

НИИ онкологии  
им. проф. Н.Н. Петрова  
Минздрава РФ,  
Санкт-Петербург

## ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ВАКЦИНЫ

И.А. Балдуева

*Методы противоопухолевой вакцинотерапии (вакцинации) могут быть самыми разнообразными. Разработке перспективных методов в этом направлении способствуют успехи, достигнутые в области молекулярной биологии, гибридная технология, рекомбинантные формы различных биологически активных веществ и многие другие достижения.*

Более 100 лет повышенный интерес вызывает вопрос об эффективности иммунного ответа на опухоль у человека. Клиницисты сталкиваются с большим разнообразием клинического течения злокачественной опухоли. Одной из гипотез, объясняющих этот факт, является представление об определяющей роли иммунной системы в течении злокачественных заболеваний и о ее возможной несостоятельности на отдельных этапах опухолевой прогрессии.

В настоящее время неэффективность иммунного ответа у больных связывают с

- 1) недостаточной иммуногенностью опухолеассоциированных антигенов,
- 2) синтезом опухолевыми клетками иммуносупрессивных веществ,
- 3) экспрессией локальных ингибирующих молекул,
- 4) нарушением регуляторной функции лимфоцитов,
- 5) повреждением механизма представления опухолевого антигена,
- 6) недостаточным контактом с поверхностными антигенами опухоли.

В результате исследований последнего десятилетия в области противоопухолевого иммунитета появилось большое число работ, которые наметили пути изменения или восстановления иммунного ответа на опухоль. Одним из таких направлений является противоопухолевая вакцинотерапия (вакцинация) [27, 33, 38, 47, 48].

Вакцинация – это способ создания активного специфического иммунитета в иммунокомпетентном организме с помощью вакцины, содержащей иммуногенный антиген. Иммуногенные антигены – генетически чужеродные вещества, способные стимулировать образование эффекторных клеток, синтез цитокинов и продукцию антител. Иммуногенностью обладают белки, полисахариды, полипептиды, нуклеиновые кислоты. В онкологии термин «иммуногенность» используется для характеристики опухолеассоциированных антигенов, участвующих в формировании противоопухолевого иммунитета.

### Опухолеассоциированные антигены

Опухолеассоциированные антигены – компоненты опухолевых клеток, измененные (по структуре или экспрессии) относительно нормальных клеток организма.

Антигенный состав опухолевых клеток долгое время оставался предметом дискуссий. Неясен был вопрос, распознаются ли опухолевые клетки иммунной системой человека как генетически чужеродные? Обнаружение у онкологических больных: 1) антител, реагирующих с клетками их собственных опухолей, 2) опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, которые лизируют HLA-идентичные опухолевые клеточные линии, легло в основу иммунологических исследований опухолевой трансформации, роста опухолей, формирования противоопухолевого иммунитета [10, 25, 30].

В процессе изучения опухолеассоциированных антигенов открылись многообещающие перспективы разработки иммунологических подходов для лечения онкологических заболеваний [8, 34, 53]. Было показано, что эти антигены, помимо экспрессии на клеточной поверхности, в большом количестве присутствуют в цитоплазме или только в цитоплазме. Многие из них обнаруживаются в культуральной жидкости при длительном культивировании опухолевых клеток.

Особо следует отметить быстрые успехи в описании репертуара опухолеассоциированных антигенов меланом для субпопуляций клеток, представляющих

отдельные этапы дифференцировки, развития или злокачественной трансформации. Показано, что на экспрессию некоторых из этих антигенов в клетках меланом влияет экспрессия клеточных онкогенов, которые могут играть роль в этиологии или прогрессировании опухолей. Кроме того, уровень экспрессии некоторых опухолеассоциированных антигенов модулируется  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -интерферонами.

В настоящее время идентифицированы десятки опухолеассоциированных антигенов и список их постоянно увеличивается. Основываясь на образцах, экспрессирующих родственные белки, выделяют 6 групп антигенов, связанных с опухолевыми клетками [46]:

1) **опухолевые антигены** – антигены, которые специфичны для определённых тканевых ростков, например меланоцитные антигены MART-1/Melan-A (MART-1), gp100, gp75, mda-7, тирозиназа и связанные с этим ферментом белки, простатический мембранный антиген и простатический антиген. Эти антигены экспрессируются как в опухолевых, так и в нормальных клетках того же ростка;

2) **мутированные антигены** – эпитопы антигенов, кодирующиеся вследствие опухолеспецифических мутаций в онкогенах или супрессорных генах, или появляющиеся вследствие увеличения экспрессии того или иного генетического элемента (мутации в гене *ras*, перестройки в гене *bcr/abl*, суперэкспрессия гена *Her-2/neu*, мутация в гене *p53* и т.д.);

3) **немутированные антигены** – антигены, которые экспрессируются в опухолевых клетках различного гистогенеза – MAGE, BAGE, RAGE и NY-ESO;

4) **антигены, связанные с клональной перестройкой генов иммуноглобулинов** и ассоциированные с индивидуальным иммунологическим портретом миелом и В-клеточных лимфом;

5) **антигены вирусного происхождения**, например онкобелки Е6 и Е7 папилломавирусов;

6) **немутированные эмбриональные белки**, экспрессируемые опухолями (альфа-фетопротеин, раково-эмбриональный антиген и т.д.) [45].

### Распознавание опухолеассоциированных антигенов регуляторными Т-лимфоцитами

Т-клеточные реакции направлены главным образом на чужеродные антигены, связанные с клетками, даже в присутствии растворимых чужеродных антигенов в сыворотке. Это определяется необходимостью одновременного распознавания «чужеродного» антигена и «своих» молекул МНС (от англ. Major Histocompatibility Complex – главный комплекс гистосовместимости).

Цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) эффективно распознают антигены опухолей и вирусов, а также продукты других внутриклеточных паразитов, экспрессируемые на поверхности продуцирующих их клеток. Способность ЦТЛ распознавать «свои» молекулы МНС класса I, присутствующие почти на всех аутологических клетках

организма, позволяет Т-лимфоцитам реагировать на экспрессию чужеродных антигенов на этих клетках. Благодаря способности ЦТЛ узнавать и лизировать трансформированные или инфицированные аутологичные клетки, распространение потенциально опасных факторов предотвращается путем уничтожения их источника. Таким образом, уникальная защитная роль ЦТЛ в элиминации чужеродных антигенов – это их особенная способность распознавания, благодаря которой ЦТЛ не реагируют на инактивацию растворимых антигенов, но распознают генетически измененные клетки собственного организма [40, 43].

Направленность Т-клеточного распознавания исключительно на антигены, связанные с клетками, способствует также эффективным взаимодействиям хелперных Т-лимфоцитов с антигенпредставляющими клетками (АПК). Для индукции оптимального иммунного ответа хелперные Т-клетки, рестриктированные по «своим» антигенам МНС класса II, взаимодействуют с «профессиональными» АПК – дендритными клетками (ДК), макрофагами и антиген-специфичными В-лимфоцитами. В то же время, частота хелперных Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов, а также ДК или макрофагов, специфичных к тому или иному чужеродному антигену, в норме невелика и для их кооперации (одновременного распознавания) необходимы специальные условия, способствующие соединению этих редко встречающихся клеток. Например, распознавание Т-хелперами опухолеассоциированных антигенов в комплексе со «своими» молекулами МНС класса II на поверхности активированных аутологичных ДК «направляет» функцию Т-хелперов на участвующие в реакции ДК. Эффективное взаимодействие ДК и Т-клеток поэтому прямо зависит от условий распознавания Т-хелперами «своих» молекул МНС класса II [21, 22, 63].

**«Профессиональная» антигенпредставляющая клетка (АПК)** – специализированная клетка, обладающая способностью захватывать (фагоцитоз, эндоцитоз, пиноцитоз и т.п.), процессировать и представлять (экспрессировать) чужеродный для организма антиген на клеточной поверхности, а также стимулировать пролиферацию Т-лимфоцитов.

**Процессинг антигена** – совокупность явлений расщепления, фрагментации и комплексирования антигенной детерминанты с МНС/МНС-подобной молекулой. В классическом понимании представляемый антиген – антигенный эпитоп является пептидным биополимером (например, пептидный олигомер), который представляется Т-клеткам.

**Представление** (презентация) антигена – процесс представления антигенного эпитопа для специфического распознавания Т-лимфоцитами. В подавляющем большинстве случаев Т-лимфоцит распознает одновременно представляемый антигенный эпитоп в ассоциации (в комплексе) с МНС-молекулой, что известно как «феномен двойной рестрикции» (зависимость распознавания от двух факторов).

**МНС молекула** – молекула из семейства белков главного комплекса гистосовместимости, обеспечивающих

представление процессированного антигена на поверхности клетки.

Таким образом, для индукции эффективного противоопухолевого иммунного ответа необходимо кооперативное (одновременное) взаимодействие АПК, хелперных Т-лимфоцитов, ЦТЛ при модулирующем влиянии цитокинов.

### **Нарушения распознавания опухолеассоциированных антигенов регуляторными Т-лимфоцитами**

Неадекватность процесса распознавания опухолевых клеток иммунной системой организма с опухолью связывают с их иммунорезистентностью [14, 48]. Чувствительность этих клеток к гуморальным и клеточным иммунологическим факторам зависит от плотности размещения опухолеассоциированных антигенов на клеточной поверхности, которая коррелирует с повреждающим действием антител и клеток-киллеров. Снижение концентрации антигенов на поверхности опухолевых клеток обуславливает иммунорезистентность их к механизмам антигенного распознавания. Клетки с низкой плотностью опухолеассоциированных антигенов можно получить из иммуночувствительной популяции опухолевых клеток. Кроме того, при опухолевой прогрессии может наблюдаться маскировка антигенных детерминант на поверхности клетки. Концентрация антигенов на клеточной поверхности может изменяться в результате соматической гибридизации. Так, случайно возникшая сублиния асцитной опухоли ТАЗ имела в 50–60 раз более низкую по сравнению с исходным штаммом концентрацию изоантигенов на клеточной поверхности.

В нормально функционирующей иммунной системе могут наблюдаться нарушения Т-клеточного распознавания. Известно много примеров ареактивности Т-клеток нормальных животных на определенные антигены при сохранении ответа на большинство других антигенов. Кроме того, идентификация молекул МНС, определяющих реактивность и ареактивность Т-клеток, позволила предположить, что ареактивность Т-клеток связана с неспособностью распознавания определенного антигена в комплексе с определенной аллельной формой молекулы МНС. Это предположение было основано на том, что не отвечающие на данный антиген индивиды могут распознавать другие чужеродные антигены в ассоциации со своими молекулами МНС, а «нераспознаваемый» антиген – в ассоциации с другими продуктами МНС. Двойная специфичность (в отношении антигена и аллеля МНС) реакций имеет два следствия. Во-первых, очень простые антигены, в том числе опухолеассоциированные антигены с немногими потенциально активными эпитопами скорее могут быть неиммуногенными для данной популяции Т-клеток, чем сложные антигены, имеющие множество независимых эпитопов, каждый из которых потенциально может распознаваться Т-клетками. В соответствии с этим наблюдением отдельные пептидные фрагменты сложных антигенов, пред-

ставленные на опухолевой клетке, могут обнаруживать свойства небольших, простых антигенов и не индуцировать иммунный ответ в организме с опухолью, распознающих нефрагментированный опухолевый антиген.

Второй эффект Т-клеточной ареактивности на определенные комбинации опухолеассоциированных антигенов со своими молекулами МНС может быть связан с неспособностью Т-клеточной популяции распознавать этот антиген в комплексе с определенными молекулами МНС на АПК. Чтобы объяснить отсутствие распознавания, были предложены две не исключают одна другую гипотезы: 1) комплекс опухолеассоциированного антигена с молекулой МНС не образуется в иммуногенной форме на поверхности АПК в организме с опухолью; 2) Т-клетки в таком организме недостаточно эффективно распознают функционально «полноценный» комплекс на АПК. Экспериментальная проверка этих гипотез связана с большими трудностями, так как Т-клеточная активация – это единственно известный способ регистрации функционирующих комплексов антигена с молекулами МНС на поверхности АПК, и активация соответствующим комплексом – это единственный способ доказать существование Т-клеток с определенной специфичностью [2, 41, 56].

Таким образом, маскировка антигенов, снижение их концентрации или иммунорезистентности опухолевых клеток представляет собой одну из основных причин нарушения распознавания опухолеассоциированных антигенов регуляторными Т-клетками в организме с опухолью.

### **Восстановление распознавания опухолеассоциированных антигенов регуляторными Т-лимфоцитами с помощью противоопухолевых вакцин**

Основной задачей противоопухолевой вакцинации или активной специфической иммунотерапии является индукция и поддержание иммунного ответа, направленного на распознавание и элиминацию иммунорезистентных опухолевых клеток с помощью противоопухолевых вакцин. Клинические исследования активной специфической иммунотерапии больных с опухолями различных локализаций проводятся в настоящее время во всех онкологических центрах мира. Современные исследования в области создания противоопухолевых вакцин включают два основных направления: 1) совершенствование разных этапов традиционной технологии и 2) разработку нового поколения вакцин на основе достижений молекулярной биологии и теоретической иммунологии.

### **Классификация противоопухолевых вакцин** (В.М. Моисеенко, 2001) [1].

- Вакцины на основе цельных клеток:
  - аутологичные:
    - немодифицированные,
    - модифицированные (трансфекция);
  - аллогенные.

- Аутологичные белки теплового шока.
- Ганглиозиды.
- Синтетические пептиды.
- ДНК.
- Рекомбинантные вирусы.
- Вакцины на основе дендритных клеток.

В настоящее время в большинстве случаев применяют вакцины на основе аутологичных и аллогенных немодифицированных и модифицированных опухолевых клеток, синтетические поливалентные вакцины, вакцины на основе ДК, часто с различными адьювантами.

#### Вакцины на основе цельных опухолевых клеток

Аутологичные или аллогенные опухолевые клетки облучают или лизируют с целью инактивации и оптимизации опухолеассоциированных антигенов и вводят вместе с иммунологическим адьювантом(ами) для привлечения АПК хозяина [9, 32, 42, 62]. Традиционным адьювантом, который положительно зарекомендовал себя в такого рода исследованиях, являются живые аттенуированные микобактерии Кальметта–Жерена (вакцина БЦЖ), а также *S. parvum*, липополисахарид грамотрицательных бактерий, полный адьювант Фрейнда и др. Воздействуя главным образом на макрофаги, клетки Лангерганса и дермальные дендритные клетки, они способствуют:

- их активации, эффективному распознаванию, процессингу и представлению опухолеассоциированных антигенов на клеточной поверхности,
- продукции большого количества цитокинов, необходимых для активации и пролиферации хелперных и цитотоксических Т-лимфоцитов и усилении ими цитотоксического потенциала,
- лучшей кооперации клеток в иммунном ответе.

К такому же результату приводит ксеногенизация *ex vivo* опухолевых антигенов с помощью введения генетически чужеродного материала в цельные опухолевые клетки или лизаты. С этой целью чаще всего используются аденовирусы, тропные к тканям человека, а также введение в процессе вакцинации лимфокинов или их индукторов, что повышает иммунный ответ.

Аллогенные вакцины обычно готовят из смеси опухолевых клеточных линий с известным на сегодняшний день набором опухолеассоциированных антигенов, которые хранятся в банке клеточных культур. Приготовлению аутологичных вакцин предшествует хирургическое вмешательство и наращивание числа опухолевых клеток с индивидуальным спектром опухолеассоциированных антигенов. Исследования показали, что вакцины на основе опухолевых клеток с адьювантом могут усилить иммунный ответ больного на опухоль, в то же время эти вакцины обладают ограниченной способностью стимулировать специфический иммунитет у больных в развернутой стадии заболевания, часто после безуспешного применения более традиционных способов лечения. Усовершенствование условий получения кле-

точных культур аутологичных опухолевых клеток, изучение экспрессии на клеточной поверхности опухолеассоциированных антигенов и молекул МНС, а также их модификация, в том числе под влиянием различных современных иммуноадьювантов, является чрезвычайно важным для дальнейшего развития активной специфической иммунотерапии [7, 16, 49].

#### Геномодифицированные вакцины

В аутологичные или аллогенные опухолевые клетки вводят гены (последовательности экзогенной ДНК), которые вызывают экспрессию или синтез молекул цитокинов, или синтез других белков, активирующих иммунный ответ или обладающих токсическим действием в отношении клеток опухоли [37, 52, 55]. В последнем случае может наблюдаться резкое снижение числа митозов, возрастание числа апоптических клеток и, как следствие, – активация ДК, специфических ЦТЛ, разрушение модифицированных клеток и регресс неизмененных опухолевых клеток. Показано, что экспрессия ИЛ- 2, ИФН- $\gamma$  или костимулирующей молекулы В7.1 на опухолевых клетках вызывает активацию ЦТЛ без участия «профессиональных» АПК и Т-хелперов хозяина. Однако доклинические исследования показали, что наибольшей противоопухолевой эффективностью обладают вакцины на основе аутологичных опухолевых клеток, модифицированных колониестимулирующим фактором ГМ-КСФ (рис.1). На модели костномозговых химер G. Dranoff и соавт. (1993) показали, что такие вакцины активно привлекают АПК, стимулируют захват и экспрессию опухолевых антигенов, а также способствуют формированию устойчивого противоопухолевого иммунного ответа. На этом основании в последующем стали разрабатывать геномодифицированные вакцины, экспрессирующие или синтезирующие другие иммунореактивные молеку-

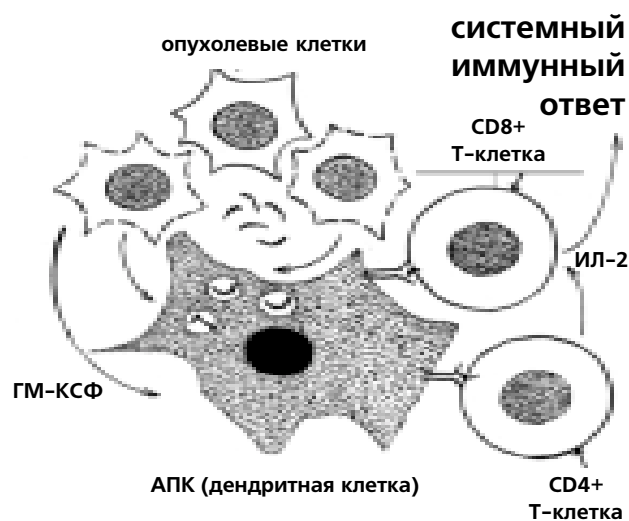


Рис. 1. Секретия вакцинными геномодифицированными опухолевыми клетками гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) приводит к активации АПК, захвату и представлению опухолеассоциированных антигенов Т-лимфоцитам в месте введения вакцины.

лы, но обладающие схожим механизмом стимуляции иммунной системы.

В течение последних лет проводятся клинические исследования I–II–III фазы модифицированными аутологичными противоопухолевыми вакцинами, в том числе в комбинации с иммунологическими адьювантами или другими модификаторами иммунного ответа. Основным недостатком этого метода является трудоемкость, высокотехнологичность и длительность процесса приготовления вакцины. Поэтому аутологичные геномодифицированные вакцины в ряде случаев стали заменять вакцинами на основе аллогенных опухолевых или неопухолевых клеток (обычно фибробласты). Это оказалось возможным, так как аллогенные опухолевые клетки, геномодифицированные *ex vivo*, привлекают и активируют АПК *in vivo*. В результате наблюдается стимуляция ЦТЛ против опухолеассоциированных антигенов в организме с опухолью. Такой подход значительно снижает время приготовления вакцины и может устранять проблему, связанную с продукцией некоторыми опухолевыми клетками иммуносупрессивных веществ.

Проводятся клинические исследования противоопухолевых векторных вакцин [31]. Предполагается, что эффективный иммунный ответ можно получить, используя вектор экспрессии, кодирующий вирусные иммуногены так, что синтезируемые белки образуют вирусную частицу путем самосборки. Очевидно, что такие вирусы не будут содержать инфекционной нуклеиновой кислоты. Уже получены и используются на экспериментальных моделях дефектные вирусы ВИЧ.

В перспективе предполагается использовать векторы, в которые встроены гены, контролирующие синтез протективных антигенов, и гены, кодирующие различные медиаторы иммунного ответа [44, 54]. Получены рекомбинантные штаммы БЦЖ, которые секретируют  $\gamma$ -интерферон, интерлейкины, колониестимулирующий фактор ГМ-КСФ. Предварительные исследования свидетельствуют о высокой эффективности этих вакцин в отношении рака мочевого пузыря. Получать эффективную векторную вакцину на основе бактерий достаточно трудно из-за нестабильности трансфекции генного материала, токсичности чужеродного антигена для бактерий, малого количества экспрессированного антигена. Частично эти проблемы можно решать с помощью вакцин на основе белков теплового шока, ганглиозидов, синтетических пептидов и «высокопрофессиональных» ДК, в том числе геномодифицированных [41, 44].

Вакцины на основе белков теплового шока, ганглиозидов, пептидов

В последние годы большое внимание, с точки зрения возможности генерирования противоопухолевого иммунного ответа, уделяется **белкам теплового шока** (heat-shock proteins) [6, 57, 58]. Эти белки являются устойчивыми внутриклеточными молекулами, которые, как установлено, содержат потенциально иммуногенные пептиды. Известно, что белки теплового шока специфиче-

чески связываются с поверхностными структурами АПК, подвергаются эндоцитозу и представлению иммуногенного пептида в ассоциации с МНС-молекулами класса I цитотоксическим Т-клеткам [11].

В ряде клинических исследований изучается подобный подход, в том числе при меланоме. При этом из удаленной опухоли выделяют белки теплового шока (например, HSP96) и вводят внутривожно. Как показали результаты, этот метод безопасен и способен индуцировать противоопухолевый иммунный ответ. В настоящее время предпринимаются попытки комбинированной вакцинации на основе рекомбинантного белка теплового шока (HSP70) совместно с тиразиной gp100.

Другим вариантом вакцин, которые также содержат потенциально иммуногенные пептиды, являются **ганглиозидные вакцины**. Ганглиозиды – гликолипидные антигены, экспрессируемые на поверхности опухолевых клеток и вызывающие образование антител. Показано, что на поверхности меланомных клеток наиболее интенсивно экспрессируются ганглиозиды, содержащие как нейтральные сахара, так и сиаловые кислоты. Известно несколько ганглиозидов: GM3, GD3 (основной меланомный ганглиозид), GD2, GM2 и O-ацетил GD3 [60].

GM2 является наиболее иммуногенным меланомным ганглиозидом и по этой причине является объектом большинства клинических исследований. Уже первые работы показали тесную связь между наличием в сыворотке больных антител против GM2 и увеличением безрецидивной и общей выживаемости. Образование GM2 IgM было обнаружено у 85% леченых больных. В последующем была разработана новая форма вакцины на основе GM2, связанная с адьювантом (ГМК). Эта форма вакцины сопровождается образованием антител у 100% больных [17].

Эффективность ГМК-вакцины оценивалась у больных меланомой в мультицентровых рандомизированных исследованиях по сравнению с интерфероном- $\alpha$ . Первые 16 мес наблюдения за больными не показали увеличения показателей безрецидивной и общей выживаемости больных.

Одной из причин отсутствия значимого лечебного эффекта, вероятно, является то, что ганглиозид GM2 экспрессируется на поверхности всех меланомных клеток, но степень его экспрессии незначительна по сравнению с другими ганглиозидами. Менее 20% клеточных линий меланомы могут быть лизированы моноклональными антителами к GM2 и комплементу. Поэтому для получения клинически значимого результата необходимо индуцирование образования антител против других ганглиозидов. В этой связи очевидна целесообразность использования поливалентных вакцин на основе нескольких ганглиозидов.

Еще одним вариантом вакцин, которые также активно разрабатываются и исследуются, являются **пептидные вакцины**. Современные биотехнологические методы позволяют получать синтетические опухолеассоциированные антигенные пептиды в необходимых ко-

личества. Имеются убедительные экспериментальные доказательства того, что пептиды, представляемые иммунной системе в течение нескольких дней, являются высокоиммуногенными. По этой причине проводятся исследования интранодального введения пептидов, в том числе с костимулирующими факторами, адъювантами.

Одним из первых было проведено исследование MAGE-3, являющегося пептидом, рестриктированным HLA-A1 гаплотипу [29]. Лечебный эффект был зарегистрирован у 6 из 19 больных. Это исследование убедительно показало, что синтетические пептиды являются безопасным и перспективным методом вакцинотерапии. Цитотоксичность Т-лимфоцитов против клеток меланомы обратно коррелирует с экспрессией антигена в тканях меланомы. У больных с прогрессированием на фоне вакцинотерапии наблюдались варианты с потерей антигена, что позволяет предположить возможность иммуноселекции опухолевых клонов на фоне вакцинации [18].

Ряд исследований было выполнено в Национальном институте рака (США) по изучению пептидов, полученных из меланомного дифференцировочного антигена gp100. Первоначально лечение проводилось HLA-A2+ пациентам с помощью нативного пептида, но в последующем другая группа больных получала лечение белком, в котором изменена одна аминокислота. Этот пептид имеет аффинность к HLA-A2\*201 выше, чем нативный, что послужило основанием предполагать возможно большую индукцию ответа Т-лимфоцитов [35]. После введения ИЛ- 2 в периферической крови эти Т-лимфоциты не обнаруживались, но лечебный эффект наблюдался, что позволило предположить их миграцию в места локализации антигенов.

Были проведены клинические исследования, в которых предпринимались попытки вакцинировать больных меланомой с помощью немутированных антигенов

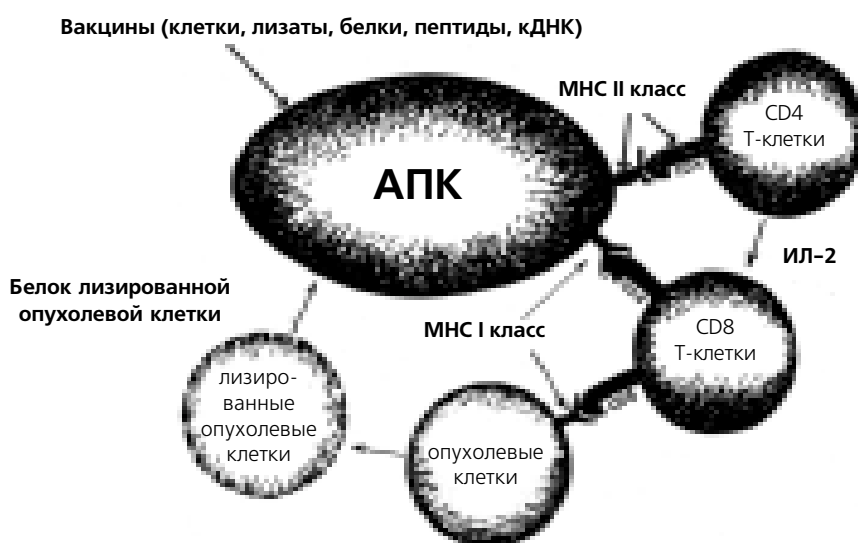
(MAGE, BAGE, RAGE), в том числе в комбинации с иммунологическими адъювантами.

Вакцины на основе синтетических пептидов считаются одним из перспективных методов иммунотерапии и активно изучаются в клинике [36].

#### Вакцины на основе дендритных клеток

Как стало ясно в последнее время, ДК играют важную роль в процессе опухолевой прогрессии [3, 4]. Установлено, что по причине отсутствия ДК в опухоли или слабой экспрессии молекул МНС класса I и II, а также CD80 и CD86 костимулирующих молекул на ДК, инфильтрирующих опухоль, не создается устойчивый антиген-специфический Т-клеточный ответ. По мнению ряда авторов [30], это может быть следствием продукции злокачественной опухолью факторов (ИЛ- 10, ТФР-бета, фактор роста эндотелия и др.), угнетающих дифференцировку, созревание и функциональную активность периферических ДК. При культивировании таких ДК в условиях *in vitro*, позволяющих получить их максимальный рост и активацию, наблюдается увеличение экспрессии поверхностных молекул, но их уровень оказывается недостаточным для усиления ответа специфических ЦТЛ.

Наибольшей способностью к представлению специфического опухолевого антигена Т-лимфоцитам у экспериментальных животных с опухолью или у пациентов оказались аутологичные костномозговые предшественники ДК, выращенные в соответствующих условиях *in vitro*, а также сингенные или аллогенные ДК из периферической крови здоровых индивидуумов, активированные опухолеассоциированными антигенами [5, 15, 50]. Для этого функционально активные ДК инкубируют с антигенами, специфичными для опухоли (пептиды, белки, кДНК или мРНК, кодирующие антиген), с целью получения эффекта представления пептидных фрагмен-



**Рис. 2. Этапы активации Т-лимфоцитов.**

1) вакцинные АПК представляют опухолеассоциированные антигены Т-лимфоцитам *in vivo* и активируют их; активированные антигенспецифические Т-лимфоциты лизируют опухолевые клетки; 2) АПК хозяина распознают лизированные опухолевые клетки и поддерживают цитотоксическую активность Т-лимфоцитов.

тов опухолеассоциированных антигенов в ассоциации с молекулами МНС на поверхностной мембране ДК (рис.2). В последующем ДК, нагруженные антигеном, вводят больному. Противоопухолевый эффект достигается повторными процедурами «обработки» и введением ДК в режиме вакцинотерапии.

Формирование эффективного противоопухолевого иммунного ответа на вакцинотерапию, как правило, требует от нескольких недель до нескольких месяцев. Поэтому клинический эффект активной специфической иммунотерапии часто является отсроченным. Понятно, что этот метод должен быть эффективным при применении с адьювантной целью в случае так называемой резидуальной опухолевой болезни. При большой опухолевой массе эффективность вакцинотерапии *a priori* значительно ниже, так как в этих случаях часто наблюдается недостаточное проникновение в опухоль клеток-эффекторов, генерированных в результате вакцинации.

Вакцинотерапия может быть неэффективной у пациентов с быстрым опухолевым ростом, так как при прогрессировании злокачественные опухоли генетически нестабильны (следствие мутаций) и это может способствовать «ускользанию» новых опухолевых клонов от распознавания иммунной системой хозяина. Применение современных методов иммунотерапии у больных с диссеминированными опухолями, устойчивыми к традиционным методам лечения, помогает более полно понять эффективность иммунологического ответа, а также определить место иммунотерапии в комплексном лечении онкологических больных.

При разработке методов вакцинотерапии большое значение имеют лабораторные тесты, результаты которых могут прогнозировать клиническое течение заболевания [13, 20]. К ним относятся: определение внутрицитоплазматического  $\gamma$ -интерферона, пептид-НЛА-тетрамеров, ELISPOT-тест (enzyme-linked immunospot), полимеразная цепная реакция с использованием обратной транскриптазы. Эти тесты позволяют определить количество антигенспецифических Т-клеток в периферической крови и способность Т-клеток повреждать клетка-мишени, экспрессирующие чужеродный антиген.

Большие споры вызывает вопрос о выборе материала для лабораторного исследования при оценке эффекта вакцинотерапии: периферическая кровь, опухолевая ткань или дренированные лимфатические узлы. Определение содержания антигенспецифических эффекторных клеток в циркулирующей крови отмечено как наиболее значимое. Вместе с тем важным остается изучение связи лабораторных показателей и отсроченного регресса опухоли. С практической точки зрения, наибольшее значение имеют клинические методы оценки лечебного эффекта (полный, частичный регресс, стабилизация процесса – их продолжительность).

В настоящее время рассматриваются различные типы миелоидных ДК, которые могут быть пригодными для клинического использования: 1) выделенные из периферической крови, 2) выращенные *ex vivo* из их костно-

мозговых предшественников (CD34<sup>+</sup>-гемопоэтические стволовые клетки), 3) полученные из моноцитов периферической крови. Тип ДК – это определенная стадия созревания гемопоэтической клетки за пределами костного мозга, в которой важная роль отводится типу антигенной стимуляции. Встреча с иммуогенным антигеном способствует их созреванию или активации и может изменить функцию (например, миграцию, стимуляцию Т-клеток, продукцию цитокинов и др.) [28, 59, 61].

Одновременно оцениваются различные методы доставки антигена для ДК *ex vivo*. Для активации ДК используют специфические пептиды, но их применение ограничено в связи с зависимостью от HLA-типа пациента. При некоторых опухолях опухолеассоциированные антигены остаются неизвестными, поэтому используется лизат цельных опухолевых клеток, пептиды, элюированные с поверхности аутологичных опухолевых клеток, гибриды «ДК-опухолевая клетка» [12, 24]. РНК и ДНК опухолевой клетки также могут быть трансфицированы в ДК с целью синтеза антигенного опухолевого белка и/или представления на своей поверхности иммуогенных пептидов. Противоопухолевым эффектом обладают также экзосомы, которые представляют собой «антиген-представляющие пузырьки», полученные из опухолевых клеток или ДК [64].

В последнее время установлено, что выбор типа ДК для клинического применения зависит от типа антигена. ДК процессируют антиген, который может быть доставлен как пептид, белок или генетическая вакцина. Незрелые ДК, которые активно используют эндоцитоз и эффективно захватывают экзосомы, могут быть наиболее подходящими для доставки иммуогенного белка или антигенных комплексов. В противоположность этому, зрелые ДК с высокой экспрессией HLA молекул могут быть наиболее подходящими для использования пептидов. Короткие пептиды (от 8 до 10 аминокислотных остатков) могут напрямую связываться с HLA (МНС) молекулами на поверхности ДК и не нуждаются в захвате антигена и его процессинге. В клинических исследованиях оцениваются молекулярно-биологические методы, которые способствуют увеличению функциональной активности ДК. Генные манипуляции с ДК *ex vivo* способствуют экспрессии на их поверхности иммуностимулирующих молекул, которые могут усилить ДК-Т-клеточные взаимодействия и, как следствие, – противоопухолевый иммунный ответ.

Производится также поиск оптимальной дозы ДК, разрабатывается график вакцинаций, оцениваются пути введения ДК-вакцины. Установлено, что ДК должны обладать следующими свойствами: 1) после культивирования *ex vivo* быть жизнеспособными *in vivo* в течение продолжительного времени, так как они могут достаточно долго не встретить уникальные (редко встречающиеся) антигенспецифические Т-клетки в лимфатических узлах; 2) эффективно мигрировать к лимфатическим узлам; 3) содействовать эффекторной функции Т-клеток *in vivo*. Кроме того, выживаемость эффекторных Т-кле-

ток *in vivo*, генерированных с помощью вакцинации, нуждается в продолжительной поддерживающей стимуляции, обеспечивая тем самым оптимальную и устойчивую ориентацию на опухоль [19, 23].

Важным является клинически оценить подкожное, внутривоковое, внутриопухолевое, внутривенное и внутрилимфатическое введение ДК-вакцины. Введение вакцины в периферические лимфатические узлы обеспечивает доставку в лимфоидную ткань и длительное поддержание там стимулирующей способности Т-клеток. При внутривенном введении ДК оседают в легких, печени, селезенке и костном мозге, но они не обнаруживаются в лимфатических узлах или опухолевых образованиях. В противоположность этому, исследования с использованием внутрикожного введения ДК, полученные из моноцитов, показали миграцию ДК в лимфатические узлы. В этих исследованиях использовались незрелые ДК и их количество было незначительным. Это свидетельствует о том, что незрелые ДК являются оптимальной популяцией для достижения вакциной периферической лимфоидной ткани. Вместе с тем, Schuler-Thurner и коллеги (2000) использовали зрелые ДК, полученные из моноцитов *ex vivo*, которые эффективно стимулировали противоопухолевый иммунный ответ. Без прямого сравнения эти данные можно объяс-

нить эффективной миграцией и представлением опухолеассоциированных антигенов Т-лимфоцитам активированными *ex vivo* ДК.

Перспективным является применение ДК-вакцин с рекомбинантными гемопоэтическими, провоспалительными или Т-клеточными цитокинами (Flt-3 лиганд, GM-CSF, CD40 лиганд, интерлейкин- 2, - 12, интерферон- $\gamma$ , - $\alpha$  и др.). Эти цитокины могут быть использованы как адъюванты при проведении ДК-вакцинотерапии [26, 39, 51].

Таким образом, представленный обзор литературных данных показывает, что методы противоопухолевой вакцинотерапии (вакцинации) могут быть самыми разнообразными. Разработке перспективных методов в этом направлении способствуют успехи, достигнутые в области молекулярной биологии, гибридная технология, рекомбинантные формы различных биологически активных веществ и многие другие достижения.

Решение вопроса об эффективности противоопухолевых вакцин, применяемых с лечебной и адъювантной целью, будет основано на получении объективных данных об увеличении продолжительности жизни онкологических больных, отсутствии риска развития поствакцинальных осложнений и соотношении стоимость/эффективность.

## Литература

1. Моисеенко В.М. Возможности вакцинотерапии меланомы кожи // *Практ. онкол.* – 2001. – № 4(8). – С. 58-64.
2. Andreola G, Rivoltini L, Castelli C. et al. Induction of lymphocytes apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles // *J. Exp. Med.* – 2002. – Vol. 195. – P. 1303-1316.
3. Banchemreau J, Briere F, Caux C. et al. Immunobiology of dendritic cells // *Ann. Rev. Immunol.* – 2000. – Vol. 18. – P. 767-811.
4. Banchemreau J, Steinman R.M. Dendritic cells and control of immunity // *Nature.* – 1998. – Vol. 392. – P. 121-135.
5. Banchemreau J, Palucka A.K., Dhodapkar M. et al. Immune and clinical response in patients with metastatic melanoma to CD34+ progenitor-derived dendritic cell vaccine // *Cancer Res.* – 2001. – Vol. 61. – P. 6451-6458.
6. Belli F, Testori A, Rivoltini L. et al. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous tumor-derived heat shock protein peptide-complex-96 (Oncophage): clinical and immunological findings // *J. Clin. Oncol.* – 2002. – Vol. 20. – P. 4169-4180.
7. Bendandi M. Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-monocyte colony-stimulating factor against lymphoma // *Nat. Med.* – 1999. – Vol. 5. – P. 1171-1177.
8. Benlalam H., Labarriere N., Liénard B. et al. Comprehensive analysis of CD8 melanoma infiltrating lymphocytes (TIL): implications for immunotherapy // *Europ. J. Immunol.* – 2001. – Vol. 31. – P. 2007-2015.
9. Berzofsky J.A., Ahlers J.D., Belyakov I.M. Strategies for designing and optimizing new generation vaccines // *Nat. Rev. Immunol.* – 2001. – Vol. 1. – P. 209-219.
10. Boon T., Cerottini J. C., van der Eynde B. and Van Pel. A. Tumor antigens recognized by T lymphocyte // *Ann. Rev. Immunol.* – 1994. – Vol. 12. – P. 337-365.
11. Castelli C., Ciupitu A.M., Rini F. et al. Human HPS70 peptide complexes specifically activate anti-melanoma T cells // *Cancer Res.* – 2001. – Vol. 61. – P. 222-227.
12. Chag A.E., Redman B.G., Whitfield J.R. et al. A phase I trial of tumor lysate-pulsed dendritic cells in the treatment of advanced cancer // *Clin. Cancer Res.* – 2002. – Vol. 8. – P. 1021-1032.
13. Clay T.M., Hobeika A.C., Mosca P.J. Assays for monitoring cellular immune responses to active immunotherapy of cancer // *Clin. Cancer Res.* – 2001. – Vol. 7. – P. 1127-1135.
14. Farris A.D., Keech C.L., Gordon T.P. et al. Epitope mimics and determinant spreading: Pathways to autoimmunity // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2000. – Vol. 57. – P. 569-578.
15. Fong L., Hou Y., Rivas A. et al. Dendritic cell-based xenoantigen vaccination for prostate cancer immunotherapy // *J. Immunol.* – 2001. – Vol. 167. – P. 7150-7156.
16. Gjersten M.K., Buanes T., Rosseland A.R. et al. Intradermal ras peptide vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjuvant: clinical and immunological responses in patients with pancreatic adenocarcinoma // *Int. J. Cancer.* – 2001. – Vol. 92. – P. 441-450.



17. Helling F, Zhang S, Shang A. *et al.* GM2-KLH conjugate vaccine: increased immunogenicity in melanoma patients after administration with immunological adjuvant QS-21 // *Cancer Res.* – 1995. – Vol. 55. – P. 2783-2788.
18. Jager E, Ringhoffer M, Altmannsberger M. *et al.* Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma // *Int. J. Cancer.* – 1997. – Vol. 72(2). – P. 142.
19. Jonuleit H, Giesecke-Tuettenberg A. *et al.* A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection // *Int. J. Cancer.* – 2001. – Vol. 93. – P. 243-251.
20. Keilholz U, Weber J, Finke J.H. *et al.* Immunologic monitoring of cancer vaccine therapy: Results of a workshop sponsored by the Society for Biological Therapy // *J. Immunother.* – 2002. – Vol. 25. – P. 97-138.
21. Klein J, Sato A. The HLA system: First of two parts // *N. Engl. J. Med.* – 2000. – Vol. 343. – P. 702-709.
22. Klein J, Sato A. The HLA system: Second of two parts // *N. Engl. J. Med.* – 2000. – Vol. 343. – P. 782-786.
23. Ku C.C., Murakami M., Sakamoto A. *et al.* Control of homeostasis of CD8- memory T cells by opposing cytokines // *Science.* – 2000. – Vol. 288. – P. 675-678.
24. Kugler A, Stubler G, Walden P. *et al.* Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids // *Nat. Med.* – 2000. – Vol. 6. – P. 332-336.
25. Lan M.S., Metzgar R.S., Gendler S. *et al.* Human tumor-associated antigens: characterization and isolation // *Human tumor antigens and specific tumor therapy* /Ed. by R.S. Metzgar and M.S. Mitchell. – 1988. – P. 1-93.
26. Lee P., Wang F., Kuniyasbi J. *et al.* Effects of interleukin-12 on the immune response to multi-peptide vaccine for resected metastatic melanoma // *J. Clin. Oncol.* – 2001. – Vol. 19. – P. 3836-3847.
27. Lotze M., Dallal R.M., Kirwood J.M., Flickinger J.C. *et al.* Cutaneous melanoma // *Cancer: Principles & Practice of oncology* / Eds. V.DeVita, S.Hellman, S.Rosenberg, 6<sup>th</sup> Ed. - Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. – P. 2012-2069.
28. Mackensen A., Herbst B., Chen J.L. *et al.* Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34+ hematopoietic progenitor cells // *Int. J. Cancer.* – 2000. – Vol. 86. – P. 385-392.
29. Marchand M., Weynants P., Rankin E. *et al.* Tumor regression responses in melanoma patients treated with a peptide encoded by gene MAGE-3 // *Int. J. Cancer.* – 1995. – Vol. 63. – P. 883.
30. Marincola F.M., Jaffee E.M., Hicklin D.J. *et al.* Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance // *Adv. Immunol.* – 2000. – Vol. 74. – P. 181-273.
31. Mincheff M., Tchakarov S., Zoubak S. *et al.* Naked DNA and adenoviral immunizations for immunotherapy of prostate cancer: A phase I/II clinical trial // *Europ. Urol.* – 2000. – Vol. 38. – P. 208-217.
32. Mitchell M.S. Perspective on allogeneic melanoma lysates in active specific immunotherapy // *Semin. Oncol.* – 1998. – Vol. 25. – P. 623-635.
33. Pardoll D.M. Cancer vaccines // *Nat. Med.* – 1998. – Vol. 4. – P. 525-531.
34. Pardoll D.M. Spinning molecular immunology into successful immunotherapy // *Nat. Rev. Immunol.* – 2002. – Vol. 2. – P. 227-238.
35. Parkhurst M.R., Salgaller M.L., Southwood S. *et al.* Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A\*0201-binding residues // *J. Immunol.* – 1996. – Vol. 157. – P. 25-39.
36. Parmiani G., Castelli C., Dalerba P. *et al.* Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: what have we achieved? Where are we going? // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2002. – Vol. 94. – P. 805-818.
37. Parmiani G., Rodolfo M., Melani C. Immunological gene therapy with ex vivo gene-modified tumor cells: a critique and reappraisal // *Hum. Gene Ther.* – 2000. – Vol. 11. – P. 1269-1275.
38. Parmiani G., Pilla L., Castelli C. *and Rivoltini L.* Vaccination of patients with solid tumours // *Ann. Oncol.* – 2003. – Vol. 14. – P. 817-824.
39. Peterson A.C., Harlin H., Gajewski K. Immunization with Melan-A peptide-pulsed peripheral blood mononuclear cells plus recombinant human interleukin-12 induces clinical activity and T-cell responses in advanced melanoma // *J. Clin. Oncol.* – 2003. – Vol. 21. – P. 2342-2348.
40. Rabbins P.F. *and Kawakami Y.* Human tumor antigens recognized by T cells // *Curr. Opin. Immunol.* – 1993. – Vol. 8. – P. 626-636.
41. Rafiq K., Bergtold A., Clynes R. Immune complex-mediated antigen presentation induces tumor immunity // *J. Clin. Invest.* – 2002. – Vol. 110. – P. 71-79.
42. Ramsbaw I.A., Ramsey A.J. The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination // *Trends Immunol. Today.* – 2000. – Vol. 21. – P. 163-165.
43. Renkvist N., Castelli C., Robbins P.F. *et al.* A listing of human tumor antigens recognized by T lymphocytes // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2001. – Vol. 50. – P. 3-15.
44. Ribas A., Butterfield L.H., Economou J.S. Genetic immunotherapy for cancer // *Oncologist.* – 2000. – Vol. 5. – P. 87-98.
45. Ribas A., Butterfield L.H., Glaspy J.A. *et al.* Cancer immunotherapy using gene-modified dendritic cells // *Curr. Gene Ther.* – 2002. – Vol. 110. – P. 57-78.
46. Ribas A., Butterfield L.H., Glaspy J.A., Economou J.S. Current development in cancer vaccines and cellular immunotherapy // *J. Clin. Oncol.* – 2003. – Vol. 21. – P. 2415-2432.

47. Rosenberg S. Principles of cancer management: biologic therapy // *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, 5<sup>th</sup> ed./ Eds. V.DeVita, S.Hellman, S.Rosenberg; Chapter 18. –49–373. –Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997.
48. Rosenberg S.A. Progress in human tumour immunology and immunotherapy // *Nature*. – 2001. – Vol. 411. – P. 380-384.
49. Schad S.G., Klimek V.M., Panageas K.S. et al. T-cell response against tyrosinase 368-376(370D) peptide in HLA\*A0201 melanoma patients: randomized trial comparing the incomplete Freund's adjuvant, granulocyte macrophage colony-stimulating factor, and QS- 21 as immunological adjuvants // *Clin. Cancer Res.* – 2002. – Vol. 8. – P. 967-972.
50. Schadendorf D., Nestle F.O. Autologous dendritic cells for treatment of advanced cancer – an update // *Recent Res. Cancer Res.* – 2001. – Vol.158. – P. 236-248.
51. Scheibenbogen C., Schmittle A., Keilholz U. et al. Phase 2 trial of vaccination with tyrosinase peptides and granulocyte-macrophage colony stimulating factor in patients with metastatic melanoma // *J. Immunother.* – 2000. – Vol. 23. – P. 275- 281.
52. Schirmacher V., Ablert T., Probstle T. et al. Immunization with virus-modified tumor cells // *Semin. Oncol.* – 1998. – Vol. 24. – P. 677-696.
53. Schultze J.L., Vonderbeide R.H. From cancer genomics to cancer immunotherapy: Toward second-generation tumor antigens // *Trends Immunol.* – 2001. – Vol. 22. – P. 516-523.
54. Seder RA, Gurunathan S. DNA vaccines: Designer vaccines for the 21st century // *N. Engl. J. Med.* – 1999. – Vol. 341. – P. 277-278.
55. Seder RA, Gurunathan S. DNA vaccines: immunology, application, and optimization // *Annu. Rev. Immunol.* – 2000. – Vol. 18. – P. 927-974.
56. Sloan-lancaster J., Allen P. M. Altered peptide ligand-induced partial T cell activation: Molecular mechanisms and role in T cell biology // *Annu. Rev. Immunol.* – 1996. – Vol. 14. – P. 1-27.
57. Srivastava P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adoptive immune response // *Ann. Rev. Immunol.* – 2002. – Vol. 20. – P. 395-425.
58. Srivastava P. K. Roles of heat-shock proteins in innate and adoptive immunity // *Nat. Rev. Immunol.* – 2000. – Vol. 2. – P. 185-194.
59. Steinman R.M., Dodhapkar M. Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future // *Int. J. Cancer.* – 2001. – Vol. 94. – P.459-473.
60. Tai T., Caban L.D., Tsuchida T. et al. Immunogenicity of melanoma-associated gangliosides in cancer patients // *Int. J. Cancer.* – 1985. – Vol. 35. – P. 607-612.
61. Thurner B., Haendler I., Roder C. et al. Vaccination with MAGE-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanomas // *J. Exp. Med.* – 1999. – Vol. 190. – P. 1669-1678.
62. Wallack M.K., Sivanandham M., Ditaranto K. et al. Increased survival of patients treated with a vaccinia melanoma oncolysate vaccine // *Ann. Surg.* – 1997. – Vol. 226. – P.198-206.
63. Zinkernagel R.M., Hengartner H. Regulation of the immune response by antigen // *Science.* – 2001. – Vol. 293. – P. 251-253.
64. Zitvogel L., Regnault A., Lozier A. et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: Dendritic cell-derived exosomes // *Nat. Med.* – 1998. – Vol. 4. – P. 594-600.

Поступила в редакцию 05.08.2003 г.