

*С.А. Кулева<sup>1</sup>, А.Е. Друй<sup>2,3</sup>*

## **Иммунология и перспективы иммунотерапии первичных злокачественных опухолей ЦНС: адоптивная клеточная терапия и виротерапия**

<sup>1</sup>ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>ФГБУ «НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава РФ, г. Москва

<sup>3</sup>Государственное автономное учреждение здравоохранения Свердловской области «Центр специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург

**Глиомы высокой степени злокачественности (Grade III–IV) являются высокоагрессивными опухолями центральной нервной системы с плохим прогнозом. Современные исследования направлены на изучение патогенетических механизмов роста опухоли на клеточном и молекулярно-генетическом уровнях с целью разработки эффективных методов индивидуализированного лечения пациентов, поскольку запас увеличения выживаемости при использовании стандартной терапии на сегодняшний день может считаться исчерпанным. Интеграция в комплексное лечение опухолей головного мозга иммунотерапевтических подходов, в том числе клеточной терапии, является актуальной и многообещающей стратегией, основанной на биологических свойствах опухолевой ткани.**

**Ключевые слова:** глиомы высокой степени злокачественности, иммунотерапия, клеточный иммунитет

Глиомы высокой степени злокачественности (Grade III–IV) — гетерогенная группа крайне агрессивных опухолей центральной нервной системы (ЦНС). Выживаемость больных с данными новообразованиями остается катастрофически низкой, особенно при глиобластомах, и не превышает 25%. Исследования последних лет направлены на изучение патогенетических механизмов роста опухоли на клеточном и молекулярно-генетическом уровнях с целью разработки эффективных методов индивидуализированного лечения пациентов, поскольку запас увеличения выживаемости при использовании стандартных подходов (оперативные вмешательства, химиолучевая терапия) на сегодняшний день может считаться исчерпанным.

Реализация полноценного иммунного ответа в центральной нервной системе зависит от проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), представленного эндотелиоцитами и отростками олигодендроглиоцитов. Барьер

ограничивает выход антигенов из ЦНС в регионарные лимфатические узлы, проникновение наивных Т-лимфоцитов, антител и антиген-презентирующих клеток в ЦНС. Развитие опухоли сопровождается нарушением структуры ГЭБ, что особенно заметно при высокоvascularизированных неоплазиях. Это способствует доступу клеток и гуморальных факторов в забарьерное пространство и реализации противоопухолевого иммунного ответа. Пенетрантность барьера также регулируется факторами врожденного иммунитета. Воздействие на Toll-like рецепторы (в частности, TLR3 — Toll-like receptor 3) и активация сигнального пути STAT способствуют ослаблению взаимодействия клаудина и окклюдина плотных контактов между эндотелиоцитами [1]. Напротив, воздействие на рецепторы интерферонов I типа и стимуляция RAC1 приводят к увеличению плотности межклеточных контактов [2]. Таким образом, используя баланс ГТФаз (гуанозин-5'-трифосфат) можно манипулировать проницаемостью ГЭБ с целью обеспечения лучшего проникновения лекарственных препаратов и иммунокомпетентных клеток в вещество головного мозга. Кроме того, повышение проницаемости можно достичь при помощи агонистов брадикинина, озонированного физиологического раствора, фокусированного ультразвука и др. [3–5]. Поляризация клеточных компонентов ГЭБ регулирует миграцию лейкоцитов в ЦНС посредством семейства рецепторов CXCL (C-X-C motif ligand — C-X-C мотив лиганд). Так CXCL4 обеспечивает проникновение антиген-специфических Т-клеток, а CXCL12 — локализацию Т-клеток под воздействием хемокинов [5]. Увеличение количества десмин-позитивных перицитов в сосудах ГЭБ и увеличение экспрессии белка SIP3 (survival of motor neuron protein-interacting protein 1 — белок, связанный с белком выживания моторных нейронов 1) астроцитами приводит к повышению проницаемости барьера. Ста-

билизация SIP3 в глиальных клетках может служить мишенью для управления пенетрантностью ГЭБ [5].

Снижению иммуногенности клеточных структур ЦНС способствует отсутствие на них рецепторов хоминга для лейкоцитов, а также угнетение активированных Т-лимфоцитов (экспрессирующих Fas-лиганд) ганглиозидами головного мозга [6-8]. Лейкоцитарный инфильтрат глиальных опухолей обеднен эффекторными клетками (CD8+ FOXP3-) и представлен в основном регуляторными Т-клетками и макрофагами 2 типа (M2). Макрофаги данного типа составляют до 45% лейкоцитов, инфильтрирующих опухоли. Они дифференцируются в ответ на стимуляцию IL4 (interleukin — интерлейкин — 4), IL10, IL13, а также стероидными гормонами. Кроме того, ангиокринное воздействие IL6 способствует «альтернативной поляризации» макрофагов и сдвигу в сторону M2-клеток. В отличие от моноцитарных клеток 1 типа, стимулируемых IFN $\gamma$  (interferon  $\gamma$  — интерферон  $\gamma$ ) и продуцирующих TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor — ), IL12, NO $\square$  радикал и активные формы кислорода, и проявляющих противоопухолевый эффект как за счет прямой цитотоксичности, так и за счет активации Th1-иммунного ответа, M2 макрофаги, напротив, потенцируют прогрессирование опухоли. Они продуцируют цитокины IL1 $\beta$ , IL6, IL8, металлопротеазы и VEGF (vascular endothelial growth factor — фактор роста сосудистого эндотелия) и способствуют переключению иммунного ответа с цитотоксического (Th1) на гуморальный (Th2). Обогащение лейкоцитарной популяции, инфильтрирующей опухоль данным типом клеток, ассоциировано с высоким риском развития рецидива и низкой общей выживаемостью больных. Напротив, присутствие IFN $\gamma$ -положительных клеток в инфильтрате приводит к усилению экспрессии CXCL10 клетками микроокружения опухоли, индукции спонтанного Т-клеточного ответа и увеличению выживаемости.

#### **Адоптивная клеточная терапия злокачественных опухолей ЦНС**

Первый опыт использования клеточной пассивной иммунотерапии был связан с введением аутологичных лимфокинактированных киллеров (ЛАК) и рекомбинантного IL-2 в ложе опухоли после оперативного вмешательства, что сопровождалось рядом побочных явлений, а именно, отеком головного мозга, угнетением сознания, нарушением внутричерепного давления [9-11]. Большей специфичностью обладали активированные опухолевыми антигенами моноклеарные лимфоциты. В исследовании

G.E. Plautz et al. (1998), использовавших стимулированные бактериальным суперантигеном Т лимфоциты, у 2 из 10 больных удалось достичь регресса рецидива глиобластомы [12].

На сегодняшний день применение клеточной терапии против злокачественных глиом связано с использованием цитотоксических клеток, несущих стандартный Т-клеточный рецептор или химерный антигенный рецептор. В первом случае Т-клеткам пациента в условиях *ex vivo* придается специфичность в отношении поверхностных антигенов опухоли (MAGE, GP100, NY-ESO, MART1, CEA), в дальнейшем для адоптивного переноса пациенту отбираются  $\gamma\delta$ -Т клетки. Данный подход позволил добиться увеличения выживаемости пациентов с глиобластомой на 44% по сравнению с использованием темозоломида [13, 14].

Вторым вариантом клеточной терапии злокачественных глиом является применение Т-клеток, несущих химерный антигенный рецептор (chimeric antigen receptor — CAR-T) третьего поколения, в состав рецепторной молекулы которых входит фрагмент иммуноглобулина и два костимуляторных фрагмента. Эффективность CAR-T клеток, специфичных для EGFRvIII (epidermal growth factor receptor — рецептор эпидермального фактора роста), GD2 (disialoganglioside — дисиалоганглиозид), IL13R $\alpha$ 2 в отношении клеток глиобластомы была продемонстрирована в доклинических моделях [15]. Опыт системного введения анти-CD19 CAR-T клеток для лечения В-клеточных лимфом ЦНС у макак резус показал их способность проникать в ЦНС, персистировать в цереброспинальной жидкости и инфильтрировать вещество головного мозга [16, 17]. Нежелательными явлениями при проведении данной терапии были синдром выброса цитокинов и острая неврологическая токсичность, купируемые применением натализумаба (блокирование проникновения CAR-T клеток в ЦНС) и анакинры (антагонист рецептора IL1).

Также исследовалась мышьяная модель интравентрикулярного введения анти-IL13R $\alpha$ 2 CAR-T клеток, активных в отношении клеток глиобластомы. Ее применение было более успешным по сравнению с внутривенным введением. Был сделан вывод о благоприятном влиянии микроокружения в веществе головного мозга и цереброспинальной жидкости на выживаемость и функциональную активность CAR-T клеток. Более того, клетки оказались способными мигрировать из ЦНС через ГЭБ и определялись в периферической циркуляции. Вышеперечисленные факты в конечном итоге приводили к полной эрадикации опухолевых клеток из организма модельных животных. Результаты клинического

применения анти-IL13R $\alpha$ 2 CAR-T клеток при локальном введении (в послеоперационную полость) при рецидивирующей глиобластоме, продемонстрировавшие увеличение медианы общей выживаемости до 7,9 мес., были восприняты с осторожным оптимизмом [18].

Перспективной мишенью для CAR-T-клеточной терапии является молекула EGFRvIII. Являясь мутантной формой соответствующего мембранного рецептора, она определяет злокачественный фенотип клетки, отсутствует на нормальных клетках организма и экспрессируется на поверхности мембраны. Несмотря на то, что в первой фазе клинических испытаний эффективность применения анти-EGFRvIII CAR-T-клеточной терапии при рецидивирующей глиобластоме в отношении увеличения выживаемости без прогрессирования и общей выживаемости подтверждена не была [19], исследования в данной области продолжаются [20-23].

### Виротерапия злокачественных опухолей ЦНС

Генно-модифицированная цитотоксическая терапия — это разновидность иммунотерапии с использованием аденовирусного вектора, несущего ген HSV-тимидинкиназы (*herpes simplex virus* — простой вирус герпеса). Данный фермент превращает ганцикловир в токсичный метаболит, провоцируя, тем самым, гибель как HSV-положительных, так и HSV-отрицательных соседствующих клеток (*bystander effect* — эффект «свидетеля»). В ложе опухоли во время операции вводится аденовирусный вектор AdV-tk (*adenoviral vector expressing the HSV-thymidine kinase gene*). Через 7 дней в течение двух недель используется пероральное введение валацикловира. Параллельно проводится стандартная радиотерапия с введением темозоломида в конкомитантном и адьювантном режимах. Схема сочетанного лечения представлена на рис. 1.

Также в качестве средства доставки генетических конструкций в опухолевые клетки используются ретровирусы. Они могут быть

применены для введения в клетку кодирующей последовательности эпитопов неоантигенов, что увеличивает иммунореактивность опухоли, проявляющуюся в увеличении инфильтрации ее опухоль-ассоциированными лимфоцитами. Исследование Тоса5 предполагает введение ретровирусного вектора Тоса 551, содержащего ген цитозин-деаминазы в ложе опухоли. В послеоперационном периоде пациент принимает перорально 5-фторцитозин, который в клетках опухоли метаболизируется в 5-фторурацил. Данный подход показал свою эффективность в отношении высокозлокачественных глиом у взрослых (в клинических испытаниях I фазы) и доклинических моделях детских медуллобластом группы SHH с мутацией в гене *TP53* и группы 3 с амплификацией гена *MYC* [24].

Прямое цитотоксическое действие вирусов в отношении клеток опухоли было продемонстрировано в ряде клинических исследований. Модифицированный полио-риновирус, не способный повреждать мотонейроны, вводимый в ткань опухоли, продемонстрировал способность инициировать IFN $\gamma$ -зависимый противоопухолевый иммунный ответ. В настоящее время он анализируется в отношении эффективности против злокачественных глиом у взрослых (исследование I фазы) [25]. Онколитические свойства вируса кори и наличие экспрессии CD46 на мембране различных первичных опухолей головного мозга легли в основу использования данного вируса в I фазе клинических испытаний для лечения больных с рецидивом или прогрессированием медуллобластомы, атипичной тератоид-рабдоидной опухоли и глиобластомы [26-28].

Эффективность изолированной виротерапии не превышает 30%, однако, за счет эффекта «свидетеля» элиминируется более 70% опухолевых клеток [29]. Кроме того, все используемые методы лечения стимулируют инфильтрацию опухоли антигенпрезентирующими клетками, увеличивая пролиферацию опухоль-специфических Т лимфоцитов, тем самым, усиливая клеточный противоопухолевый иммунитет. Показатели 2- и 3-летней выживаемости составили 33% и 25% соответственно [29].

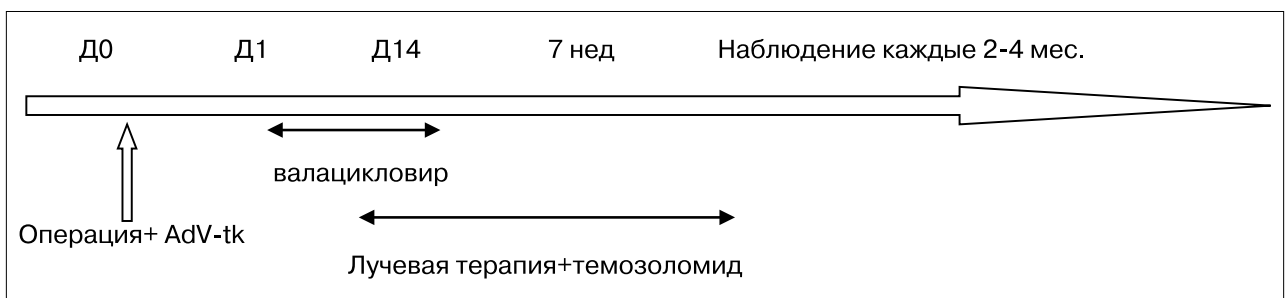


Рис. 1. Схема виротерапии при глиобластомах

## Оценка эффективности иммунотерапии опухолей головного мозга

Специфика локализации опухоли и реализации противоопухолевого иммунного ответа потребовали разработки специфического алгоритма оценки эффективности данного вида иммунотерапии. Это привело к созданию системы оценки эффекта иммунотерапии у нейроонкологических больных (Immunotherapy Response Assessment in Neuro-Oncology — iRANO) [30]. В целом, признаками эффективности противоопухолевой иммунотерапии считаются следующие: а) развитие воспалительной реакции в опухолевой ткани (нередко сопровождаемой увеличением размеров очага по данным визуализации и развитием феномена псевдопрогрессии); б) увеличение общего количества лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, и содержания среди них CD8<sup>+</sup> клеток; в) переключение функциональной активности макрофагов с M2 на M1 тип; г) усиление IFN $\gamma$ -зависимого сигналинга. Так, феномен псевдопрогрессии развивается практически сразу после локального введения CAR-T клеток, активных в отношении глиобластомы, и сохраняется в течение 4–7 мес., после чего следует объективно визуализируемый регресс опухоли [31, 32].

В целом, неудовлетворительные показатели выживаемости больных со злокачественными глиомами требуют поиска и интеграции в режимы лечения современных методов терапии, в том числе иммунотерапевтических подходов. Актуальными остаются персонализированные стратегии, основанные на молекулярных мишенях в опухолевых клетках.

### Конфликт интересов

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА

- Bigner D.D., Brown M., Coleman R.E., et al. Phase I studies of treatment of malignant gliomas and neoplastic meningitis with 131I-radiolabeled monoclonal antibodies anti-tenascin 81C6 and anti-chondroitin proteoglycan sulfate Me1-14 F (ab')<sub>2</sub> — a preliminary report // J. Neurooncol. — 1995. — Vol. 24(1). — P. 109–122.
- Blancher A., Roubinet F., Grancher A.S., et al. Local immunotherapy of recurrent glioblastoma multiforme by intracerebral perfusion of interleukin-2 and LAK cells // Eur. Cytokine Netw. — 1993. — Vol. 4(5). — P. 331–341.
- Медяник И.А., Мухина И.В., Яковлева Е.И. и др. Способ временного повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера. Патент РФ No.2391107. 2010.
- Bidros D.S., Vogelbaum M.A. Novel drug delivery strategies in neuro-oncology // Neurotherapeutics. — 2009. — Vol. 6(3). — P. 539–546.
- Liu H.L., Hua M.Y., Chen P.Y. et al. Blood-brain barrier disruption with focused ultrasound enhances delivery of chemotherapeutic drugs for glioblastoma treatment // Radiology. — 2010. — Vol. 255(2). — P. 415–425.
- Anirban G. Immune connection in glioma: fiction, fact and option, glioma, in glioma — exploring its biology and practical relevance. In: Glioma — exploring its biology and practical relevance. Ed. by Ghosh D.A. InTech, 2011. — P. 305–324.
- Flügel A., Schwaiger F.W., Neumann H. et al. Neuronal FasL induces cell death of encephalitogenic T lymphocytes // Brain Pathol. — 2000. — Vol. 10(3). — P. 353–364.
- Hickey W.F. Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles // Semin. Immunol. — 1999. — Vol. 11(2). — P. 125–137.
- Blancher A., Roubinet F., Grancher A.S., et al. Local immunotherapy of recurrent glioblastoma multiforme by intracerebral perfusion of interleukin-2 and LAK cells // Eur. Cytokine Netw. — 1993. — Vol. 4(5). — P. 331–341.
- Boiardi A., Silvani A., Ruffini P.A. et al. Loco-regional immunotherapy with recombinant interleukin-2 and adherent lymphokine-activated killer cells (A-LAK) in recurrent glioblastoma patients // Cancer Immunol. Immunother. — 1994. — Vol. 39(3). — P. 193–197.
- Hayes R.L., Koslow M., Hiesiger E.M. et al. Improved long term survival after intracavitary interleukin-2 and lymphokineactivated killer cells for adults with recurrent malignant glioma // Cancer. — 1995. — Vol. 76(5). — P. 840–852.
- Plautz G.E., Barnett G.H., Miller D.W. et al. Systemic T cell adoptive immunotherapy of malignant gliomas // J. Neurosurg. — 1998. — Vol. 89(1). — P. 42–51.
- Nakazawa T., Nakamura M., Park Y.S. et al. Cytotoxic human peripheral blood-derived  $\gamma\delta$ T cells kill glioblastoma cell lines: implications for cell-based immunotherapy for patients with glioblastoma // J. Neurooncol. — 2014. — Vol. 116(1). — P. 1–9.
- Miyauchi J.T., Tsirka S.E. Advances in immunotherapeutic research for glioma therapy // J. Neurol. — 2018. — Vol. 265(4). — P. 741–756.
- Brown C.E., Aguilar B., Starr R. et al. Optimization of IL13R $\alpha$ 2-Targeted Chimeric Antigen Receptor T Cells for Improved Anti-tumor Efficacy against Glioblastoma // Mol. Ther. — 2018. — Vol. 26(1). — P. 31–44.
- Abramson J.S., McGree B., Noyes S. et al. Anti-CD19 CAR T Cells in CNS Diffuse Large-B-Cell Lymphoma // Engl. J. Med. — 2017. — Vol. 377(8). — P. 783–784.
- Tiberghien P., Deconinck E., Adotevi O. More on Anti-CD19 CAR T Cells in CNS Diffuse Large-B-Cell Lymphoma // N. Engl. J. Med. — 2017. — Vol. 377(21). — P. 2101–2102.
- Brown C.E., Aguilar B., Starr R. et al. Optimization of IL13R $\alpha$ 2-Targeted Chimeric Antigen Receptor T Cells for Improved Anti-tumor Efficacy against Glioblastoma // Mol. Ther. — 2018. — Vol. 26(1). — P. 31–44.
- O'Rourke D.M., Nasrallah M.P., Desai A. et al. A single dose of peripherally infused EGFRVIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma // Sci. Transl. Med. — 2017. — Vol. 9(399). — pii: eaaa0984.
- Murakami T., Nakazawa T., Natsume A. et al. Novel Human NK Cell Line Carrying CAR Targeting EGFRVIII Induces Antitumor Effects in Glioblastoma Cells // Anticancer Res. — 2018. — Vol. 38(9). — P. 5049–5056.
- Jiang H., Gao H., Kong J. et al. Selective Targeting of Glioblastoma with EGFRVIII/EGFR Bitargeted Chimeric

- Antigen Receptor T Cell // *Cancer Immunol. Res.* — 2018. — Vol. 6(11). — P. 1314-1326.
22. Zheng Y., Gao N., Fu Y.L. et al. Generation of regulable EGFRvIII targeted chimeric antigen receptor T cells for adoptive cell therapy of glioblastoma // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2018. — Vol. 507(1-4). — P. 59-66.
  23. Wang S., O'Rourke D.M., Chawla S. et al. Multiparametric magnetic resonance imaging in the assessment of anti-EGFRvIII chimeric antigen receptor T cell therapy in patients with recurrent glioblastoma // *Br. J. Cancer.* — 2019. — Vol. 120(1). — P. 54-56.
  24. Cloughesy T.F., Landolfi J., Hogan D.J. et al. Phase 1 trial of vocimagene amiretrorepvec and 5-fluorocytosine for recurrent high-grade glioma // *Sci. Transl. Med.* — 2016. — Vol. 8(341). — P. 341ra75.
  25. PVSRIPO for Recurrent Glioblastoma (GBM) (PVSRIPO) ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01491893.
  26. Dhiman N., Jacobson R.M., Poland G.A. Measles virus receptors: SLAM and CD46 // *Rev. Med. Virol.* — 2004. — Vol. 14(4). — P. 217-229.
  27. Hardcastle J., Mills L., Malo C.S. et al. Immunovirotherapy with measles virus strains in combination with anti-PD-1 antibody blockade enhances antitumor activity in glioblastoma treatment // *Neuro. Oncol.* — 2017. — Vol. 19(4). — P. 493-502.
  28. Msaouel P., Opyrchal M., Dispenzieri A. et al. Clinical Trials with Oncolytic Measles Virus: Current Status and Future Prospects // *Curr. Cancer Drug Targets.* — 2018. — Vol. 18(2). — P. 177-187.
  29. Яшин К.С., Медяник И.А. Иммуноterapia злокачественных опухолей головного мозга (обзор) // *СТМ.* — 2014. — № 4. — С. 189-200.
  30. Okada H., Weller M., Huang R. et al. Immunotherapy Response Assessment in Neuro-Oncology (iRANO): A Report of the RANO Working Group // *Lancet Oncol.* — 2015. — Vol. 16(15). — P. e534-e542.
  31. Galldiks N., Kocher M., Langen K.J. et al. Pseudoprogression after glioma therapy: an update // *Expert Rev. Neurother.* — 2017. — Vol. 17(11). — P. 1109-1115.
  32. Ellingson B.M., Chung C., Pope W.B. et al. Pseudoprogression, radionecrosis, inflammation or true tumor progression? challenges associated with glioblastoma response assessment in an evolving therapeutic landscape // *J. Neurooncol.* — 2017. — Vol. 134(3). — P. 495-504.

*S.A. Kulyova<sup>1</sup>, A.E. Druy<sup>2,3</sup>*

**Immunology and prospects of immunotherapy of the primary malignant brain tumors: cellular therapy, virotherapy**

<sup>1</sup>N.N. Petrov National Research Center of Oncology, St-Petersburg,

<sup>2</sup>Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow,

<sup>3</sup>Research Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg

High-grade gliomas (Grade III-IV) are aggressive brain tumor with poor prognosis. Recent investigations are aimed on pathogenic mechanisms of tumor growth on cellular at the molecular-genetic level for the development of effective individualized treatment methods, while the limit of survival benefit of conventional therapeutic options has been already reached. Integration of immunotherapeutic approach (cellular therapy, virotherapy) into treatment schemes of the brain tumors is relevant and promising strategy based on biological features of tumor tissue.

Key words: high-grade gliomas, immunotherapy, cellular immunity

Поступила в редакцию 21.03.2019 г.