

# ЧАСТИЧНО-ЗРЕЛЫЕ ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ОСНОВА ДЛЯ ИНДУКЦИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ОТВЕТА У БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ГЛИОМАМИ

Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Козлов Ю.П. \*,  
Ступак В.В. \*, Никонов С.Д., Останин А.А., Черных Е.Р.

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН,

\* НИИ травматологии и ортопедии МЗ РФ, г. Новосибирск, Россия

**Резюме.** В работе проведен сравнительный анализ фенотипических и функциональных свойств дендритных клеток (ДК), выращенных в присутствии GM-CSF и IFN $\alpha$  из моноцитов крови больных злокачественными опухолями головного мозга (ЗОГМ) и здоровых доноров, а также исследована возможность использования ДК для индукции противоопухолевого иммунного ответа у больных глиомами. Установлено, что среди полученных ДК здоровых доноров содержится 17-18% CD14<sup>+</sup> моноцитов, 90 и 52% клеток экспрессируют соответственно HLA-DR антигены и CD86 костимуляторные молекулы, при этом в среднем 38% клеток являются CD83<sup>+</sup> зрелыми ДК. Кондиционная среда моноцитов (30% v/v) и лейкинферон (250 ЕД) обладали равной эффективностью в качестве дозревающего стимула. Несмотря на дефект моноцитов при злокачественных глиомах, аналогичная популяция ДК успешно генерировалась *in vitro* у всех обследованных больных ЗОГМ. Однако количество CD83<sup>+</sup> клеток среди ДК больных было достоверно ниже (24%), что указывает на задержку созревания ДК при ЗОГМ. Тем не менее, ДК больных характеризовались схожей с донорами аллостимуляторной активностью, а 52-62% клеток сохраняли способность к рецептор-зависимому эндоцитозу. Кроме того, ДК больных эффективно презентировали бактериальные и опухолеассоциированные антигены. Иммунотерапия с использованием аутологичных ДК позволяет индуцировать у 50% больных ЗОГМ сенсбилизацию к опухолевым антигенам в кожном тесте *in vivo* и в культуре *in vitro*.

**Ключевые слова:** дендритные клетки, противоопухолевый ответ, иммунотерапия, злокачественные глиомы.

Leplina O.Yu., Tihonova M.A., Kozlov Yu.P., Stupak V.V., Nikonov S.D., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

## SEMI-MATURE DENDRITIC CELLS AS A POTENTIAL BASIS FOR THE INDUCTION OF ANTI-TUMOR RESPONSE IN PATIENTS WITH MALIGNANT GLIOMAS

**Abstract.** The comparative analysis of phenotypical and functional features of dendritic cells (DCs), generated in presence of GM-CSF and IFN $\alpha$  from blood monocytes of patients with malignant gliomas (MG) and healthy donors, was carried out in this research. The potential value of the DC-based immunotherapy in the induction of anti-tumor response in patients with MG was also examined. Our results show that within generated DCs of healthy donors 90 and 52% cells expressed correspondingly HLA-DR and CD86, only 17-18% cells were CD14<sup>+</sup> monocytes, whereas 38% cells exhibited the phenotype of mature CD83<sup>+</sup> dendritic cells. The both monocyte conditioned medium (MCM, 30% v/v) and Leukinferon® (250 IU of IFN $\alpha$ ) were comparably efficient as maturation-induced stimuli. Despite monocyte's disturbances in malignant gliomas, the analogous population of DCs was efficiently generated in all examined patients with MG. However, the percentage of mature CD83<sup>+</sup> DCs was significantly decreased compared to that in healthy donors (24 vs 38%), and these data strongly suggest the delay maturation of DCs in MG. Nevertheless the patient's DCs showed the allostimulatory activity, comparable with healthy donor's DCs, and 52-62% cells maintained the ability for the receptor-dependent en-

### Адрес для переписки:

Леплина О.Ю. 630099, Новосибирск, ул.  
Ядринцевская, д. 14, ГУ НИИ клинической  
иммунологии СО РАМН, Тел.: (3832) 28-21-01.  
Факс (3832) 22-70-28. E-mail: ctl\_ab@mail.ru

docytosis. Moreover, the patient's DCs effectively presented bacterial and tumor-associated antigens (TAA). Immunotherapy with autologous DCs allowed to induce the TAA-specific immune reactions, both in skin test *in vivo* and *in vitro*, in 50% patients with MG. (*Med. Immunol.*, 2005, vol.7, № 4, pp 365-374)

## Введение

Дендритные клетки (ДК) являются профессиональными антиген-презентирующими клетками, которые обеспечивают наиболее эффективное представление различных антигенов и активацию Т-клеток. Поскольку ДК способны презентировать опухолеассоциированные антигены (ОАА) и запускать противоопухолевый иммунный ответ, иммунизация ДК, нагруженными опухолевыми антигенами (ДК-вакцины), рассматривается как один из новых подходов в иммунотерапии злокачественных опухолей [25, 14, 23]. Действительно, клиническая апробация ДК-вакцин при меланоме, раке предстательной железы, раке почки, лимфомах и др. показала хорошую переносимость и у части больных (10-30%) сопровождалась клиническим эффектом в виде частичной и полной регрессии опухоли [6, 9, 10].

Злокачественные опухоли головного мозга (ЗОГМ) характеризуются крайне неблагоприятным прогнозом. Несмотря на комплексный подход, включающий хирургическое удаление опухоли, радио- и химиотерапию, результаты лечения данной патологии остаются неудовлетворительными. Средняя выживаемость пациентов составляет 12-18 месяцев. Возможность использования ДК-вакцин в лечении глиом была продемонстрирована в ряде исследований на экспериментальных животных с внутримозговыми опухолями. Иммуноterapia ДК приводила к генерации опухоль-специфических цитотоксических лимфоцитов и улучшала показатели выживаемости животных с внутримозговыми глиомами [17, 13, 7]. Клинические испытания ДК-вакцин у человека также подтвердили возможность генерации специфического иммунного ответа и увеличение продолжительности жизни пациентов после проведенной терапии [26, 28, 12]. Поскольку специфический для глиом антиген до сих пор не идентифицирован, источником антигена в этих исследованиях служили либо лизат опухолевых клеток [26], либо поверхностные пептидные антигены опухолевых клеток [28], либо гибриды опухолевых и дендритных клеток [12].

Важно отметить, что одним из ключевых вопросов при использовании ДК-вакцин является оптимальный выбор типа ДК. В клинической практике наибольшее распространение получил метод генерации ДК путем культивирования прилипающей фракции мононуклеарных клеток с GM-CSF и IL-4 (незрелые ДК) с последующей стимуляцией их конечной дифференцировки различными факторами (зрелые ДК) [19, 24]. В качестве ДК-

вакцин используются как зрелые, так и незрелые ДК [15], однако какие из них являются более предпочтительными, остается неясным. Так, 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. Кроме того, способность зрелых ДК активно секретировать IL-12 имеет транзитный характер и снижается уже через 10-12 часов культивирования, что уменьшает их эффективность в индукции Th1 ответа [14].

В последние годы в литературе появились данные о возможности быстрой генерации частично зрелых ДК путем культивирования моноцитов с GM-CSF и IFN $\alpha$  [21]. Важной отличительной особенностью данного типа ДК (IFN-ДК) является их высокая способность к захвату антигена, миграции и активации Th1-ответа [18]. Тем не менее, клиническая апробация IFN-ДК с целью генерации противоопухолевого ответа не проводилась. Учитывая дефект ДК у больных с опухолевым ростом, остается также невыясненной сама возможность генерации функционально полноценных IFN-ДК у больных злокачественными глиомами. Исходя из этого, целью настоящей работы явился сравнительный анализ фенотипических и функциональных свойств IFN-ДК у больных ЗОГМ и здоровых доноров и оценка их способности генерировать противоопухолевый иммунный ответ у больных злокачественными глиомами.

## Материалы и методы

Группа обследованных включала 25 доноров и 22 больных ЗОГМ (15 мужчин и 7 женщин), которые были прооперированы и наблюдались в клинике нейрохирургии НИИ травматологии и ортопедии МЗ РФ в период с 2002 по 2004 г. Среди обследованных больных у 6 пациентов диагностировалась гистологически верифицированная глиобластома, у 16 - астроцитомы 3 степени анаплазии. Возраст больных варьировал от 16 до 54 лет. Всем больным проводилось стандартное комплексное лечение, включающее операцию с удалением опухоли в пределах видимых границ и проведение лучевой терапии в стандартной дозе на область удаленной опухоли (55-60 Грэй). Комбинированную иммунотерапию с использованием ДК (КИТ-ДК) проводили в режиме пилотных исследований в послеоперационном периоде в соответствии с разработанным патентом [4]. ДК, нагруженные опухолевыми антигенами, использовались для ге-

нерации специфических цитотоксических лимфоцитов, а также для подкожной иммунизации. Источником опухолевых антигенов служил лизат опухолевых клеток, который получали путем 5-кратного замораживания (в жидком азоте) и размораживания (в водяной бане при 37°C) суспензии опухолевых клеток, выделенных из фрагмента удаленной опухоли. Цитотоксические лимфоциты в средней суммарной дозе  $400 \pm 17 \times 10^6$ /больного вводили в послеоперационном периоде в ложе удаленной опухоли в комбинации с рекомбинантным интерлейкином-2 (IL-2; 250000 Ед, препарат «Ронколейкин», ООО «Биотех», СПб). После этого проводилась вакцинация пациентов аутологичными ДК, нагруженными опухолевыми антигенами, с кратностью 1 раз в неделю курсом 4-6 вакцинаций. ДК вводили в область предплечья в 4-5 точек подкожно в комбинации с Ронколейкином (500000 Ед).

Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из периферической крови стандартно в градиенте плотности фиколла-верографина. Дендритные клетки получали путем культивирования прилипающей фракции МНК во флаконах для культивирования (BD Biosciences Falcon, UK) в течение 3 сут в среде RPMI-1640 (Sigma, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 5% инактивированной сывороткой доноров АВ(IV) группы, в присутствии GM-CSF (Leucotax, Шеринг-Плау, Швейцария) 1000 Ед/мл и IFN $\alpha$  (Роферон-А, Roche, Швейцария) 1000 Ед/мл. В последующие 48 ч добавлялся дозирующий стимул – либо кондиционная среда моноцитов (monocyte conditionate medium; MCM; 30% v/v), либо лейкинферон (НПФ «Интекор», Москва) в конечном разведении 1:40. Для приготовления кондиционной среды моноцитов прилипающую фракцию МНК здоровых доноров ( $50 \times 10^6$ ) культивировали в течение 24 ч в чашках Петри (90 мм), покрытых Ig человека (Биомед, Россия) в концентрации 1мг/мл, после чего супернатанты собирали и криоконсервировали.

Полученные ДК подвергали фенотипическому и функциональному исследованию и при необходимости замораживали в 90% растворе альбумина (НПО «Микроген», Россия), содержащего 10% DMSO (Biomedicals Inc., США). Для загрузки опухолевыми антигенами ДК культивировали в течение 1 ч с опухолевым лизатом с концентрацией белка 0,1 мг/мл.

Для генерации цитотоксических лимфоцитов МНК больных культивировали с ДК, нагруженными опухолевыми антигенами, в соотношении 1:100 в присутствии IL-2 (Ронколейкин, 100 Ед/мл) в полной культуральной среде в течение 5 сут.

Фенотипирование клеток проводили методом проточной цитофлуориметрии (FACSCalibur,

Becton Dickinson) с использованием моноклональных антител - CD14, HLA-DR, («Сорбент», Москва) и CD86, CD83 (BD Bioscience Pharmingem, США).

Оценка способности ДК к эндоцитозу проводилась методом проточной цитофлуориметрии по захвату FITC-декстрана (мол. вес 40 000, Sigma). Для этого ДК в концентрации  $2 \times 10^5$ /мл инкубировали в среде, содержащей FITC-декстран в конечной концентрации 1 мг/мл в течение 30 мин при 37°C или при 4°C (контроль) с последующей трехкратной отмывкой в холодном забуференном физиологическом растворе, после чего оценивалась внутриклеточная экспрессия FITC-декстрана в дендритных клетках [20].

Аллостимуляторную активность ДК оценивали в реакции смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ). В качестве отвечающих клеток использовались МНК доноров ( $0,2 \times 10^6$ /лунку), которые культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах для иммунологических исследований в среде RPMI-1640 (как описано выше) и 10% инактивированной сыворотки доноров АВ(IV) группы. Стимуляторами служили ДК больных в соотношении МНК/ДК = 10:1 и 100:1. Ответ оценивался на 5 сутки радиометрически по включению  $^3\text{H}$ -тимидина (1 мкКю/лунку), вносимого за 18 ч до окончания культивирования.

Способность ДК презентировать ОАА или РРД (очищенный дериват туберкулина, РАО «Биопрепарат», Санкт-Петербург) оценивали на 5-ые сутки по пролиферативному ответу МНК больных, культивируемых в присутствии аутологичных ДК, нагруженных, соответственно, лизатом опухолевых клеток или РРД (50 мкг/мл). Для оценки пролиферативного ответа МНК на РРД (50 мкг/мл) и IL-2 (50 Ед/мл) клетки в концентрации  $0,1 \times 10^6$ /лунку культивировали в течение 5 суток.

Реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) *in vivo* оценивали по выраженности кожной пробы. Для этого в верхнюю треть предплечья вводился лизат 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 по продукции фактора торможения миграции лейкоцитов в ответ на стимуляцию клеток лейкоцитарной опухолем лизатом [1]. В качестве контрольного антигена использовали комплекс антигенов из мозговой ткани человека в аналогичной концентрации, любезно предоставленный д.м.н., профессором Аутеншлюсом А.И. (НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАМН, Новосибирск).

Математическая обработка полученных результатов проводилась методами описательной, параметрической и непараметрической статистики на

персональном компьютере с использованием программы «Statistica 5.0».

## Результаты

Фенотипическая характеристика IFN-ДК доноров и больных ЗОГМ

На первом этапе мы исследовали возможность генерации и фенотипические свойства IFN-ДК у здоровых доноров (Табл. 1). Используемая в качестве источника ДК прилипающая фракция МНК была представлена клетками, большинство из которых ( $73 \pm 2,6\%$ ) экспрессировали моноцитарный маркер CD14 и не содержали клеток, экспрессирующих маркер зрелых ДК (CD83). При культивировании в течение 3 сут. с GM-CSF и IFN $\alpha$  моноциты периферической крови превращались в плавающие клетки с признаками дифференцировки в сторону ДК, о чем свидетельствовало существенное снижение доли CD14<sup>+</sup> клеток, и появление CD83<sup>+</sup> клеток ( $19,0 \pm 4,7\%$ ). Дополнительное культивирование в течение 2 сут. с кондиционной средой моноцитов сопровождалось дальнейшим созреванием ДК. Так, в 5-суточных культурах отмечалось дальнейшее снижение количества CD14<sup>+</sup> клеток и увеличение доли клеток, экспрессирующих HLA-DR антигены и костимуляторные молекулы (CD86). Кроме того, достоверно возрастало количество CD83<sup>+</sup> клеток, представляющих зрелые ДК. Согласно данным литературы созревание ДК контролируется рядом

провоспалительных цитокинов, источником которых может быть кондиционная среда активированных моноцитов. Однако поскольку концентрация цитокинов в МСМ от серии к серии может существенно варьировать, мы исследовали возможность использования в качестве дозревающего стимула комплексного цитокинсодержащего препарата («Лейкинферона»), стандартизированного по содержанию интерферона- $\alpha$ . Проведенные предварительно исследования показали, что оптимальный эффект лейкинферона при использовании его в качестве дозревающего стимула наблюдался при разведении препарата 1:40 и 1:20. Поэтому в дальнейших экспериментах лейкинферон использовался в разведении 1:40. Сравнение двух типов дозревающих стимулов (Табл. 2) показало, что относительное содержание CD83<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup> и CD14<sup>+</sup>-клеток в культурах с МСМ и лейкинфероном было сходным. Таким образом, МСМ и лейкинферон обладали эквивалентной активностью в отношении дозревания IFN-ДК.

Полученные нами ранее результаты в совокупности с данными литературы свидетельствуют об изменении свойств моноцитов у больных ЗОГМ, в частности более низкой экспрессией HLA-DR антигенов и наличии супрессорной активности [3]. Поэтому на следующем этапе представлялось важным оценить принципиальную возможность получения полноценных ДК из моноцитов больных злокачественными глиомами. В таблице 3 пред-

Табл. 1 ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА IFN-ДК ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

| Маркер     | Длительность культивирования <i>in vitro</i> |                  |
|------------|--|------------------|
|            | 3 сут<br>n=9                                 | 5 сут<br>n=9     |
| CD14 (%)   | $33,0 \pm 6,4$                               | $17,0 \pm 2,3^*$ |
| CD86 (%)   | $56,0 \pm 4,3$                               | $65,2 \pm 4,4^*$ |
| CD83 (%)   | $19,0 \pm 4,7$                               | $33,2 \pm 7,2^*$ |
| HLA-DR (%) | $74,0 \pm 3,4$                               | $86,0 \pm 2,5^*$ |

Примечание: дозревающим стимулом в 5-суточных культурах служила кондиционная среда моноцитов, n – число наблюдений,

\* - $P < 0,05$  – достоверность различий по сравнению с 3-суточными культурами, U – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни.

Табл. 2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ДОЗРЕВАЮЩИХ СТИМУЛОВ В ГЕНЕРАЦИИ ЧАСТИЧНО ЗРЕЛЫХ ДК

| Условия культивирования                | Относительное содержание (%) |                  |                  |
|--|------------------------------|------------------|------------------|
|  | CD14                         | CD83             | HLA-DR           |
| GM-CSF + IFN<br>(3-суточные культуры)  | $36,6 \pm 6,6$               | $19,0 \pm 4,7$   | $70,5 \pm 4,4$   |
| + МСМ<br>(5-суточные культуры)         | $17,0 \pm 2,3^*$             | $38,4 \pm 5,1^*$ | $91,6 \pm 4,6^*$ |
| + Лейкинферон<br>(5-суточные культуры) | $18,2 \pm 1,8^*$             | $37,6 \pm 4,7^*$ | $90,7 \pm 3,6^*$ |

Примечание: приведены средние значения процентного содержания CD14<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup> и HLA-DR<sup>+</sup> клеток в популяции IFN-ДК здоровых доноров (n=9) в 3-суточных культурах и после 48-часового дозревания с различными стимулами. Кондиционную среду моноцитов (МСМ) добавляли в концентрации 30% (v/v), лейкинферон в разведении 1:40 (250 ЕД). \* - $P < 0,05$  – достоверность различий по сравнению с 3-суточными культурами, U – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни.



ставлена сравнительная характеристика IFN-ДК у доноров и пациентов с ЗОГМ. Как видно, относительное содержание CD14, CD86, HLA-DR- позитивных клеток в культурах сгенерированных ДК у больных ЗОГМ и здоровых доноров статистически не различалось. В то же время количество CD83<sup>+</sup> клеток было достоверно ниже, чем у здоровых доноров, что указывает на задержку созревания зрелых ДК у больных ЗОГМ.

### Функциональная активность IFN-ДК у здоровых доноров и больных ЗОГМ

Одной из функций ДК, важной в отношении их использования в качестве ДК-вакцин, является их способность к захвату антигена. Поэтому, прежде всего, была исследована способность IFN-ДК к рецептор-зависимому эндоцитозу по поглощению FITC-декстрана. Большинство (74,9±6,2%) ДК больных, полученных в 3-суточных культурах, активно поглощали FITC-декстран, что является характерным признаком их незрелости. После дозревания с лейкинфероном или МСМ доля клеток с внутриклеточным содержанием FITC-декстрана закономерно снижалась (до 62,0±8,6% и 52,5±7,8%, соответственно). Тем не менее, и в 5-суточных культурах ДК более половины клеток обладали способностью к эндоцитозу. Следовательно, можно полагать, что полученные IFN-ДК представляют частично зрелые ДК, пригодные для нагрузки антигеном.

Для оценки способности IFN-ДК презентировать антигены и активировать Т-клетки далее была исследована аллостимуляторная активность ДК в

смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ), а также их способность индуцировать пролиферативный ответ аутологичных Т-клеток на опухолевые антигены и туберкулиновый белковый дериват (PPD). В таблице 4 представлены данные по сравнительной характеристике аллостимуляторной активности ДК доноров и больных ЗОГМ. Видно, что по сравнению с донорской группой ДК больных обладали схожей аллостимуляторной активностью, эффективно стимулируя пролиферацию отвечающих клеток доноров в соотношении 1:100. При этом уровень пролиферативного ответа при использовании ДК больных был эквивалентен ответу в однонаправленной СКЛ доноров (10550±3420 имп/мин), где в качестве стимуляторов использовались митомицин-обработанные аллогенные МНК в соотношении 1:1.

Ранее нами было показано, что больные с ЗОГМ характеризуются наличием иммунной недостаточности, одним из проявлений которой является снижение митогенной реактивности [2, 3, 5]. Исследование ответа на PPD, который, как известно, активизирует Th1, также выявило у больных 2-кратное снижение пролиферативной активности (13700±3430 vs 35920±6530 у здоровых доноров; P<sub>U</sub><0,05). Однако уровень пролиферативного ответа значительно возрастал и приближался к таковому у доноров, если для стимуляции использовались аутологичные IFN-ДК, нагруженные PPD (Рис. 1). Таким образом, ДК больных обладали способностью эффективно презентировать как мембранноассоциированные аллоантигены, так и экзогенные белковые бактериальные антигены.

Табл. 3. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА IFN-ДК ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ЗОГМ

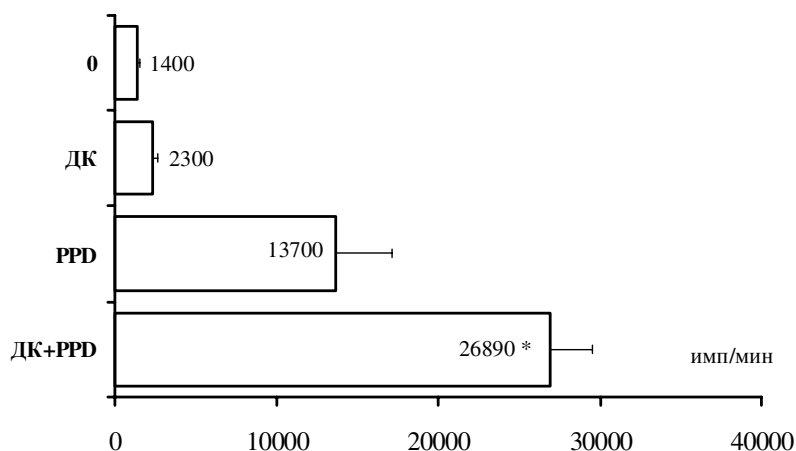
| Маркер     | Доноры (n=16) | Больные (n=15) |
|------------|---------------|----------------|
| CD14 (%)   | 18,2 ± 1,8    | 18,5 ± 9,2     |
| CD86 (%)   | 51,6 ± 4,8    | 53,0 ± 9,9     |
| CD83 (%)   | 37,6 ± 4,7    | 23,8 ± 2,4 *   |
| HLA-DR (%) | 90,7 ± 3,6    | 82,4 ± 3,6     |

Примечание: дозревание ДК проходило в присутствии лейкинферона (250 ЕД) в течение 2 сут, \* - P<sub>U</sub><0,05 – достоверность различий между количественным содержанием CD83<sup>+</sup> клеток в группах больных и доноров, U- критерий Вилкоксона-Манна-Уитни.

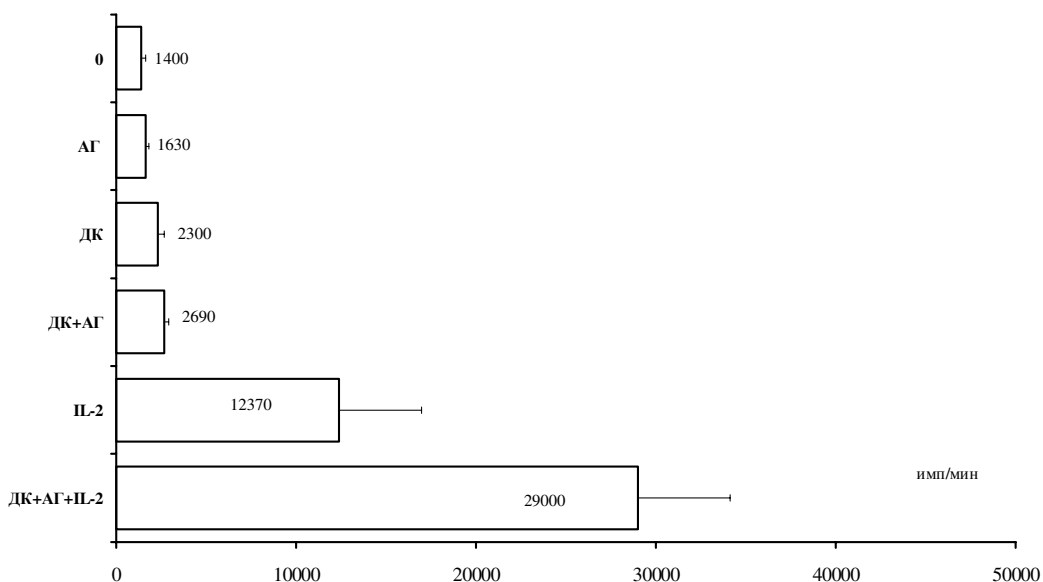
Табл. 4. АЛЛОСТИМУЛЯТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ДК ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ЗОГМ

| Группы  | Спонтанная пролиферация | Алло-СКЛ     | ИБ         |
|---------|-------------------------|--------------|------------|
| Доноры  | 1750 ± 170              | 8285 ± 1365  | 5,0 ± 0,34 |
| Больные | 1740 ± 250              | 11760 ± 4835 | 7,0 ± 3,35 |

Примечание: представлены средние значения уровня пролиферации (имп/мин) и индексы влияния (ИБ) дендритных клеток в аллогенной смешанной культуре лимфоцитов. Респондеры – МНК доноров (0,2 × 10<sup>6</sup>/лунку), стимуляторы – аллогенные дендритные клетки здоровых доноров (n=5) или больных ЗОГМ (n=13) в соотношении 1:100 (2 × 10<sup>3</sup> ДК/лунку).



**Рис. 1. Способность ДК, нагруженных туберкулиновым антигеном, стимулировать пролиферативный ответ аутологических МНК.** 0,2 x 10<sup>6</sup>/лунку МНК больных ЗОГМ (n=8) инкубировали в течение 5 сут в полной культуральной среде в круглодонных 96-луночных планшетах в отсутствии стимуляции (0), либо в присутствии: очищенного деривата туберкулина в дозе 50 мкг/мл (PPD); аутологических ДК в соотношении 10:1 (ДК); аутологических ДК, нагруженных в течение 1 ч PPD 50 мкг/мл (ДК+PPD).



**Рис. 2. Способность ДК, нагруженных опухолевыми антигенами, стимулировать пролиферативный ответ аутологических МНК.** 0,2 x 10<sup>6</sup>/лунку МНК больных ЗОГМ (n=8) инкубировали в течение 5 сут в полной культуральной среде в круглодонных 96-луночных планшетах в отсутствии стимуляции (0), либо в присутствии: опухолевого антигена в дозе 0,1 мг/мл (АГ); аутологических ДК в соотношении 10:1 (ДК); аутологических ДК, нагруженных в течение 1 ч опухолевым антигеном 0,1 мг/мл (ДК+АГ); интерлейкина-2 в дозе 50 Ед/мл (ИЛ-2); аутологических ДК, нагруженных опухолевым антигеном, и ИЛ-2 (ДК+АГ+ИЛ-2).

Одним из принципиальных вопросов стало выяснение возможности IFN-ДК презентировать ОАА. Для этого был проведен анализ пролиферативной активности МНК в ответ на стимуляцию опухолевым лизатом. Как видно из рис. 2, МНК больных не отвечали пролиферацией на стимуляцию опухолевыми антигенами. Интенсивность пролиферации МНК в присутствии аутологичных ДК была также минимальной. В то же время ДК, нагруженные ОАА, эффективно стимулировали пролиферацию МНК в присутствии IL-2. Следует отметить, что изолированное добавление к культурам МНК IL-2 также стимулировало пролиферацию, однако интенсивность ответа была существенно ниже, чем в культурах с ДК, нагруженными опухолевыми антигенами. Таким образом, частично зрелые IFN-ДК больных в присутствии IL-2 обладали способностью индуцировать пролиферативный ответ МНК на ОАА.

В завершении был проведен анализ возможности использования IFN-ДК для индукции противоопухолевого ответа у больных злокачественными глиомами. ДК использовались для генерации цитотоксических Т-лимфоцитов, вводимых в ложе удаленной опухоли, а также для подкожных вакцинаций. Учитывая полученные выше данные, генерацию цитотоксических лимфоцитов проводили путем культивирования МНК больных с ДК, нагруженными опухолевым лизатом, в присутствии IL-2, а вакцинацию ДК сочетали с одновременным подкожным введением IL-2. Лечение с использованием ДК было проведено 15 пациентам. Чтобы оценить сенсбилизацию к опухолевым антигенам исходно, а также после 3 и 6 вакцинаций проводилась кожная проба и реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) *in vitro*. Из представленных в таблице 5 данных видно, что исходно сенсбилизация к опухолевым антигенам *in vitro* регистрировалась у незначительного количества больных. В то же время после 3 и

особенно 6 иммунизаций доля больных, МНК которых реагировали на опухолевый лизат, существенно возрастала. Интересно отметить, что по мере иммунизации также увеличивалось число пациентов с сенсбилизацией МНК к контрольному антигену, в качестве которого использовался комплекс антигенов из мозговой ткани человека. Это, по-видимому, объясняется тем фактом, что большинство опухолевых антигенов представляют по своей природе тканеспецифические пептиды, и формирование иммунной реакции против опухоли в той или иной степени провоцирует развитие ответа к собственным антигенам. Кожная проба на опухолевый антиген исходно была отрицательной у всех пациентов, однако после 6 иммунизаций становилась положительной у половины больных. Таким образом, в ходе проведения комплексной иммунотерапии с использованием дендритных клеток у 50% больных ЗОГМ удается индуцировать развитие антиген-специфического противоопухолевого иммунного ответа.

## Обсуждение

Полученные за последние годы данные о способности ДК презентировать ОАА CD4 и CD8 Т-клеткам, в том числе наивным Т-клеткам, и запускать противоопухолевый иммунный ответ послужило толчком к созданию нового типа вакцин на основе ДК [14, 22] и их успешной клинической апробации [16, 24, 26]. Тем не менее, широкое внедрение ДК-вакцин в клинику тормозится рядом нерешенных вопросов, одним из которых является выбор оптимального типа ДК и источника ОАА. Используемые в клинической практике зрелые и незрелые ДК, как два различных варианта, имеют свои преимущества и недостатки. Поэтому проведенное в настоящей работе исследование ДК частичной степени зрелости, в том числе анализ возможности генерации таких клеток у больных

Табл. 5. ИНДУКЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА К ОПУХОЛЕВЫМ АНТИГЕНАМ У БОЛЬНЫХ ЗОГМ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИММУНОТЕРАПИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ ЧАСТИЧНО ЗРЕЛЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК

| Время обследования        | Реакция гиперчувствительности замедленного типа |  |  |
|---------------------------|---|--|--|
|                           | На опухолевый антиген<br><i>in vivo</i>         | На опухолевый антиген<br><i>in vitro</i> | На тканеспецифический<br>антиген <i>in vitro</i> |
| До вакцинации             | 0 % (0/8)                                       | 14 % (2/14)                              | 18 % (2/11)                                      |
| После трех<br>вакцинаций  | 38 % (3/8)                                      | 21 % (3/14)                              | 20 % (1/5)                                       |
| После шести<br>вакцинаций | 50 % (4/8) *                                    | 50 % (3/6)                               | 33 % (2/6)                                       |

Примечание: представлена частота и абсолютное количество больных, положительно ответивших на антиген, \* -  $P_{\text{ТМО}} = 0,038$  – достоверность различий частот в группах больных до вакцинации и после шести вакцинаций, рассчитанная точным методом Фишера.

ЗОГМ и их использования в качестве вакцин, представляет на наш взгляд несомненный интерес. Согласно данным литературы быстрая генерация частично зрелых ДК достигается в процессе 3-дневного культивирования моноцитов периферической крови в присутствии GM-CSF и IFN $\alpha$  с последующим дозреванием в присутствии провоспалительных цитокинов. Действительно, анализ фенотипических свойств ДК, полученных по указанному протоколу, показал, что 38% клеток экспрессировали CD83 – маркер зрелых клеток, и лишь 17-18% несли маркер моноцитов (CD14). Причем кондиционная среда моноцитов и лейкоинтерферон обладали одинаковой эффективностью в качестве дозревающего стимула. Примечательно, что аналогичный тип ДК удалось сгенерировать и из фракции моноцитов у больных ЗОГМ. Нарушение созревания и дифференцировки ДК при опухолевом росте рассматривается как один из возможных механизмов дефекта противоопухолевого ответа [11]. Несмотря на изменение функциональной активности моноцитов при злокачественных глиомах, IFN-ДК генерировались у всех обследованных больных. Однако количество CD83<sup>+</sup> клеток в популяции ДК у больных было достоверно ниже, что указывает на задержку созревания ДК при ЗОГМ.

Исследование функциональных свойств IFN-ДК в группе больных показало, что половина из них обладает высокой поглотительной активностью, в частности способностью к рецептор-зависимому эндоцитозу. Как известно, это свойство характерно для незрелых клеток [20], и имеет принципиальное значение для эффективной нагрузки клеток антигеном. Наряду с тем IFN-ДК обладали выраженной аллостимуляторной активностью, сравнимой с ДК здоровых доноров, что указывает на их сохранную способность активировать Т-клетки. Более того, ДК больных эффективно презентировали бактериальные пептиды, например PPD, обладая более выраженной антигенпрезентирующей активностью по сравнению с моноцитами периферической крови. На это указывают полученные нами данные о снижении у больных ответа МНК на PPD и его нормализации в присутствии ДК, нагруженных PPD.

Одним из важных фрагментов работы стало исследование способности ДК больных презентировать ОАА. Поскольку специфического опухолевого антигена при злокачественных глиомах не идентифицировано, в качестве источника антигена использовался лизат опухолевых клеток, что является достаточно эффективным антигеном по данным литературы и широко используется рядом авторов [8, 26, 11]. ДК, нагруженные лизатом опухолевых клеток, стимулировали пролиферацию аутологичных МНК в присутствии IL-2. Возможность индуцировать иммунный ответ к ОАА была

подтверждена и при использовании IFN-ДК *in vivo*. Иммунотерапия с использованием ДК сопровождалась появлением сенсibilизации к ОАА (положительная кожная проба) у половины больных, тогда как исходно кожная проба у всех больных была отрицательной. Полученные нами данные в целом согласуются с результатами Yu J.S. с соавторами, которые использовали для иммунизации ДК, полученные в процессе 6-дневного культивирования с GM-CSF и IL-4. Развитие противоопухолевого иммунного ответа в виде появления антигенспецифических цитотоксических Т-клеток регистрировалось у 4 из 9 иммунизированных пациентов [28].

Таким образом, полученные нами данные обосновывают возможность использования нового типа ДК, а именно, частично зрелых IFN-ДК, для усиления противоопухолевого ответа и свидетельствуют о возможности генерации функционально полноценных IFN-ДК у больных ЗОГМ.

## Благодарности

Авторы выражают признательность Фрейдлину И.С. за обсуждение возможности использования IFN $\alpha$  для генерации дендритных клеток и Региональному общественному фонду содействия отечественной медицине за поддержку в проведении исследований.

## Список литературы

1. Лозовой В.П., Кожевников В.С. Методы оценки клеточных эффекторных функций гиперчувствительности замедленного типа // Методические рекомендации. – Москва, 1990. – С.1-10.
2. Останин А.А., Центнер М.И., Хонина Н.А., Леплина О.Ю., Шевела Е.Я., Никонов С.Д., Ступак В.В., Черных Е.Р. Антигенспецифическая иммунотерапия в комплексном лечении больных со злокачественными опухолями головного мозга // Вопр. онкологии.- 2003.- Т. 49, № 2.- С. 170-175.
3. Хонина Н.А., Центнер М.И., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Ступак В.В., Никонов С.Д., Черных Е.Р., Останин А.А. Характеристика и механизмы иммунных нарушений у больных со злокачественными опухолями головного мозга // Вопр. онкологии.- 2002.- Т. 48, № 2.- С. 196-201.
4. Черных Е.Р., Леплина О.Ю., Останин А.А., Никонов С.Д., Ступак В.В., Козлов Ю.П. Способ иммунотерапии злокачественных опухолей головного мозга // Заявка на изобретение № 2004100550/14 (00155) приоритет от 05.01.2004 г.
5. Черных Е.Р., Ступак В.В., Центнер М. И., Хонина Н. А., Леплина О. Ю., Тихонова М.А., Никонов С. Д., Останин А. А. Комбинированная иммунотерапия в лечении злокачественных опухолей



головного мозга // Мед. иммунология.- 2002.- Т. 4, № 4/5.- С.583-592.

6. Adams M., Navaba H., Jasani B., Man S., Fian-der A., Evans A.S., Donniger C., Mason M. D. Den-dritic cell based therapy for cervical cancer – use of DC pulsed with tumour lysate and matured with a novel synthetic clinically non-toxic double stranded RNA analogue poly // *Vaccine*.- 2003. – Vol.21. – P.787-790.
7. Akasaki Y., Kikuchi T., Homma S. Antitumor effect of immunizations with fusions of dendritic and glioma cells in a mouse brain tumor model // *J. Im-munother.*- 2001.-Vol. 24.- P. 106-113.
8. Asavaroengchai W., Kotera Y., Mule J.J. Tumor lysate-pulsed dendritic cells can elicit an effective an-titumor immune response during early lymphoid re-covery // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002.- Vol. 99. – P. 931-936.
9. Baar J. Clinical applications of dendritic cell cancer vaccines // *Oncologist*.- 1999. – Vol. 4. – P. 140-144.
10. Bjork P. Development of dendritic cells and their use in tumor therapy // *Clin. Immunol.*- 1999. – Vol. 92, N. 2. – P. 119-127.
11. Fong L., Engleman E.G. Dendritic cells in can-cer immunotherapy // *Annu. Rev. Immunol.*- 2000.- Vol. 18.- P. 245-273.
12. 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.-Vol.50.-P.337-344.
13. Liau L.M., Black K.L., Prins R.M. Treatment of intracranial gliomas with bone-marrow-derived dendritic cells pulsed with tumor antigens. // *J.Neurosurg.*-1999.-Vol.90.-P.1115-1124.
14. Lipcomb M., Masten B.J. Dendritic cells – im-mune regulators in health and disease // *Physiol. Rev.*- 2002. – Vol.82. – P.97-130.
15. Mcllroy D., Gregoire M. Optimizing dendritic cell-based anticancer immunotherapy – maturation state does have clinical impact // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2003.- Vol. 52. – P. 583-591.
16. Murphy G., Tjoa B., Simmons S., Jarisch J., Bowes V., Ragde H., Elgamal A., Kenny G., Cobb O., Ireton R., Troychak M., Salgaller M., Boynton A. In-fusion of dendritic cells pulsed with HLA-A2-spesif-ic prostate-specific membrane antigen peptides – a phase II prostate cancer vaccine trial involving pa-tients with hormone-refractory metastatic disease // *Prostate*.- 1999. – Vol. 38. – P. 73-78.
17. Orada I., Tahara I., Shurin M., Attanucci J., Giezeman –Smits K., Fellows W., Lotze M., Cham-bers W., Bozik M. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with a tumor-specific peptide el icit ef-fective anti-tumor immunity against intracranial neo-plasms // *J. Neurooncol.*- 1998. – Vol. 38. – P. 233-239.
18. 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 mono-cyte-derived dendritic cells – importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activ-ities // *Blood*.- 2001.- Vol.98. – P. 3022-3029.
19. Pickl W., Majdic O., Kohl P., Stockl J., Reidl E., Scheinecker C., Bello-Fernandez C., Knapp W. Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD 14 peripher-al blood monocytes // *J. Immunol.*- 1996.- Vol. 157. – P. 3850-3859.
20. Piemonti L., Monti P., Allavena P., Leone B.E., Caputo A., Carlo V.D. Glucocorticoids increase the endocytic activity of human dendritic cells // *Int. Im-munol.* – 2002. – Vol. 11.- N. 9. – P. 1519-1526.
21. Santini S., Lapenta C., Logozzi M., Parlato S., Spada M., Di Pucchio T., Bellardelli F. Type I Inter-feron as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cells development and activity in vitro and in HU-PBL-SCID mice // *J. Exp. Med.*- 2000.-Vol. 191. – P. 1777-1788.
22. Schuler-Thurner B., Schultz E., Berger T., Weinlich G., Ebner S., Woel P., Bender A., Feuer-stain B., Fritsch P., Romani N., Schuler G. Rapid in-duction of tumor-specific type I T-helper cells in met-astatic melanoma patients by vaccination with mat-ure, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-de-rived dendritic cells // *J. Exp. Med.*- 2002.- Vol. 195.- P. 1279-1288.
23. Steinman R.M., Dodhupkar M. Active immu-nization against cancer with dendritic cells: the near future // *Int. J. Cancer*.- 2001.- Vol. 94.- P. 459-473.
24. 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 leuka-pheresis products for clinical applications // *J. Im-munol. Meth.* – 1999. – Vol. 223. – P. 1-15.
25. 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 ther-apy // *Cancer J.*- 2001.- Vol. 1/2.- P. 53-61.
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 im-mune responses: results of a clinical phase I/II trial // *Br. J. Cancer*.- 2003.- Vol. 89.- P. 1172-1179.
27. Yamanaka R., Yajima N., Abe T., Tsuchiya N., Homma J., Narita M., Takahashi M., Tanaka R. Den-dritic cell-based glioma immunotherapy // *Int. J. On-col.* - 2003.- Vol. 23.-P. 5-15.
28. Yu J.S., Wheller C.J., Zelter P., Ying H., Fin-ger D., Lee P.K., Yong W.H., Incardona F., Thomp-son 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. – Vol. 61. – P. 842-847.

*поступила в редакцию 10.11.2004*  
*принята к печати 13.12.2004*