

ПОЛУЧЕНИЕ Т-КЛЕТОЧНОЙ ВАКЦИНЫ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

Иванова И.П., Селедцов В.И., Банул Н.В.,
Самарин Д.М., Селедцова Г.В., Савкин И.В.,
Ширинский В.С., Пронкина Н.В., Козлов В.А.

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г.Новосибирск, Россия

Резюме. Описана 2-х этапная технология получения Т-клеточной вакцины, предназначенной для лечения рассеянного склероза (РС). Первый этап включает в себя антиген-зависимую культуральную селекцию миелин-специфических Т-клеток, тогда как второй – их наращивание в необходимом количестве посредством неспецифической стимуляции. Показано, что полученная таким образом вакцина способна индуцировать специфический антиидиотипический иммунный ответ, направленный против миелин-реактивных Т-лимфоцитов. Результаты однолетнего наблюдения 18 вакцинированных больных церебро-спинальной формой рассеянного склероза указывают на отсутствие побочных эффектов Т-клеточной вакцинации и предполагают ее возможную клиническую эффективность в лечении РС на ранних стадиях развития заболевания.

Ключевые слова: Т-клетки, вакцина, рассеянный склероз.

*Ivanova I.P., Selezdov V.I., Banul N.V., Samarin D.M., Selezdova G.V.,
Savkin I.V., Shyrinsky V.S., Pronkina N.V., Kozlov V.A.*

T-CELL VACCINE PREPARATION FOR MULTIPLE SCLEROSIS TREATMENT

Abstract. A two-stage technology of preparation of T-cell vaccine designated for multiple sclerosis treatment is described. At the first stage myelin-specific lymphocytes undergo antigen-dependent cultural selection, whereas at the second stage they are grown by means of non-specific stimulation. The vaccine prepared in this way was found to induce specific anti-idiotypic immune response, directed against myelin-reactive T-lymphocytes. The results of 1- year follow-up of 18 vaccinated patients with a cerebral-spinal type of multiple sclerosis indicated the absence of side effects of T-cell vaccination, and suggest the possibility of effective application of this treatment within early stages of disease. (*Med. Immunol.*, 2005, vol.7, № 1, pp 27-32)

Введение

Ключевую роль в патогенезе рассеянного склероза (РС) играют Т-лимфоциты, реактивные по отношению к поверхностным антигенам клеток нервной ткани [11]. Показано, что адаптивный перенос активированных миелин-реактивных Т-клеток приводит к развитию экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита у животных [6]. Миелин-реактивные

Т-клетки в повышенном количестве обнаружены в периферической крови и ликворе больных РС [1, 7, 8]. Эти аутореактивные CD4+ Т-клетки продуцируют провоспалительные цитокины (IL-2, TNF α , IFN γ), которые поддерживают в ЦНС миелин-деструктивный воспалительный процесс [8, 10, 11].

Является очевидным то, что элиминация аутоиммунных Т-лимфоцитов из организма должна лежать в основе патогенетического лечения РС. Один из способов решения этой задачи связан с возможностью стимуляции у больного антиидиотипического иммунного ответа, направленного на идиотипы рецепторов аутореактивных лимфоцитов. Вакцинация миелин-реактивными Т-клетками животных с эксперимен-

Адрес для переписки:

Ивановой И.П., 630099, Новосибирск-99,
ул. Ядринцевская, 14, ИКИ СО РАМН,
Тел.: (3832) 28-25-47.
Факс: (3832) 28-26-73. E-mail: VS@online.nsk.su

тальным аутоиммунным энцефаломиелитом приводит к остановке развития аутоиммунного демиелинизирующего процесса [6]. В пилотных клинических исследованиях показано, что в ответ на иммунизацию аутологичными миелин-реактивными Т-клеточными клонами у пациентов индуцируется антиклонотипический Т-клеточный ответ, который приводит к специфической делеции циркулирующих миелин-реактивных Т-клеток [2, 4, 5, 9, 10, 13]. Т-клеточная делеция является следствием литической активности антиклонотипических CD8+ Т-клеток, которые специфически распознают идиотипические структуры Т-клеточных рецепторов [2, 5, 12]. Т-клеточная вакцинация также вызывает генерацию анти-клонотипических CD4+ Т-клеток, которые в активированном состоянии продуцируют противовоспалительные цитокины IL-4 и IL-10 [2, 5, 12].

Несмотря на очевидную перспективность применения Т-клеточной вакцинации в лечении РС и других аутоиммунных заболеваний, ее широкомасштабному использованию препятствует материальная затратность и трудоемкость получения Т-клеточных клонов, а также невозможность во многих случаях точно определить аутоантигенные детерминанты, вовлеченные в патологический процесс.

Целями нашего исследования были: разработка технологии наращивания миелин-реактивных Т-

клеток без их клонирования и предварительная оценка эффективности их применения в качестве вакцины в лечении больных РС.

Материалы и методы

Миелин был получен по методу Деблера из тканей спинного мозга свиней [3].

Разработанная нами технология получения Т-клеточной вакцины состоит из двух последовательных этапов (рис.1). Первый этап включает в себя специфическую селекцию клеток, тогда как второй – их наращивание в необходимом количестве. На первом этапе выделенные из периферической крови мононуклеарные клетки (МНК) пациента культивировались в концентрации 2×10^6 в мл среды RPMI 1640, содержащей 10% инактивированной аутологичной плазмы, 5 мМ HEPES, 2 мМ L-глутамин, 5×10^{-5} М меркаптоэтанол (все реагенты компании «Sigma», США) в присутствии 50 мкг/мл миелина в течение 7 дней во влажной атмосфере с 5% CO₂. На втором этапе антиген-реактивные бластные лимфоциты отделялись от других клеток посредством центрифугирования клеточной суспензии на перколле (плотность 1,065 г/л, «Sigma») и далее культивировались в присутствии 5 мкг/мл фитогемагглютина (ФГА, «Sigma») и 100 ед/мл рекомбинантного IL-2 (Ронколейкин, «Биотех», Санкт-Петербург) в течение 5 дней. По завершении культивирования клетки облучали в дозе 2000 рад, далее криоконсервировали стандартным путем в плазме с 10% диметилсульфоксида («Sigma») и хранили в жидком азоте до момента использования. Общее количество полученных от одного больного клеток варьировало в пределах $18-27 \times 10^7$.

Поверхностные маркеры вакцинальных клеток определяли с помощью моноклональных антител (МА) LT3 (CD3), LT4 (CD4), LT8 (CD8), LKN 16 (CD16) («Сорбент», Москва), конъюгированных с флуоресцеинизотиоцианатом, и MA ICO-180 (CD20) («МедБиоСпектр», Москва), CD45RO («Becton Dickinson», США), меченных фикоэритрином. Процент позитивных клеток определяли на иммуноцитометре «FACS Calibur» («Becton Dickinson») с использованием программы «CELLQuest» («Becton Dickinson»).

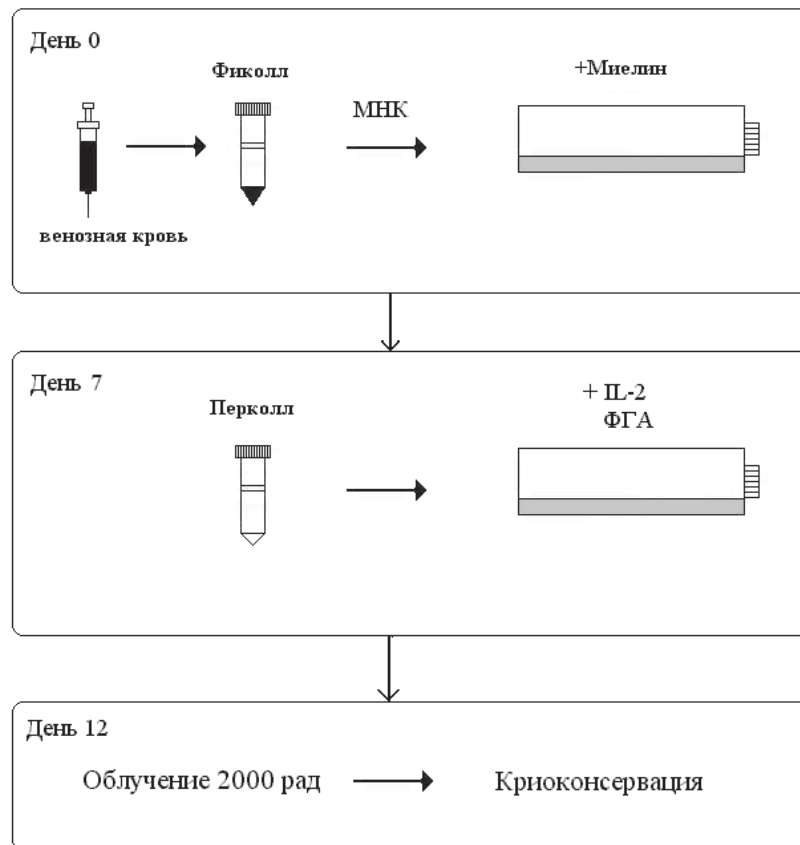


Рис. 1. Схема получения миелин-реактивных Т-лимфоцитов

Табл.1. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ С РЕМИТТИРУЮЩИМ ТЕЧЕНИЕМ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Ф.И./ Возраст	Давность заболевания, годы	Степень тяжести заболевания	Частота обострений		EDSS	
			до лечения	через 12 месяцев после начала лечения	до лечения	через 12 месяцев после начала лечения
Г.Д./38	8	II	2	нет	2,5	2,5
С.Е./20	2	II	2	нет	2	2
Ф.О./27	2	II	2	2	3,5	4
М.Н./30	5	II	1	1	2,5	2,5

Табл.2. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ С ПРОГРЕДИЕНТНЫМ ТЕЧЕНИЕМ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Ф.И./Возраст	Давность заболевания, годы	Течение заболевания	Степень тяжести заболевания	EDSS	
				До лечения	Через 12 месяцев после начала лечения
Д.Н./31	6	прогр.-ремит.	II	4	4,5
Н.Н./32	8	прогр.-ремит.	III	6	6
С.Н./28	5	прогр.-ремит.	II	3,5	3,5
В.А./48	12	перв.-прогр.	III	4,5	4,5
Н.О./42	4	перв.-прогр.	III	4	4
К.Ю./37	12	втор.-прогр.	IV	6,5	6,5
М.Н./46	2	втор.-прогр.	II	3	3
Л.П./45	6	втор.-прогр.	II	4	4
З.В./50	19	втор.-прогр.	III	5	5,5
Б.Н./40	6	втор.-прогр.	III	5	5,5
В.О./28	12	втор.-прогр.	II	3,5	4
Н.А./35	13	втор.-прогр.	IV	6,5	7
Х.А./43	14	втор.-прогр.	IV	4,5	6
Г.Ю./41	8	втор.-прогр.	IV	8	8,5

Специфичность вакцинальных Т-лимфоцитов оценивали по их антиген-индуцированному пролиферативному ответу. Для этого 10^5 миелин-реактивных Т-клеток культивировали в течение 72 часов совместно с облученными (2000 рад) аутологичными МНК в присутствии 50 мкг/мл миелина или контрольного антигена (белок мышинной меланомы) в лунках 96-луночного круглодонного планшета («Costar», США).

Для оценки специфичности антиидиотипического ответа 10^5 МНК, выделенных из периферической крови вакцинированных больных РС, культивировали в течение 72 часов совместно с облученными вакцинальными Т-лимфоцитами (10^5) или с Т-клетками, специфичными к антигенам мышинной меланомы. Последние были получены по той же методике, что и миелин-реактивные Т-клетки.

Для получения антиидиотипической Т-клеточной линии МНК (2×10^6 /мл) культивировали с облученными миелин-реактивными Т-клетками (10^6 /мл). Через 7 дней в культуру вносили облученные аутологичные МНК и идиотип-несущие Т-лимфоциты и продолжали клеточное культивирование в присутствии рекомбинантного IL-2 (100 ед/мл) еще 7 суток. Далее прокультивированные клетки облучали (2000 рад) и оценивали их супрессорную активность в пролиферативном тесте. Для этого 10^5 этих клеток культивировали в течение 72 ч совместно с аутологичными миелин-реактивными Т-клетками (10^5) и с облученными МНК (10^5) в присутствии миелина (50 мкг/мл).

Клеточная пролиферация оценивалась стандартным методом по включению ^3H тимидина. Индекс стимуляции вычисляли следующим образом: имп./мин для стимулированных клеток: имп./мин для нестимулированных клеток. Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия U Вилкоксона-Манна-Уитни.

Клинические исследования проводились в соответствии с протоколом, утвержденным Ученым советом и Этическим комитетом Института клинической иммунологии СО РАМН. От каждого пациента, участвующего в исследовании, было получено информированное согласие. Иммунотерапевтическое лечение было проведено 8 больным церебро-спинальной формой РС в возрасте от 26 до 50 лет с давностью заболевания не менее 2 лет. У 4 больных имелось место ремиттирующее, у 3 - прогрессивно-ремиттирующее, у 2 - первично-прогрессивное и у 9 - вторично-прогрессивное течение заболевания. Диагноз был установлен клинически и подтвержден магнитно-резонансным исследованием. Пациенты не получали иммуносупрессивную терапию, по крайней мере, в течение 6 месяцев до начала лечения. Схема иммунотерапии включала в себя 4 еженедельных подкожных Т-клеточных вакцинации и поддерживающие введения вакцины с интервалом в 2 месяца. Вакцинальная доза варьировала в пределах $2,0\text{--}4,0 \times 10^7$ клеток.

Неврологический статус пациентов оценивался по функциональной шкале Куртцке с использованием расширенной шкалы инвалидизации (EDSS).

Кроме того, проводилось электромиографическое исследование с оценкой времени центрального моторного проведения «кора - С7» и «кора - S1» в ответ на магнитную стимуляцию.

Результаты

На начальном этапе исследований нами были отработаны оптимальные условия для получения миелин-реактивных Т-лимфоцитов. Метод, описанный в предыдущем разделе, позволяет получить

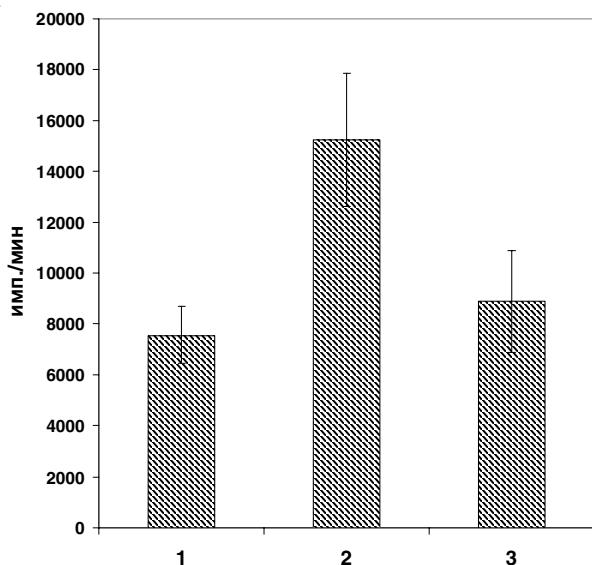


Рис. 2. Проллиферативный ответ Т-клеток на миелин и контрольный антиген. 1 - миелин-реактивные клетки + МНК; 2 - миелин-реактивные клетки + МНК + миелин; 3 - миелин-реактивные клетки + МНК + контрольный антиген. На рисунке представлены данные 5 экспериментов. $P_{1-2} < 0,005$; $P_{2-3} < 0,005$ - статистическая значимость различий, критерий U

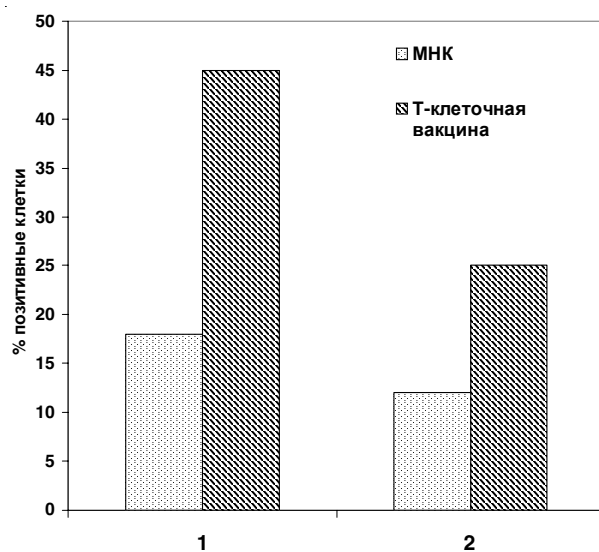


Рис. 3. Содержание CD45RO-лимфоцитов в МНК и Т-клеточной вакцине. 1 - CD4⁺CD45RO⁺; 2 - CD8⁺CD45RO⁺. Представлены данные одного из 4 экспериментов.

популяции Т-клеток, пролиферативный ответ которых на миелин превышает контрольные значения в 1,8-2,0 раза (рис.2). Цитофлюориметрический маркерный анализ этих лимфоидных популяций показал, что процентное содержание в них CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD20⁺ клеток составляет 90-94%, 50-67%, 25-38%, 3-9% и 2-3% соответственно. Содержание в них CD4⁺CD45RO⁺ и CD8⁺CD45RO⁺ Т-клеток памяти превышало в 2 раза значения, исходно выявляемые в периферической крови больного (рис.3).

На рисунке 4 показано, что после 4 вакцинаций пролиферативный ответ МНК больного на вакцинальные клетки в 6 раз превышал контрольные значения. От вакцинированных больных были получены антиидиотипические Т-клеточные линии, реактивные по отношению к миелин-специфичным Т-клеткам. Было установлено, что они на 49-52% подавляли индуцированную миелином пролиферацию последних (рис. 5). В целом, на основании представленных данных, можно полагать, что полученная Т-клеточная вакцина способна индуцировать специфический антиидиотипический иммунный ответ, направленный против миелин-реактивных Т-лимфоцитов.

Как показано на рисунке 6, антиидиотипический пролиферативный ответ у больных, получивших 4 вакцинации и далее прекративших иммунотерапию, достигает максимальных значений через 1 месяц и практически полностью затухает через 8 месяцев после начала лечения. Эти данные указывают на необходимость включения в схему иммунотерапии поддерживающих Т-клеточных вакцинаций.

Предварительные результаты лечения 18 пациентов со сроком наблюдения 12 месяцев представ-

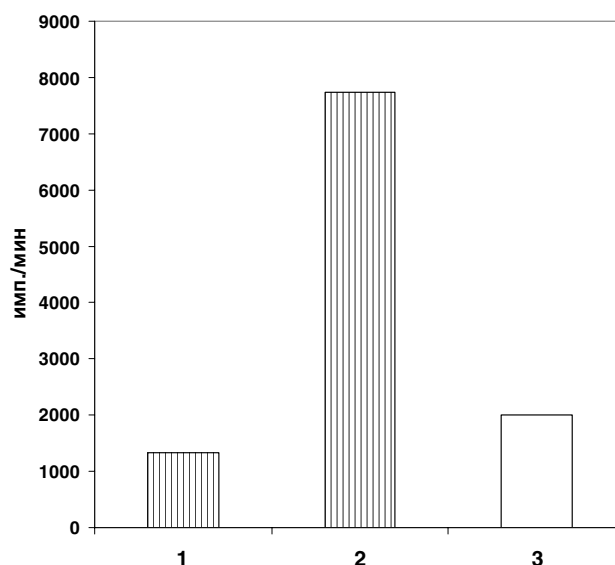


Рис. 4. Проллиферативный ответ МНК вакцинированных больных на клетки вакцины и контрольные Т-клетки. 1 - МНК; 2 - МНК + вакцинальные Т-клетки; 3 - МНК + контрольные Т-клетки. Представлены типичные данные одного из 3 экспериментов.

лены в таблицах 1 и 2. За время наблюдения у 2 из 4 больных с ремиттирующим и у 2 из 3 с прогрессивно-ремиттирующим течением РС обострений заболевания зарегистрировано не было, их состояние, оцениваемое по шкале Куртцке, было стабильным. По данным электромиографического исследования у одного пациента из этой подгруппы отмечено значительное улучшение показателей центрального моторного проведения «кора - S1» (данные не показаны). У 2 пациентов с первично-прогрессирующим течением заболевания состояние сохранялось стабильным на протяжении всего срока наблюдения. Только у 3 из 9 пациентов с вторично-прогрессирующим течением заболевания имела место стабилизация клинических параметров, у остальных отмечено ухудшение в неврологическом статусе, связанное с прогрессией болезни.

Обсуждение

Стандартное лечение аутоиммунных заболеваний базируется на применении гормонов, цитостатиков и других препаратов, обладающих неспецифической иммуносупрессорной активностью. Такое лечение снижает иммунитет в целом и ассоциируется с высоким риском развития серьезных побочных эффектов. Очевидное преимущество Т-клеточной вакцинации заключается в том, что она избирательно направлена на элиминацию из организма именно тех лимфоцитов, которые ответственны за развитие аутоиммунного процесса [5, 10]. Важно, что эта технология эксплуатирует механизм иммунной памяти,

и поэтому подразумевает возможность получения длительного клинического эффекта.

Предлагаемая нами 2-этапная технология получения Т-вакцины имеет очевидные преимущества перед методами, которые были использованы в клинической практике ранее [9, 13]. Во-первых, она позволяет избежать Т-клеточного клонирования - процедуры длительной, трудоемкой и дорогой. Во-вторых, при использовании этой технологии под удар антиидиотипического иммунного ответа попадают в первую очередь именно те клетки, которые имеют доминантное представительство в вакцине, и которые могут быть в наибольшей степени вовлечены в развитие аутоиммунного процесса.

Как следует из представленных в этой работе данных, концентрация идиотипических детерминант в получаемой Т-клеточной вакцине достаточна для индукции эффективного антиидиотипического иммунного ответа. Следует, однако, иметь в виду, что длительность такого ответа после курса из 4 вакцинаций не превышает нескольких месяцев. Для того чтобы удлинить эту защиту, представляется целесообразным дополнять лечение поддерживающими вакцинациями.

Проводимые нами пилотные клинические исследования в настоящее время продолжаются и выводы относительно эффективности разработанного метода лечения делать преждевременно. Тем не менее, уже сейчас можно указать на безопасность такого лечения. За весь период наблюдения ни одного случая осложнений его применения зарегистриро-

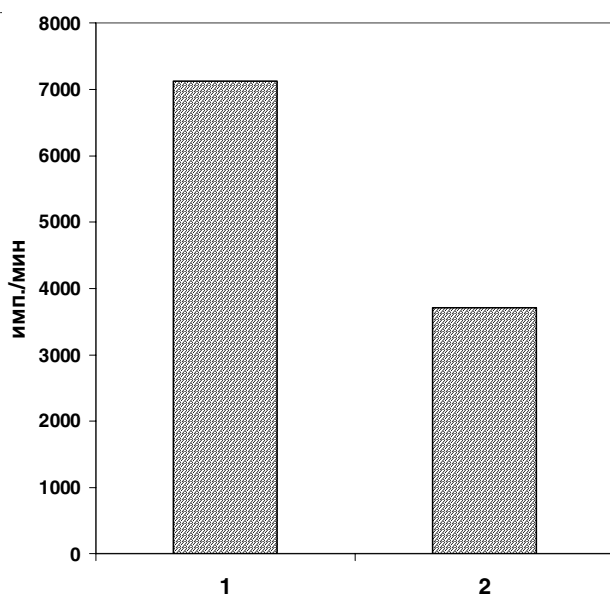


Рис. 5. Влияние антиидиотипических Т-лимфоцитов на пролиферацию миелин-реактивных Т-клеток. 1 – миелин-реактивные Т-клетки +МНК + миелин; 2 – миелин-реактивные Т-клетки +МНК + миелин + антиидиотипические Т-лимфоциты. Представлены результаты одного из 3 экспериментов.

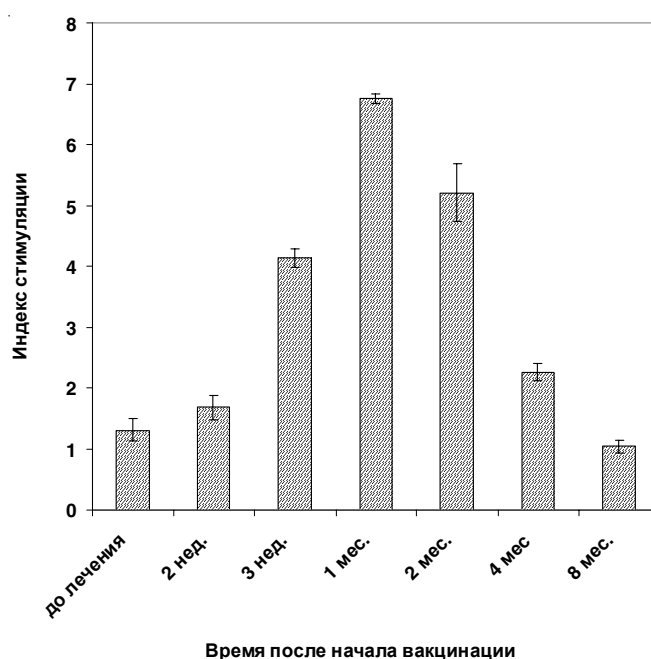


Рис. 6. Пролиферативный ответ МНК больных РС на вакцинальные клетки в различные сроки после начала лечения. Представлены результаты 3 экспериментов.

вано не было. Есть также основания полагать, что Т-клеточная вакцинация может быть наиболее эффективна на ранних стадиях заболевания. Вместе с тем, не исключено, что развитие этой технологии в будущем позволит получать ощутимые результаты не только на ранних, но и на поздних стадиях заболевания.

Список литературы

1. Chou Y.K., Boudete D.N., Offner H. Frequency of T cells specific for myelin basic protein and myelin proteolipid protein in blood and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis // J.Neuroimmunol.- 1992.- Vol.38, № 1-2. - P.105-113.
2. Correale J., Lund B., McMillan M. T-cell vaccination in secondary progressive multiple sclerosis.// J.Neuroimmunol.- 2000.- V.107, №2. - P. 130-139.
3. Deibler G.E., Martenson R.E. and Kies M.W. Large scale preparation of myelin basic protein of several mammalian species // Prep. Biochem.- 1972.- №2.- P.139-165.
4. Hohlfeld R. Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis // Brain.- 1997.- V.120.- P. 865-916.
5. Hermans G., Medaer R., Raus J., Stinissen P. Myelin reactive T cells after T cell vaccination in multiple sclerosis: cytokine profile and depletion by additional immunizations // J.Neuroimmunol.-2000.- V.102, №1.- P.79-84.
6. Mor F., Cohen I.R. Experimental aspects of T cell vaccination // Clin. Exp. Rheumatol.- 1993.- Suppl.8.- P.55-57.
7. Pender M.P., Csurhes P.A., Greer J.M. Surges of increased T cell reactivity to an encephalitogenic region of myelin proteolipid protein occur more often in patients with multiple sclerosis than in healthy subjects // The Journal of Immunology. - 2000.- V.165. № 9.- P. 5322-5331.
8. Pette M., Fujita K., Kitz B. Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals // Neurology.- 1990.- V. 40, №11.- P. 1770-1776.
9. Stinissen P., Zhang J., Medaer R. Vaccination with autoreactive T cell clones in multiple sclerosis: overview of immunological and clinical data // J. of Neuroscience Research.- 1996.- V.45.- P.500-511.
10. Stinissen P. and Raus J. Autoreactive T lymphocytes in multiple sclerosis: pathogenic role and therapeutic targeting // Acta neurol. Belg. - 1999.- V.99.- P.65-69.
11. Sun J-B. Autoreactive T and B cells in nervous system diseases // Acta neurol. Scandinavica. - 1993.- V. 87, №142.- Suppl.- P.5-56.
12. Zang Y.C.Q., Hong J., Tejada-Simon M.V. Th 2 immune regulation induced by T cell vaccination in patients with multiple sclerosis // Eur. J.Immunol. - 2000.- V.30.- P. 908-913.
13. Zhang J., Stinissen P., Medaer R. T-cell vaccination: clinical application in autoimmune diseases // J.Mol.Med. - 1996.- V. 74.- P. 653-662.

поступила в редакцию 20.06.2004

отправлена на доработку 07.12.2004

принята к печати 10.01.2005