

© Т.Л. Нехаева, А.Б. Данилова, Н.А. Ефремова, А.О. Данилов, Е.С. Зуй,  
И.А. Балдуева

## Прогностическая роль клеточных моделей в оценке эффективности дендритно-клеточных вакцин\*

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Российская Федерация

© Tatyana L. Nekhaeva, Anna B. Danilova, Natalya A. Efremova, Aleksei O. Danilov,  
Ekaterina S. Zuy, Irina A. Baldueva

## The Prognostic Role of Cellular Models in Evaluating the Efficacy of Dendritic Cell Vaccines\*\*

N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, St. Petersburg, the Russian Federation

**Введение.** Противоопухолевые вакцины на основе аутологичных дендритных клеток (АДКВ) в настоящее время вызывают значительный интерес. Конструирование и использование клеточных моделей, воспроизводящих иммунологические реакции, представляется весьма перспективным инструментом мониторинга такой терапии и предсказания исхода заболевания.

**Цель.** Разработка аутологичных клеточных моделей, воспроизводящих *in vitro* активацию противоопухолевых механизмов в результате воздействия АДКВ, и изучение их прогностического значения в процессе лечения.

**Материалы и методы.** Был использован биологический материал 11 пациентов (у семи — меланома кожи (МК), у четырех — саркомы мягких тканей и остеогенные саркомы (СМТ/ОС), которые получали лечение АДКВ CaTeVac в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова. Для создания клеточных моделей использовали культуры опухолевых клеток и активированных Т-лимфоцитов, генерированных при кокультивировании с вакцинными дендритными клетками пациентов. Для анализа степени активации клеток и клеточных взаимодействий использовали методы проточной цитометрии, иммуноферментного анализа, оценки пролиферативного потенциала опухолевых клеток.

**Результаты.** У 90,9 % пациентов (10/11) до лечения АДКВ наблюдали генерацию активированных Т-лимфоцитов. Моделирование взаимодействия Т-лимфоцитов с аутологичными клетками опухолей пациентов воспроизводило реальную клиническую ситуацию в восьми из 11 (72,7 %) случаев. Обнаружена корреляция между содержанием MICA и TGFβ<sub>1</sub>, экскретируемых малигнизированными клетками пациентов, и коэффициентом клеточного лизиса ( $\rho = -0,792$ ,  $p = 0,001$  и  $\rho = -0,472$ ,  $p = 0,048$  соответственно), а также между относительным содержанием пролиферирующих CD3<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> лимфоцитов и концентрацией IL-10 ( $\rho = -0,579$ ,  $p = 0,019$ ), TGFβ<sub>1</sub> ( $\rho = -0,512$ ,  $p = 0,043$ ) в периферической крови пациентов до лечения. При образовании клона пролиферирующих CD3<sup>+</sup>клеток обнаружили увеличение субпопуляции терминально дифференцированных лимфоцитов (TEMRA) CD4<sup>+</sup> ( $p = 0,018$ ) и CD8<sup>+</sup> ( $p = 0,048$ ) у пациентов с достаточным эффектом (ДЭ) до лечения по сравнению с недостаточным эффектом. После двух-шести

**Introduction.** Anticancer vaccines based on activated dendritic cells (DCs) are of significant interest. Constructing and utilizing cellular models that reproduce immunological responses for monitoring such therapy and predicting disease outcomes is a promising approach.

**Aim.** To develop autologous cellular models that reproduce *in vitro* activation of antitumor mechanisms following exposure to a DC vaccine and to study their prognostic value during treatment.

**Materials and Methods.** Biological material was obtained from 11 patients (7 with skin melanoma, 4 with soft tissue or osteogenic sarcomas (STS/OS) treated with the autologous CaTeVac vaccine in N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology. Cellular models were created using cultures of patient-derived tumor cells and T-lymphocytes activated via coculture with vaccine DCs. The models were analyzed using flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and assessment of tumor cell proliferation potential.

**Results.** Generation of activated T-lymphocytes in response to vaccine DC stimulation was observed in 90.9 % of patients prior to treatment. The modeled interaction between T-lymphocytes and autologous tumor cells reproduced the clinical response in 8 out of 11 (72.7 %) of cases. Inverse correlations were found between the levels of MICA and TGFβ<sub>1</sub>, secreted by tumor cells and the cell lysis ratio ( $\rho = -0.792$ ,  $p = 0.001$  and  $\rho = -0.472$ ,  $p = 0.048$ , respectively), and between relative content of proliferating CD3<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> lymphocytes and plasma concentrations of IL-10 ( $\rho = -0.579$ ,  $p = 0.019$ ) and TGFβ<sub>1</sub> ( $\rho = -0.512$ ,  $p = 0.043$ ) in patients' peripheral blood before treatment.

During the formation of a proliferating CD3<sup>+</sup> cell clone, an increase in the subset of terminally differentiated lymphocytes (TEMRA) CD4<sup>+</sup> ( $p = 0.018$ ) and CD8<sup>+</sup> ( $p = 0.048$ ) was observed in patients with a sufficient effect (SE) before treatment compared to those with an insufficient effect (IE). After 2–6 cycles of DCV, SE patients experienced a signifi-

\* Статья содержит онлайн-приложение, в котором размещены полный текст статьи на английском языке и дополнительные материалы.

\*\* Полный текст статьи на английском языке доступен по ссылке <https://voпросыонкологии.ru/index.php/journal/article/view/2-26-The-Prognostic-Role>

циклов АДКВ у пациентов с ДЭ происходило значительное увеличение количества CD8<sup>+</sup>клеток эффекторной памяти (CD8<sup>+</sup>Tem) ( $p = 0,036$ ) и TEMRA CD8<sup>+</sup>лимфоцитов, продуцирующих гранзим В (TEMRA GrB<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) ( $p = 0,025$ ).

**Заключение.** Цитотоксические свойства антигенспецифических Т-лимфоцитов различаются у пациентов и соответствуют клинической картине заболевания и ответу на терапию, что дает возможность предложить клеточное моделирование в 2D- и 3D-формате как метод для прогнозирования и мониторинга эффективности клеточной терапии.

**Ключевые слова:** дендритно-клеточные вакцины; клеточные модели; меланома; саркома; цитотоксические лимфоциты

**Для цитирования:** Нехаева Т.Л., Данилова А.Б., Ефремова Н.А., Данилов А.О., Зуй Е.С., Балдуева И.А. Прогностическая роль клеточных моделей в оценке эффективности дендритно-клеточных вакцин. *Вопросы онкологии*. 2026; 72(2): 364-376.-DOI: <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2026-72-2-OF-2501>

✉ Контакты: Нехаева Татьяна Леонидовна, [nehaevat151274@mail.ru](mailto:nehaevat151274@mail.ru)

## Введение

Среди иммунотерапевтических методов, разрабатываемых в настоящее время, значительный интерес вызывают противоопухолевые вакцины на основе активированных аутологичных дендритных клеток (ДК), суть действия которых заключается в иммунизации организма пациента иммуногенными пептидами, полученными из опухолеассоциированных антигенов, что приводит к активации поливалентного адаптивного иммунного ответа, нацеленного на клетки злокачественной опухоли [1].

ДК, часто называемые «природными адъювантами», представляют собой профессиональные антигенпрезентирующие клетки, которые играют неотъемлемую роль в стимулировании адаптивного иммунного ответа, обеспечивая три сигнала, необходимые для активации лимфоцитов: ДК процессируют внутриклеточные и внеклеточные антигены и представляют производные антигена — пептиды на молекулах главного комплекса гистосовместимости (МНС) I или II класса CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитам соответственно. Затем ДК подают необходимые координирующие сигналы лимфоцитам, что опосредованно взаимодействием CD80/CD86 : CD28. Наконец, ДК секретируют поляризующие цитокины, такие как IL-12, стимулируя эффекторные функции лимфоцитов. Взаимодействуя с ДК, наивные Т-клетки дифференцируются в эффекторные Т-клетки, что в конечном итоге приводит к генерации опухолеспецифического клеточного и гуморального ответа. Именно поэтому ДК как ключевые медиаторы иммунного ответа являются очень перспективной основой для множества стратегий противоопухолевых вакцин [2].

ДК также обладают способностью координировать не только адаптивную, но и врожденную иммунную систему. Так, они вырабатывают

cant increase in the number of CD8<sup>+</sup> effector memory cells (CD8<sup>+</sup>Tem) ( $p = 0.036$ ) and TEMRA CD8<sup>+</sup> lymphocytes producing granzyme B (TEMRA GrB<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) ( $p = 0.025$ ).

**Conclusion.** The cytotoxic properties of antigen-specific T-lymphocytes induced by mature DCs vary between patients and correlate with the clinical disease presentation and therapy response. This supports the use of 2D and 3D cellular modeling as an *in vitro* method for predicting and monitoring the efficacy of dendritic cell-based immunotherapy.

**Keywords:** dendritic cell vaccines; cellular models; melanoma; sarcoma; cytotoxic lymphocytes

**For Citation:** Tatyana L. Nekhaeva, Anna B. Danilova, Natalya A. Efremova, Aleksei O. Danilov, Ekaterina S. Zuy, Irina A. Baldueva. The prognostic role of cellular models in evaluating the efficacy of dendritic cell vaccines. *Voprosy Onkologii = Problems in Oncology*. 2026; 72(2): 364-376.-DOI: <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2026-72-2-OF-2501>

защитные цитокины, такие как интерлейкины IL-6, IL-12 и факторы роста в ответ на сигналы «опасности», которые модулируют текущие иммунные реакции. Кроме того, ДК взаимодействуют с клетками врожденной иммунной системы: естественными киллерами, макрофагами или тучными клетками, что приводит к генерации мощного и полного иммунного ответа [3].

Данные свидетельствуют о том, что у онкологических больных наблюдается снижение как количества, так и функции ДК, причем при метастатических опухолях наблюдается более выраженное снижение, чем у больных с ранними стадиями первичных опухолей [4]. Иммуносупрессивное микроокружение, создаваемое малигнизированными клетками, препятствует созреванию и правильному функционированию ДК, что приводит к отсутствию эффективного опухолеспецифического иммунного ответа [5]. Кроме того, недостаток иммуногенности в некоторых «холодных» опухолях обусловлен отсутствием инфильтрации Т-клеток или их дисфункциональным/истощенным статусом. Дефекты реализации иммунного цикла можно подвергнуть коррекции с помощью дендритно-клеточных вакцин (ДКВ).

Сенсибилизация ДК опухолевыми антигенами, содержащимися в лизатах опухолевых клеток, представляет собой часто используемый метод приготовления ДК-вакцин. Незрелые ДК, нагруженные опухолевыми антигенами пациентов, дифференцируют в зрелые ДК, а затем эти ДК, нагруженные антигенной информацией, вводят обратно пациентам для дальнейшей активации противоопухолевого иммунного ответа в организме [6].

Важным аспектом в достижении эффективности ДКВ является поиск и изучение факторов, позволяющих прогнозировать исход заболевания и выявлять когорту больных злокачественными

новообразованиями с наилучшими показателями ответа на проводимое лечение. Конструирование и использование клеточных моделей, которые воспроизводят степень восстановления иммунологических реакций, направленных на распознавание и элиминацию опухолевых клеток пациента после применения ДКВ, представляется весьма перспективным направлением для выявления прогностических и предиктивных факторов. Поэтому целью нашего исследования стала разработка аутологичных клеточных моделей, воспроизводящих *in vitro* активацию противоопухолевых механизмов в результате воздействия АДКВ, и изучение их прогностического значения в процессе лечения.

## Материалы и методы

### Характеристика материала

В исследование включены биологические образцы 11 пациентов, семь из которых — с диссеминированными формами меланомы кожи (МК), четыре — сарком мягких тканей и остеогенных сарком (СМТ/ОС), которые получали лечение аутологичной ДКВ CaTeVac в НИИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова [7]. Протокол исследования одобрен этическим комитетом, от всех пациентов получено информированное согласие. Клиническая характеристика пациентов представлена в табл. 1. Из больных СМТ/ОС двое имели остеогенную саркому, один — плеоморфную рабдомиосаркому, один — опухоль из оболочек периферических нервов. Для ана-

лиза различий по клиническим эффектам ДКВ больные были классифицированы как имеющие достаточный (ДЭ) или недостаточный (НДЭ) эффект терапии. Под достаточным эффектом понимали отсутствие прогрессирования в течение 6 мес. — при проведении самостоятельной (паллиативной) терапии, и 12 мес. — при проведении адъювантной иммунотерапии [8]. Шесть пациентов имели ДЭ и получили от 12 до 62 циклов ДКВ, пять — НДЭ, и получили от четырех до 12 циклов ДКВ.

### Выделение и культивирование клеток злокачественных новообразований

Фрагменты опухолевой ткани подвергали механической дезагрегации с помощью медимашин (Agilent Technologies, США), клетки опухолей высевали в пластиковые флаконы (Sarstedt, ФРГ), помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор Heracel (Termo Electron LTDGmbH, Германия), непрерывно культивировали, руководствуясь методами R.I. Freshney [9] с собственными модификациями [10], используя питательную среду DMEM/F12 (Биолот, Россия), содержащую 20 % сыворотки эмбрионов коров (Биолот, Россия), 20 % кондиционированной среды фибробластов легких эмбриона человека, инсулин (5 мкг/мл), трансферрин (5 мкг/мл), селен (5 нг/мл) (Invitrogen, USA). При достижении монослоя производили пересев клеток с использованием равных объемов 0,25 %-ного раствора трипсина и 0,02 %-ного раствора версена (Биолот, Россия). Осуществляли непрерывное культивирование опухолевых клеток не менее 10 пассажей —

Таблица 1. Характеристика пациентов, включенных в исследование

Характеристика пациентов		МК	СМТ/ОС
N		7	4
Возраст, лет	Медиана	52	19,5
	Диапазон	21–65	18–33
Пол	Мужской	3	4
	Женский	4	0
Стадия заболевания	III	6	0
	IV	1	4
Линии предшествующего системного лечения	0	7	0
	1	0	1
	2	0	1
	3 и более	0	2
Режим ДК-терапии	Адъювантный	7	1
	Лечебный	0	3
Количество циклов ДК-терапии	Медиана	12	19
	Диапазон	4–62	6–23
Эффект ДК-терапии	Достаточный	3	3
	Недостаточный	4	1

МК — меланома кожи; СМТ/ОС — саркомы мягких тканей и остеогенные саркомы.

процесса однократного посева и роста клеток в культуре [9]. Прижизненное наблюдение за ростом культур опухолевых клеток осуществляли с помощью клеточного автоматического анализатора Cell-IQ (СМ Technologies, Финляндия).

Чтобы избежать контаминации опухолевых культур фибробластами, использовали генетицин в дозе 100 мкг/мл [11]. Проводили контроль чистоты культуры на проточном цитометре FACS Canto II (BD, США) с использованием моноклональных антител к маркеру фибробластов ER-TR7 (Santa Cruz Biotech, США).

#### *Культивирование дендритных клеток*

Для получения аутологичных вакцинных ДК использовали адгезионную фракцию CD14<sup>+</sup> моноцитов из периферической крови онкологических больных, которую обрабатывали согласно оптимизированной ранее методике [7]. Для дифференцировки ДК применяли сбалансированную бессывороточную среду Cell-Gro DC (CellGenix, Германия) в культуральных флаконах с повышенной адгезией (TPP, Швейцария) при температуре 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub> и влажности 98 %. На первый, третий и пятый дни культивирования добавляли гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF, 72 нг/мл) и интерлейкин-4 (IL-4, 20 нг/мл) (CellGenix, Германия). Для нагрузки и специфической активации к незрелым ДК (фенотип CD14-CD1a<sup>+</sup>) на седьмой день культивирования добавляли клеточный препарат IRTAN-2018, представляющий собой коктейль девяти лизированных аллогенных РТА<sup>+</sup> опухолевых клеточных линий [12]. Лизированные опухолевые клетки добавляли к ДК в соотношении 3 : 1, одновременно в культуральные флаконы вносили фактор некроза опухоли (TNF-α, 20 нг/мл), IL-4 (20 нг/мл) и гранулоцитарно-макрофагальный ростовой фактор (GM-SCF, 72 нг/мл). Спустя 48 ч получали ДК с фенотипом CD1a<sup>-</sup>CD83<sup>+</sup>, которые собирали и осаждали центрифугированием.

На всех этапах дифференцировки ДК оценивали на предмет экспрессии линейноспецифических и дифференцировочных антигенов методом лазерной проточной цитофлуориметрии BD FACSCantoII (BD, США) с использованием моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромами: CD14-FITC, CD1a-APC, CD83-PE-Cy7, CD80-APC-Cy7, CD86-PerCP-Cy5.5, CD40-PE, HLA-DR-APC-Cy7, CD209-PerCP-Cy5.5, CCR7-BV421) [13].

#### *Культивирование активированных лимфоцитов*

Для активации лимфоцитов кокультивировали последние с аутологичными вакцинными ДК, внося в систему культивирования размороженную лимфоцитарную суспензию. На 16-е сутки отбирали лимфоцитарную фракцию и вносили ее в новую систему культивирования с свежей

порцией ДК, нагруженных опухолевыми антигенами. 14 дней непрерывного кокультивирования ДК и лимфоцитов проводили в присутствии цитокинов IL-2 (12,5 МЕ/мл) и IL-7 (10 нг/мл).

#### *Оценка индуцированной Т-клеточной пролиферации*

При оценке индуцированной Т-клеточной пролиферации для окрашивания Т-лимфоцитов применяли флуоресцентный краситель CFSE (5 мкМоль/мл). В качестве индукторов пролиферации эффекторных Т-лимфоцитов использовали вакцинные ДК в соотношении 10 : 1. Относительное содержание пролиферирующих Т-клеток оценивали на пятый день кокультивирования по разведению флуоресцентной метки методом проточной цитометрии (FACS Canto™ II, BD Biosciences, США) с помощью программного обеспечения BD FACSDiva (версия 8.0.1). Показатель спонтанной пролиферации лимфоцитов, меченных CFSE, использовали в качестве отрицательного контроля.

Анализ клеточного состава пула пролиферирующих Т-лимфоцитов, активированных *in vitro*

Субпопуляционный состав пролиферирующих Т-лимфоцитов, индуцированных зрелыми ДК в клеточных моделях, изучали на проточном цитометре FACS Canto™ II, BD Bioscience, США, с применением моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромами: CD45RA-PE, CD28-PerCP-Cy™5.5, CD8-PE-Cy7, CD3-APC, CD45-APC-Cy7, CD197-BV421 (CCR7) (BD Bioscience, США) и программы BD FACSDiva (версия 8.0.1). Для определения антиген-специфической продукции гранзима Б (GrB) Т-лимфоцитами проводили внутриклеточное окрашивание клеток моноклональными антителами с использованием соответствующих протоколов фиксации и пермеабиллизации мембран (BD Cytofix/Cytoperm™).

Цитотоксический тест был выполнен с помощью оценки пролиферации клеток злокачественных новообразований, кокультивируемых со специфически активированными Т-лимфоцитами, на приборе xCELLigence RCPA DP Instrument (ACEA Biosciences, США). Опухолевые клетки высевали в количестве 2x10<sup>4</sup> кл/лунка в планшеты E-Plate View (ACEA Biosciences, США). Через 24 ч в те же лунки добавляли аутологичные активированные Т-лимфоциты в соотношении клетка-мишень/клетка-эффектор 1/10 и помещали в прибор для анализа в течение 48 ч. В качестве контроля использовали культуру опухолевых клеток пациента без воздействия. Эффективность клеточного лизиса оценивали путем вычисления параметра Slope, ассоциированного со скоростью изменения клеточного индекса, который зависит от количества живых адгезивных клеток в экспериментальной

системе. Коэффициент клеточного лизиса ( $K_L$ ) вычисляли по формуле:

$$\frac{\text{Slope}_{\text{contrl}} - \text{Slope}_{\text{exp}}}{\text{Slope}_{\text{exp}}} \times 100 \%$$

*Создание трехмерных клеточных конструкций (сфероидов)*

Для опухолевых сфероидов использовали технологию низкоадгезивных поверхностей с помощью 96-луночных планшетов Ultra-Low Attachment Surface (Corning, США). Опухолевые клетки пациентов вносили в лунки планшета в количестве  $1-2 \times 10^4$  в 200 мкл полной питательной среды и культивировали в течение трех-восьми суток в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе Heracel (Thermo Electron LTD GmbH, Германия) при  $37^\circ\text{C}$ , 100 %-ной влажности и 5 %-ном  $\text{CO}_2$ . Далее в экспериментальную систему вносили активированные Т-лимфоциты в соотношении 1 оп. кл./20 лимф. и инкубировали в течение трех-пяти суток. Т-лимфоциты предварительно были окрашены цитоплазматическим флуоресцентным красителем CFSE (5 мкМоль/мл). Для визуализации клеточных взаимодействий использовали аналитическую систему наблюдения за живыми клетками Cell-IQ (Chip Map Technologies, Финляндия). Жизнеспособность клеток в сфероидах оценивали с помощью проточной цитометрии при использовании красителя 7AAD.

*Анализ продукции факторов, ассоциированных с иммуносупрессией (ИСФ)*

Оценивали количественное содержание ИСФ: трансформирующего фактора роста  $\text{TGF}\beta_1$ , интерлейкинов IL 6, 8, 10 в супернатантах культур опухолевых клеток и в сыворотке крови пациентов с помощью мультиплексного анализа на приборе BioPlex® 200 (Bio-Rad, США) с программным обеспечением Bio-Plex Manager™ v.6.1 (Bio-Rad, США). Для определения лиганда рецептора NKG2D цитотоксических Т-лимфоцитов и естественных киллеров MICA были использованы наборы MICA Duoset ELISA Kit (R&D Systems, США).

Для моделирования супрессивного опухолевого микроокружения в экспериментальную клеточную систему добавляли MICA (100 пг/мл),  $\text{TGF}\beta_1$  (30 пг/мл), IL 6 (25 пг/мл), IL 8 (50 пг/мл), IL 10 (50 пг/мл).

*Статистическая обработка*

Анализ полученных данных проводили с помощью систем статистической обработки IBM SPSS 19.0 и Microsoft Excel 2010. Использовали методы описательной статистики, корреляционного анализа, непараметрической статистики для оценки различий между двумя независимыми выборками с использованием критериев Спирмена и Манна — Уитни [14].

## Результаты

Оценка индуцированной *in vitro* Т-клеточной пролиферации продемонстрировала, что у 90,9 % пациентов (10/11) до лечения ДКВ имеет место генерация активированных Т-лимфоцитов в ответ на стимуляцию вакцинными ДК, и далее, с увеличением циклов иммунотерапии процент пролиферирующих клеток увеличивается (табл. 2, см. приложение онлайн). Однако у пациентов с НДЭ после каждого цикла ДК-вакцинации популяция  $\text{CD3}^+\text{CFSE}^+$  лимфоцитов количественно была менее выражена, чем у пациентов с ДЭ (рис.1).

Моделирование взаимодействия активированных Т-лимфоцитов, генерированных путем кокультивирования со зрелыми ДК, соответствующего определенным циклам вакцинации, с аутологичными клетками злокачественных новообразований пациентов, воспроизводило реальную клиническую ситуацию в восьми из 11 (72,7 %) случаев (табл. 3, см. приложение онлайн). На рис. 2 представлены результаты исследований клеточных моделей, полученных из биологического материала пациентов с МК, у которых развился ДЭ и НДЭ. У пациента И.С.А. с ДЭ увеличение количества пролиферирующих  $\text{CD3}^+\text{CFSE}^+$  лимфоцитов в процессе ДК-терапии сопровождалось усилением их цитотоксических свойств, что приводило к полному торможению роста культуры клеток меланомы кожи #1111 по данным клеточного анализатора xCELLigence, которое находило выражение в уменьшении параметра Slope до отрицательных значений (рис. 2 А1, А2, А3). У пациента Ш.У.Р., у которого ДЭ не был достигнут в процессе 12 циклов ДК-терапии, также наблюдали увеличение количества пролиферирующих  $\text{CD3}^+\text{CFSE}^+$  лимфоцитов, но при этом отсутствовал эффективный клеточный лизис аутологичных клеток-мишеней, о чем свидетельствовало сравнение скорости роста культуры меланомы кожи #912 в присутствии лимфоцитов и без них (рис. 2 Б1, Б2, Б3). В отношении больных СМТ/ОС были получены аналогичные результаты: у пациентов с НДЭ реактивность специфически активированных Т-лимфоцитов, генерированных в присутствии вакцинных ДК, была значительно снижена, что не приводило к гибели опухолевых клеток, которые продолжали пролиферировать (рис.3).

Выявлена корреляция между параметрами специфической активности Т-лимфоцитов, генерированных из клеток периферической крови, полученных до лечения пациентов, и продукцией культивируемыми клетками опухолей больных факторов, ассоциированных с иммуносупрессией (ИСФ). Обнаружена обратная корреляция

ляция высокой силы между содержанием МСА, экскретируемого малигнизированными клетками пациентов, и коэффициентом клеточного лизиса ( $K_L$ ) ( $\rho = -0,792$ ,  $p = 0,001$ ). Обратная корреляция средней силы была характерна также для  $TGF\beta_1$  и  $K_L$  ( $\rho = -0,472$ ,  $p = 0,048$ ).

Количество пролиферирующих активированных  $CD3^+CFSE^+$  лимфоцитов коррелировало с количественным содержанием ИСФ в перифе-

рической крови пациентов в «нулевой точке» перед вакцинацией. Была выявлена обратная корреляция средней силы между относительным содержанием  $CD3^+CFSE^+$  лимфоцитов в экспериментальной системе после стимуляции активированными ДК и концентрацией  $IL-10$  ( $\rho = -0,579$ ,  $p = 0,019$ ),  $TGF\beta_1$  ( $\rho = -0,512$ ,  $p = 0,043$ ) в периферической крови пациентов до лечения.

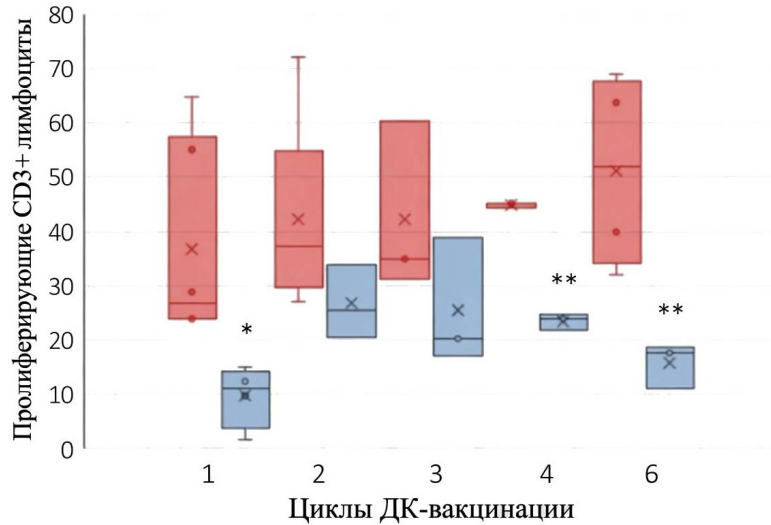


Рис. 1. Генерация активированных Т-лимфоцитов в ответ на стимуляцию вакцинными ДК у больных с ДЭ и НДЭ. ■ — ДЭ; ■ — НДЭ; \* — различия статистически значимы ( $p = 0,038$ ); \*\* — различия статистически значимы ( $p < 0,050$ )

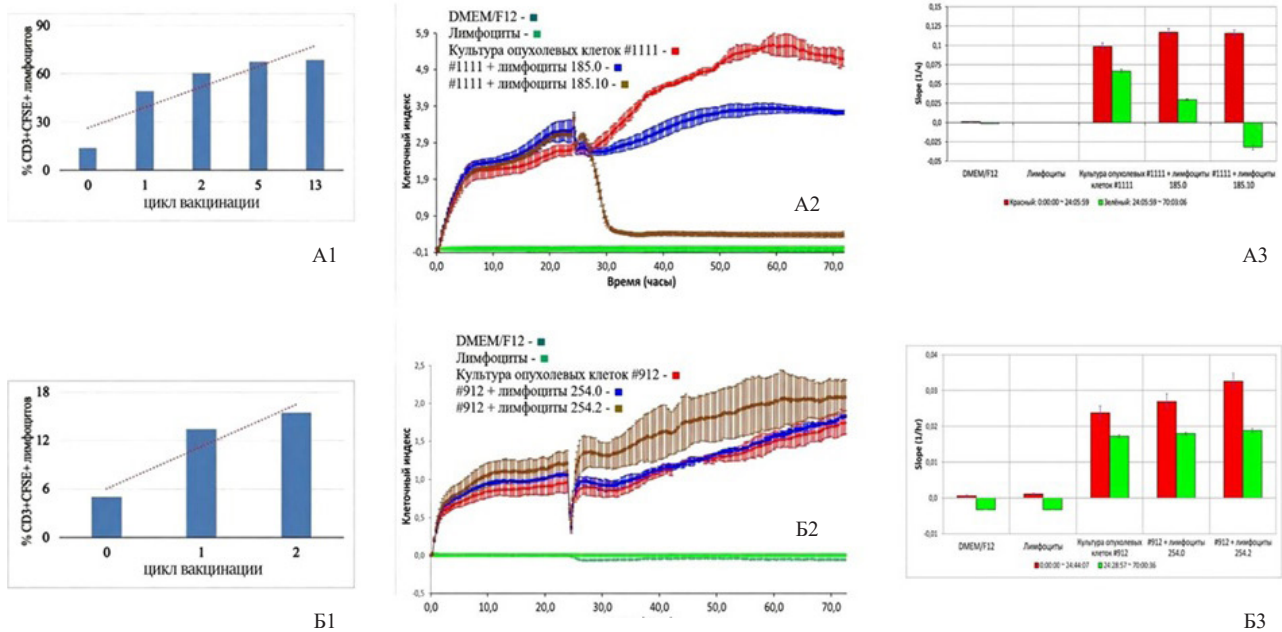


Рис. 2. Индивидуальные аутологичные клеточные модели, позволяющие оценить эффективность иммунологических синясов в процессе применения ДКВ у больных меланомой кожи. А — пациент И.С.А., 52 г., меланома кожи, достаточный эффект, 62 цикла вакцинации; Б — пациент Ш.У.Р., 29 л., меланома кожи, недостаточный эффект, 12 циклов вакцинации. 1 — динамика количественного содержания пролиферирующих  $CD3^+CFSE^+$  лимфоцитов при кокультивировании с вакцинными ДК в процессе ДК-вакцинотерапии; 2 — пролиферативная активность клеток МК пациентов в смешанной культуре с активированными аутологичными Т-лимфоцитами; 3 — оценка скорости роста культуры клеток МК в клеточном анализаторе xCELLigence по изменению показателя Slope. А2, Б2 — ■ — DMEM/F12, ■ — лимфоциты, ■ — культура клеток МК #1111 и #912 без воздействия, ■ — кокультура клеток МК и лимфоцитов, полученных из МНК до вакцинации, ■ — кокультура клеток МК и лимфоцитов, полученных из МНК в процессе вакцинации

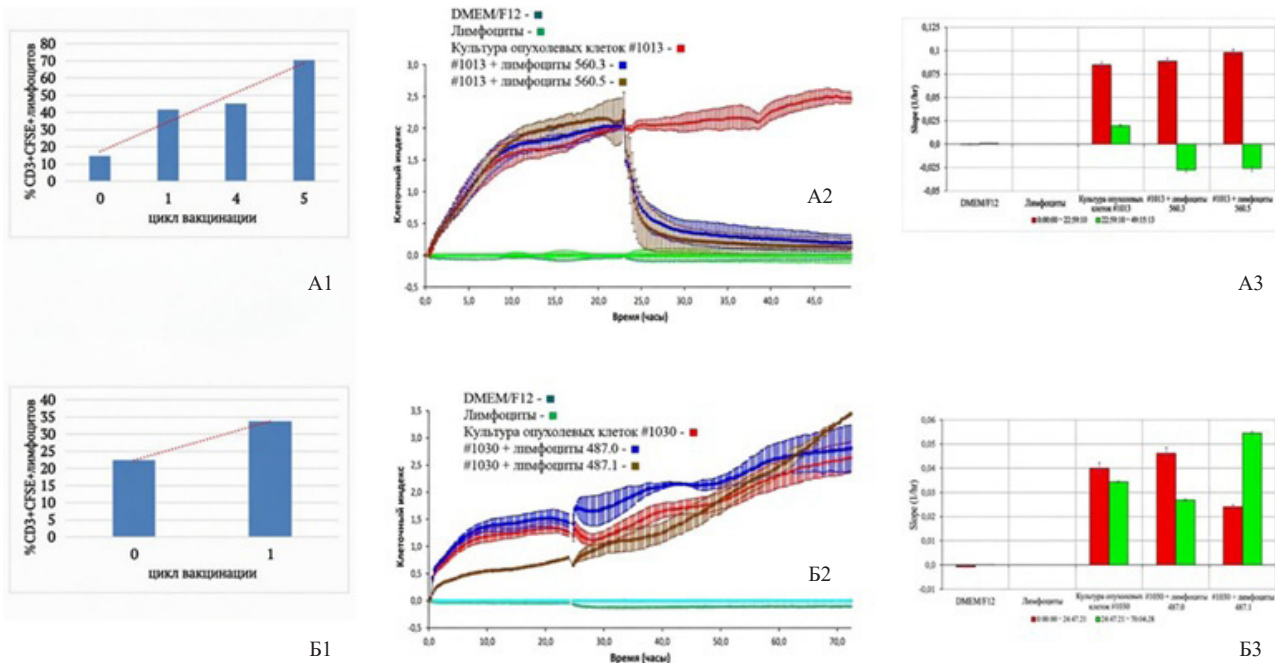


Рис. 3. Индивидуальные аутологичные клеточные модели, позволяющие оценить эффективность иммунологических синapses в процессе применения ДКВ у больных СМТ/ОС. А — пациент Д.С.А., 33 г., плеоморфная рабдомиосаркома (ПРМС), достаточный эффект, 23 цикла вакцинации; Б — пациент О.М.С., 21 год, остеогенная саркома, недостаточный эффект, шесть циклов вакцинации. 1 — динамика количественного содержания пролиферирующих CD3<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> лимфоцитов при кокультивировании с вакцинными ДК в процессе ДК-вакцинотерапии; 2 — пролиферативная активность клеток СМТ/ОС пациентов в смешанной культуре с активированными аутологичными Т-лимфоцитами; 3 — оценка скорости роста культуры клеток СМТ/ОС в клеточном анализаторе xCELLigence по изменению показателя Slope. А2, Б2 — ■ — DMEM/F12, ■ — лимфоциты, ■ — культура клеток ПРМС #1013 и ОС #1030 без воздействия, ■ — кокультура клеток СМТ/ОС и лимфоцитов, полученных из МНК до вакцинации, ■ — кокультура клеток СМТ/ОС и лимфоцитов, полученных из МНК в процессе вакцинации

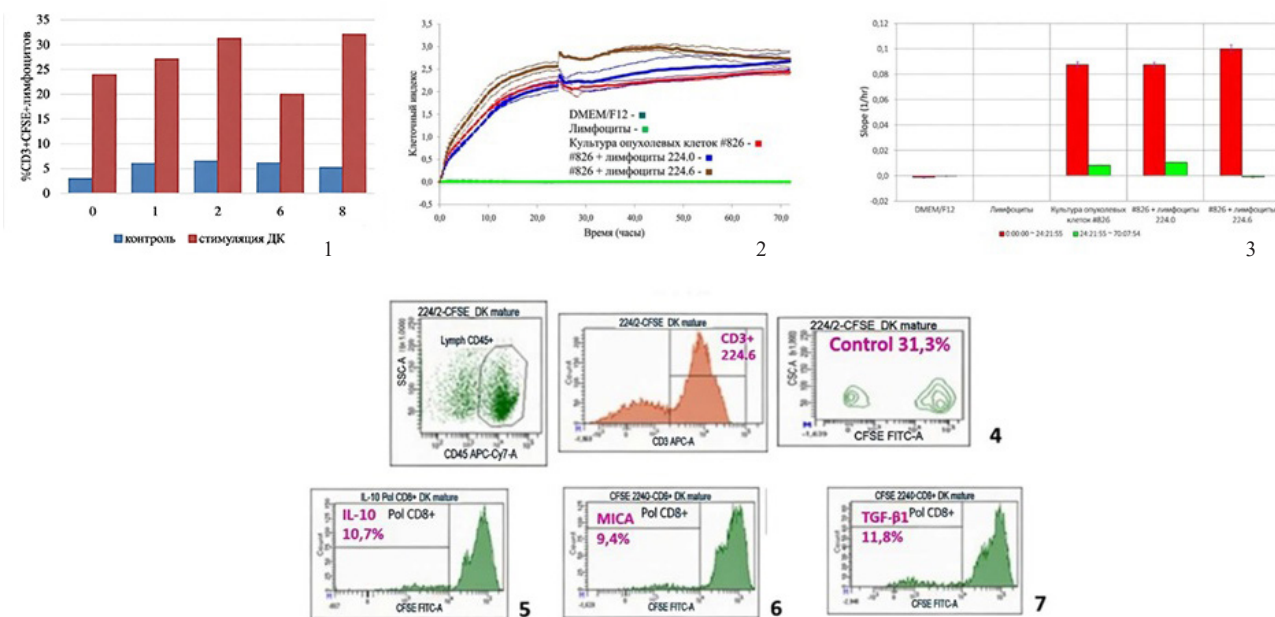


Рис. 4. Аутологичная клеточная модель с использованием биологического материала пациента Б.В.Н., 36 л., меланома кожи, получавшего адьювантную ДК-терапию (20 циклов). 1 — оценка популяции пролиферирующих CD3<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> лимфоцитов, генерированных в ответ на стимуляцию вакцинными ДК в процессе терапии. В качестве контроля оценивали спонтанную пролиферацию Т-лимфоцитов; 2 — динамика клеточного индекса, отражающего пролиферативную активность опухолевых клеток в смешанной культуре с активированными аутологичными Т-лимфоцитами; 3 — оценка скорости роста культуры клеток меланомы кожи #826 в клеточном анализаторе xCELLigence по изменению показателя Slope; 4 — количественная оценка популяции пролиферирующих CD3<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> лимфоцитов (31,3 %) с помощью проточной цитометрии после второго цикла ДК-терапии; 5 — количественная оценка популяции пролиферирующих CD3<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> лимфоцитов (10,7 %) с помощью проточной цитометрии после второго цикла ДК-терапии в присутствии IL-10; 6 — 9,4 % в присутствии MICA; 7 — 11,8 % в присутствии TGFβ1

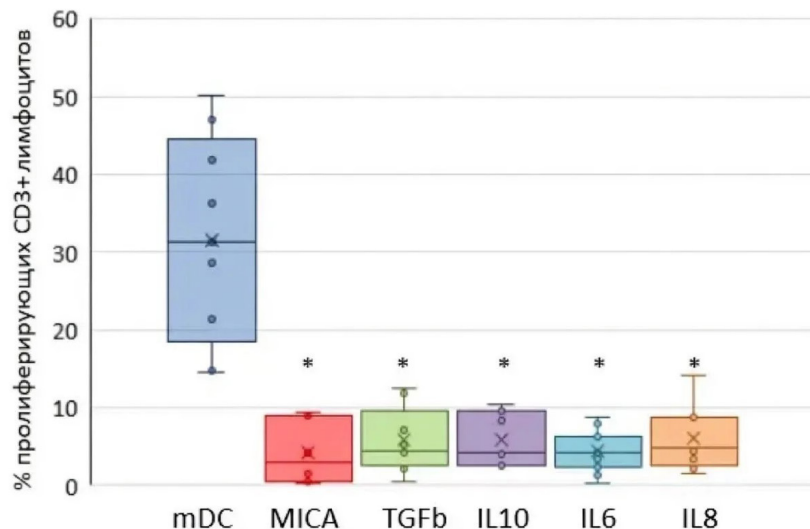


Рис. 5. Моделирование воздействия ИСФ на образование клонов активированных Т-лимфоцитов: mDC — в интактной системе при кокультивировании со зрелыми ДК, MICA — лиганда рецептора NKG2D, TGFb — в присутствии трансформирующего фактора роста  $\beta 1$ , IL10 — интерлейкина 10, IL6 — интерлейкина 6, IL8 — интерлейкина 8. Вакцинные ДК получены из моноцитов периферической крови после двух-шести циклов ДКВ (n = 13). \* — Различия статистически значимы (p < 0,05)

В процессе активации Т-лимфоцитов при образовании клона пролиферирующих CD3<sup>+</sup>клеток обнаружили статистически значимое увеличение относительного содержания субпопуляции терминально дифференцированных лимфоцитов (TEMRA) CD4<sup>+</sup> (p = 0,018) и CD8<sup>+</sup> (p = 0,048) у пациентов с ДЭ до ДК-терапии по сравнению с НДЭ. При моделировании клеточных взаимодействий после двух-шести циклов ДКВ у пациентов с ДЭ происходило значительное увеличение количества CD8<sup>+</sup>клеток эффекторной памяти (CD8<sup>+</sup>Tem) (p = 0,036) и TEMRA CD8<sup>+</sup>лимфоцитов, продуцирующих гранзим В (TEMRA GrB<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) (p = 0,025).

Более детальное изучение клеточных моделей, которые не воспроизводили реальную клиническую ситуацию, продемонстрировало важную роль воздействия компонентов опухолевого микроокружения, таких как присутствие молекул ИСФ, на реализацию функций активированных клеток иммунной системы с одной стороны, и необходимость более тщательного подхода к выбору компонентов прогностической клеточной модели — с другой. На рис. 4 представлены результаты анализа клеточной модели пациента Б.В.Н., 36 лет, с МК, получившего 20 циклов ДКВ с ДЭ. Оценка популяции пролиферирующих CD3<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup>лимфоцитов, генерированных в ответ на стимуляцию вакцинными ДК, показало положительную динамику в процессе терапии (рис. 4–1). Однако в клеточной модели не было получено различий между скоростью роста интактной культуры клеток МК #826 и при кокультивировании со специфически активированными Т-лимфоцитами, генерированными из мононуклеаров периферической крови, полученных до вакцинации и после 6-го цикла

ДКВ (рис. 4–2, –3). Оказалось, что добавление ИСФ в экспериментальную систему кокультивирования аутологичных активированных ДК и лимфоцитов снижает численность популяции CD3<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup>лимфоцитов практически в три раза (рис. 4–4, –5, –6, –7). Относительное содержание CD3<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup>лимфоцитов, полученных после второго цикла ДКВ составило 31,3 % по данным проточной цитометрии. Добавление IL10 в питательную среду кокультуры Т-лимфоцитов и ДК снижало содержание CD3<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup>лимфоцитов до 10,7 %, MICA — 9,4 %, и TGFb1 — 11,8 %. Иммуноферментный анализ концентраций ИСФ в супернатантах культуры МК #826, которая к моменту постановки эксперимента прошла 106 пассажей, продемонстрировал высокое содержание MICA (5237,8 пг/мл), TGFb1 (18,9 нг/мл), IL-10 (176,0 пг/мл), VEGF (1022,5 пг/мл) по сравнению с контрольной культурой фибробластов FLECH. После изучения данной модели были созданы иммуносупрессивные условия в экспериментальных системах с клетками других пациентов и получены аналогичные результаты (рис. 5). Обнаружены статистически значимые различия между относительным содержанием пролиферирующих Т-лимфоцитов, формирующих клоны, после нескольких циклов ДКВ под воздействием иммуносупрессивных факторов MICA, TGFb1, IL6, 8, 10 и без них (p < 0,05).

Было проведено изучение эффективности клеточного лизиса опухолевых клеток-мишеней активированными Т-лимфоцитами на аутологичных 3D-моделях из культивируемых клеток МК и разных типов сарком. После формирования опухолевых сфероидов в экспериментальные системы добавляли аутологичные активированные

CD3<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup>лимфоциты и вели прижизненное наблюдение за клеточными взаимодействиями, а также контролировали с помощью проточной цитометрии жизнеспособность опухолевых клеток и количество лимфоцитов, проникающих в сфероиды. Через сутки кокультивирования CD3<sup>+</sup>лимфоциты локализовались в кортикальной зоне сфероидов (рис. 6–1), на третьи сутки их количество составляло от 26 до 30 % их кле-

точного состава. В присутствии Т-лимфоцитов происходило разрушение структуры сфероидов, которые представляли собой плотные округлые компактные образования с четким контуром в интактной системе и на начальных этапах кокультивирования (рис. 6–2, 3). К восьмым суткам наблюдали полное разрушение сфероидов, при этом количество погибших клеток достигало более 90 % (рис. 6–4, –5, –6).

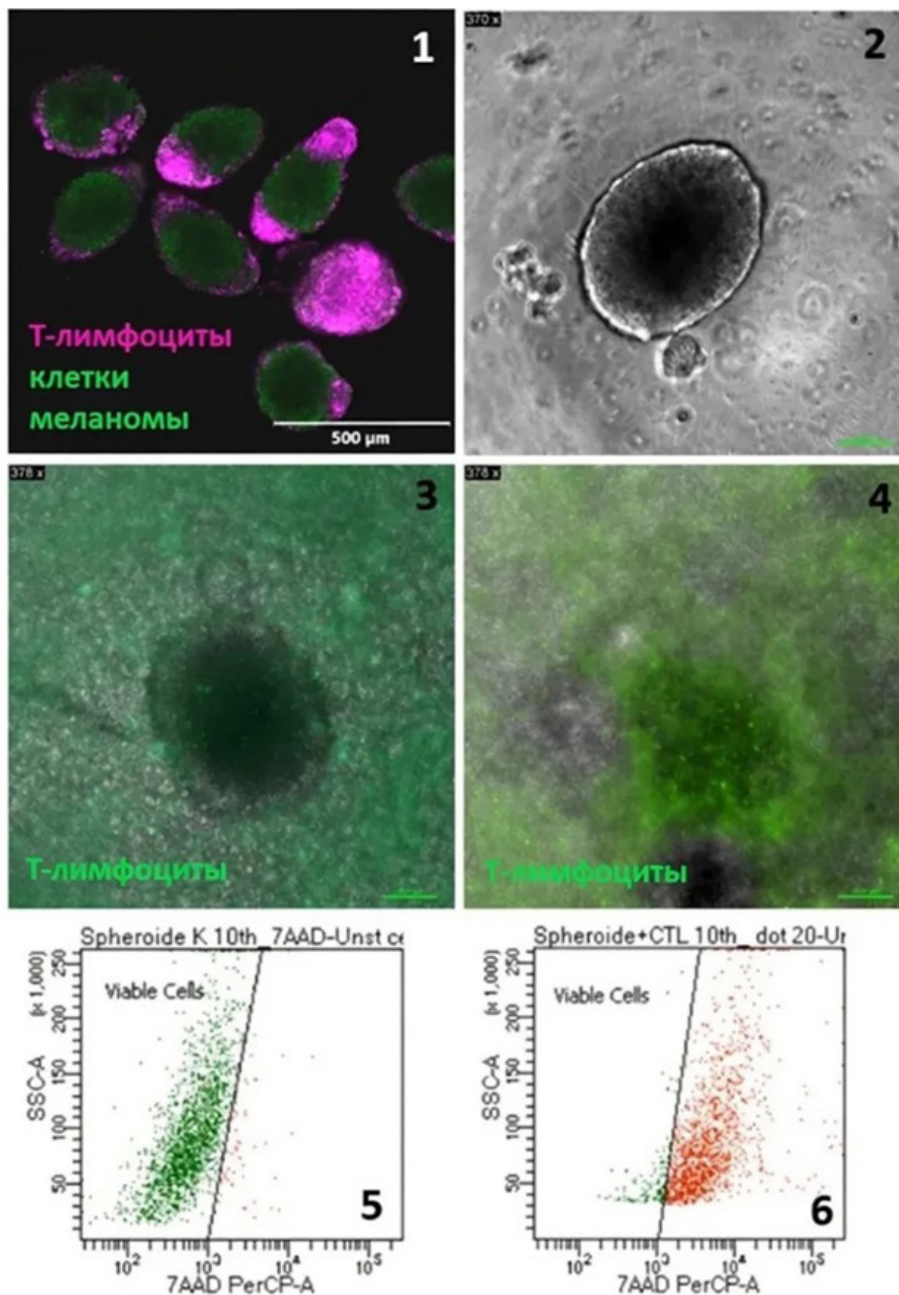


Рис. 6. Взаимодействие активированных Т-лимфоцитов и опухолевых клеток в 3D-клеточных моделях: 1 — сфероиды из клеток меланомы кожи #1111 пациента И. после инкубации с активированными CFSE<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>лимфоцитами в течение 24 ч Т-лимфоциты локализованы в кортикальной зоне сфероидов. Конфокальный микроскоп, масштабная линейка 500 мкм; 2 — интактный сфероид из клеток меланомы кожи #1111, фазовый контраст Cell-IQ, масштабная линейка 32,51 мкм; 3 — кокультивирование CFSE<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>лимфоцитов и сфероид #1111, первый день культивирования, совмещенное изображение фазовый контраст и флюоресценция, Cell-IQ, масштабная линейка 32,51 мкм; 4 — разрушение сфероид #1111 под воздействием активированных Т-лимфоцитов на восьмой день культивирования, совмещенное изображение фазовый контраст и флюоресценция, Cell-IQ, масштабная линейка 32,51 мкм; 5 — оценка жизнеспособности опухолевых клеток в интактном сфероиде #1111 с помощью проточной цитометрии: 97,4 % живых клеток; 6 — оценка жизнеспособности опухолевых клеток в сфероиде #1111 после инкубации с активированными Т-лимфоцитами (20-й цикл ДКВ) с помощью проточной цитометрии: 8,9 % живых клеток

## Обсуждение

Противоопухолевая эффективность, наблюдаемая при использовании ингибиторов иммунных контрольных точек или CAR-T терапии, убедительно продемонстрировала потенциал иммунной системы контролировать злокачественный процесс. Однако оказалось, что эффективность данных видов лечения злокачественных новообразований имеет определенные ограничения [15]. Так, применение препаратов, воздействующих на иммунные контрольные точки, может быть эффективно, если опухоль хорошо инфильтрирована цитотоксическими Т-лимфоцитами, но они отсутствуют у значительной части пациентов [16]. В то же время терапевтические противоопухолевые клеточные вакцины представляют собой активную стратегию иммунизации, которая направлена на стимуляцию адаптивного иммунного ответа против опухолевых антигенов и создание опухолеспецифических функциональных иммунных эффекторов, включая цитотоксические Т-лимфоциты. Целесообразность использования противоопухолевых вакцин на основе ДК, нагруженных опухолевыми антигенами, имеет значительное биологическое обоснование, поскольку они активируют естественный иммунный процесс [17].

Моделирование *in vitro* и исследование клеточных взаимодействий, которые могут быть индуцированы после применения таких вакцин, является полезным инструментом для мониторинга лечения и предсказания исхода заболевания. В данной статье мы сообщили о результатах создания и анализа аутологичных клеточных моделей, воспроизводящих *in vitro* функциональную активность специфически активированных Т-лимфоцитов, генерированных в результате кокультивирования с вакцинными ДК, нагруженными лизатом клеток девяти культур меланомы кожи, гиперэкспрессирующих раково-тестикулярные антигены (IRTAN-2018). Ранее было показано, что в результате взаимодействия с такими ДК происходит генерация Т-лимфоцитов, которые способны разрушать не только клетки МК, но и клетки других опухолей; при этом эффективность клеточного лизиса коррелировала с транскрипционной активностью раково-тестикулярных генов в клетках-мишенях [18].

Мы сосредоточились на создании аутологичных клеточных моделей, которые воспроизводят *in vitro* взаимодействие вакцинных ДК с наивными Т-лимфоцитами, приводящее к их специфической активации, ассоциированной с пролиферацией, формированием клонов и лизисом клеток опухоли пациентов. В системе *in vitro* практически у всех больных независимо от эффекта ДКВ мы наблюдали генерацию

Т-активированных лимфоцитов, и выраженность популяции были связаны с эффективностью терапии. Мы получали зрелые ДК из моноцитов, выделенных из периферической крови пациентов на разных этапах лечения, и обнаружили, что цитотоксические свойства лимфоцитов возрастали в процессе увеличения циклов ДКВ. В то же время иммуносупрессивное опухолевое микроокружение, которое может формироваться в том числе и за счет секреторной деятельности малигнизированных клеток, способных нарабатывать факторы, приводящие к блокаде противоопухолевых иммунных реакций и/или поляризации опухолеассоциированных клеток иммунной системы, влияет на интенсивность генерации активированных CD3<sup>+</sup>клеток и киллинга опухолевых клеток-мишеней в экспериментальной системе.

В этой связи необходимо отметить, что первые этапы развития противоопухолевой клеточной иммунотерапии продемонстрировали успех ДКВ в запуске противоопухолевых иммунных реакций, но результаты терапевтического воздействия вакцин на основе ДК в клинических исследованиях были ограничены именно из-за воздействия иммуносупрессивного опухолевого микроокружения [19]. Мы продемонстрировали, что в клеточных моделях в присутствии лиганда рецептора NKG2D цитотоксических Т-лимфоцитов и естественных киллеров MICA, фактора TGFβ<sub>1</sub> и интерлейкинов IL6, 8 10 происходило численное снижение пула CD3<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup>лимфоцитов практически в три раза. Кроме того, функциональные свойства вакцинных ДК, генерированных из CD14<sup>+</sup>моноцитов, выделенных из периферической крови пациентов до начала лечения, были связаны с присутствием определенных концентраций IL10 и TGFβ<sub>1</sub> в их кровотоке.

Функциональная активность активированных Т-лимфоцитов *in vitro* была различна у пациентов с ДЭ и НДЭ в процессе ДК-терапии, что также нашло выражение в увеличении содержания TEMRA GrB<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток и CD8<sup>+</sup>Tem в экспериментальной системе при достижении ДЭ. Как известно, праймирование наивных CD8<sup>+</sup> Т-клеток вызывает клональную экспансию и приобретение периферической тканевой хоуминговой способности, эффекторной функции и цитолитической активности. После сокращения ответа эффекторных Т-лимфоцитов Т-клетки памяти продолжают рециркулировать и также становятся резидентными в тканях по всему телу [20]. Вероятно, что увеличение пула TEMRA может быть ассоциировано с достижением ДЭ.

Как известно, трехмерные модели, такие как сфероиды, лучше демонстрируют иммуномодулирующие, пролиферативные и активационные

взаимодействия, присущие злокачественным новообразованиям, чем двухмерные культуры [21]. Мы провели серию экспериментов с использованием сфероидов из клеток МК и разных типов сарком. Интересно, что в трехмерной системе культивирования активированные Т-лимфоциты сначала концентрируются на поверхности опухолевого сфероида, далее проникают в кортикальную зону и затем располагаются диффузно по всей толщине сфероида; при этом данный феномен не зависит от гистологического типа сфероида. Под воздействием лимфоцитов сфероиды разрушаются и распадаются на отдельные фрагменты, сформированные более чем на 90 % из погибших клеток, включивших краситель 7-AAD. Аналогичные результаты были получены другими исследователями на постоянных опухолевых клеточных линиях, в частности колоректального рака [22]. При этом антитела, нацеленные против специфических лигандов NKG2D MICA и MICB, усиливали иммунозависимое разрушение опухолевого сфероида, индуцируя увеличение инфильтрации и активации NK-клеток, которые были добавлены в эту систему. В наших экспериментах присутствие молекул MICA также значительно ингибировало активацию Т-лимфоцитов, и степень разрушения сфероидов коррелировала с ответом пациентов на ДК-терапию.

### Заключение

Экспериментальные данные демонстрируют цитотоксическую способность антигенспецифических Т-лимфоцитов, полученных в результате индукции зрелыми ДК, в отношении аутологичной опухоли. Цитотоксические свойства активированных лимфоцитов разных пациентов различаются и соответствуют клинической картине заболевания и ответа на терапию, что дает возможность предложить клеточное моделирование в 2D- и 3D-формате как метод *in vitro* для прогнозирования и мониторинга эффективности клеточной терапии.

#### Благодарности

Авторы выражают благодарность врачу клинической лабораторной диагностики Емельяновой Н.А. за техническую поддержку в осуществлении анализа методом проточной цитометрии.

#### Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge N.A. Emelyanova, MD, clinical laboratory diagnostics, for her expert technical support in performing the flow cytometry analysis.

#### Конфликт интересов

Конфликт интересов отсутствует.

#### Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

#### Финансирование

Исследование выполнено в рамках государственного задания «Разработка инновационных аутологичных лекарственных препаратов на основе соматических клеток, соответствующих индивидуальному иммуногенетическому профилю пациента, для лечения злокачественных опухолей с агрессивным течением».

#### Funding

This research was conducted as part of a state-funded assignment: “Development of innovative autologous medicinal products based on somatic cells tailored to the individual immunogenetic profile of the patient for the treatment of aggressive malignant neoplasms”.

#### Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Все процедуры с вовлечением больных были проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией по правам человека в редакции 2013 г. Протокол исследования № 23/48 от 20.02.2020 одобрен этическим комитетом, от всех пациентов получено информированное согласие.

#### Compliance with patient rights and principles of bioethics

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of Declaration of Helsinki Protocol (2013). The study protocol No 23/48, dated 20 February 2020 was approved by the Institutional Ethics Committee, and written informed consent was obtained from all participants.

#### Участие авторов

Нехаева Татьяна Леонидовна — разработка концепции научной работы, планирование и осуществление экспериментов, создание черновика рукописи.

Данилова Анна Борисовна — микроскопический анализ цитологических объектов, создание трехмерных клеточных моделей, анализ инвазивной активности опухолевых клеток на клеточном анализаторе xCELLigence, описание полученных результатов.

Ефремова Наталья Александровна — подбор пациентов, создание клеточных культур солидных опухолей в 2D/3D формате, описание полученных результатов.

Данилов Алексей Олегович — проведение анализа на проточном цитометре, иммуноферментного анализа, статистическая обработка, описание полученных результатов.

Зуй Екатерина Сергеевна — проведение статистической обработки, описание полученных результатов.

Балдуева Ирина Александровна — анализ научной работы, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Author Contributions  
Nekhaeva T.L.: Conceptualization, experimental execution, and drafting of the original manuscript.

Danilova A.B.: Microscopic cytological analysis, generation of 3D cell models, analysis of tumor cell invasivity using the xCELLigence platform, and data interpretation.

Efremova N.A.: Patient selection, establishment of 2D/3D solid tumor cell cultures, and data interpretation.

Danilov A.O.: Flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), statistical analysis, and data interpretation.

Zuy E.S.: Statistical analysis and data interpretation.  
Baldueva I.A.: Critical analysis of the study, intellectual contribution, and critical revision of the manuscript.

### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Swartz A.M., Hotchkiss K.M., Smita N.K., et al. Generation of tumor targeted dendritic cell vaccines with improved

- immunogenic and migratory phenotype. *Methods Mol Biol.* 2022; 2410: 609-626.-DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1884-4\\_33](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1884-4_33).-URL: [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-1884-4\\_33](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-1884-4_33).
- Mastelic-Gavillet B., Balint K., Boudousquie C., et al. Personalized dendritic cell vaccines-recent breakthroughs and encouraging clinical results. *Front Immunol.* 2019; 10: 766.-DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00766>.-URL: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2019.00766/full>.
  - Hato L., Vizcay A., Eguren I., et al. Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Cancers (Basel).* 2024; 16(5): 981.-DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers16050981>.-URL: <https://www.mdpi.com/2072-6694/16/5/981>.
  - Lurje I., Hammerich L., Tacke F. Dendritic cell and t cell crosstalk in liver fibrogenesis and hepatocarcinogenesis: implications for prevention and therapy of liver cancer. *Int J Mol Sci.* 2020; 21: 7378.-DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21197378>.-URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/19/7378>.
  - Lehmann B.D., Colaprico A., Silva T.C., et al. Multi-omics analysis identifies therapeutic vulnerabilities in triple-negative breast cancer subtypes. *Nat Commun.* 2021; 12: 6276.-DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26502-6>.-URL: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-26502-6>.
  - González F.E., Gleisner A., Falcón-Beas F., et al. Tumor cell lysates as immunogenic sources for cancer vaccine design. *Hum Vaccines Immunother.* 2014; 10: 3261–3269.-DOI: <https://doi.org/10.4161/21645515.2014.982996>.-URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4514089/>.
  - Нехаева Т.Л. Оптимизация аутологичных дендритно-клеточных вакцин для лечения больных злокачественными новообразованиями. *Сибирский онкологический журнал.* 2013; 57(3): 52–56. [Nekhaeva T.L. Optimization of autologous dendritic cell vaccines for the treatment of patients with malignant neoplasms. *Siberian Oncol J.* 2013; 57(3): 52-56 (In Rus)].
  - Данилова А.Б., Новик А.В., Нехаева Т.Л., Балдуева И.А. Роль факторов иммуносупрессии в прогнозе эффективности клеточной иммунотерапии у больных солидными опухолями. *Эффективная фармакотерапия.* 2022; 18(17): 8–17.-DOI: <https://doi.org/10.33978/2307-3586-2022-18-17-8-17>.-URL: [https://umedp.ru/upload/iblock/961/effektivnaya\\_farmakoterapiya\\_onkologiya\\_gematologiya\\_i\\_radiologiya\\_5\\_2022.pdf](https://umedp.ru/upload/iblock/961/effektivnaya_farmakoterapiya_onkologiya_gematologiya_i_radiologiya_5_2022.pdf). [Danilova A.B., Novik A.V., Nekhaeva T.L., Balduyeva I.A. The role of immunosuppressive factors in prognosis of the efficacy of cellular immunotherapy in patients with solid tumors. *Effective Pharmacother.* 2022; 18(17): 8–17.-DOI: <https://doi.org/10.33978/2307-3586-2022-18-17-8-17>.-URL: [https://umedp.ru/upload/iblock/961/effektivnaya\\_farmakoterapiya\\_onkologiya\\_gematologiya\\_i\\_radiologiya\\_5\\_2022.pdf](https://umedp.ru/upload/iblock/961/effektivnaya_farmakoterapiya_onkologiya_gematologiya_i_radiologiya_5_2022.pdf) (In Rus)].
  - Freshney R.I. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialised applications. 6th ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell. 2010; 732.
  - Данилов А.О., Ларин С.С., Данилова А.Б., et al. Оптимизация метода приготовления вакцин на основе аутологичных генетически модифицированных опухолевых клеток для лечения больных диссеминированной меланомой кожи. *Российский биотерапевтический журнал.* 2003; 2(3): 47–53. [Danilov A.O., Larin S.S., Danilova A.B., et al. Optimization of a method for the preparation of vaccines based on autologous genetically modified tumor cells for the treatment of patients with disseminated cutaneous melanoma. *Russ Biother J.* 2003; 2(3): 47-53 (In Rus)].
  - Levin D.B., Wilson K., Valadares de Amorim G., et al. Detection of p53 mutations in benign and dysplastic nevi. *Cancer Research.* 1995; 55(19): 4278–4282.
  - Патент 2714208 С1. Балдуева И.А., Данилова А.Б., Нехаева Т.Л., Авдонкина Н.А., Емельянова Н.В., Беляев А.М. Клеточный продукт для нагрузки и активации дендритных клеток человека. Рос. Фед.: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Дата приоритета 2019.03.05. 2020. Бюл. № 5. [Patent 2714208 С1. Balduyeva I.A., Danilova A.B., Nekhaeva T.L., Avdonkina N.A., Emelyanova N.V., Belyaev A.M. Cell product for loading and activation of human dendritic cells. Russian Federation: Federal State Budgetary Institution “National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Petrov” of the Ministry of Health of the Russian Federation. Priority date 2019.03.05. 2020. Bull. No. 5 (In Rus)].
  - Нехаева Т.Л., Балдуева И.А., Новик А.В., et al. Разработка и оптимизация вакцин на основе аутологичных дендритных клеток (ДК), активированных раково-тестикулярными антигенами, для лечения больных меланомой кожи. *Вестник Уральской медицинской академической науки.* 2014; 5 (51): 92-98. [Nekhaeva T.L., Balduyeva I.A., Novik A.V., et al. Development and optimization of vaccines based on autologous dendritic cells activated by cancer-testis antigens for the treatment of cutaneous melanoma. *Bull Ural Med Acad Sci.* 2014; (5): 92-98 (In Rus)].
  - Everitt B.S., Pickles A. Statistical aspects of the design and analysis of clinical trials. Imperial College Press. London. 2004.
  - Tiwari A., Alcover K., Carpenter E., et al. Utility of cell-based vaccines as cancer therapy: Systematic review and meta-analysis. *Hum Vaccin Immunother.* 2024; 20(1): 2323256.-DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2024.2323256>.-URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10984131/>.
  - Gide T.N., Wilmott J.S., Scolyer R.A., Long G.V. Primary and acquired resistance to immune checkpoint inhibitors in metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2018; 24(6):1260–1270.-DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2267>.-URL: <https://aacrjournals.org/clincancerres/article/24/6/1260/468/Primary-and-Acquired-Resistance-to-Immune>.
  - Sellers M.C., Wu C.J., Fritsch E.F. Cancer vaccines: building a bridge over troubled waters. *Cell.* 2022; 185(15): 2770–2788.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.06.035>.-URL: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(22\)00787-5?return-url=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867422007875%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(22)00787-5?return-url=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867422007875%3Fshowall%3Dtrue).
  - Danilova A., Misyurin V., Novik A., et al. Cancer/testis antigens expression during cultivation of melanoma and soft tissue sarcoma cells. *Clin Sarcoma Res.* 2020; 10(3).-DOI: <https://doi.org/10.1186/s13569-020-0125-2>.-URL: <https://clinicalsarcomaresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13569-020-0125-2>.
  - Borges F., Laureano R.S., Vanmeerbeek I., et al. Trial watch: anticancer vaccination with dendritic cells. *Oncoimmunology.* 2024; 13(1): 2412876.-DOI: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2024.2412876>.-URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11469433/>.

20. Han J., Khatwani N., Searles T.G., et al. Memory CD8(+) T cell responses to cancer. *Semin Immunol.* 2020; 49: 101435.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2020.101435>.-URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7738415/>.
21. Boucherit N., Gorvel L., Olive D. 3D tumor models and their use for the testing of immunotherapies. *Front Immunol.* 2020; 11: 603640.-DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.603640>.-URL: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2020.603640/full>.
22. Courau T., Bonnereau J., Chicoteau J., et al. Cocultures of human colorectal tumor spheroids with immune cells reveal the therapeutic potential of MICA/B and NKG2A targeting for cancer treatment. *J Immunother Cancer.* 2019; 7(1): 74.-DOI: <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0553-9>.-URL: <https://jitc.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40425-019-0553-9>.

Поступила в редакцию / Received / 24.09.2025  
 Прошла рецензирование / Reviewed / 26.10.2025  
 Принята к печати / Accepted for publication / 18.12.2025

### Сведения об авторах / ORCID

Татьяна Леонидовна Нехаева / Tatyana L. Nekhaeva / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7826-4861>; eLibrarySPIN: 5366-8969; Researcher ID (WOS): L-7268-2018; Author ID (Scopus): 55317526900.

Анна Борисовна Данилова / Anna B. Danilova / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4796-0386>; eLibrary SPIN-9387-8328; Researcher ID H-7828-2014; Author ID 7005563064.

Наталья Александровна Ефремова / Natalya A. Efremova / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3533-2721>; eLibrarySPIN: 7352-9350; Researcher ID (WOS): P-3886-2015; Author ID (Scopus): 57194491563.

Алексей Олегович Данилов / Aleksei O. Danilov / ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0004-2890-1246>; eLibrarySPIN 3587-5413; Author ID (Scopus): 7203049937.

Екатерина Сергеевна Зуй / Ekaterina S. Zuy / ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0005-0672-5090>; eLibrarySPIN 1817-1177; Researcher ID (WOS) OJU-1349-2025; Author ID (Scopus): 57817751600.

Ирина Александровна Балдуева / Irina A. Baldueva / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7472-4613>; eLibrarySPIN: 7512-8789; Researcher ID (WOS): H-9574-2014; Author ID (Scopus): 6602224742.

