл. Интенсивность пролиферации оценивали через 72 часа по включению метки в нуклеопротеидные фракции клеток 3H-тимидина, вносимого за 18 часов до окончания культивирования в дозе 1 мкг/мл. Подсчет радиоактивности производили в жидкостном сцинтиляционном счетчике SL-30 (Intertechnic, Франция). Результаты представляли в виде среднего счета (имп/мин) из трех идентичных культур

Основная и контрольная группы (таблица 5) были сопоставимы по полу/возрасту больных, гистологическим вариантам внутримозговых опухолей, исходному уровню качества жизни (индексу Карновского). Тем не менее, в основной группе доля больных, оперированных по поводу рецидива опухоли, была несколько больше.

Таблица 5 – Характеристика больных в сформированных группах.

Признаки	Основная группа	Группа сравнения
Средний возраст (min-max)	40,0 ± 2,4 16-65 лет	46,0 ± 1,1 15-69 лет
Пол		
- мужчины	18/32 (56,3 %)	43/91 (47,3 %)
- женщины	14/32 (43,7 %)	48/91 (52,7 %)
Индекс качества жизни по Карновскому (баллы)	59,3 ± 1,9	55,9 ± 1,6
Коэффициент соотношения Grade III /Grade IV	1,66	1,33
Оперированы		
- первично	23/32 (71,9 %)	77/91 (84,6 %)
- повторно	9/32 (28,1 %)	14/91 (15,4 %)

Состояние всех пациентов в исследуемой подгруппе и подгруппе сравнения, согласно пятиступенной шкалы, разработанной в нейроонкологическом отделении РНХИ им. проф. А.Л.Поленова перед оперативным вмешательством расценивалось как компенсированное у 10,3% и 8,9% больных соответственно, субкомпенсированное – у 46,2% и 51,1%, декомпенсированное – у 38,5% и 36,7%, и крайне тяжёлое – у 5,1% и 3,8% больных. То есть, подавляющее количество больных в обеих подгруппах – от 89,7% до 91,1% находились в субкомпенсированном – крайне тяжелом состоянии.

Клинические наблюдения за больными показали хорошую переносимость иммунотерапии и отсутствие развития выраженных цитокиновых или токсических реакций в виде изменений общего состояния пациента и/или гемодинамических нарушений. Ни у одного из пациентов не

было отмечено локальных или системных инфекционных осложнений, связанных с введением клеток. Это свидетельствует об удовлетворительной переносимости процедур иммунотерапии, о предсказуемости и контролируемости предложенного метода лечения, что является одним из его положительных свойств.

### 2.1.1 Оценка антигенспецифического иммунного ответа у больных злокачественными глиомами

Для анализа эффективности генерации противоопухолевого ответа оценивали интенсивность иммунного ответа на опухолевые антигены, содержащиеся в лизате опухолевых клеток, до начала курса вакцинаций, а также через 3 и 6 вакцинаций. Сенсibilизация к опухолевым антигенам *in vitro* оценивалась по возрастанию пролиферативного ответа МНК и индекса миграции лейкоцитов больных в процессе иммунотерапии. Так, если исходно антигены лизата опухолевых клеток не стимулировали пролиферации МНК, то после 6 вакцинаций отмечалось достоверное 10-кратное усиление пролиферации в ответ на опухолевые антигены в дозе 0,01 мг/мл и 7-кратное увеличение пролиферации в ответ на опухолевые антигены в дозе 0,1 мг/мл. При этом достоверного усиления пролиферативного ответа МНК больных на контрольный антиген (экстракт мозговых тканей человека) не наблюдалось (таблица 6).

Таблица 6 – Индукция антигенспецифического ответа в процессе вакцинации ДК больных ЗОГМ высокой степени злокачественности.

	До вакцинации	После трех вакцинаций	После шести вакцинаций
Спонтанная пролиферация	425 ± 74	321 ± 88	666 ± 145
Опухолевый антиген 0,01 мг/мл	663 ± 154 (1,65 ± 0,4)	363 ± 121 (1,3 ± 0,3)	5170 ± 1507 * (10,9 ± 4,9)

Опухолевый антиген 0,1 мг/мл	1083 ± 280 (2,4 ± 0,56)	554 ± 243 (1,7 ± 0,6)	3632 ± 474 * (7,6 ± 3,1)
Контрольный антиген 0,01 мг/мл	450 ± 57 (1,1 ± 0,35)	815 ± 79 (2,1 ± 0,6)	1050 ± 245 (1,36 ± 0,7)
Контрольный антиген 0,1 мг/мл	715 ± 89 (1,6 ± 0,4)	976 ± 85,8 (2,5 ± 0,8)	1293 ± 101 (1,99 ± 0,5)

Примечание: представлены средние значения ( $M \pm SE$ ) пролиферативного ответа (имп/мин) МНК больных ( $n=10$ ) на специфический опухолевый антиген в различных концентрациях и на контрольный антиген (экстракт мозговых тканей человека). В скобках – индексы влияния (отношение индуцированной антигеном пролиферации к спонтанной пролиферации), \*-  $p_u < 0,05$  – достоверность различий по сравнению с состоянием до начала вакцинаций (U – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Аналогичным образом, в процессе вакцинаций наблюдалось достоверное увеличение индекса миграции лейкоцитов (таблица 7). Так, после 6 вакцинаций индекс миграции лейкоцитов в присутствии опухолевого антигена в дозе 0,1 мг/мл вырос с  $1,02 \pm 0,05$  до  $1,48 \pm 0,26$  ( $p_u < 0,05$ ). Причем, как и при анализе пролиферативного ответа, усиления индекса миграции лейкоцитов на контрольный антиген в аналогичной дозе не наблюдалось ( $1,02 \pm 0,06$  исходно и  $0,97 \pm 0,09$  после курса вакцинаций). Таким образом, индуцированный иммунный ответ, направлен преимущественно к опухолеассоциированным, а не тканевым антигенам.

Таблица 7 – Индукция реакции ГЗТ *in vitro* в процессе вакцинаций ДК больных глиом высокой степени злокачественности.

	До вакцинации ( $n=35$ )	После трех вакцинаций ( $n=23$ )	После шести вакцинаций ( $n=23$ )
Опухолевый антиген 0,1 мкг/мл	1,02±0,05	1,2±0,08	1,48±0,26*
Опухолевый антиген 0,01 мкг/мл	0,97±0,05	0,97±0,08	1,3±0,3*
Контрольный антиген 0,1 мкг/мл	1,02±0,06	1,1±0,08	0,97±0,09
Контрольный антиген 0,01 мкг/мл	0,97±0,06	1,02±0,07	0,98±0,06

Примечание: представлены средние значения индексов миграции (определяемые как соотношение стимулированного антигеном количества клеток в лунке к контрольным значениям), \* -  $p_u < 0,05$  – достоверность различий по сравнению с состоянием до начала вакцинаций, U – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни.

Для оценки развития иммунного ответа на опухолевые антигены у 25 пациентов была также исследована реакция ГЗТ в кожном тесте *in vivo*. Исходно кожная проба на опухолевый антиген была отрицательной у всех пациентов (таблица 8). В то же время после 3 и 6 иммунизаций положительная кожная проба регистрировалась у 7 (28%) и 16 (64%) пациентов, соответственно среди пациентов общей группы, при этом значительных различий среди пациентов с глиомой Grade IV и Grade III не наблюдалось. Реакция ГЗТ *in vivo* была сопоставима с таковой *in vitro*, что свидетельствует о нарастании антигенспецифического ответа у данных пациентов.

Таким образом, иммунотерапия приводит к развитию антигенспецифического иммунного ответа, о чем свидетельствует появление положительной реакции ГЗТ *in vivo* и *in vitro* и усиление пролиферативного ответа лимфоцитов на опухолевые антигены *in vitro*.

Таблица 8 – Индукция иммунного ответа у больных ЗОГМ на опухолевый антиген в процессе терапии с использованием ДК

Время обследования	Реакция ГЗТ на опухолевый антиген					
	<i>in vivo</i>			<i>in vitro</i>		
	Все глиомы	глиомы Grade III	глиомы Grade IV	Все глиомы	глиомы Grade III	глиомы Grade IV
До вакцинации	0 % (0/25)	0% (0/17)	0% (0/8)	8 % (2/24)	7% (1/14)	11% (1/9)
После трех вакцинаций	28 % (7/25)	29% (5/17)	25% (2/8)	12,5 % (3/24)	21% (3/14)	22% (2/9)
После шести вакцинаций	64 % (16/25) *	70% (12/17)*	50% (4/8)*	69 % (16/23)*	64% (9/14)*	67% (6/9)*

Примечание: представлена частота и абсолютное количество больных, положительно ответивших на антиген (в скобках), \* - р<sub>тмф</sub> – достоверность различий частот в группах больных до вакцинации и после шести вакцинаций, рассчитанная точным методом Фишера

### *2.1.2 Оценка клинического эффекта иммунотерапии у больных ЗОГМ*

Сравнение больных основной и контрольной групп на этапе стационарного лечения показало, что больные, получающие иммунотерапию, к моменту окончания лечения, т.е. после завершения этапа адаптивной иммунотерапии, характеризовались более выраженной положительной клинической динамикой. Так, исходно (на 7-9 сутки после операции) общемозговая симптоматика выявлялась с равной частотой у большинства больных основной группы (73,8%) и группы сравнения (72,2%). В то же время перед выпиской из стационара общемозговая симптоматика сохранялась только у 2 пациентов основной группы (5,1%), тогда как в группе сравнения выявлялась достоверно чаще – в 20% случаев. Таким образом, у больных, получивших курс иммунотерапии, к моменту выписки зарегистрировано убедительное, статистически значимое увеличение показателей общего состояния больных. К моменту выписки из нейрохирургической клиники оно было значительно более компенсировано по сравнению с пациентами, не получившими иммунотерапию. Полученные данные можно объяснить, как нам представляется, положительным влиянием проведенной по оригинальному протоколу иммунотерапии.

Анализ индекса качества жизни по Карновскому показал, что исходно пациенты сформированных групп не различались по данному показателю. Однако впоследствии через 6, 12 и 24 мес. после операции (рисунок 1) показатели индекса качества жизни в основной группе были достоверно выше ( $84 \pm 1,4$ ;  $86 \pm 1,6$ ;  $91 \pm 2,3$  балла), чем в группе сравнения ( $66 \pm 1,6$ ;  $66 \pm 1,8$  и  $61 \pm 3,7$  баллов, соответственно).

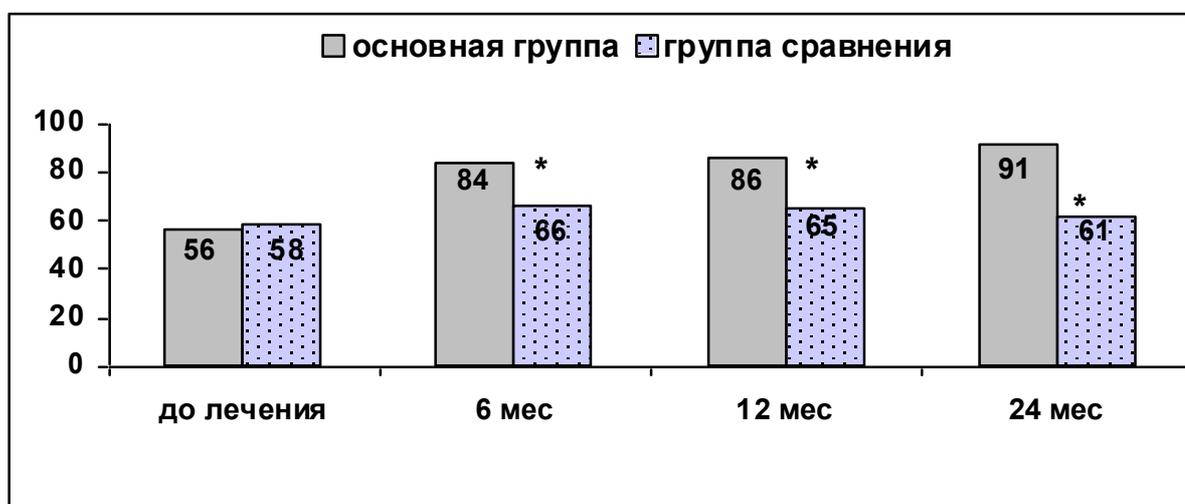


Рисунок 1 – Изменение индекса качества жизни пациентов ЗОГМ после иммунотерапии. Представлены средние значения индекса качества жизни в баллах. \*- достоверность различий,  $p_U < 0,01$ ; U–критерий Вилкоксона-Манна-Уитни.

При статистическом анализе показателей выживаемости в сравниваемых группах оказалось, что относительное количество выживших больных в основной группе к исходу 12, 24 и 36 месяцев было достоверно выше, чем в группе сравнения (таблица 9).

Таблица 9 – Анализ выживаемости больных ЗОГМ в процессе терапии с использованием ДК.

	12 мес		24 мес		36 мес	
	Группа сравнения	Основная группа	Группа сравнения	Основная группа	Группа сравнения	Основная группа
Все глиомы	48,4 % (44/91)	65,6 %* (21/32)	23 % (21/91)	50 %* (15/32)	7,7 % (7/91)	37 %* (10/27)
Глиомы Grade III	67 % (35/52)	75 % (15/20)	40 % (21/52)	75 %* (15/20)	13,5 % (7/52)	66,7 %* (10/15)
Глиомы Grade IV	23 % (9/39)	50 % (6/12)	0 % (0/39)	8,3 % (1/12)	0 % (0/39)	0 % (0/12)

Примечание: представлено относительное и абсолютное количество больных, выживших к сроку 12, 24 и 36 месяцев. \* -  $P < 0,05$  – достоверность различий частот по сравнению с контрольной группой подсчитана методом хи-квадрата ( $\chi^2$ ).

При анализе кривых выживаемости у больных с глиомами Grade III (рисунок 2) выживаемость в основной группе была достоверно выше

( $P=0,000$ ). Так, в контрольной группе медиана выживаемости составила 14 месяцев, т.е. к этому сроку умерло 50% больных.

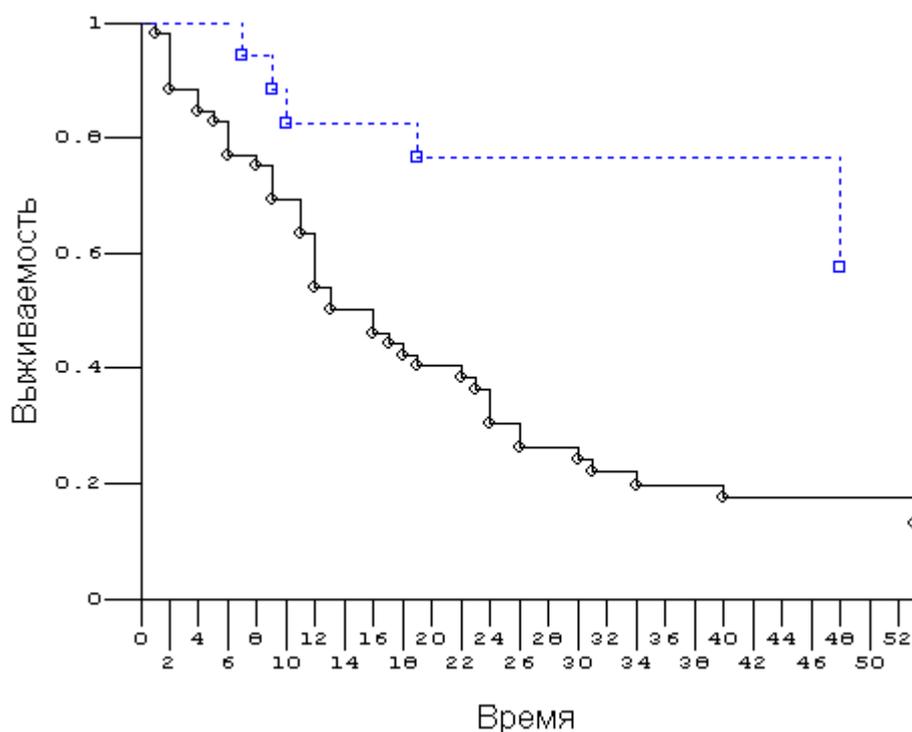


Рисунок 2 – Показатели выживаемости (месяцы) больных глиомами Grade III. Основная группа – пунктирная линия, группа исторического контроля – сплошная линия. Достоверность различий кривых –  $P=0,000$ .

В то же время, в основной группе более 50% пациентов (15 из 20) мес. на момент завершающего наблюдения (со сроком наблюдения от 26 до 55) были еще живы, что не позволило оценить медиану выживаемости в этой группе.

Анализ кривых выживаемости в основной и контрольной группах у больных глиомами Grade IV, (рисунок 3) также выявил их достоверные различия ( $P=0,003$ ). Медиана выживаемости в основной группе составила 14 месяцев и существенно превышала аналогичный показатель в группе исторического контроля (6 месяцев).

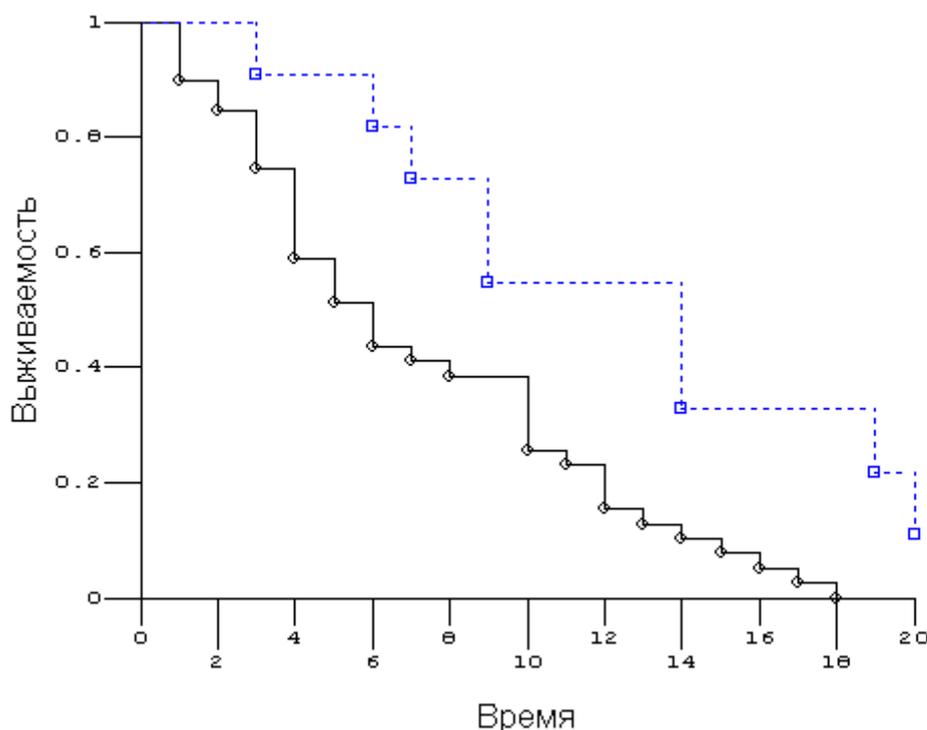


Рисунок 3 – Показатели выживаемости (месяцы) больных глиомами Grade IV. Основная группа – пунктирная линия, группа исторического контроля – сплошная линия. Достоверность различий кривых –  $P=0,009$ .

В целом, показатель продолжительности жизни больных глиомами Grade III составил в основной группе  $30,7 \pm 3,1$  месяцев, что значимо превышало таковую в группе сравнения ( $20,0 \pm 2,3$ ;  $P=0,01$ ). Средняя продолжительность жизни в основной группе больных Grade IV составила  $12,8 \pm 1,9$  месяцев, что также значимо превышало аналогичный показатель в группе исторического контроля ( $7,2 \pm 0,28$ ;  $P=0,002$ ).

Полученные факты свидетельствуют о повышении эффективности комплексного лечения на фоне специфической иммунотерапии и, в целом, согласуются с данными зарубежных авторов, продемонстрировавших увеличение медианы выживаемости у больных на фоне иммунотерапии ДК.

Чтобы выяснить, имеется ли взаимосвязь между генерацией антигенспецифического ответа и эффективностью терапии, в отдельной группе пациентов был проведен анализ выживаемости в подгруппах больных с наличием и отсутствием сенсibilизации к опухолевым антигенам после проведения иммунотерапии. Поскольку показатели выживаемости у больных

глиомами III и IV степени существенно различаются, исследование показателей 2-летней выживаемости проводилось отдельно в этих группах пациентов. В группе больных глиомами Grade III (n=15) наличие сенсibilизации к опухолевым антигенам регистрировалось у 8 из 11 выживших пациентов (73%) больных, а отсутствие – у 3 пациентов (27%). В группе умерших больных у всех 4 пациентов с АА отмечалось наличие сенсibilизации к опухолевым антигенам после курса ДК-вакцинаций. Что касается пациентов с глиомой Grade IV, то 4 из 10 пациентов на момент 24 месяцев были живы, а 6 умерли. При этом появление сенсibilизации к опухолевым антигенам наблюдалась у 3 из 4 выживших (75%) пациентов и у 2 из 6 (33%) умерших. Полученные результаты свидетельствуют, что у больных глиомой Grade IV генерация эффективного антигенспецифического ответа ассоциируется с более высоким уровнем выживаемости, хотя различия, в силу небольшой выборки, проявлялись только в виде тенденции и не были статистически значимы.

Полученные результаты свидетельствуют об удовлетворительной переносимости иммунотерапии с использованием ДК и отсутствии побочных токсических реакций, как на этапе проведения адаптивной иммунотерапии, так и на этапе вакцинаций ДК. Кроме того, судя по полученным предварительным данным, применение иммунотерапии с использованием ДК-вакцин позволяет улучшить показатели качества жизни и выживаемости по сравнению с группой больных, которым иммунотерапия не проводилась. Полученные результаты подтверждают безопасность и являются обоснованием целесообразности иммунотерапии у больных ЗОГМ. При этом нами впервые апробирован новый тип ДК, генерируемых в присутствии ИФН- $\alpha$ , которые по своим функциональным свойствам отличаются от ДК, полученных в стандартном протоколе с использованием ГМ-КСФ и ИЛ-4.

Таким образом, иммунотерапия с применением ИФН-ДК безопасна и не вызывает побочных реакций (воспалительных, аутоиммунных и аллергических) сопровождается индукцией противоопухолевого иммунного

ответа, увеличением сроков выживаемости больных и улучшением качества их жизни.

### *2.1.3 Клинический пример*

Больная К., 30 лет, ИБ № 572/03, находилась в клинике нейрохирургии с диагнозом: внутримозговая злокачественная опухоль правой теменной области (анапластическая астроцитома III степени анаплазии – Grade III). Эписиндром с частыми фокальными эпилептическими приступами.

Поступила в клинику 11.03.2003 с жалобами на затруднения при произнесении слов, повышенную утомляемость, раздражительность. Анамнез заболевания: считает себя больной с октября 2001, когда впервые отметила приступы подергиваний в пальцах рук, без потери сознания, без предвестников. Обратилась к невропатологу по месту жительства, по его рекомендации принимала фенobarбитал. Вышеописанные приступы повторялись по несколько раз в день. С 26.01.03 – несколько фокальных эпилептических приступов в виде фасцикуляций в кистях рук, в бедрах. На ЯМРТ обнаружена опухоль правой теменной доли с ростом в правую височную долю с кистозным и солидным компонентами.

При поступлении состояние средней степени тяжести, обусловлено наличием гипертензионного синдрома, выраженной общемозговой симптоматикой. В неврологическом статусе очаговой патологии не выявлено. Оценка по шкале Карновского – 80 баллов. Осмотр окулиста: visus OD/OS = 1,0/1,0. Поля зрения в норме. Глазное дно: диски зрительных нервов бледно-розовые, границы ступенчаты. Застойные диски зрительных нервов. ЭЭГ: Диффузные изменения биоэлектрической активности головного мозга с признаками раздражения срединных структур, брадидизритмия. ЭхоЭГ: смещение М-эха справа налево на 3,5 мм в средних отделах. ЯМРТ: Кистозно-солидное образование правой теменной доли с распространением на правую височную долю со сдавлением заднего рога правого бокового желудочка.

12.03.2003 выполнена операция: костно-пластическая трепанация черепа в правой теменно-височной области с удалением костного лоскута, удаление внутримозговой опухоли, пластика твёрдой мозговой оболочки гомотрансплантатом.

После нейрохирургического вмешательства больной проведена иммунотерапия по предложенному способу. 25.03.2003 и 26.03.2003 проведены гемоэксфузии в объеме 300 мл крови для генерации лимфокинактивированных киллерных клеток. Через 48 ч (27.03.2003 и 28.03.2003) путем введения через установленный во время операции катетер в асептических условиях в ложе удаленной опухоли введены аутологичные лимфокин-активированные киллерные клетки в общей дозе  $350 \times 10^6$  в комбинации с интерлейкином-2 (Ронколейкин, 250 000 ЕД).

Через 72 ч начат курс адаптивной иммунотерапии с использованием антиген-специфических цитотоксических лимфоцитов. 31.03.2003 проведена гемоэксфузия в объеме 300 мл крови, через 48 ч (02.04.2003) – повторная гемоэксфузия в том же объеме. После 5-суточного культивирования выделенных из крови МНК в заданном соотношении с ДК, нагруженными опухолевым антигеном, в присутствии рекомбинантного ИЛ-2 в дозе 50 ЕД/мл, полученные антиген-специфические цитотоксические Т-лимфоциты путем стереотаксической пункции в асептических условиях введены (05.04.2003 и 07.04.2003) в ложе удаленной опухоли в общей дозе  $280 \times 10^6$  в комбинации с интерлейкином-2 (Ронколейкин, 250 000 ЕД).

Завершающий курс вакцинотерапии в виде подкожных инъекций ИЛ-2 (Ронколейкин по 250 000 ЕД) и ДК, нагруженных аутологичным опухолевым антигеном, начат 14.04.2003 г. Было проведено 6 вакцинаций с интервалом в 2 недели (14.04; 28.04; 12.05; 26.05; 09.06; и 23.06.2003). Курс вакцинотерапии проводился в амбулаторном режиме, поскольку больная была выписана из стационара 09.04.2003 в удовлетворительном состоянии с оценкой по шкале Карновского 90 баллов.

Исходный уровень противоопухолевого иммунного ответа определяли перед началом курса (17.03.2003). Наличие у больной специфических иммунных реакций против аутологичных опухолевых антигенов не было выявлено ни в кожном тесте, ни в культуре *in vitro* при исследовании активности ГЗТ-эффекторов. При этом не отмечалось образование папулы в месте внутрикожного введения антигена, а индекс стимуляции опухолевым антигеном ГЗТ-эффекторов составлял 1,0 расч.ед. Появление у больной специфического противоопухолевого иммунного ответа в виде усиления активности ГЗТ-эффекторов, стимулированных *in vitro* опухолевым антигеном, было зарегистрировано на этапе проведения курса вакцинотерапии. Так, 28.04.2003 (т.е. в день выполнения 2-ой вакцинации ДК) индекс антигенной стимуляции ГЗТ-эффекторов составлял 2,7 расч.ед. Развитие противоопухолевых иммунных реакций в кожной пробе было выявлено после третьей вакцинации ДК. У больной в месте внутрикожного введения опухолевого антигена (24.05.2003) через 48 ч в день проведения 4-ой процедуры вакцинации (26.05.2003) было отмечено папулообразование, диаметр папулы 6 мм.

Спустя 38 мес после операции пациентка находилась в удовлетворительном, полностью компенсированном состоянии, трудоспособна. Головные боли не беспокоят. Оценка по шкале Карновского – 100 баллов.

Изменения головного мозга по данным ЯМРТ в динамике лечения представлены на рисунках 4 и 5.

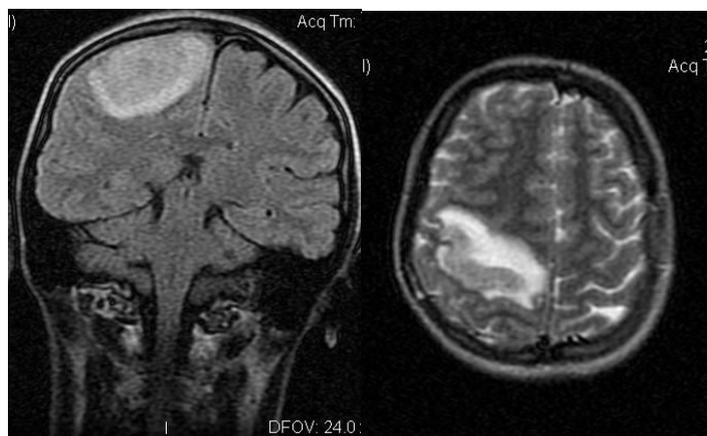


Рисунок 4 – МР–томограммы больной К., 30 лет, до операции (анапластическая астроцитома правой теменной доли).

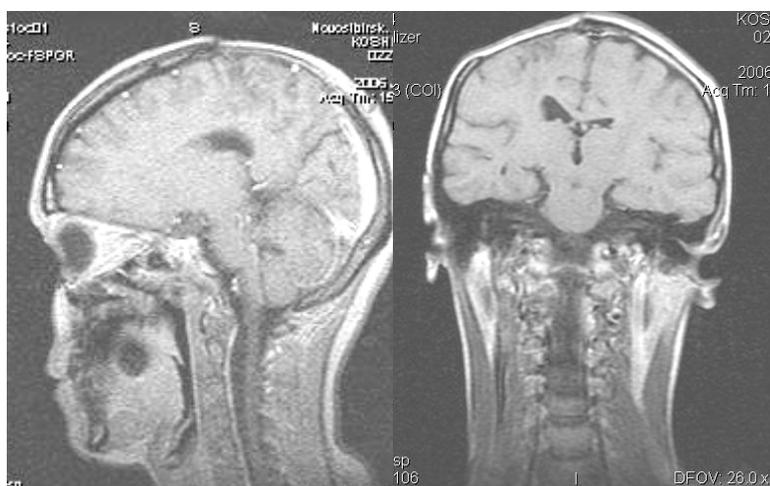


Рисунок 5 – МР–томограммы с контрастированием той же больной К., 32 лет, через 36 мес. после операции (анапластическая астроцитома правой теменной доли).

## 2.2 Формирование отчетной документации по лечению злокачественных опухолей головного мозга

### 2.2.1 Протокол клинических испытаний «Специфическая иммунотерапия в комплексном лечении злокачественных опухолей головного мозга»

*Дизайн исследования*

Открытое контролируемое исследование.

*Цель исследования*

Оценка переносимости и иммунокорректирующего эффекта специфической иммунотерапии у больных со злокачественными опухолями головного мозга.

*Препараты, дозы и путь введения*

Курс иммунотерапии ДК проводится после хирургического удаления опухоли и завершения радиотерапии и включает 6 подкожных инъекций ДК, нагруженных опухолевыми антигенами, в дозе не менее  $6 \times 10^6$  (в 4-6 точек) с кратностью вакцинаций – 1 раз в 2 недели.

*Длительность исследования*

48 месяцев

*Изучение эффективности*

Основной параметр эффективности – индукция специфического иммунного ответа в виде положительной кожной реакции гиперчувствительности замедленного типа и/или усиления пролиферативного ответа лимфоцитов *in vitro* на опухолевые антигены.

*Контингент больных*

Основной диагноз – Супратенториальные глиомы головного мозга – глиобластомы (GradeIV) и анапластические астроцитомы III степени анаплазии (GradeIII). Обязательным условием является оперативное удаление опухолевого субстрата.

*Количество больных*

30-40 больных в основной клинической группе и 30-40 больных в группе сравнения

*Критерии включения*

- Наличие гистологически подтвержденного диагноза
- Возраст не старше 70 лет
- Способность подписать информированное согласие
- Проведенное хирургическое лечение

*Критерии исключения*

- Одновременное участие в другом клиническом исследовании
- Несоответствие критериям включения

- Терминальное или декомпенсированное состояние в раннем послеоперационном периоде
- Аутоиммунные заболевания в анамнезе
- Острые инфекции на момент исследования
- Терапия глюкокортикоидами
- Неспособность подписать информированное согласие.

*Выполнение исследования*

*Оценка до лечения*

- 1) Проводится сбор анамнестических данных
- 2) Иммунологическое исследование

*Схема лечения*

*Подготовительный этап.* Получение образца опухолевой ткани и приготовление опухолевых антигенов. Источником опухолевых антигенов является лизат опухолевых клеток, который получают из фрагмента аутологичной опухоли больного, в результате 5-кратного замораживания/размораживания суспензии опухолевых клеток.

*I этап.* Получение ДК, нагрузка их антигеном и криоконсервация. ДК генерируют путем культивирования прилипающей фракции МНК в 6-луночных планшетах в течение 3 суток в среде RPMI-1640 в присутствии ГМ-КСФ 1000 Ед/мл и INF- $\alpha$  1000 Ед/мл с последующей стимуляцией дозревания в течение 24 час полиоксидонием (1 мкг/мл) при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Для нагрузки опухолевыми антигенами полученные ДК инкубируют в течение 2 часов с лизатом опухолевых клеток в концентрации 0,1 мг/мл (по белку). Отмытые после нагрузки опухолевыми антигенами ДК подвергают криоконсервации и хранят при -80°C в морозильной камере до момента использования.

*II этап.* Курс иммунотерапии ДК проводится после хирургического удаления опухоли и завершения радиотерапии и включает 6 подкожных инъекций ДК, нагруженных опухолевыми антигенами, в дозе не менее  $6 \times 10^6$  (в 4-6 точек) с кратностью вакцинаций – 1 раз в 2 недели.

### *Оценка иммунокорректирующего эффекта*

Больным основной группы до начала иммунотерапии, а также через 3 и 6 вакцинаций проводят иммунологическое исследование, которое включает оценку кожной реакции гиперчувствительности замедленного типа и пролиферативной активности лимфоцитов *in vitro* на опухолевые антигены. Больным группы сравнения, не получавшим специфической иммунотерапии, первичное иммунологическое обследование проводилось после проведения хирургического лечения и радиотерапии. Повторное – в среднем через 2 месяца, т.е. через интервал времени, соответствующий сроку проведения специфической иммунотерапии.

### *Прекращение лечения*

Лечение прекращается в следующих случаях:

- Завершение исследования согласно протоколу.
- Появление выраженных побочных эффектов лечения
- Отказ пациента или его ближайших родственников от проведения лечения

К протоколу прилагаются: регистрационная карта (приложение А) и информированное согласие (приложение Б).

### *2.2.2 Стандарты операционных процедур (SOPs)*

#### *Получение дендритноклеточных вакцин*

ДК генерируют из моноцитов периферической крови больного. Процедуру гемоэкспузии проводят в утренние часы. Для этого, в стерильный флакон, содержащий раствор гепарина (10 000 Ед), забирают 200 мл венозной крови больного, добавляют 40 мл раствора желатиноля и инкубируют 45 мин при 37°C. Собранную лейкоцитарную массу собирают в отдельный флакон, центрифугируют при 1000 об/мин 20 мин. Содержащуюся в надосадке аутоплазму собирают для последующего использования. Осажденные клетки лейкоцитарной массы однократно отмывают фосфат-буферным физиологическим раствором (PBS), наслаивают на градиент

плотности фиколла-верографина и центрифугируют в течение 20 мин при 3000 об/мин. Собранные из интерфазы МНК двукратно отмывают, и ресуспендируют в культуральной среде RPMI-1640, дополненной 5% аутоплазмы, 5мМ HEPES-буфера и гентамицином в дозе 80 Ед/мл. Затем, выделенные МНК в концентрации  $3 \times 10^6$ /мл инкубируют в течение 2 ч при 37<sup>0</sup>С в стерильных флаконах площадью 75 или 150 см<sup>2</sup> (Falcon). Фракцию неприкрепившихся к пластику клеток удаляют. Для получения незрелых ДК к оставшимся во флаконе прикрепившимся клеткам моноцитарно-макрофагального ряда (80-90% CD14+моноцитов) добавляют полную культуральную среду, дополненную 1,5% аутоплазмы, 40 нг/мл ГМ-КСФ (Sigma-Aldrich) и 1000 Ед/мл ИФН-альфа (Роферон-А, Roche, Швейцария) и культивируют в течение 3 суток при 37<sup>0</sup>С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 5% CO<sub>2</sub>. Конечное созревание незрелых ИФН-ДК проводят в течение дополнительных 24 ч в присутствии фармакопейного препарата полиоксидония (НПО ПетроваксФарм, Москва) в дозе 2 нг/мл. Полученные в результате зрелые ИФН-ДК нагружают (пульсируют) лизатом аутологичных опухолевых клеток в дозе 0,1 мг/мл во время часовой инкубации при 37<sup>0</sup>С. Антигенный материал для загрузки дендритных клеток получают из фрагмента аутологичной опухоли больного, удаленной во время нейрохирургического вмешательства. Суспензию выделенных опухолевых клеток подвергают 5-кратному замораживанию/размораживанию (соответственно, в жидком азоте и при 37<sup>0</sup>С), затем опухолевый лизат центрифугируют, надосадок собирают и определяют концентрацию антигенного материала (в мг/мл по белку). Полученный раствор опухолевых антигенов хранят в замороженном виде.

Таким образом, общее время получения ИФН-ДК, нагруженных специфическим вирусным антигеном, составляет 4 суток. Затем ИФН-ДК криоконсервируют в растворе 10% DMSO и 90% альбумина в концентрации  $5,0-6,0 \times 10^6$ /мл и хранят при -80<sup>0</sup>С до последующего использования.

#### *Проведение вакцинотерапии*

Вакциноterapia осуществляется в постоперационном периоде после проведения полного курса радиотерапии на амбулаторном этапе. Специфическую иммунотерапию проводят в виде курса вакцинаций из 4-6 подкожных инъекций ИФН-ДК в дозе  $5 \times 10^6$  клеток с 2-недельным интервалом. Обязательным условием при проведении ДК-вакцинаций является использование в качестве адьюванта фармакопейного препарата рекомбинантного интерлейкина-2 человека (рИЛ-2, Ронколейкин<sup>®</sup>, ООО «Биотех», Санкт-Петербург), который также вводят подкожно в дозе 0,25 мг. Использование рИЛ-2 в качестве адьюванта может значительно усилить антиген-специфический Т-клеточный ответ при проведении ДК-вакцинаций за счет преодоления состояния анергии Т-клеток, предотвращения апоптоза Т-клеток, генерации Т-клеток-памяти, в том числе длительно живущих цитотоксических Т-лимфоцитов.

#### *Оценка антиген-специфического иммунного ответа*

Для оценки эффективности индукции/поддержания антиген-специфического иммунного ответа у больных исследуют уровень пролиферативного ответа МНК на стимуляцию лизатом опухолевых клеток и реакцию гиперчувствительности замедленного типа *in vivo* и *in vitro*. Исследования проводят до начала курса вакцинаций, а также через 3 и 6 вакцинаций. Для этого, из 10 мл гепаринизированной венозной крови больных выделяют МНК центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина (как было описано ранее). МНК в концентрации  $0,1 \times 10^6$ /лунку культивируют при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>, в 96-луночных круглодонных планшетах для иммунологических исследований в полной культуральной среде, содержащей RPMI-1640, дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 80 мкг/мл гентамицина и 10% инактивированной сыворотки доноров АВ(IV) группы. Для стимуляции клеток используют антиген лизата опухолевых клеток в дозе 0,1 мг/мл. Интенсивность пролиферации оценивают через 72 ч по включению в нуклеопротеидные фракции клеток <sup>3</sup>H-тимидина, вносимого за 18 ч до

окончания культивирования в дозе 1 мкг/мл. Подсчет радиоактивности производят в жидкостном сцинтиляционном счетчике SL-30 (Intertechnic, Франция). Результаты представляют в виде среднего счета (имп/мин) из трех идентичных культур. Реакцию гиперчувствительности замедленного типа *in vivo* оценивали по выраженности кожной пробы в ответ на введение лизата опухолевых клеток (0,1 мг/мл) в объеме 0,5 мл в верхнюю треть предплечья. Проба оценивалась через 48 ч по наличию папулы и гиперемии в месте введения. Реакцию гиперчувствительности замедленного типа *in vitro* оценивали в модифицированном тесте миграции лейкоцитов в ответ на аналогичную стимуляцию клеток лейкоцитарной линии. В качестве контрольного антигена использовали комплекс антигенов из мозговой ткани человека в аналогичной концентрации.

### **2.3 Оценка переносимости и безопасности ДК-вакцин**

Всем пациентам во время и после подкожного введения проводили мониторинг основных показателей жизнедеятельности организма: измеряли температуру тела, частоту пульса, величину артериального давления и частоту дыхания. Наряду с этим в динамике фиксировали жалобы больных и их субъективные ощущения.

Введение клеток ни в одном случае не сопровождалось нарушением витальных функций – ни в момент введения, ни в течение последующего срока наблюдения. Через 2-3 часа у 29% пациентов с исходной нормотермией отмечалось повышение температуры до субфебрильных цифр (максимум до 38,6°C у одного пациента), нормализация температуры происходила после введения НПВС в обычной дозе через 3-4 часа. Субъективные ощущения пациентов во время процедуры ограничились кратковременной головной болью (в 20% случаев), которая купировалась инъекцией ненаркотических анальгетиков.

Из вышеизложенного следует, что при проведении иммунотерапии по предложенному протоколу нежелательных и тем более выраженных для

большого цитокиновых реакций в виде изменений общего состояния пациента, значительного колебания артериального давления, пульса и кожных аллергических проявлений не отмечено. Это свидетельствует об удовлетворительной переносимости процедур клинической иммунотерапии, о предсказуемости и контролируемости предложенного метода лечения, что является одним из его положительных свойств.

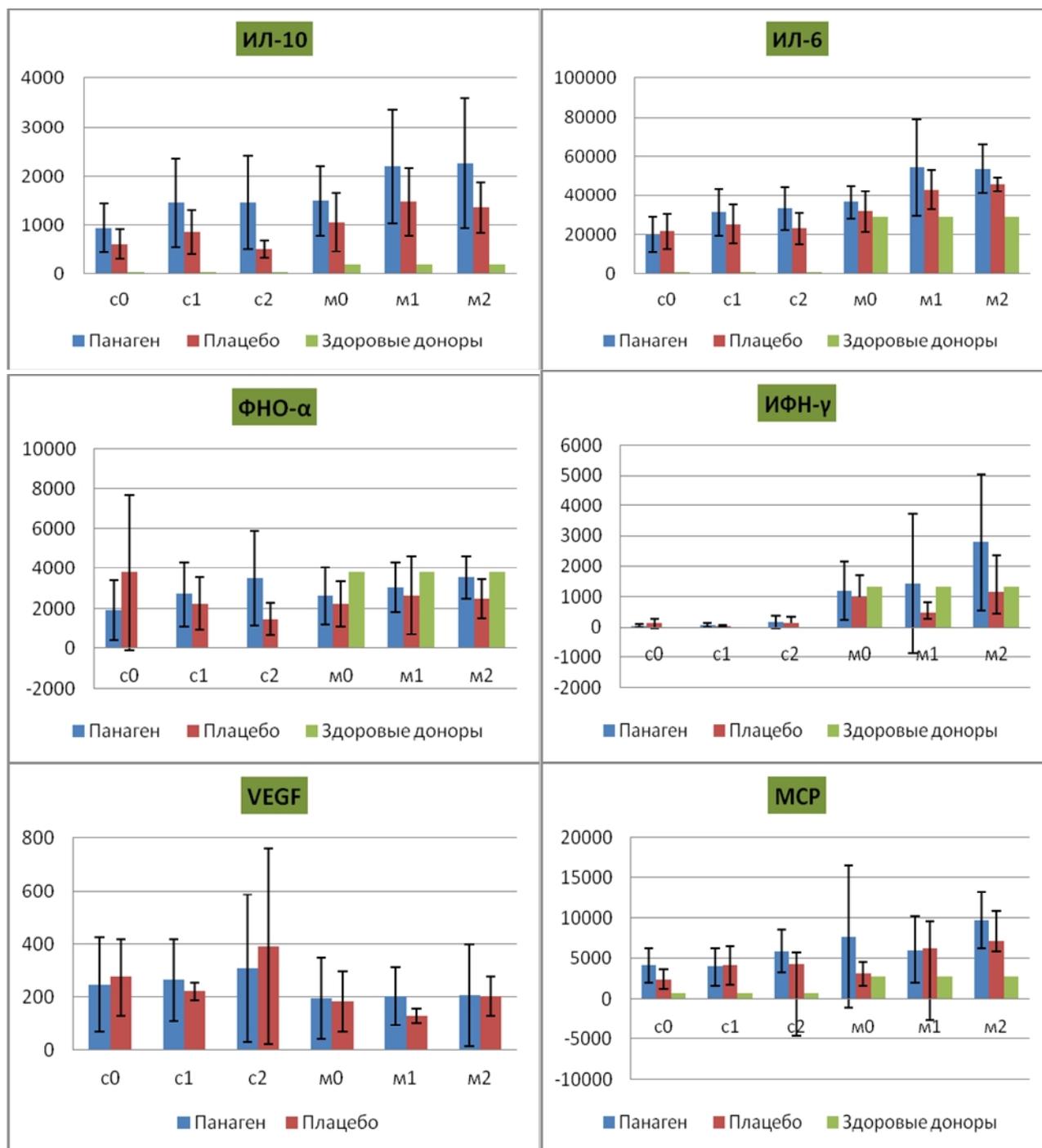
#### **2.4 Оценка изменения цитокинового баланса у больных с онкопатологией, участвующих в исследованиях препарата Панаген на II фазе Клинических испытаний**

Препарат фрагментированной ДНК человека «Панаген» характеризуется специфическим воздействием на иммунные клетки организма и в первую очередь на иммунокомпетентные антигенпрезентирующие ДК. Инкубация культуры ДК в присутствии препарата «Панаген» приводит к созреванию и индукции аллостимуляторной активности ДК. При этом, как было показано на предыдущих этапах работы, активированные препаратом двуцепочечной ДНК человека ДК в смешанной культуре лимфоцитов индуцируют развитие CD8<sup>+</sup> Т-цитотоксических лимфоцитов с повышенным содержанием перфорина. Установлено, что ДК, активированные препаратом двуцепочечной ДНК человека, продуцируют набор провоспалительных цитокинов, определяющих развитие Th1 пути.

Лекарственная форма препарата «Панаген», представляющая собой таблетку, покрытую гастроэнтерическим покрытием, исследовалась в клинических испытаниях второй фазы при лечении рака молочной железы (схема FAS, Новосибирск, 20 пациентов). Предполагалось, что в результате лечения препарат активирует иммунные клетки к продукции цитокинов, определяющих описанную для препарата двуцепочечной ДНК человека активность ингибировать развитие опухолевого трансплантата.

В формате настоящего проекта был проведен анализ продукции цитокинов клетками периферической крови пациентов. Результаты

приведены на рисунке 6 в виде средних значений продукции цитокинов в группах пациентов, принимавших препарат «Панаген» и плацебо, в сравнении с медианой значений, полученных для здоровых доноров.



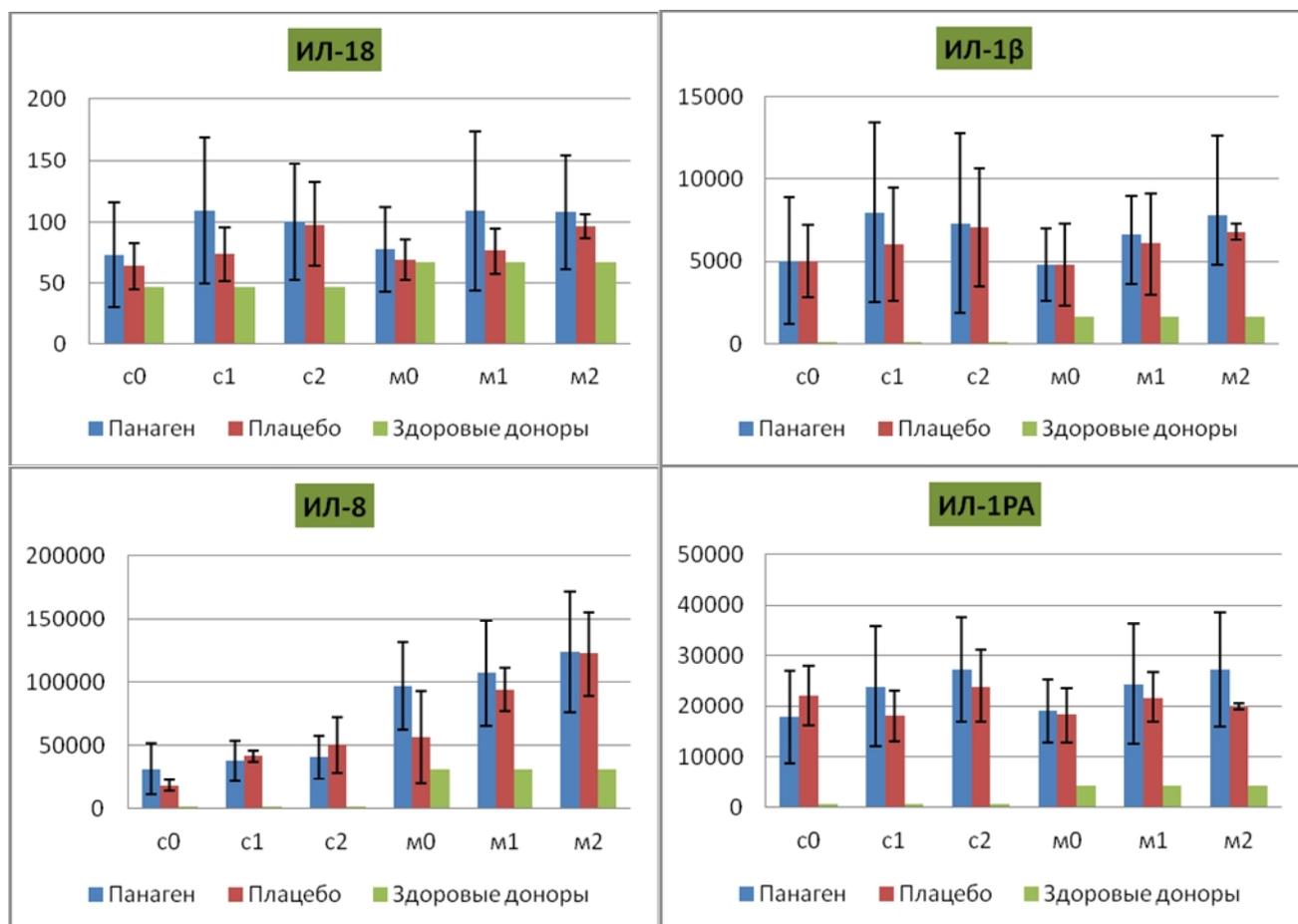


Рисунок 6 – Результаты по продукции цитокинов у пациентов, принимавших препарат «Панаген» и плацебо, а также у здоровых доноров. На диаграммах представлены средние значения продукции цитокинов в каждой точке и стандартное отклонение. Для здоровых доноров приведены медианы значений. С – спонтанная продукция, М – митогенактивированная продукция. С0, М0 – исходная точка, С1, М1 – 21 день после 1 ХТ, С2, М2 – 21 день после 3 ХТ.

Оценка полученных данных на настоящем этапе исследования свидетельствует о следующих тенденциях в изменении цитокинового профиля у исследуемых больных. У всех больных, находящихся в испытании, базовый уровень цитокинов многократно выше, чем у здоровых доноров. Это факт связан с активацией иммунной системы развитием основного заболевания. При спонтанной индукции мононуклеаров периферической крови наблюдается существенное увеличение продукции ИЛ-10 и ФНО-α при использовании препарата «Панаген» на фоне трех непрерывных химиотерапий по схеме FАС. При этом умеренно возрастает продукция таких цитокинов как ИЛ-6, МСР, ИЛ-18, ИЛ-1β, ИЛ-1РА. На

продукцию VEGF и ИЛ-8 препарат «Панаген» действия не оказывает. Митогенактивированная продукция цитокинов мононуклеарами крови пациентов имеет дополнительные характеристики по сравнению со спонтанной. Проведенный анализ демонстрирует существенное увеличение продукции таких цитокинов как ИЛ-10 и ИФН- $\gamma$ . Умеренно увеличивается продукция цитокинов ФНО- $\alpha$ , ИЛ-8, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-18, ИЛ-6, MCP, ИЛ-1РА. На продукцию цитокинов VEGF и ИЛ-8 препарат «Панаген» действия не оказывает.

Полученные первые данные демонстрируют сложный ответ организма на действие препарата «Панаген». Клетки мононуклеарной фракции активируются как к продукции цитокинов Th1 пути ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, так и антагониста ИЛ-10. Предполагается, что такой эффект связан с механизмом действия препарата через лимфоидную ткань кишечника, где активируются иммунные клетки всех типов. При этом каждый тип клеток продуцирует индивидуальный набор цитокинов, что и определяет детектируемый набор. Полученные данные на настоящем этапе исследования, в силу неполной обработанной выборки, характеризуют только определенные тенденции в оцениваемых параметрах и статистически незначимы. Тем не менее, общая совокупность результатов и имеющиеся необработанные данные по оставшимся 30 пациентам предполагают правомерность обсуждения этих тенденций как отражающих определенные процессы активации иммунной системы препаратом фрагментированной ДНК человека.

Таблица 10 – Сравнение спонтанной и митогенактивированной продукции цитокинов у пациентов, принимавших участие в исследовании, и здоровых доноров (данные ЗАО «Вектор-Бэст», набор «ЦИТОКИН-СТИМУЛ-БЕСТ»). ≈ – значение находится в пределах между верхним и нижним квартилями (25-75%) выборки здоровых доноров, ↑UQ – значение превышает верхний квартиль, ↓LQ – значение меньше нижнего квартиля.

	ИЛ-10				ИЛ-6				ФНО-α				ИФН-γ				ИЛ-18			
	с0		м0		с0		м0		с0		м0		с0		м0		с0		м0	
<b>Панаген</b>																				
02-01	1024	↑UQ	919	↑UQ	20739	↑UQ	21490	≈	715	↑UQ	2487	↓LQ	40	↑UQ	294	≈	57	≈	44	≈
02-02	978	↑UQ	2104	↑UQ	28480	↑UQ	45795	↑UQ	1368	↑UQ	5558	≈	12	↑UQ	854	≈	115	↑UQ	100	↑UQ
02-03	1119	↑UQ	1032	↑UQ	27668	↑UQ	31887	≈	1704	↑UQ	3500	≈	81	↑UQ	1749	≈	174	↑UQ	135	↑UQ
02-05	1635	↑UQ	3291	↑UQ	12270	↑UQ	40265	≈	1207	↑UQ	1646	↓LQ	11	↑UQ	1340	≈	36	≈	61	≈
02-06	12	≈	857	↑UQ	383	↑UQ	22884	≈	15	≈	1741	↓LQ	6	≈	976	≈	64	↑UQ	115	↑UQ
02-08	595	↑UQ	1009	↑UQ	16667	↑UQ	34973	≈	2030	↑UQ	844	↓LQ	9	↑UQ	254	↓LQ	44	≈	45	≈
02-10	873	↑UQ	1470	↑UQ	15046	↑UQ	40782	≈	3498	↑UQ	2341	↓LQ	79	↑UQ	1811	≈	33	≈	47	≈
02-11	1548	↑UQ	1643	↑UQ	32566	↑UQ	41757	≈	5422	↑UQ	2080	↓LQ	30	↑UQ	1792	≈	64	↑UQ	61	≈
02-15	1220	↑UQ	1185	↑UQ	26818	↑UQ	41226	≈	1031	↑UQ	1714	↓LQ	43	↑UQ	598	≈	36	≈	39	≈
02-16	1030	↑UQ	1620	↑UQ	24030	↑UQ	46062	↑UQ	2423	↑UQ	4704	≈	170	↑UQ	3390	≈	89	↑UQ	86	≈
02-18	250	↑UQ	1190	↑UQ	16416	↑UQ	35718	≈	1475	↑UQ	2431	↓LQ	66	↑UQ	161	↓LQ	91	↑UQ	119	↑UQ
<b>Плацебо</b>																				
02-07	957	↑UQ	1917	↑UQ	19119	↑UQ	35272	≈	2786	↑UQ	874	↓LQ	31	↑UQ	681	≈	73	↑UQ	57	≈
02-12	577	↑UQ	924	↑UQ	29392	↑UQ	43150	↑UQ	9450	↑UQ	3605	≈	346	↑UQ	1910	≈	81	↑UQ	78	≈
02-14	473	↑UQ	645	↑UQ	27993	↑UQ	19064	≈	2346	↑UQ	2135	↓LQ	108	↑UQ	1073	≈	63	↑UQ	88	≈
02-19	448	↑UQ	688	↑UQ	10096	↑UQ	29368	≈	623	↑UQ	2279	↓LQ	29	↑UQ	304	≈	38	≈	53	≈

	MCP				ИЛ-1β				ИЛ-8				ИЛ-1РА			
	c0		m0		c0		m0		c0		m0		c0		m0	
<b>Панаген</b>																
02-01	2381	↑UQ	2218	≈	4285	↑UQ	2401	≈	24615	↑UQ	59730	↑UQ	18740	↑UQ	14534	≈
02-02	7551	↑UQ	6535	↑UQ	10909	↑UQ	6515	↑UQ	61678	↑UQ	103013	↑UQ	12012	↑UQ	15884	≈
02-03	2697	↑UQ	2292	≈	12329	↑UQ	9185	↑UQ	65830	↑UQ	97935	↑UQ	17607	↑UQ	13582	≈
02-05	4012	↑UQ	11147	↑UQ	1497	↑UQ	4267	≈	16684	↑UQ	129445	↑UQ	37417	↑UQ	31167	↑UQ
02-06	6222	↑UQ	32712	↑UQ	171	↑UQ	3000	≈	5147	↑UQ	170998	↑UQ	2462	↑UQ	25073	↑UQ
02-08	2127	↑UQ	5480	↑UQ	3130	↑UQ	2625	≈	20635	↑UQ	84081	↑UQ	21526	↑UQ	20546	↑UQ
02-10	915	≈	1333	↓LQ	3143	↑UQ	6476	↑UQ	11582	↑UQ	62538	↑UQ	6545	↑UQ	8195	≈
02-11	7243	↑UQ	9076	↑UQ	7325	↑UQ	4773	↑UQ	34127	↑UQ	128078	↑UQ	18163	↑UQ	22788	↑UQ
02-15	4311	↑UQ	5557	↑UQ	2417	↑UQ	3160	≈	50564	↑UQ	79780	↑UQ	25258	↑UQ	19402	↑UQ
02-16	3915	↑UQ	3802	≈	6743	↑UQ	6979	↑UQ	30767	↑UQ	78129	↑UQ	18947	↑UQ	21972	↑UQ
02-18	3505	↑UQ	4453	≈	3511	↑UQ	3446		19007	↑UQ	68638	↑UQ	18076	↑UQ	17790	↑UQ
<b>Плацебо</b>																
02-07	1410	≈	2641	≈	4114	↑UQ	2854	≈	22381	↑UQ	91603	↑UQ	20630	↑UQ	11812	≈
02-12	1890	↑UQ	2189	≈	8210	↑UQ	8139	↑UQ	14643	↑UQ	50000	↑UQ	17154	↑UQ	16379	≈
02-14	2146	↑UQ	2712	≈	4607	↑UQ	3036	≈	20749	↑UQ	7250	↓LQ	19961	↑UQ	20612	↑UQ
02-19	4098	↑UQ	5052	↑UQ	3167	↑UQ	5256	↑UQ	13542	↑UQ	75836	↑UQ	30769	↑UQ	24392	↑UQ

## 2.5 Определение соотношения некоторых поверхностных маркеров у больных с онкопатологией, участвующих в исследованиях препарата Панаген на II фазе Клинических испытаний

Была проведена оценка соотношения CD34+/45+ поверхностных маркеров, характерных для клеток предшественников гемопоэза. Оценка проводилась на 7 сутки после введения цитостатика на первой химиотерапии (ХТ) и на 21 сутки после каждой проведенной ХТ согласно протоколу клинических исследований фаза II для пациентов с раком молочной железы, проходящих химиотерапию по схеме FAC – доксорубин, циклофосфан, фторурацил (таблица 11).

Таблица 11 – Процентное содержание CD34+/45+ клеток в периферической крови у пациентов, получавших препарат «Панаген» и плацебо, в различных контрольных точках в ходе проведения трех курсов ХТ.

	0	7 день	21 день		
		после 1 ХТ	после 1 ХТ	после 2 ХТ	после 3 ХТ
<b>Панаген</b>					
02-01	1,90	0,05	0,19	0,03	0,15
02-02	0,03	0,08	0,15	0,20	0,10
02-03	0,02	0,03	0,25	0,70	0,30
02-04	1,20	0,05	0,15	0,05	
02-05	0,14	0,12	0,26	0,14	0,07
02-06	0,09	0,16	0,26	0,22	0,25
02-08	0,38	0,01	0,66	0,50	0,20
02-09	0,02	0,10	0,14	0,09	0,08
02-10	0,02	0,10	0,10	0,08	0,08
02-11	0,05	0,03	0,30	0,22	0,31
02-13	0,04	0,20			
02-15	0,03		0,08	0,07	
02-16	0,08	0,02	0,17	0,28	
02-18	0,02		0,24	0,04	0,11
<b>Плацебо</b>					
02-07	0,05	0,08	0,19	0,45	0,08
02-12	0,05	0,05	0,20	0,30	0,43
02-14	0,12	0,01	0,20	0,31	
02-19	0,08	0,04	0,55		

При анализе полученных результатов был выявлен факт того, что часть или все пациенты группы «Плацебо» отвечают на проведенную терапию

существенно превосходящим исходный уровень увеличением значения характеризуемого показателя (CD34+/45+ ГСК). В этой связи было проведено статистическое сравнение с использованием двух подходов.

В первом варианте сравнения был применен критерий Вилкоксона-Манна-Уитни после разбивки выборки на две группы «отвечающие» и «не отвечающие».

Второй вариант сравнения учитывал тот факт, что в группе «Плацебо» определенное количество пациентов или все пациенты также отвечали существенным увеличением над исходным уровнем в значениях показателя на проводимую терапию. В этом случае рассчитывались и сравнивались медианы по группам, квартильные диапазоны 25-75% и минимум-максимум диапазоны. Также оценивалось количество пациентов в каждой группе.

При анализе учитывался тот факт, что часть пациентов не отвечает на действие препарата в данной контрольной точке, а другая часть отвечает. При этом, в другой контрольной точке, те пациенты или часть пациентов, которые не отвечали на действие препарата, становятся чувствительными к его действию.

Как показал проведенный анализ, число предшественников гемопоэза к 21 дню каждой последующей ХТ многократно превышал исходный уровень как в группе принимающих препарат «Панаген», так и в группе «Плацебо» (таблица 12). Это связано с тем, что терапии по схемам, включающим цитостатик циклофосфан, обладают самостоятельным мобилизующим действием на предшественников кроветворения и часто используются в сочетании с Г-КСФ с целью максимальной активации пролиферации и выходу в кровь клеток нейтрофильного ряда.

Анализ относительного значения параметра на 7 сутки после проведения 1 ХТ показал существенную и достоверную разницу в количестве предшественников гемопоэза между группами «Плацебо» и «Панаген – отвечающие» (рисунок 7).

Таблица 12 – Условное содержание CD34+/45+ клеток в периферической крови пациентов в различных контрольных точках в ходе проведения 3 курсов ХТ по отношению к исходному уровню. Красным цветом и звездочкой (\*) выделены медианы значений в группе «Панаген – отвечающие», которые достоверно выше по сравнению с группой «Плацебо» ( $p < 0,05$ , критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

	7 день	21 день		
	после 1 ХТ	после 1 ХТ	после 2 ХТ	после 3 ХТ
<b>Панаген</b>				
02-01	2,6	10,0	1,6	7,9
02-02	230,3	454,5	606,1	303,0
02-03	165,0	1250,0	3500,0	1500,0
02-04	4,2	12,5	4,2	
02-05	85,7	185,7	100,0	50,0
02-06	177,8	288,9	244,4	277,8
02-08	3,2	173,7	131,6	52,6
02-09	476,2	666,7	428,6	381,0
02-10	588,2	588,2	470,6	470,6
02-11	68,1	638,3	468,1	659,6
02-13	500,0			
02-15		266,7	233,3	
02-16	25,0	212,5	350,0	
02-18		1000,0	166,7	458,3
Медиана	<b>125,4</b>	<b>288,9</b>	<b>244,4</b>	<b>342,0</b>
Отвечающие, %	50	85	85	70
Не отвечающие, %	50	15	15	30
Медиана по отвечающим	<b>353,2*</b>	<b>454,5</b>	<b>350,0</b>	<b>458,3</b>
Медиана по не отвечающим	14,6	11,3	2,9	50,0
Общее количество ответивших пациентов, %	<b>86</b>			
<b>Плацебо</b>				
02-07	152,0	380,0	900,0	160,0
02-12	100,0	400,0	600,0	860,0
02-14	5,8	166,7	258,3	
02-19	43,8	687,5		
Медиана	<b>71,9</b>	<b>390,0</b>	<b>600,0</b>	<b>510,0</b>



Рисунок 7 – Относительное количество CD34+/45+ клеток в периферической крови участников клинических исследований на 7 контрольные сутки после первой ХТ по отношению к исходному уровню. Красной звездочкой (\*) отмечены достоверные отличия от группы «Плацебо» ( $p < 0,05$ , критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Также было проведено статистическое сравнение, при котором учитывался минимальный-максимальный диапазон значений в группе «Плацебо» (выборка стандартизации, статистическая норма). В этом случае учитывались значения в выборке стандартизации, а не отношение значений в контрольных точках к нулевому значению. Такая оценка позволяла учесть изменения в группе «Плацебо», связанные с проводимой стандартной терапией (рисунок 8). Полученные результаты с использованием двух статистических подходов полностью соответствуют друг другу. У 50% пациентов в группе «Панаген» количество ГСК в периферической крови на 7 сутки после 1 ХТ достоверно больше, чем в группе «Плацебо».

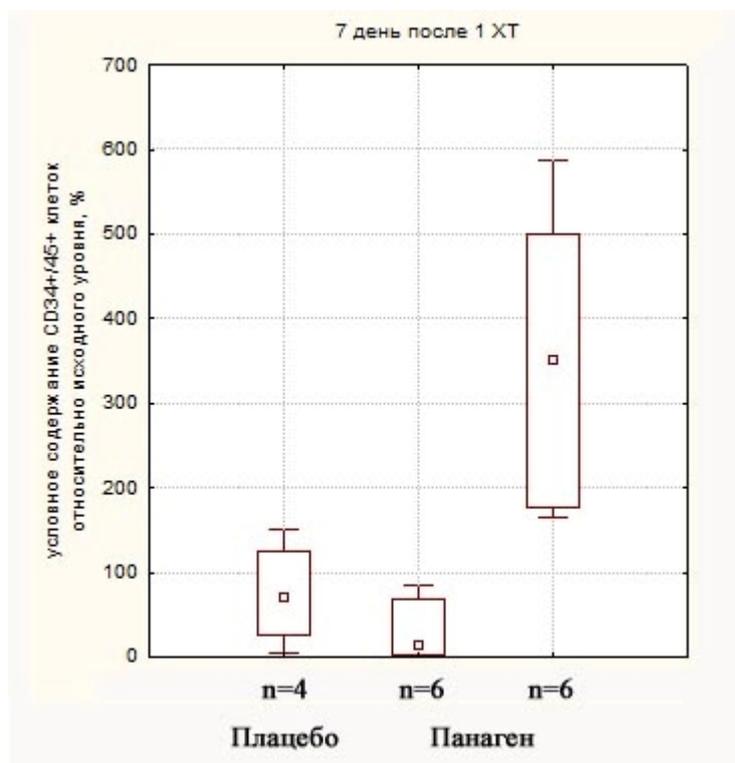


Рисунок 8 – Условное содержание CD34+/45+ клеток в периферической крови пациентов, находящихся в исследовании, на 7 день после 1 ХТ. Приведены медианы по группам, квартильный диапазон 25-75% (прямоугольник) и минимум-максимум диапазон; n – количество пациентов в каждой группе.

Факт активации пролиферации CD34+/45+ тотипотентных гемопоэтических стволовых клеток был обнаружен экспериментально при анализе показателей, полученных в контрольной точке 7 сутки после 1 ХТ. Оказалось, что только в этот момент времени можно обнаружить достоверные отличия в показателе в группе ответивших на препарат «Панаген» пациентов по сравнению с группой пациентов, принимавших плацебо. В остальных контрольных точках действие препарата «Панаген» экранируется мобилизирующим действием циклофосфана на стволовые клетки.

### 3 Обобщение результатов по итогам всего проекта

ДК являются уникальными антигенпрезентирующими клетками, способными индуцировать иммунный ответ против различных антигенов, включая опухолевые и вирусные антигены. Наряду с запуском адаптивного

иммунного ответа эти клетки обладают непосредственной эффекторной функцией и способны лизировать опухолевые и вирус-инфицированные клетки. При опухолевом росте и хронических рецидивирующих вирусных заболеваниях количественные и функциональные параметры ДК претерпевают существенные изменения, что приводит к снижению эффективности иммунного ответа. Соответственно технологии генерации ДК и использования их в качестве индивидуальных вакцин рассматриваются в качестве перспективных инновационных клеточных технологий, направленных на усиление противоопухолевого и противовирусного иммунитета. Развитие подобных технологий стало возможным благодаря разработке методов генерации ДК из периферической крови человека.

Традиционно ДК генерируют путем культивирования прилипающей фракции МНК в присутствии двух ключевых цитокинов – гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) и интерлейкина-4 (ИЛ-4) [3]. ГМ-КСФ индуцирует дифференцировку в миеломоноцитарном направлении, а ИЛ-4 ингибирует созревание моноцитов в сторону макрофагальной линии [28]. Генерируемые таким образом незрелые миелоидные ДК (ИЛ4-ДК) обладают высокой способностью к захвату антигена, но слабой стимуляторной активностью в отношении Т-клеток. Дальнейшее культивирование ДК в присутствии ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1, ЛПС, CD40-лиганд или коктейля факторов ведет к дозреванию ДК и повышению их способности стимулировать Т-клеточный иммунный ответ [29]. Однако, является ли такой путь генерации физиологичным – остается спорным вопросом, поскольку локальная продукция высоких концентраций ИЛ-4 *in vivo* в ответ на различные стресс-факторы представляется маловероятной. Кроме того, генерируемые *in vitro* ИЛ4-ДК обладают низкой миграционной активностью и в условиях дефицита ростовых факторов могут подвергаться обратной трансформации в моноциты.

Наряду с традиционным протоколом, Santini с соавт. продемонстрировали, что частично зрелые ДК можно генерировать при

замене ИЛ-4 ИФН- $\alpha$  [30-35]. Такой путь генерации представляется более физиологичным, поскольку ИФН- $\alpha$  является ранним медиатором врожденного иммунного ответа и продуцируется в больших количествах в ответ на стимуляцию инфекционными антигенами и провоспалительными цитокинами. Кроме того, ИФН-ДК имеют ряд особенностей, делающих эти клетки «привлекательными» в плане потенциального клинического использования. Так, ИФН-ДК генерируются быстрее по времени, характеризуются высокой способностью к захвату антигена, сохраняют стабильность в отсутствие цитокинов, имеют более высокую миграционную активность, более активно стимулируют CD8 Т-лимфоциты и индуцируют сбалансированный иммунный ответ, поскольку наряду с выраженной Th1-стимулирующей способностью обладают умеренной Th2-стимулирующей активностью [31, 36, 37].

Учитывая также, что интерфероны способны усиливать цитотоксический потенциал ДК [38-40] и ИФН-ДК по некоторым данным обладают более выраженной цитотоксической активностью [41], применение этого типа ДК при опухолевых и вирусных заболеваниях представляется весьма перспективным.

Несмотря на возрастающий интерес к ИФН-ДК, свойства этих клеток, особенно активированных ИФН-ДК, охарактеризованы недостаточно. Это касается спектра и уровня продуцируемых ДК цитокинов, экспрессии ряда поверхностных молекул и способности ДК активировать Th и Th2 ответ. В литературе практически отсутствуют сравнительные данные о цитотоксической и толерогенной активности ИЛ4-ДК и ИФН-ДК. Кроме того, допуская, более высокую экспрессию «проапоптогенных» молекул на ИФН-ДК, нельзя исключить, что эти ДК будут оказывать более выраженное ингибирующее действие на Т-клетки. Имеются отдельные сообщения, что ИФН-ДК продуцируют более высокий уровень ИЛ-10 и индуцируют дифференцировку регуляторных Т-клеток 1-го типа [37, 42], что может обуславливать более высокий толерогенный потенциал этих клеток.

Неисследованным остается также вопрос, насколько эффективно могут генерироваться ИФН-ДК при различных патологических состояниях и отличаются ли ИФН-ДК в таком случае по функциональной активности. Наконец, большой интерес представляет клиническая апробация ИФН-ДК в качестве адьювантной клеточной терапии, направленной на активацию специфического иммунного ответа у больных с опухолевыми и инфекционными заболеваниями.

Целью данной работы являлось обоснование и разработка технологии создания индивидуальных вакцин на базе инновационных подходов генерации ДК с использованием ИФН- $\alpha$  для лечения онкологических и инфекционных (вирусных) заболеваний человека.

В ходе работ первого этапа были исследованы фенотипические и функциональные свойства ИФН-ДК в сравнении с ИЛ4-ДК. Установлено, что по своим фенотипическим характеристикам популяция ИФН-ДК является «частично зрелыми» (semi-mature DCs) клетками, и отличается от ИЛ4-ДК повышенным содержанием CD123+ ДК, а также клеток, экспрессирующих B7-H1 и TRAIL, что свидетельствует об их более высоком цитотоксическом потенциале. Кроме того, ИФН-ДК отличаются повышенной продукцией Th1/провоспалительных (ИФН- $\gamma$ , ИЛ-2, ИЛ-17, ИЛ-1 $\beta$ ) и Th2/противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10, ИЛ-5), а также Г-КСФ и MСР-1. Таким образом, ИФН-ДК по сравнению с ИЛ4-ДК могут более активно индуцировать реакции клеточного и гуморального иммунитета. При обследовании больных раком молочной железы показано, что на фоне химиотерапии, сочетающейся с приемом препарата фрагментированной ДНК человека (Панаген), регистрируется достоверное увеличение относительного содержания плазмацитоидных CD123+/HLA-DR+ ДК, и абсолютного количества миелоидных CD11c+/HLA-DR+ ДК, что свидетельствует о позитивных изменениях параметров иммунитета, благоприятствующих подавлению опухолевого роста.

В ходе работ второго этапа исследована функциональная способность ИФН-ДК и ИЛ4-ДК активировать Т-лимфоциты, а именно – Th1- и Th2-клетки, а также цитотоксические CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты с внутриклеточным содержанием перфорины. Установлено, что ИФН-ДК обладают схожей с ИЛ4-ДК способностью активировать Т-клетки к продукции Th1/провоспалительных (ИЛ-2, ИЛ-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$ , ИЛ-12p70, ИЛ-17) и Th2/противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-13), ростовых факторов гемоиммунопозза (ИЛ-7, Г-КСФ, ГМ-КСФ), а также СХС и СС хемокинов (ИЛ-8, MCP-1). При этом ИФН-ДК оказывают более выраженный стимулирующий эффект на Th1- и Th2-клетки, что проявляется достоверно более высоким уровнем продукции ИФН- $\gamma$  и ИЛ-5, а также СС хемокина – MIP-1 $\beta$ . По сравнению с ИЛ4-ДК ИФН-ДК обладают более выраженной способностью активировать Th1 клетки, что проявляется 10-кратным увеличением количества CD3<sup>+</sup>ИФН- $\gamma$ <sup>+</sup> Т-клеток в смешанной культуре лимфоцитов. Кроме того, ИФН-ДК характеризуются также наличием умеренной Th2-стимуляторной активности, которая проявляется в смешанной культуре лимфоцитов статистически значимым увеличением количества CD3<sup>+</sup>ИЛ-4<sup>+</sup> Т-клеток, и практически отсутствует у ИЛ4-ДК. Показано, что ИФН-ДК характеризуются способностью к активации цитотоксических Т-лимфоцитов, экспрессирующих внутриклеточно перфорин. При этом, данная функциональная активность ИФН-ДК может быть дополнительно усилена при использовании в качестве дозревающего стимула нативной ДНК человека (препарат Панаген). Таким образом, ИФН-ДК по сравнению с ИЛ4-ДК могут более активно индуцировать реакции клеточного и гуморального иммунитета.

В ходе работ третьего этапа исследованы особенности фенотипа и функциональной активности ИФН-ДК у больных с онкопатологией (злокачественные глиомы, лимфомы) и инфекционными заболеваниями (гепатит В и С, туберкулез). Установлено, что ИФН-ДК, генерируемые у пациентов с онкопатологией и инфекционными заболеваниями,

характеризуются некоторой задержкой дифференцировки/созревания, что проявляется увеличением клеток с фенотипом моноцитов (CD14+) и ДК промежуточной степени зрелости (CD1a, CD83+CD1a+, CD11+CD123+), а с другой стороны – снижением доли клеток, экспрессирующих молекулы зрелых и активированных ДК (CD83+, CD83+CD1a–, CD25+). Среди больных с онкопатологией эти признаки были наиболее выражены в группе больных со злокачественными лимфомами, в меньшей степени – в группе пациентов со злокачественными глиомами и минимальны у больных с множественной миеломой. Среди больных с инфекционными заболеваниями наиболее выраженные нарушения дифференцировки/созревания ДК регистрировались у пациентов с хроническими вирусными гепатитами с исходом в цирроз печени, а также у больных туберкулезом легких с туберкулиновой анергией (сниженным пролиферативным ответом Т-клеток на ППД). Изменения фенотипа ИФН-ДК, как правило, ассоциируются с нарушениями функциональной (цитокин-секреторной и Th1/Th2-стимуляторной) активности ИФН-ДК, которые в зависимости от вида патологии также имеют различную степень выраженности – от явных дисфункций до их минимальных проявлений или отсутствия таковых.

В ходе работ четвертого этапа исследовано влияние различных биоактивных продуктов (гормона – дегидроэпиандростерон сульфата [ДГЭАС]; иммуномодулирующих препаратов – сополимера N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксиэтил)-1,4-этиленпиперазиний бромида [«Полиоксидоний»] и комплекса нативных провоспалительных цитокинов [«Суперлимф»], препарата рекомбинантного ИЛ-2 человека [«Ронколейкин»]; препарата двуцепочечной ДНК человека [«Панаген»]) на фенотипические и функциональные характеристики ИФН-ДК здоровых доноров и больных с онкопатологией (злокачественные глиомы, лимфомы) и туберкулезом легких. В частности, изучали корригирующие эффекты исследуемых биоактивных медиаторов на процесс дифференцировки и созревания ИФН-ДК, а также их влияние на аллостимуляторную, цитокин-

секреторную и цитотоксическую активность ДК, генерируемых в культуре *in vitro*. Установлено, что иммуномодулирующие препараты («Полиоксидоний», «Суперлимф»), препарат двуцепочечной ДНК человека («Панаген»), а также гормон ДГЭАС характеризуются выраженным стимулирующим эффектом на процесс дифференцировки/созревания ИФН-ДК. Так, например, Панаген по своему стимулирующему действию на ДК был сопоставим с «классическим» дозревающим стимулом – липополисахаридом стенки бактерий. Показано, что стимулирующий эффект ДГЭАС на созревание ИФН-ДК во многом обусловлен усилением эндогенной продукции ФНО $\alpha$  – цитокина, который является одним из мощных «созревающих» стимулов для ДК. При исследовании влияния биоактивных препаратов на функциональные свойства ДК, полученных от больных с онкопатологией и туберкулезом легких, была показана принципиальная возможность восстановления сниженной функциональной активности ДК у больных с тяжелыми онкологическими и инфекционными заболеваниями с помощью различных биоактивных препаратов («Полиоксидоний», «Суперлимф», «Ронколейкин», «Панаген»), добавление которых на этапе конечного созревания ДК позволяет значительно повысить аллостимуляторную и цитотоксическую активность генерируемых *in vitro* ИФН-ДК.

В ходе работ пятого этапа проведен анализ результатов пилотных клинических исследований по оценке переносимости и клинической эффективности вакцин на основе ИФН-ДК в лечении хронической рецидивирующей герпетической инфекции. Установлено, что проведение специфической иммунотерапии с использованием индивидуальных, аутологичных лечебных вакцин на основе ИФН-ДК в виде курса подкожных инъекций у больных с хронической и часто рецидивирующей герпетической инфекцией позволяет уменьшить число/выраженность клинических проявлений рецидивов и увеличить продолжительность безрецидивного периода за счет эффективной активации антиген-специфического

противовирусного иммунного ответа и восстановления функциональной реактивности Т-клеток. Проведение дендритноклеточных вакцинаций характеризовалось хорошей переносимостью и было безопасным. При исследовании влияния препарата двуцепочечной ДНК человека («Панаген») на уровень продукции цитокинов клетками крови здоровых доноров в культуре *in vitro* было установлено, что препарат двуцепочечной ДНК стимулирует продукцию целого ряда цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- $\alpha$ , ИФН- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ , МСР, VEGF, ИЛ-1RA и ИЛ-10, при этом его стимулирующий эффект был близким или сравнимым с действием комплекса митогенов. В целом, проведенные исследования обосновывают новые подходы в лечении инфекционных (вирусных) и онкологических заболеваний с использованием аутологичных дендритноклеточных вакцин.

В ходе работ шестого этапа было показано, что иммунотерапия с применением ИФН-ДК у больных со ЗОГМ безопасна и не вызывает побочных реакций (воспалительных, аутоиммунных и аллергических), сопровождается индукцией противоопухолевого иммунного ответа, увеличением сроков выживаемости больных и улучшением качества их жизни. Был проведен анализ продукции цитокинов клетками периферической крови пациентов в рамках второй фазы клинических исследований препарата Панаген (схема FAS, Новосибирск, 20 пациентов). Кроме того, была проведена оценка соотношения CD34<sup>+</sup>/45<sup>+</sup> поверхностных маркеров, характерных для клеток предшественников гемопоэза, у больных с онкопатологией, участвующих в исследованиях препарата Панаген на II фазе Клинических испытаний. У 50% пациентов в группе «Панаген» количество гемопоэтических стволовых клеток в периферической крови на 7 сутки после 1 химиотерапии было достоверно больше, чем в группе «Плацебо».

Проведенное исследование позволило охарактеризовать ДК, генерируемые в условиях замены ИЛ-4 на ИФН- $\alpha$  и сравнить ИФН-ДК по фенотипу и функциональной активности с ДК, генерируемыми в «стандартном» протоколе с ИЛ-4. Причем впервые проведена сравнительная

характеристика ИФН-ДК и ИЛ4-ДК, активированных ЛПС. Полученные данные позволили заключить, что ИФН-ДК имеют отличительные особенности, ряд из которых делает эти клетки привлекательными для использования в клинической практике. В отличие от ИЛ4-ДК, ЛПС-активированные ИФН-ДК сохраняют промежуточный по степени зрелости фенотип, т.к. характеризуются более высоким содержанием клеток, экспрессирующих CD14, CD11cCD123 и меньшим количеством зрелых CD83<sup>+</sup> клеток и обладают высокой эндоцитарной активностью. При этом ИФН-ДК характеризуются сходной экспрессией костимуляторных молекул (CD86) и молекул главного комплекса гистосовместимости (HLA-DR), а также сравнимой аллостимуляторной активностью, что свидетельствует об их сохранной и аналогичной с ИЛ4-ДК антигенпрезентирующей функции. По сравнению с ИЛ4-ДК, популяция ИФН-ДК характеризуется более высокой цитокин-продуцирующей функцией, в том числе способностью продуцировать ИФН- $\gamma$ , ИЛ-2, ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-10, ИЛ-5, G-CSF и MCP-1 и оказывает более выраженный стимулирующий эффект на Th1 и Th2-клетки. В то же время супрессорная/толерогенная активность ИФН-ДК, в частности, способность индуцировать генерацию CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>ИЛ10<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток, не превышает таковую у ИЛ4-ДК. Наконец, отличительным свойством ИФН-ДК является более выраженная цитотоксическая активность против опухолевых клеток, ассоциированная с более высокой экспрессией молекулы TRAIL.

Исследование ИФН-ДК у больных онкологическими и инфекционными заболеваниями показало принципиальную возможность получения этих клеток в культуре *in vitro*. Тем не менее, при ряде патологий генерируемые ДК отличались признаками задержки дифференцировки и созревания, что проявлялось увеличением в популяции ИФН-ДК клеток с фенотипом незрелых ДК и ДК промежуточной степени зрелости (CD14<sup>+</sup>, CD1a<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup>, CD11<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup>) и снижением доли клеток, экспрессирующих молекулы зрелых и активированных ДК (CD83<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup>, CD25<sup>+</sup>). Кроме

того, ИФН-ДК у больных с онкопатологией и инфекционными заболеваниями характеризовались снижением продукции цитокинов с Th1/провоспалительной и/или усилением секреции Th2/противовоспалительных цитокинов, ослаблением Th1-стимулирующей активности и/или усилением Th2-стимулирующей активности, а также снижением цитотоксической активности (у больных с онкопатологией). В целом, выявленные изменения свидетельствовали о снижении стимулирующей активности ДК и приобретении ими толерогенных/супрессорных свойств, ассоциированных с повышенной продукцией ИЛ-10, снижением Th1- и усилением Th-2 стимуляторной активности. Эти изменения у больных с онкопатологией ДК были наиболее выражены у пациентов злокачественной лимфомой, а среди пациентов с инфекционными заболеваниями – в группе с вирусным гепатитом С и у больных туберкулезом легких со сниженным антигенспецифическим ответом.

Исследование влияния различных иммуноактивных препаратов (интерлейкина-2, комплекса провоспалительных цитокинов, двуцепочечной ДНК и полиоксидония) на функции ДК показало, что обработка ДК этими препаратами на этапе созревания в культуре *in vitro* значительно усиливала аллостимуляторную активность ДК у больных со злокачественными лимфомами и туберкулезом легких. Культивирование ДК с интерлейкином-2, полиоксидонием и препаратом ДНК («Панаген») усиливало цитотоксическую активность ДК у больных онкологическими заболеваниями. Полученные результаты обосновывают принципиальную возможность коррекции дисфункций ИФН-ДК, при наличии таковых у больных с онкопатологией и инфекционными заболеваниями.

Итогом заключительных разделов работы стала оценка безопасности и эффективности иммунотерапии на основе ИФН-ДК в лечении больных ЗОГМ и хроническими вирусными инфекциями. Проведенные исследования показали хорошую переносимость и безопасность вакцин на основе ДК. При

этом было продемонстрировано, что вакцинация ИНФ-ДК индуцировала развитие антигенспецифического ответа как у больных ЗОГМ, так и пациентов с герпесвирусной инфекцией. При этом иммунотерапия с использованием ИНФ-ДК сопровождалась положительными клиническими эффектами, которые проявлялись улучшением показателей качества жизни/выживаемости у больных со злокачественными внутримозговыми опухолями и увеличением продолжительности безрецидивного периода при хронической герпесвирусной инфекции.

В целом, полученные результаты обосновывают возможность и перспективность использования ИНФ-ДК в качестве клеточной основы для создания индивидуальных лечебных вакцин, которые могут быть использованы в комплексной терапии больных с онкопатологией или хроническими вирусными заболеваниями для индукции/усиления противоопухолевого или противоинфекционного иммунного ответа.

### **Заключение**

Иммунотерапия является многообещающим подходом в профилактике и лечении злокачественных опухолей и хронических вирусных инфекций. Среди различных методов специфическая иммунотерапия представляет особый интерес, поскольку является единственным истинно лечебным мероприятием, осуществление которого в организме не затрагивает (или минимально затрагивает) функции иммунокомпетентных клеток иной специфичности и других регуляторных систем организма. Известно, что как опухолевые, так и хронические вирусные заболевания протекают на фоне уже выраженных изменений иммунитета. Уместно также отметить, что опухолевые антигены обладают невысокой иммуногенностью и не индуцируют провоспалительного ответа. Более того, к опухолевым антигенам имеется толерантность, поскольку большинство из них принадлежит к аутоантигенам нормальных тканей. Учитывая эти обстоятельства, главным в решении вопросов эффективности

противоопухолевой терапии должны стать проблемы элиминации активности опухолевых супрессорных факторов и ослабления/выключения активности регуляторных супрессорных Т-клеток, создания длительной иммунологической памяти, протекции эффекторных Т-клеток от анергии и апоптоза,. Соответственно, важным критерием эффективности вакцин для больных с продвинутыми стадиями опухолевого процесса может служить не только выраженность регрессии опухоли, но и длительность стабилизации процесса.

С другой стороны, вирусные антигены высоко иммуногенны и при взаимодействии с антигенпрезентирующими клетками индуцируют продукцию провоспалительных цитокинов (необходимых для созревания ДК и их эффективного взаимодействия с Т-лимфоцитами), но, при наличии дефекта антигенпрезентирующих клеток при хронизации процесса не происходит эффективного развития иммунного ответа. Поэтому запуск антигенспецифического ответа с помощью ДК-вакцин, несомненно является перспективным способом иммунотерапии хронических вирусных инфекций.

Суммируя представленные выше данные можно заключить, что имеющиеся на сегодняшний день результаты иммунотерапии пока далеки от совершенства. Тем не менее, данный этап является основой для разработки новых стратегий иммунотерапии и вселяет надежду, что результаты лечения злокачественных опухолей и хронических вирусных инфекций в будущем могут быть существенно улучшены.

Таким образом, полученные нами результаты научно обосновывают целесообразность использования ИФН-ДК в качестве клеточной основы при создании индивидуальных лечебных вакцин, которые могут быть использованы в комплексной терапии больных с онкопатологией или хроническими вирусными заболеваниями для индукции/усиления противоопухолевого или противои инфекционного иммунного ответа.

В ходе работ шестого этапа было показано, что иммунотерапия на основе ИФН-ДК у больных ЗОГМ сопровождается индукцией

специфического иммунного ответа (усилением пролиферативного ответа МНК и появлением реакции ГЗТ в ответ на опухолевые антигены). Отсутствие выраженных побочных реакций, улучшение показателей качества жизни и выживаемости свидетельствует о безопасности и клинической эффективности ДК вакцин в лечении больных с онкопатологией.

Была разработана необходимая регламентирующая документация – протокол клинических исследований, форма информированного согласия, стандарты операционных процедур (SOPs) получения дендритноклеточных вакцин, проведения вакцинотерапии, оценки антиген-специфического иммунного ответа.

Экономическая эффективность работы заключается в том, что результаты работы могут быть использованы для создания новой медицинской технологии применения индивидуальных ДК-вакцин для лечения инфекционных (вирусных) заболеваний человека, которая после регистрации в Росздравнадзоре может быть внедрена в практическое здравоохранение.

Результаты, полученные в ходе выполнения НИР, используются в виде разделов курса иммунологии, читающегося на кафедре иммунологии Новосибирского государственного медицинского университета, и курса клинической иммунологии, читающегося студентам 4 курса медицинского факультета Новосибирского государственного университета, а также в виде лекционного материала в обучении клинических ординаторов и аспирантов НИИ клинической иммунологии СО РАМН. Подготовлена рабочая учебная программа тематического усовершенствования врачей (72 ч) по курсу «Применение клеточных технологий в медицине», в которую также включены лекции с использованием научных данных, полученные в ходе выполнения НИР.

Предусмотренные календарным планом задания выполнены полностью.

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Steinman R.M., Dodhapkar M. Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future // *Int. J. Cancer.* – 2001. – V. 94. – P. 459-473.
- 2 Valone F.H., Small E., MacKenzie M., Burch P., Lacy M., Peshwa M.V., Laus R. Dendritic cell-based treatment of cancer: closing in on a cellular therapy // *Cancer J.* – 2001. – V. 1/2. – P. 53-61.
- 3 Thurner B., Roder C., Dieckmann D., Heuer M., Kruse M., Glaser A., Keikavoussi P., Kampgen E., Bender A., Schuler G. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical applications // *J. Immunol. Meth.* – 1999. – V. 223. – P. 1-15.
- 4 Celluzzi C.M., Mayordomo J.I., Storkus W.J., Lotze M.T., Falo L.D. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity // *J. Exp. Med.* – 1996. – V. 183. – P. 283-287.
- 5 Tjoa B.A., Simmons S.J., Bowes V.A., Ragde H, Rogers M, Elgamal A, Kenny GM, Cobb OE, Ireton RC, Troychak MJ, Salgaller ML, Boynton AL, Murphy GP. Evaluation of phase I/II clinical trials in prostate cancer with dendritic cells and PSMA peptides // *Prostate.* – 1998. – V. 36. – P. 39-44.
- 6 Chang A.E., Redman B.G., Whitfield J.R., Nickoloff B.J, Braun T.M, Lee P.P, Geiger J.D, Mule J.J. A phase I trial of tumor lysate-pulsed dendritic cells in the treatment of advanced cancer // *Clin. Cancer Res.* – 2002. – V. 8. – P. 1021–1032.
- 7 Kugler A., Stuhler G., Walden P., Zoller G., Zobywalski A., Brossart P., Trefzer U., Ullrich S., Muller C.A., Becker V., Gross A.J., Hemmerlein B., Kanz L., Muller G.A., Ringert R.H. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids // *Nat. Med.* – 2000. – V. 6. – P. 332-336.
- 8 McIlroy D., Gregoire M. Optimizing dendritic cell-based anticancer immunotherapy – maturation state does have clinical impact // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2003. – V. 52. – P. 583-591.

9 de Vries I.G., Lesterhuis W.J., Scharenborg N.M., Engelen L.P., Ruiter D.J., Gerritsen M-J.P., Croockewit S., Britten C.M., Torensma R., Adema G.J., Figdor C.G., Punt C.J. Maturation of Dendritic Cells Is a Prerequisite for Inducing Immune Responses in Advanced Melanoma Patients // *Clinical Cancer Research*. – 2003. – V. 9. – P. 5091-5100.

10 Witham T.F., Erff M.L., Okada H., Chambers W.H. Pollack I.F. 7-Hydroxystaurosporine-induced apoptosis in 9L glioma cells provides an effective antigen source for dendritic cells and yields a potent vaccine strategy in an intracranial glioma model // *Neurosurgery*. – 2002. – V. 50. – P. 1327-1334.

11 Soling A., Rainov N.G. Dendritic cell therapy of primary brain tumors // *Mol Med*. – 2001. – V. 7. – P. 659-667.

12 Liao L.M., Black K.L, Martin N.A. Sykes S.N, Brontstein J.M, Joubin-Steele L. Treatment of a glioblastoma patient by vaccination with autologous dendritic cells pulsed with allogeneic major histocompatibility complex class I-matched tumor peptides // *Case report. Neurosurg.* – 2000. – V. 9. – P. 1–5.

13 Heimberger A.B., Crotty L.E., Archer G.E. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with tumor homogenate induce immunity against syngeneic intracerebral glioma // *J. Neuroimmunol.* – 2000. – V. 103. – P.16–25.

14 Aoki H., Mizuno M., Natsume A., Tsugawa T., Tsujimura K., Takahashi T. Dendritic cells pulsed with tumor extract-cationic liposome complex increase the induction of cytotoxic T lymphocytes in mouse brain tumor // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2001. – V. 50. – P. 463-468.

15 Fujita M., Zhu X., Ueda R., Sasaki K., Kohanbash G., Kastenhuber E., McDonald H., Gibson G., Watkins S., Muthuswamy R., Kalinski P., Okada H. Effective Immunotherapy against Murine Gliomas Using Type 1 Polarizing Dendritic Cells-Significant Roles of CXCL10 // *Cancer Res.* – 2009. – V. 69. – P. 1587–1589.

16 Insug O., Ku G., Ertl H.C., Blaszczyk-Thurin M. A dendritic cell vaccine induces protective immunity to intracranial growth of glioma // *Anticancer Res.* – 2002. – V. 22. – P.613-621.

17 Akasaki Y., Kikuchi T., Homma S., Abe T., Kofe D., Ohno T. Antitumor effect of immunizations with fusions of dendritic and glioma cells in a mouse brain tumor model // *J. Immunother.* – 2001 – V. 24. – P. 106-113.

18 Witham T.F., Erff M.L., Okada H., Chambers W.H. Pollack I.F. 7-Hydroxystaurosporine-induced apoptosis in 9L glioma cells provides an effective antigen source for dendritic cells and yields a potent vaccine strategy in an intracranial glioma model // *Neurosurgery.* – 2002. – V. 50. – P. 1327-1334.

19 Yamanaka R., Homma J., Yajima N., Tsuchiya N., Sano M., Kobayashi T., Yoshida S., Abe T., Narita M., Takahashi M., Tanaka R. Clinical Evaluation of Dendritic Cell Vaccination for Patients with Recurrent Glioma: Results of a Clinical Phase I/II Trial // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – V. 11. – P. 4160-4167.

20 Zhang Z., Tang L., Zhan R., Tong Y., Yao H., Du L. Immunotherapy of intracranial G422 glioblastoma with dendritic cells pulsed with tumor extract or RNA // *J. Zhejiang Univ. Sci.* – 2004. – V. 5. – P. 1298–1303.

21 Yu J.S., Wheeler C.J., Zelter P., Ying H., Finger D., Lee P.K., Yong W.H., Incardona F., Thompson R., Riedinger M., Zhang W., Prins R., Black K. Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicit systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration // *Cancer Res.* – 2001. – V. 61. – P. 842-847.

22 Yu J.S., Wheeler C.J., Zeltzer P.M. Dendritic cell immunotherapy for patients with glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma // *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* – 2001. – P. 274-275.

23 Yu J., Liu G., Ying H., Yong W.H., Black K.L. Wheeler C.J. Vaccination with Tumor Lysate-Pulsed Dendritic Cells Elicits Antigen-Specific, Cytotoxic T-Cells in Patients with Malignant Glioma // *Cancer Research.* – 2004. – V. 64. – P. 4973-4979.

24 Kikuchi T., Akasaki Y., Irie M. Results of a phase I clinical trial of vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells // *Cancer Immunol Immunother.* – 2001. – V. 50. – P. 337-344.

25 Rutkowski S., De Vleeschouwer S., Kaempgen E., Wolff E., Kühl J., Demaerel P., Warmuth-Metz M., Flamen P., Van Calenbergh F., Plets C., Sørensen N., Opitz A., Van Gool S. Surgery and adjuvant dendritic cell-based tumour vaccination for patients with relapsed malignant glioma, a feasibility study // *Br. J. Cancer.* – 2004. – V. 91. – P. 1659-1662.

26 Yamanaka R., Abe T., Yajima N., Tsuchiya N., Homma J., Kobayashi T., Narita M., Takahashi M., Tanaka R. Vaccination of recurrent glioma patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits immune responses: results of a clinical phase I/II trial // *Br. J. Cancer.* – 2003. – V. 89. – P. 1172-1179.

27 Yamanaka R., Yajima N., Abe T., Tsuchiya N., Homma J., Narita M., Takahashi M., Tanaka R. Dendritic cell-based glioma immunotherapy // *Int. J. Oncol.* – 2003. – V. 23. – P. 5-15.

28 Szabolics P., Avigan D., Gezelter S., Ciocon D. H., Moore M.A., Steinman R.M., Joung J.W. Dendritic cells and macrophages can mature independently from a human bone marrow-derived, post colonyforming unit intermediate // *Blood.* – 1996. – V. 87. – P. 4520–4530.

29 Jonuleit H., Kuchn U., Muller C., Steinbrink R., Paragnik L., Schmitt E., Knop J., Enk. A.N. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions // *Eur. J. Immunol.* – 1997. – V. 27. – P. 3135-3142.

30 Paquette R., Hsu N., Kiertscher S., Park A., Tran L., Roth M., Glaspy J. Interferon-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells // *J. Leukoc. Biol.* – 1998. – V. 64. – P. 358-367.

31 Santini S., Belardelli F. Advances in the use of dendritic cells and new adjuvants for the development of therapeutic vaccines // *Stem cells.* – 2003. – V. 21. – P. 495-505.

32 Santini S., Lapenta C., Logozzi M., Parlato S., Spada M., Di Pucchio T., Bellardelli F. Type I Interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived

dendritic cells development and activity in vitro and in HU-PBL-SCID mice // *J. Exp. Med.* – 2000. – V. 191. – P.1777-1788.

33 Santini S., Puccini T., Lapenta C., Parlato S., Logozzi M., Belardelli F. A new type 1 IFN-mediated pathway for the rapid differentiation of monocytes into highly active dendritic cells // *Stem cells.* – 2003. – V. 21. – P. 357-362

34 Santini S.M, Lapenta C., Belardelli F. Type I interferons as regulators of the differentiation/activation of human dendritic cells: methods for the evaluation of IFN-induced effects // *Methods Mol. Med.* – 2005. – V. 116. – P. 167-181.

35 Santini S.M., Lapenta C., Santodonato L., D'Agostino G., Belardelli F., Ferrantini M. IFN-alpha in the generation of dendritic cells for cancer immunotherapy // *Handb. Exp. Pharmacol.* – 2009. – V. 188. – P. 295-317.

36 Parlato S., Santini S., Lapenta C., Di Pucchio T., Logozzi M., Spada M., Giammarioly A., Malorni W., Fais S., Bellardelli F. Expression of CCR-7, MIP-3b, and Th1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells – importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities // *Blood.* – 2001. – V. 98. – P. 3022-3029.

37 Carbonneil C., Saidi H., Donkova-Petrini V., Weiss L. Dendritic cells generated in the presence of interferon- $\alpha$  stimulate allogeneic CD4<sup>+</sup> T-cell proliferation: modulation by autocrine IL-10, enhanced T-cell apoptosis and T regulatory type 1 cells // *International Immunology.* – 2004. – V. 16. – P. 1037-1052.

38 Chauvin C., Josien R. Dendritic cells as killers: mechanistic aspects and potential roles // *J. Immunol.* – 2008. – V. 181. – P. 11-16.

39 Lu G., Janjic B., Janjic J., Whiteside T., Storkus W., Vujanovic N. Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. II. Role of TNF, lymphotoxin-1-2, Fas ligand, and TNF-related apoptosis-inducing ligand // *J. Immunology.* – 2002. – V. 168. – P. 1831-1840.

40 Papewalis C., Jacobs B., Wuttke M., Ullrich E., Baehring T., Fenk R., Willenberg H.S. Schinner S., Cohnen M., Seissler J., Zacharowski K., Scherbaum W.A., Matthias Schott M. IFN- $\alpha$  Skews Monocytes into CD59<sup>+</sup>-Expressing

Dendritic Cells with Potent Functional Activities In Vitro and In Vivo // J. Immunology. – 2008. – V. 180. – P. 1462-1470.

41 Korthals M., Safaian N., Kronenwett R., Maihofer D., Schott M., Papewalis C., Diaz Blanco E., Winter M., Czibere A., Haas R., Kobbe G., Fenk R. Monocyte derived dendritic cells generated by IFN-alpha acquire mature dendritic and natural killer cell properties as shown by gene expression analysis // J. Transl. Med. – 2007. – V. 25. – P. 46-48.

42 Ito T., Amakawa R., Inaba M., Ikehara S., Inaba K., Fukuhara S. Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by INFs // J. Immunol. – 2001. – V. 166. – P. 2961-2969.

**ИНДИВИДУАЛЬНАЯ РЕГИСТРАЦИОННАЯ КАРТА**

ПАЦИЕНТ: ФИО \_\_\_\_\_ М/Ж ВОЗРАСТ \_\_\_\_ № ИБ \_\_\_\_\_ ДАТА  
ПОСТУПЛЕНИЯ \_\_\_\_\_

<b>ОСНОВНОЙ ДИАГНОЗ, ГИСТОЛОГ.ВАРИАНТ</b>			
<b>ЛОКАЛИЗАЦИЯ ОПУХОЛИ, РАЗМЕР</b>			
<b>СОПУТСТВУЮЩИЕ</b>			
<b>НАСТОЯЩАЯ ОПЕРАЦИЯ:</b>	ДАТА	<b>РАДИКАЛЬНАЯ/ПАРЦИАЛЬНАЯ ПЕРВИЧНАЯ/ПОВТОРНАЯ</b>	
<b>ПРЕДШЕСТВУЮЩИЕ ОПЕРАЦИИ</b>	ДАТА	ДАТА	ДАТА
ИТ (ДА/НЕТ) СМЕРТИ _____	ДАТА ВЫПИСКИ _____ ИЛИ		

**Данные иммунологического обследования**

	До вакцинации	После трех вакцинаций	После шести вакцинаций
Дата обследования			
Спонтанная пролиферация			
Пролиферативный ответ на ОА (0,1 мг/мл)			
Пролиферативный ответ на ОА (0,01 мг/мл)			
Пролиферативный ответ на контрольный АГ (0,1 мг/мл)			
Пролиферативный ответ на контрольный АГ (0,01 мг/мл)			
Положительная реакция ГЗТ (есть/нет)			

### Информированное согласие для пациента

Я имею злокачественное заболевание головного мозга. Этим подписанным документом, я, \_\_\_\_\_, даю согласие на проведение специфической иммунотерапии.

#### Объяснение

Цель специфической иммунотерапии – повысить эффективность комплексного лечения больных со злокачественными глиомами головного мозга путём активации специфического противоопухолевого иммунитета. Для достижения этой цели используется разработанный в Институте клинической иммунологии СО РАМН новый метод, основанный на подкожном введении аутологичных (собственных) дендритных клеток, полученных из моноцитов периферической венозной крови и нагруженных специфическим антигеном.

#### Описание процедуры

Для усиления иммунного ответа проводится иммунотерапия дендритными клетками, нагруженными опухолевыми антигенами курсом 5-6 процедур с интервалом 1-2 недели. Клетки вводятся подкожно в область дельтовидной мышцы (или в подлопаточную область) в 3- 4 точки.

#### Риск

Каждый из существующих методов лечения чреват возможными осложнениями. Предложенный метод является новой разработкой, поэтому его возможные осложнения окончательно не установлены. Во время процедуры или после ее окончания могут развиваться следующие побочные эффекты: повышение температуры, озноб, головная боль, тошнота, рвота.

#### Клинический эффект

Результатом проводимого лечения может быть улучшение качества жизни пациента за счет улучшения функции головного мозга и/или ослабления проявлений неврологической симптоматики. Однако такой результат не может быть гарантирован.

#### Подтверждение согласия

Так как практическая медицина не является точной наукой, никто не давал мне никаких гарантий, письменных или устных, в отношении исхода моего заболевания. Мой лечащий врач \_\_\_\_\_ и его коллеги обсудили со мной все интересующие меня аспекты лечения в соответствии с протоколом «Специфическая иммунотерапия в лечении злокачественных глиом головного мозга».

Мне объяснены и понятны суть моего заболевания, а также опасности, связанные с дальнейшим развитием болезни. Я полностью осознаю то, что предложенное мне лечение является новой разработкой, результаты применения которой окончательно не изучены. Я информирован (а), что данное лечение будет проводиться на базе ФГУ ННИИТО и цель проводимых исследований – оценить его переносимость и клиническую эффективность. Я получил (а) удовлетворившие меня ответы на все заданные мной вопросы и разрешаю моему лечащему врачу и врачам-исследователям НИИ клинической иммунологии СО РАМН проводить вышеуказанное лечение, а также выполнять все необходимые для этого медицинские манипуляции и обследования. Я знаю, что имею право прервать лечение в любое время.

Я удостоверяю, что текст данного информированного согласия мною внимательно прочитан, мне понятно назначение данного документа, и независимо от исхода заболевания, я не буду иметь имущественных претензий к ФГУ ННИИТО и НИИ клинической иммунологии СО РАМН

Дата \_\_\_\_\_ время \_\_\_\_\_

Подпись \_\_\_\_\_ и ее расшифровка \_\_\_\_\_

Адрес \_\_\_\_\_

Телефон \_\_\_\_\_

Подпись врача \_\_\_\_\_ и ее расшифровка \_\_\_\_\_