

ОЦЕНКА КЛЕТОЧНОЙ ИММУНОРЕАКТИВНОСТИ ПРИ КСЕНОВАКЦИНОТЕРАПИИ ПАЦИЕНТОВ С IV СТАДИЕЙ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

Фельде М.А., Самарин Д.М., Ница Н.А., Шишков А.А.,
Повещенко О.В., Кащенко Э.А., Селедцов В.И.,
Селедцова Г.В., Козлов В.А.

ГУ НИИКИ СО РАМН, г.Новосибирск, Россия

Резюме. Тридцать семь пациентов с IV стадией колоректального рака были подвергнуты иммунотерапии с использованием полиантигенной вакцины, приготовленной на основе разрушенных мышиных карциномных (LLC) и меланомных (B16) клеток. Индуцирующий курс вакциноотерапии состоял из 5 подкожных иммунизаций с недельным и 5 - с двухнедельным интервалом. Поддерживающий курс состоял из ежемесячных иммунизаций. Ксеновакциноотерапия не ассоциировалась с серьезными побочными эффектами и не оказывала влияния на субпопуляционный состав лимфоцитов крови. После индуцирующего курса лечения значительный прирост клеточной реактивности на вакцинальные карциномоассоциированные антигены у пациентов был выявлен в кожном тесте, а также и в реакции антиген-индуцируемого бластогенеза. На примере 37 вакцинированных и 37 клинически сопоставимых контрольных пациентов с IV стадией заболевания показано, что ксеновакциноотерапия способна значительно улучшать показатели 2-летней выживаемости (медиана выживаемости контрольных и вакцинированных пациентов была 7 и 17 месяцев, соответственно).

Ключевые слова: рак кишечника, ксеновакцина, клеточный иммунитет, ГЗТ.

*Felde M.A., Samarin D.M., Niza N.A., Shishkov A.A., Poveshenko O.V., Kashchenko E.A.,
Seledtsov V.I., Seledtsova G.V., Kozlov V.A.*

EVALUATION OF CELLULAR IMMUNE RESPONSE DURING XENOVACCINE THERAPY OF THE PATIENTS WITH STAGE IV OF COLORECTAL CANCER

Abstract. Thirty-seven patients with stage colorectal cancer stage IV were subjected to immunotherapy using a polyantigenic vaccine, prepared, basically, from lysed cells of murine melanoma (B16) and murine carcinoma (LLC) cells. The inducing course of xenovaccine therapy consisted of 10 subcutaneous immunizations (5 injections weekly followed by 5 bi-weekly). Consolidating treatment included monthly vaccinations. Ther xenovaccine therapy was not associated with any serious adverse effects, and did not influence the composition of blood lymphocyte subsets. Significant increase in cellular immune reactions to vaccinal carcinoma-associated antigens occurred in the patients after an inducing treatment, as determined by both skin and antigen-driven blastogenesis test. The overall 2-year survival of thirty-seven stage IV colorectal cancer patients was shown to be significantly better, than in control group (37 clinically comparable patients), with median survival rates of 17 and 7 months, respectively. (*Med. Immunol.*, 2006, vol.8, № 1, pp 67-72)

Адрес для переписки:

Фельде М.А., 630099 г. Новосибирск,
Ядринцевская ул., 14, ГУ НИИКИ СО РАМН.
Тел.: 8 (3832) 28-26-73, факс 8 (3832) 49-46-40.
E-mail: D.M.Samarin@ngs.ru

Введение

Колоректальный рак является одной из наиболее распространенных злокачественных опухолей. В структуре онкологической заболеваемости в мире колоректальный рак в настоящее время занимает четвертое место, представляя огромную медицинс-

кую и социальную проблему. Каждый год в мире отмечается около 800 тысяч вновь заболевших больных колоректальным раком, более половины из них (440 тысяч) умирает. В России по смертности колоректальный рак занимает третье место (после рака легкого и желудка у мужчин; после рака молочной железы и желудка у женщин) [1].

С открытием опухолевых антигенов и разработкой методов формирования специфического иммунного ответа против них получил свое развитие подход по созданию противоопухолевых вакцин, с которым связаны перспективы существенного повышения эффективности противоопухолевой иммунотерапии [3, 9, 11]. В литературе имеются экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что использование в качестве вакцины ксеногенных опухолевых клеток приводит к развитию иммунного ответа на собственную опухоль [2, 5, 6, 10]. В связи с этим, в нашем институте была разработана вакцина на основе мышинных меланомных и карциномных клеток, экспрессирующих на своей поверхности разные классы опухолеассоциированных антигенов (ОАА) (патенты РФ № 2192883, № 2192884). Отличия мышинных ОАА от их человеческих аналогов придают им дополнительную иммуногенность, которая позволяет индуцировать иммунные реакции у пациентов, иммунитет которых находится под иммунодепрессивным опухолевым влиянием.

Основной целью данной работы являлось изучение влияния ксеновакцинотерапии на клеточное звено иммунитета, а также оценка ее клинической эффективности у пациентов с IV стадией рака кишечника.

Материалы и методы

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. В исследование было включено 37 пациентов (17 женщин и 20 мужчин) с IV стадией колоректального рака в возрасте от 38 до 79 лет. Исходный уровень функциональной активности по Карновскому составлял не менее 70%. Пациенты не получали какого-либо системного лечения в течение 2 месяцев до момента начала проведения ксеновакцинотерапии.

При проведении иммунотерапии использовали вакцину, приготовленную на основе лизатов клеток мышинных опухолей меланомы В16 и карциномы LLC (патенты РФ № 2192883, 2192884). Клеточную вакцину стерилизовали жестким облучением и хранили до использования в замороженном виде. Одна вакцинирующая доза была эквивалентна 75×10^6 лизированных клеток. Индуцирующий курс вакцино-

терапии состоял из 5 подкожных иммунизаций с недельным и 5 - с двухнедельным интервалам. Поддерживающий курс включал в себя вакцинации с месячным интервалом. Иммунореактивность пациентов была оценена до и после проведения индуцирующего курса вакцинотерапии.

Предназначенные для кожного теста лизаты клеток мыши получали ранее описанным методом [12]. Полученные лизаты центрифугировали для удаления детрита. Далее растворы стерилизовали посредством фильтрации ($0,22 \mu\text{m}$) и определяли в них содержание белка спектрофотометрическим методом (280 нм). Для оценки клеточной иммунореактивности 100 мкл антигенного раствора (2 мг/мл) вводили внутрикожно в область средней трети внутренней поверхности предплечья. Учет реакции производили через 24 ч.

Для оценки антиген-индуцированной бласттрансформации лимфоцитов мононуклеарные клетки периферической крови помещали в 96-луночный круглодонный планшет (Linbro, Великобритания) в количестве 2×10^5 на лунку и культивировали в присутствии лизатов мышинных клеток (5×10^4 на лунку) в среде RPMI-1640, содержащей 10% аутологичной плазмы, 5 mM HEPES, 2 mM L-глутамина (Sigma) и антибиотики в течение 120 ч при температуре 37°C во влажной атмосфере с 5% CO_2 . Уровень пролиферации оценивали по включению меченного ^3H -тимидина, вносимого в дозе 1 мкКю на лунку за 6 ч до окончания культивирования. Индекс стимуляции (ИС) рассчитывали по формуле:

$$\text{ИС} = \text{опыт (имп/мин)} / \text{контроль (имп/мин)}.$$

Оценку содержания основных субпопуляций лимфоцитов проводили с использованием моноклональных антител к Т-клеточным антигенам (CD3, CD4, CD8), В-клеточным антигенам (CD20), естественным киллерам (CD16) («Becton Dickinson») на проточном цитофлуориметре (Becton Dickinson, США).

Клиническая эффективность ксеновакцинотерапии была оценена по данным 2-х летней выживаемости 37 вакцинированных пациентов с IV стадией колоректального рака. Группу контроля составили пациенты, получавшие традиционное лечение. Пациенты этой группы были сопоставимы с опытной группой по локализации и распространенности опухолевого процесса, полу, возрасту, а также времени наблюдения после генерализации процесса (табл. 1).

Статистическую обработку полученных данных проводили методами непараметрической статистики (критерии Уилкоксона и Манна-Уитни); выживаемость пациентов оценивали критерием Kaplan & Meier с использованием стандартного пакета программ прикладного статистического анализа (Statistica for Windows 6.0).

Результаты

При проведении ксеновакцинотерапии нами не было зафиксировано побочных эффектов, а также других системных осложнений. Кратковременные локальные реакции в виде покраснения места вве-

дения вакцины были отмечены у большинства пациентов. В течение 24-48 ч после вакцинации у 50% пациентов наблюдалось умеренное повышение температуры (до 37,5°), которое не требовало дополнительного медикаментозного вмешательства. Соглас-

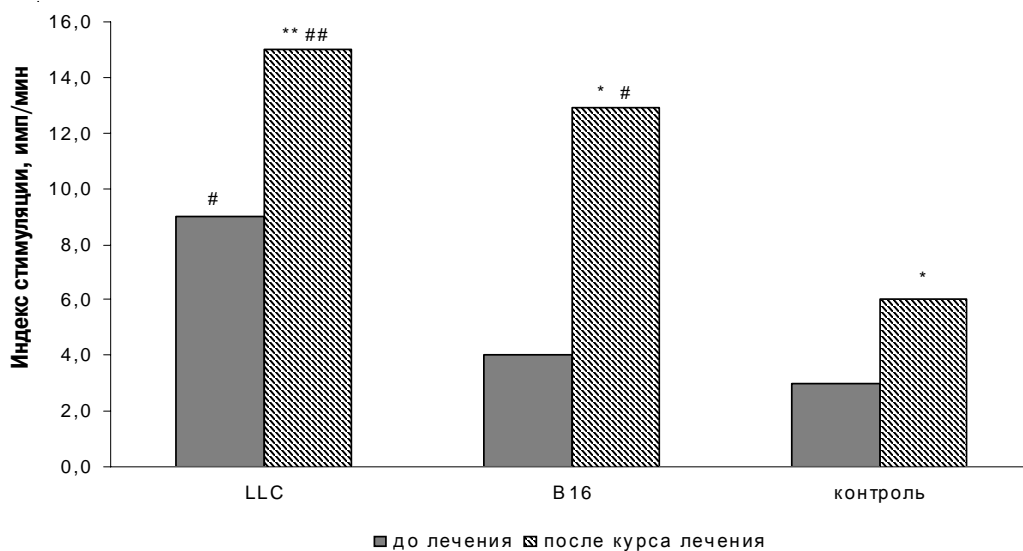


Рис. 1. Индекс стимуляции ($M \pm m$) в реакции бласттрансформации лимфоцитов на вакцинальные антигены у пациентов ($n=31$) до и после индуцирующего курса ксеновакцинотерапии. Примечание: * - $p=0,003$; в сравнении с показателем до лечения; ** - $p=0,009$; в сравнении с показателем до лечения; # - $p < 0,03$; в сравнении с реакцией на неопухолевые антигены; ## - $p=0,00$; в сравнении с реакцией на неопухолевые антигены.

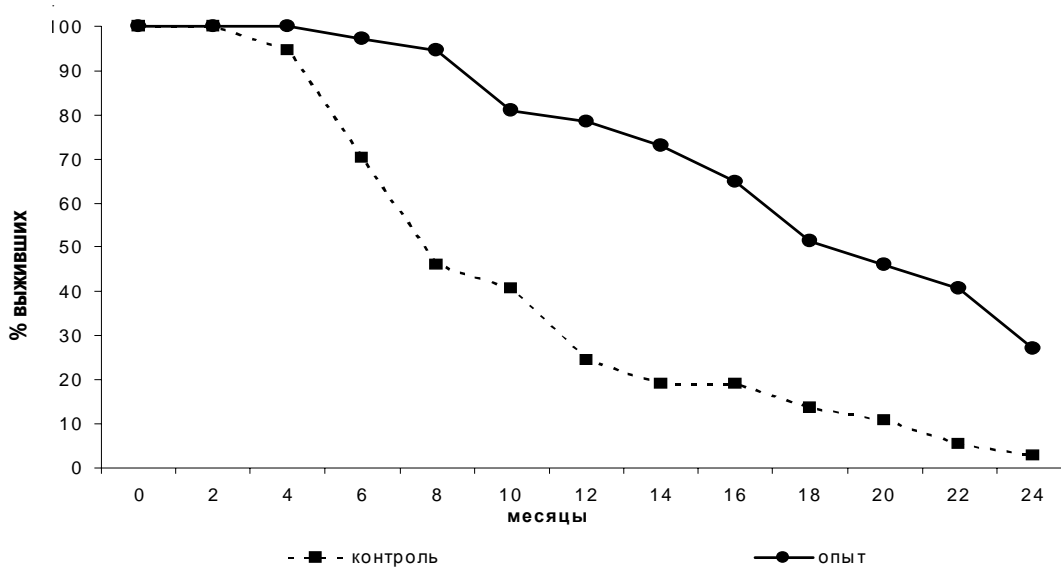


Рис. 2. Двухлетняя выживаемость вакцинированных ($n=37$) и контрольных ($n=37$) пациентов с IV стадией заболевания от момента генерализации заболевания. Примечание: * - $p < 0,05$; в сравнении с группой контроля

но полученным данным, индуцирующий курс вакцинотерапии не оказывал существенного влияния на субпопуляционный состав мононуклеарных клеток крови (CD3, CD4, CD8, CD 20, CD16) (данные не представлены).

По данным кожных тестов, после проведения индуцирующего курса вакцинотерапии отмечено отчетливое увеличение размера кожного пятна (5 мм и более) как на вакцинальные карциномные (LLC) антигены, так и на меланомные (B16) ОАА у 31 (84%) из 37 пациентов. Однако, более выраженный средний прирост реакции (11 мм) был выявлен у пациентов на антигены карциномы мыши ($P=0,00$) (табл. 2). Среди этих пациентов наиболее значимый прирост (с $4\pm 0,9$ до $18\pm 2,3$ мм) был отмечен у 12 из 18 больных с исходно низкой реактивностью (реакция менее 10 мм). Исходно реактивность на неопухолевые ксеноантигены у большинства пациентов была невысокой и после индуцирующего курса вакцинотерапии, как правило, не достигала 10 мм.

Реакция пролиферации Т-лимфоцитов на вакцинальные антигены была оценена у 31 пациента (17 женщин и 14 мужчин). Достоверный прирост реакции у этих пациентов был выявлен как на опухолевые, так и на неопухолевые ксеноантигены (рис. 1). Следует, однако, отметить, что в целом вакцинальные ОАА индуцировали прирост реакции бласттрансформации лимфоцитов более чем в 2 раза по сравнению с неопухолевыми ксеноантигенами.

Как показано на рисунке 2, значения 2-х летней выживаемости пациентов в исследуемой группе достоверно отличались от контрольных значений ($p<0,05$). К концу срока наблюдения количество выживших в группе исследования и в контрольной группе составило 10 (27%) и 1 (3%) пациентов, соответственно. Медиана выживаемости в группе ис-

следования равнялась 17 месяцев, тогда как в контрольной группе 7 месяцам. Клинический эффект разной степени выраженности (полный, частичный ответ, стабилизация болезни) продолжительностью не менее 3 месяцев был достигнут у 23 (62 %) пациентов.

Обсуждение

Основной целью специфической иммунотерапии является стимуляция эффективного противоопухолевого иммунного процесса посредством увеличения количества в организме сенсибилизированных Т-лимфоцитов, способных реагировать на ОАА. Большинство ОАА представлено эволюционно консервативными молекулами. Следствием этого является высокая степень гомологии между ОАА человека и животных. С другой стороны, межвидовые отличия ОАА можно выгодно использовать при разработке противоопухолевых вакцин. Так, показано, что иммунизация мышей (C57BL6) ОАА человека способна предотвращать развитие в их организме меланомы B16 [7]. Есть основания полагать, что в обратной ситуации мышинные ОАА могут быть более эффективными индукторами иммунных реакций у пациентов в сравнении с их человеческими аналогами.

Исследуемая нами вакцина состоит из разрушенных мышинных опухолевых клеток. Человек и мышь виды дискордантные по отношению друг к другу. Это означает, что при попадании в организм человека, мышинные клетки опсонизируются естественными (пресуществующими) антителами и далее посредством опосредуемого Fc-рецепторами фагоцитоза попадают в профессиональные антиген-презентирующие клетки (макрофаги, дендри-

Табл. 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ВАКЦИНИРОВАННЫХ И КОНТРОЛЬНЫХ ПАЦИЕНТОВ

Характеристика	Группа исследования	Контрольная группа
Количество пациентов	37	37
Пол:		
мужчины	20 (54%)	20 (54%)
женщины	17 (46%)	17 (46%)
Средний возраст, годы	$61,1 \pm 1,4$ (от 38 до 79)	$55,6 \pm 1,7$ (от 30 до 80)
Локализация метастазов:		
легкие	8 (22%)	6 (16%)
печень	27 (73%)	19 (51%)
лимфатические узлы, мягкие ткани	17 (46%)	17 (46%)
другие локализации (мозг, кости и др.)	11 (30%)	8 (22%)

Табл. 2. КОЖНАЯ РЕАКЦИЯ ($M\pm m$, мм) НА АНТИГЕНЫ ВАКЦИНЫ У ПАЦИЕНТОВ ($n=37$) ДО И ПОСЛЕ ИНДУЦИРУЮЩЕГО КУРСА КСЕНОВАКЦИНОТЕРАПИИ

	Карцинома мыши	Меланома мыши	Спленоциты мыши
До лечения	$10 \pm 1,9^{##}$	$12 \pm 1,7^{\#}$	$3 \pm 1,3$
После курса лечения	$21 \pm 2,1^{*##}$	$21 \pm 2,2^{##}$	$9 \pm 2,0$

Примечание: * - $p=0,002$; в сравнении с показателем до лечения; ** - $p=0,00$; в сравнении с показателем до лечения; # - $p=0,00$; в сравнении с реакцией на неопухолевые антигены; ## - $p=0,01$; в сравнении с реакцией на неопухолевые антигены.

тические клетки). Активное вовлечение этих клеток в процессинг чужеродного материала и презентацию опухолеассоциированных антигенных детерминант в комплексе с продуктами главного комплекса гистосовместимости как II, так и I класса - важный элемент в механизме развития индуцируемого вакциной противоопухолевого процесса [4, 8]. Вероятно, активированные ОАА и ксеноантигенами, CD4⁺ клетки за счет секреции IFN γ , IL-2, IL-15 вызывают также стимуляцию клеток с неспецифической противоопухолевой активностью (макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, NK-клетки). В нашей работе мы не обнаружили количественных изменений в субпопуляционном составе иммунных клеток организма пациентов на фоне вакцинотерапии. Возможно, влияние ксеновакцинотерапии надо оценивать не по количественному содержанию основных субпопуляций лимфоцитов, а по их функциональной активности. Для того чтобы расширить спектр ОАА в вакцине, в ее состав были включены не только карциномные (LLC), но и меланомные (B16) продукты. Наблюдаемая у части пациентов (62%) исходно высокая реактивность не только на карциномные, но и меланомные ОАА может быть объяснена определенной иммунной сенсibilизацией, произошедшей в процессе опухолевого развития. Так, пресуществующий клеточный иммунитет был выявлен в реакции ГЗТ *in vivo* в специфическом ответе на антигены меланомы и карциномы мыши, а также в реакции бласттрансформации лимфоцитов на антигены карциномы мыши. Ксеногенные клетки являются мощными индукторами специфического клеточного и гуморального противоопухолевых ответов [5, 6, 7]. Поэтому после курса вакцинации наблюдается возрастание уровня реакции ГЗТ на антигены вакцины. Причем, наблюдается преимущественно стимуляция карцином-специфических Т-лимфоцитов, что и обуславливает более выраженный иммунный ответ на антигены карциномы мыши. Специфический пролиферативный ответ Т-клеток на антигены вакцины в тесте бласттрансформации лимфоцитов после курса вакцинотерапии также согласуется с результатами кожных проб.

Очевидно, что не только ОАА, но и неопухолевые антигены, входящие в состав вакцины, способны индуцировать иммуногенез. Однако, есть основания, полагать что иммуногенность вакцины в большей степени связана с ОАА, а не с продуктами нормальных клеток. Во-первых, как в каждом тесте, так и в реакции бластогенеза, в сравнении с контрольными ксеноантигенами ОАА вызывали более выраженную количественно реакцию. Во-вторых, у части пациентов вызванный вакцинацией прирост реактивности на карциномные ОАА не ассоциировался с заметным приростом реактивности на неопухолевые ксеноантигены.

Таким образом, полученные нами предварительные результаты свидетельствуют о том, что специфическая иммунотерапия с использованием ксеногенной клеточной вакцины способна эффективно стимулировать противоопухолевый клеточный иммунитет, а также пролонгировать жизнь больных с IV стадией колоректального рака.

Список литературы

1. Тимофеев Ю.М. Колоректальный рак: современные аспекты диагностики и лечения // Русский медицинский журнал. -2004. -№ 11. -С.1-8.
2. Bergman P.J., McKnight J., Novosad A., Charney S., Farrelly J., Craft D., Wulderk M., Jeffers Y., Sadelain M., Hohenhaus A.E., Segal N., Gregor P., Engelhorn M., Riviere I., Houghton A.N., Wolchok J.D. Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase: a phase I trial // Clin.Cancer Res.-2003. -V.9. -P.1284-1290.
3. Berzofsky J.A., Terabe M., Oh S.K., Belyakov I.M., Ahlers J.D., Janik J.E., Morris J.C. Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer // The Journal of Clinical Investigation. -2004. -Vol.113. -P.1515-1525.
4. Galili U., LaTempe D.C. Natural anti-Gal antibody as a universal augmentor of autologous tumor vaccine immunogenicity // Immunology Today. -1997. -Vol.18. -P.281-285.
5. Graf N., Adam C., Mocikat R. Persistence of xenogenized vaccine cells in vivo // Int.J.Cancer. -2003. -V.105. -P.217-220.
6. Luo F., Wei Y., Kan B. Anti-tumor immune response against mouse melanoma to xenogeneic vaccination // Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. -2001. -Vol.23. -P.118-121.
7. Naftzger C., Takechi Y., Kohda H., Hara I., Vijayaradhhi S., Houghton A.N. Immune response to a differentiation antigen induced by altered antigen: a study of tumor rejection and autoimmunity // PNAS. -1996. -Vol.93. -P.14809-14814.
8. Rafiq K., Bergtold A., Clynes R. Immune complex-mediated antigen presentation induces tumor immunity // J Clin Invest. -2002. -Vol.11. -P.71-79.
9. Renkvist N., Castelli C., Robbins P.F., Parmiani G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells // Cancer Immunology Immunotherapy. -2001. -Vol.50. -P.3-15.
10. Srinivasan R., Wolchok J.D. Tumor antigens for cancer immunotherapy: therapeutic potential of xenogeneic DNA vaccines // Journal of translational medicine. -2004. -V.2. -P.1.
11. Van Den Eynde B.J., Gaugler B., Brandle D., Gulloux Y., Van Der Bruggen P., Coulle P., Bri-

chard V., Boon T. Characterization of antigens recognized by T cells on human tumors // Symposium in Immunology YI, Springer-Verlag, Heidelberg. - 1997. -P.1-11.

12. Yoshihito K., Koichi S., and James J.M. Comparative analysis of necrotic and apoptotic tumor cells as a source of antigen(s) in dendritic cell-based immunisation // Cancer Research. –2001. -Vol.61. -P.8105-8109.

поступила в редакцию 07.05.2005

принята к печати 15.09.2005