©Коллектив авторов, 2014
УДК 616.006.34-612.017.1

Вопросы онкологии, 2014. Том 60, № 6

И.А. Балдуева, А.Б. Данилова, А.В. Новик, Ю.И. Комаров, Т.Л. Нехаева, С.А. Проценко, А.И. Семенова, Н.П. Пипиа, Е.В. Воробейчиков, А.П. Карицкий, В.Ф. Климашевский, Е.Н. Имянитов, А.М. Беляев

Дендритные клетки, активированные раково-тестикулярными антигенами (РТА+), в лечении метастатических сарком мягких тканей

ФБГУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Представлены результаты клинического и иммунологического исследования активной специфической иммунотерапии РТА$^+$-активированными аутологичными ДК больных метастатичекими формами сарком мягких тканей. В исследование было включено 9 больных, получавших лечение в НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова с 2012 по 2014 г. Технология приготовления противоопухолевой РТА$^+$ ДК- вакцины заключается в дифференцировке ДК из адгезионной CD14$^+$ моноцитарной фракции периферической крови пациентов, нагрузке и специфической активации CD1a$^+$ незрелых ДК путем добавления коктейля лизированных аутологичных и/или аллогенных опухолевых клеток, получении зрелых CD83$^+$ вакцинных ДК.

Больные получали в/м циклофосфамид (ЦФ) в дозе 300 мг за три дня до введения РТА$^+$ ДК-вакцины для элиминации регуляторных Т-лимфоцитов и интерлейкин-1 бета (Беталейкин) 40000 МЕ в качестве иммунологического адъюванта. Проведено в среднем по 7 введений вакцины. Полный или частичный регресс у больных не зарегистрирован. Стабилизация опухолевого процесса после окончания курса вакцинотерапии наблюдалась у 5 (56%) больных, при этом стабилизация более 6 мес. была зарегистрирована у 4 (44%) пациентов, более 12 мес. — у 2 (22,2%) больных и у одного пациента эффект сохранялся более 17 мес. Прогрессирование заболевания было отмечено у 4 (44%) пациентов. Установлено, что вакцина не вызывает нежелательных явлений (НЯ) 3 и 4 ст.; НЯ 1 и 2 ст. наблюдались у 6/9 больных. Реакция ГЗТ зарегистрирована у 77,7% (7 из 9) первично иммунизированных пациентов. Иммунологический мониторинг РТА$^+$ ДК -вакцинотерапии выявил тенденцию к увеличению абсолютного содержания активированных Т- хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови на фоне снижения содержания регуляторных Т-лимфоцитов.

Ключевые слова: дендритные клетки, иммунотерапия, вакцинотерапия, раково-тестикулярные антигены, саркома мягких тканей

Введение

Таргетная иммунотерапия (моноклональные антитела, вакцины, клоны цитотоксических лимфоцитов), механизм действия которой направлен на прямое или опосредованное клетками иммунной системы разрушение опухоли, в последнее время становится одной из наиболее значимых в лечении распространенных форм злокачественных новообразований. Результаты клинических исследований позволяют надеяться на ее решающую роль в лечении онкологических больных, в том числе, пациентов с саркомами мягких тканей. В течение многих лет иммунотерапия сарком мягких тканей обсуждается в качестве одного из возможных способов лечения этих сложных гистотипически многообразных злокачественных новообразований [2, 14, 15]. Достижения иммунотерапии в лечении солидных опухолей не вызывают сомнения, и становится очевидной необходимость разработки новых более эффективных схем применения при саркомах мягких тканей.

В настоящее время получены вакцины для лечения синовиальных сарком, иммуногенность которых направлена на продукты мутированных генов, в том числе саркома-специфические гибридные SYT-SSX белки [8]. При саркоме Капоши используют иммуногенные эпитопы вируса Эпштейн-Барр, ассоциированные с вирусом герпеса человека 8-го типа (HHV8) [9], применяют ганглиозиды, аутологичные опухолевые клетки с IFN-γ или GM-CSF в качестве иммунологических адъювантов [16]. Вместе с тем, до настоящего времени эти методы остаются недостаточно разработанными и не могут быть внедрены в клиническую практику в качестве стандартного лечения. Более того, есть ряд проблем, связанных с коррекцией противоопухолевого иммунного ответа, так как известно более 50 типов сарком мягких тканей, и

то, что может быть иммуногенным для одного типа, окажется ареактивным (толерантным) для другого. По тем же причинам трудно определить единые мишени для иммунотерапии этой «многоликой» опухоли.

Общепризнанный успех в иммунотерапии диссеминированной меланомы создает платформу для разработки терапевтических вакцин на основе раково-тестикулярных антигенов (РТА) для метастатических форм сарком мягких тканей, резистентных к стандартным методам лечения.

РТА представляют собой группу белков, которые считаются одними из наиболее перспективных в качестве мишеней для иммунотерапии. Начиная с 70-х годов, были описаны клоны Т-лимфоцитов, распознающие иммуногенные эпитопы раково-тестикулярного антигена MAGE-1 (Melanoma antigen-1). Установлено, что РТА экспрессируются в ткани яичек, плаценте и отсутствуют в нормальных тканях. В настоящее время известно более 70 семейств генов РТА, многие из которых изучаются в качестве мишеней для вакцинотерапии и адоптивной клеточной терапии [5].

Вместе с тем иммуногенные по определению РТА, могут оказаться малоиммуногенными или неиммуногенными у некоторых групп пациентов. Это связано с тем, что эпитопы РТА могут быть ассоциированы с довольно редкими специфичностями главного комплекса гистосовместимости человека (HLA — от англ. *Human Leukocyte Antigen*). В то же время, некоторые молекулы HLA I класса выявляются относительно часто, например, HLA *0201 обнаружен у половины лиц европейской популяции. Показано, что среди РТА, ассоциированных с HLA*0201 эпитопами, присутствуют иммуногенные антигеныNY-ESO-1, LAGE-1, PRAME, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A9, SSX-2. Их экспрессия наиболее часто выявляется в синовиальной саркоме, липосаркоме, саркоме Юинга и др.

Недавно выявлены эпитопы NY-ESO-1 антигена, ассоциированные с аллелями DRB1, DRB4, DRB5 HLA II класса и распознаваемые $CD4^+$ Т-лимфоцитами у пациентов с диссеминированной меланомой кожи. Установлена центральная роль $CD4^+$ Т-клеток в индукции и регуляции антиген-специфических $CD8^+$ цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ) [17]. Менее известным остается значение $CD4^+$ Т-клеток в реализации клеточного и гуморального иммунитета инициированного NY-ESO-1 антигеном у больных саркомами мягких тканей. Можно предположить, что NY-ESO-1/$CD4^+$ Т-лимфоциты модулируют направленность Th1 клеточного и Th2 гуморального иммунного ответа, определяя профиль продукции цитокинов, в том числе, в опухолевом микроокружении. Кроме того, антиген-презентирующие ДК в опухолевом микроокружении могут повлиять на активность Th0 (наивные Т-хелперы) и реализацию вакциноопосредованного противоопухолевого иммунного ответа.

Актуальность данной проблемы обусловила необходимость проведения клинического исследования специфической иммунотерапии на основе $РТА^+$ активированных ДК у больных диссеминированными саркомами мягких тканей.

Материалы и методы

В исследование включено 9 больных с морфологически верифицированным диагнозом одного из подтипов сарком мягких тканей (синовиальная саркома, злокачественная фиброзная гистиоцитома, лейомиосаркома, внескелетная хондросаркома, злокачественная шванома, рабдомиосаркома), получавших лечение в НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова с 2012 по 2014 г. Критериями включения были возраст старше 18 лет, наличие сарком мягких тканей с экспрессией MAGE-A3 и/или NY-ESO-1 в опухоли или их отсутствие, измеряемые или неизмеряемые опухолевые очаги, проведение химиотерапии по поводу диссеминированного заболевания. Клиническая характеристика больных представлена в табл. 1.

Таблица 1

Клиническая характеристика больных саркомами мягких тканей, получивших ДК-вакцинотерапию

Характеристика	Количество пациентов (n=9)
Средний возраст, годы	49,6±12,43 (от 23 до 64)
Пол: мужчины женщины	 2 (22%) 7 (78%)
Локализация первичного очага: конечность туловище внутренние органы	 3 (33%) 1 (11%) 5 (55%)
Местастазы в легких: есть нет	 8 (88%) 1 (11%)
Характеристика опухоли: лейомиосаркома злокачественная фиброзная гистиоцитома синовиальная саркома злокачественная шваннома эмбриональная рабдомиосаркома эпителиоидная саркома	 2 (22%) 1 (11,%) 2 (22%) 1 (11%) 1 (11%) 1 (11%) 1 (11%)
Предшествующее лечение хирургическое химиотерапия A AP CyVADIC AI IE MAID CM GT лучевая терапия	 9 (100%) 9 (100%) 1 (11%) 1 (11%) 3 (33%) 4 (44%) 3 (33%) 3 (33%) 2 (22%) 1 (11%) 2 (22%)
Количество линий предшествующей терапии: 1 2 3	 4 (44%) 4 (44%) 1 (11%)

A — монотерапия доксорубицином; AP — доксорубицин с цисплатином, CyVADIC — циклофосфамид, доксорубицин, дакарбазин, AI — доксорубицин и ифосфамид, IE — ифосфамид и этопозид, MAID — ифосфамид, доксорубицин, дакарбазин, CM — циклофосфамид с метотрексатом в метрономном режиме, GT — гемцитабин и паклитаксел

Все больные, включенные в исследование, получили хирургическое лечение. Трем больным проводились лапаротомия и удаление опухоли, 5 пациентов получили лечение в виде иссечения мягких тканей и 1 больному выполнена ампутация нижней конечности. Двум больным в адъювантном режиме была проведена лучевая терапия на область послеоперационного рубца и ложа опухоли в суммарной дозе 50 Гр. До начала ДК-вакцинотерапии все пациенты получили стандартное лекарственное лечение. Первая линия химиотерапии была проведена 4 больным, вторая линия — 4. Один больной получил 3 линии химиотерапии до начала лечения. Перечень применявшихся лечебных режимов представлен в табл.1.

Молекулярно-генетический анализ уровня экспрессии PTA NY-ESO-1 и MAGE-A3 был выполнен всем больным. Источником мРНК служили образцы опухолевой ткани. Выделение мРНК проводили, как описано ранее [12]. Последовательности кДНК гена-мишени и гена-рефери (SDHA) амплифицировали при помощи специфических праймеров в присутствии TaqMan-зондов или красителя SYBR Green. ПЦР в режиме реального времени осуществляли на оборудовании BioRad CFX96 Real-time PCR Detection System в лаборатории молекулярной онкологии НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова (рук. проф. Е.Н. Имянитов). Для оценки уровня экспрессии вычисляли соотношение относительных количеств копий кДНК гена-мишени и гена-рефери; данные значения определяли при помощи построения стандартных кривых.

Технология приготовления вакцины на основе аутологичных ДК, нагруженных PTA+ опухолевым лизатом, заключалась в дифференцировке ДК из адгезионной моноцитарной фракции (CD14+) периферической крови больных саркомами мягких тканей в условиях 37°C, 5% CO2 и 98% влажности в адгезионных культуральных флаконах (Sarstedt, Германия), сбалансированной бессывороточной среде «Cell-Gro DC» (CellGenix, Германия). Ростовые факторы и факторы дифференцировки — GM-CSF (72 нг/мл) и IL-4 (20 нг/мл) (CellGenix, Германия) вносили на 1-й, 3-й и 5-й дни культивирования.

Для нагрузки и специфической активации незрелых ДК ($CD14^-CD1a^+$) на 7-й день добавляли коктейль лизированных аутологичных и/или аллогенных опухолевых клеток, экспрессирующих иммуногенные PTA^+ ($NY\text{-}ESO\text{-}1^+$, $MAGE^+$, $HAGE^+$, $GAGE^+$) в соотношении 1 (ДК) к 3 (лизированные опухолевые клетки), ростовые факторы: GM-SCF (72 нг/мл), IL-4 (20 нг/мл) и TNF-a (20 нг/мл). Через 48 ч ДК ($CD1a^-CD83^+$) собирали, осаждали центрифугированием, отмывали в 10 мл 0,9% раствора хлорида натрия, содержащего альбумин человека (конечная концентрация 2%), переносили в стерильный флакон и доставляли в клиническое отделение для введения больному [4].

Вакцину вводили внутрикожно паравертебрально в дозе 5-15 млн. клеток на одну инъекцию в сочетании с иммунологическим адъювантом (Беталейкин, РФ) 40000 МЕ с интервалом в 2 (1-2 вакцинации), 3 (3-4 вакцинации) и 4 (5-12 вакцинации) недели в 3 точки на расстоянии 3 см друг от друга, в 4-ю контрольную точку вводили антигенный опухолевый материал (опухолевый лизат). Перед каждой вакцинацией за 3 дня до введения вакцины пациент получал циклофосфамид (ЦФ) внутримышечно в дозе 300 мг для элиминации регуляторных Т-лимфоцитов.

Через 24 и 48 ч измеряли реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) в ответ на введение ДК-вакцины и PTA^+ опухолевый лизат.

Методом проточной цитометрии на приборе Facs Calibur (BD, США) оценивали количественное содержание основных популяций и субпопуляций лимфоцитов в периферической крови больных: Т-лимфоцитов $CD3^+CD19^-$, В-лимфоцитов $CD3^-CD19^+$, Т-хелперов $CD3^+CD4^+$, активированных Т-хелперов $CD3^+CD4^+HLADR^+$, $CD3^+CD4^+CD25^+$, цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) $CD3^+CD8^+$, активированных ЦТЛ $CD3^+CD8^+HLADR^+$, двойных положительных Т-лимфоцитов $CD3^+CD4^+CD8^+$, NK-клеток $CD3^-CD16^+CD56^+$, NKT-клеток $CD3^+CD16^+CD56^+$, регуляторных Т-лимфоцитов $CD4^+CD25^{bright}CD127^{low}$.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием систем статистической обработки IBM SPSS Statistics v. 21. Для анализа использованы методы описательной статистики.

Результаты и обсуждение

Ниже представлены результаты клинической и иммунологической оценки эффективности активной специфической иммунотерапии на основе PTA+-активированных аутологичных ДК для лечения больных диссеминированными формами сарком мягких тканей. Индивидуальная характеристика больных, получавших ДК-вакцинотерапию, приведена в табл. 2.

Нежелательные явления (НЯ) 1-2 ст. наблюдали у 2/3 больных в виде лихорадки 1 ст. (4/9 больных, 44%) и гриппоподобного синдрома 1 ст. у 4 больных (субфебрильная температура, ознобы, артралгии и миалгии). Эти НЯ не требовали прерывания лечения или применения лекарственных средств для их купирования. Изменения риска развития НЯ в процессе терапии выявлено не было.

Полных и частичных регрессов зафиксировано не было, стабилизацию заболевания (SD) наблюдали у 5 (55,6%) больных. При этом стабилизация более 6 мес. была зарегистрирована у 4 (44,4%) пациентов, стабилизация более 12 мес. — у 2 (22,2%) больных, и у одного больного эффект сохранялся 17 мес., после чего отмечено крайне медленное прогрессирование заболевания, позволившее продолжить лечение и выполнить полное удаление опухолевых очагов хирургическим путем. Дальнейшее прогрессирование заболевания (PD) через 1-2 мес. было отмечено у 4 (44,4%) больных.

Необходимо отметить, что другие исследования, посвященные изучению клинической эффективности вакцин на основе ДК, нагруженных лизатом опухолевых клеток или различными пептидами, для лечения сарком, немногочисленны и демонстрируют неоднозначные результаты. Так, в работе J.D. Geiger и соавт. [10], по изучению эффектов применения ДК-вакцин, нагруженных аутологичным опухолевым лизатом, был зарегистрирован полный регресс метастатических очагов фибросаркомы в легких у одного пациента из десяти. В исследовании R.Dagher и соавт. из 16 больных с распространенными формами сарком мягких тканей, получивших вакцины на основе ДК, нагруженных опухолеспецифическими пептидами, у четырех пациентов наблюдали стабилизацию заболевания [6]. При использовании вакцин на основе ДК, активированных тремя синтетическими пептидами, которые являются фрагментами опухолеспецифических белков

синовиальной саркомы и саркомы Юинга, для лечения 5 пациентов был достигнут полный регресс у одного больного саркомой Юинга с продолжительным эффектом более 77 мес. Еще у двух пациентов зарегистрировали непродолжительную стабилизацию заболевания [19].

В нашем исследовании все больные с метастазами, затрагивающими жизненно важные органы, после хирургического лечения получили одну (4/9, 44%) или более (5/9, 56%) линий лекарственного лечения. Таким образом, отсутствие полного и частичного регресса в нашем исследовании может быть связано с рядом причин: распространённостью опухолевого процесса, интенсивной предшествующей терапией и резистентным характером опухолей у больных.

У 7 из 9 больных (77,7%) зарегистрирована реакция ГЗТ через 24 ч уже после первого введения ДК-вакцины, в том числе в контрольной точке, куда вводили РТА$^{+}$-опухолевый лизат. В процессе ДК-вакцинотерапии наблюдали увеличение размеров реакции ГЗТ практически у всех пациентов (рис.1). В ряде исследований различных типов вакцин для лечения сарком мягких тканей авторы оценивали положительную динамику реакции ГЗТ в процессе вакцинотерапии как демонстрацию иммунного ответа in vivo. В частности, при введении вакцин на основе аутологичных опухолевых клеток с адъювантами (GM-CSF и INF-γ) медиана общей выживаемости больных с хорошо выраженной реакцией ГЗТ составила 16,6 мес. по сравнению с больными, не ответившими на лечение (8,2 мес.) [7]. Вместе с тем, описаны случаи отсутствия ГЗТ у пациентов, получавших неклеточные вакцины на основе пептидов, несмотря на обнаружение специфически активированных ЦТЛ в периферической крови [11, 13]. Таким образом, реакция ГЗТ в процессе вакцинотерапии является важным, но недостаточным условием успешного лечения [3].

При определении экспрессии РТА NY-ESO-1 и MAGE-A3 в опухоли у двух больных она была зарегистрирована для обоих антигенов, у четырех пациентов экспрессировался один из изучаемых антигенов, в образцах опухолевой ткани двух больных мы не обнаружили экспрессии. Корреляции между экспрессией NY-ESO-1 и MAGE A3 и эффектом проводимой терапии не наблюдали. Выбор исследуемых РТА был продиктован данными литературы о достаточно частой встречаемости этих белков в клетках солидных опухолей. Отсутствие изучаемой корреляции связано, вероятно, с малой численностью наблюдений и в то же время указывает на необходимость более полного и комплексного обследования больных на предмет экспрессии РТА. Установлено, что саркомы мягких тканей способны экспрессировать широкий спектр РТА, и, например, в клетках синовиальной саркомы и лейомиосаркомы чаще встречается MAGE A4 и SSX-2, а клетки хондросарком чаще экспрессируют LAGE-1 [18].

Таблица 2

Индивидуальная характеристика больных саркомами мягких тканей, получавших ДК-вакцину

Больной		Диагноз	Предшествующее лечение	Локализация метастазов	Экспрессия		Кол-во вакцинаций	Ответ на вакцинотерапию		
№	Возраст, пол				NY-ESO-1	MAGE A3		ГЗТ	Клинический эффект	Время до прогрессирования
1	Ш., 43, Ж	Злокачественная фиброзная гистиоцитома	ХЛ, ХТ	Легкие, забрюшинные л/у	Есть	Есть	1	+	PD	1 мес.
2	М., 46, Ж	Синовиальная саркома	ХЛ, ХТ	Легкие, забрюшинные л/у, мягкие ткани	Есть	Нет	2	+	PD	1 мес.
3	К., 51, Ж	Злокачественная шваннома	ХЛ, ХТ, ЛТ	Легкие, л/у средостения	Есть	Нет	4	+	PD	2 мес.
4	Н., 64, Ж	Лейомиосаркома	ХЛ, ХТ	л/у малого таза, локальный рецидив	Нет	Есть	6	+	SD	5 мес.
5	К., 23, Ж	Синовиальная саркома	ХЛ, ХТ, ЛТ	Легкие	Есть	Нет	16	+	SD	15 мес.
6	Г., 50, М	Хондросаркома	ХЛ, ХТ	Легкие	Нет	Нет	18	+	SD	17 мес.
7	Х., 62, Ж	Лейомиосаркома	ХЛ, ХТ	Легкие	-	-	7	+	SD	9 мес.
8	Е., 60, М	Эмбриональная рабдомиосаркома	ХЛ, ХТ, ЛТ	Легкие, л/у средостения	Есть	Есть	3	+	PD	2 мес.
9	Т., 48, Ж	Эпителиоидная саркома	ХЛ, ХТ	Легкие, забрюшинные л/у, мягкие ткани	Нет	Нет	10	+	SD	11 мес.

ЛТ – лучевая терапия, ХЛ – хирургическое лечение, ХТ – химиотерапия, PD – прогрессирование заболевания, SD – стабилизация заболевания

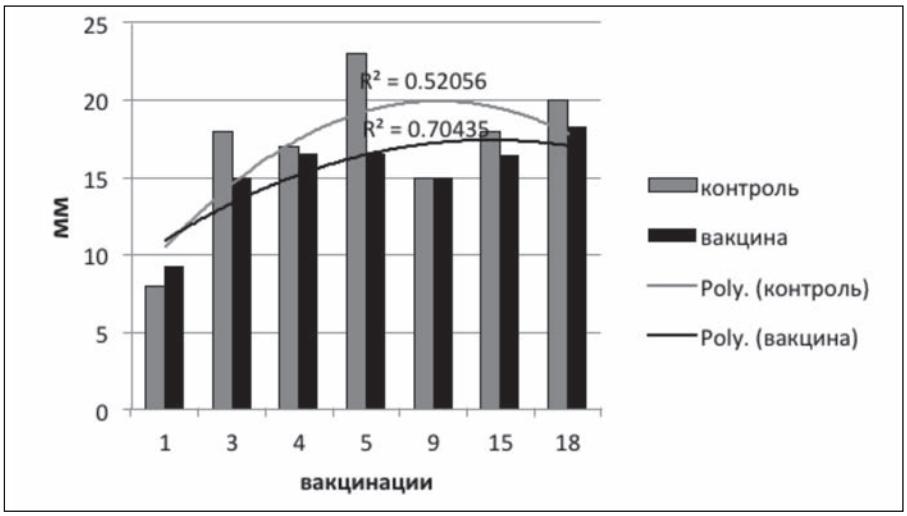

Рис.1 Динамика размеров реакции ГЗТ больного Г., 50 л., в процессе лечения ДК-вакциной

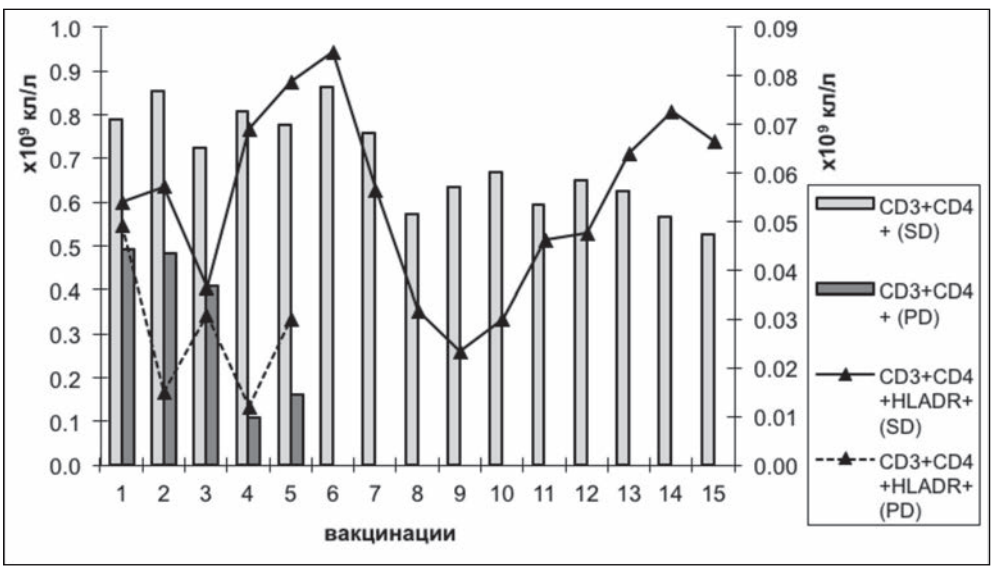

Рис.2 Динамика абсолютного содержания Т-хелперов и активированных Т-хелперов (HLA-DR⁺) в периферической крови больных саркомами мягких тканей с различным клиническим эффектом в процессе ДК-вакцинотерапии

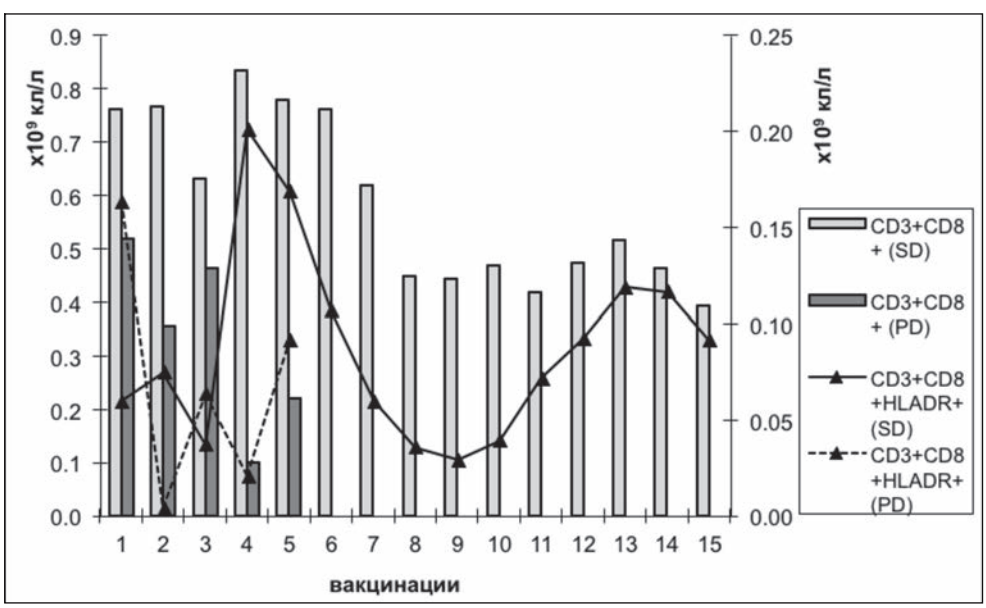

Рис.3 Динамика абсолютного содержания цитотоксических Т-лимфоцитов и активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (HLA-DR⁺) в периферической крови больных саркомами мягких тканей с различным клиническим эффектом в процессе ДК-вакцинотерапии

При анализе результатов лабораторного иммунологического обследования наблюдали различную динамику иммунологических показателей у больных с SD и PD (табл.3). Введение изучаемой дозы ЦФ было достаточным для поддержания малой численности субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов ($CD4+CD25^{bright}CD127^{low}$), не превышающей референтных значений у больных с SD. В то же время, у пациентов с PD количество этих лимфоцитов увеличивалось в ходе лечения, и у одного больного превысило референтные показатели в процентном соотношении. Кроме того, больных с SD характеризовала тенденция к увеличению в периферической крови абсолютного содержания Т-лимфоцитов и NK-клеток, а так же к сохранению количества В-лимфоцитов в пределах нормы, в то время как у больных с PD наблюдали снижение количества Т- и В-лимфоцитов в процессе лечения. Интересно, что пациенты с SD демонстрировали волнообразную динамику содержания Т-хелперов и ЦТЛ в процессе ДК-вакцинотерапии, но даже при уменьшении количества этих клеток в периферической крови нарастала их активность, о чем можно судить по увеличению абсолютного содержания лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности антигены HLA-DR (рис. 2 и 3).

Заслуживает внимания недавно описанный случай успешного применения комбинации ДК-вакцины, активированной аутологичным опухолевым лизатом, и цитокин-индуцированных киллеров для лечения больного недифференцированной эмбриональной саркомой печени, когда в процессе вакцинотерапии осуществляли мониторинг состояния клеточного иммунитета и обнаружили также значительное увеличение количества лимфоцитов с экспрессией CD3+, CD4+, CD8+ антигенов [20].

В нашем исследовании наблюдалось сниженное содержание клеток с иммунофенотипом CD3+CD16+CD56+ у больных с PD и сохранение этого показателя в пределах референсных значений у больных с положительным клиническим эффектом. Учитывая, что лимфоциты с данными поверхностными антигенами играют важную роль в индукции противоопухолевого иммунного ответа за счет продукции IFN-γ, активирующего NK-клетки, ЦТЛ и макрофаги, можно рассматривать тенденцию к снижению численности этой субпопуляции клеток как неблагоприятную [1]. У четырех больных из пяти с SD наблюдали низкий иммунорегуляторный индекс (CD4/CD8) за счет численного преобладания субпопуляции ЦТЛ, в то время как у двух больных из трех с PD имела место противоположная тенденция. Таким образом, обнаруживается связь между динамикой показателей клеточного иммунитета больных саркомами мягких тканей, определяемых методом проточной цитометрии, и признаками клинической эффективности РТА+ ДК-иммунотерапии.

Заключение

Результаты, полученные при использовании $РТА^{+}$-активированных ДК для лечения больных диссеминированными формами сарком мягких тканей, указывают на перспективность этого подхода для терапии пациентов с исчерпанными возможностями стандартного лечения, в частности, в случае химиорезистентных форм опухоли. Существует необходимость совершенствовать критерии выбора тактики лечения пациентов при назначении специфической иммунотерапии, основанные на гистологической, молекулярно-генетической, иммунологической характеристике

Таблица 3

Анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови больных саркомами мягких тканей в процессе ДК-вакцинотерапии

№	Измеряемый показатель (х109 кл/л)	SD (n=5)					PD (n=3)			
		1	2	3	4	7	1	2	3	4
1	CD3+CD19-	1,61±0,17	1,62±0,30	1,46±0,22	1,73±0,11	1,71±0,13	1,07±0,16	***0,88±0,07***	1,04±0,58	***0,37±0,05***
2	CD3-CD19+	0,13±0,02	0,18±0,06	0,18±0,09	0,19±0,09	0,19±0,08	0,11±0,04	0,18±0,03	***0,002***	***0,002***
3	CD3+CD4+	0,79±0,06	0,85±0,09	0,72±0,13	0,80±0,10	0,86±0,06	***0,49±0,12***	***0,48±0,12***	0,80±0,09	***0,11±0,02***
4	CD3+CD4+HLADR+	**0,054±0,01**	**0,057±0,01**	0,036±0,006	**0,069±0,021**	**0,085±0,018**	0,049±0,003	0,015	0,041±0,016	0,012
5	CD4+CD25+	0,26±0,06	0,31±0,09	0,17±0,03	0,21±0,03	0,32±0,04	0,07±0,01	***0,13±0,06***	***0,12±0,09***	0,03
6	CD3+CD8+	0,76±0,13	0,76±0,23	0,63±0,13	0,83±0,15	0,78±0,11	0,52±0,02	***0,35±0,02***	0,46±0,04	***0,10***
7	CD3+CD8+HLADR+	0,06±0,02	0,07±0,02	0,04±0,01	**0,20±0,05**	**0,17±0,01**	**0,16±0,01**	***0,004***	0,064±0,022	0,021
8	CD3+CD4+CD8+	0,028±0,009	0,032±0,008	0,027±0,003	0,032±0,005	0,033±0,004	***0,011±0,001***	***0,011±0,005***	0,015±0,001	***0,003***
9	CD3-CD16+CD56+	**0,38±0,09**	**0,31±0,12**	0,19±0,04	0,24±0,03	**0,33±0,12**	0,25±0,07	0,16±0,01	0,22±0,04	0,07
10	CD3+CD16+CD56+	0,11±0,03	0,11±0,05	0,11±0,04	0,12±0,05	0,10±0,05	***0,05±0,003***	***0,02±0,006***	***0,06±0,002***	***0,03***
11	$CD4+CD25^{bright}CD127^{low}$	0,044±0,003	0,057±0,010	0,044±0,006	0,05±0,004	0,052±0,001	0,046±0,009	0,053±0,009	0,067±0,003	0,087

000-повышенный показатель, ***000***-пониженный показатель, 000-показатель в пределах референсных значений

первичной опухоли и ее метастазов. Изучение иммунологических особенностей отдельных подтипов сарком мягких тканей и последовательная разработка новых подходов иммунотерапии позволит повысить эффективность лечения этой сложной, гистотипически многообразной группы злокачественных новообразований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акинфиева О.В., Бубнова Л.М., Бессмельцев С.С. NKT-клетки: характерные свойства и функциональная значимость для регуляции иммунного ответа // Онкогематология. — 2010. — № 4. — P. 39-48
2. Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Михайлова И.Н., Петенко Н.Н. Вакцинотерапия рака: от эксперимента к клинике // Вестн. Росс. Акад. Мед. наук. — 2007. — № 10. — С. 46-48.
3. Михайлова И.Н., Иванов П.В., Петенко Н.Н. Внутрикожная клеточная реакция на фоне вакцинотерапии меланомы кожи // Росс. биотерап. журнал. — 2010. — № 1. — С. 63-67.
4. Нехаева Т.Л. Оптимизация аутологичных дендритноклеточных вакцин для лечения больных злокачественными новообразованиями // Сиб. онкол. журнал. — 2013. — № 3 (57). — С. 52—56.
5. Caballero O.L., Chen Y.T. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy // Cancer Sci. — 2009. — Vol. 100 (11). — P. 2014-2021.
6. Dagher R., Long L.M., Read E.J. et al. Pilot trial of tumor-specific peptide vaccination and continuous infusion interleukin-2 in patients with recurrent Ewing sarcoma and alveolar rhabdomyosarcoma: an inter-institute NIH study // Med. Pediatric Oncol. — 2002. — Vol. 38 (3). — P. 158–164.
7. Dillman R., Barth N., Selvan S., et al. Phase I/II trial of autologous tumor cell line-derived vaccines for recurrent or metastatic sarcomas // Cancer Biother. Radiopharm. — 2004. — Vol. 19 (5). — P. 581–588.
8. Emori M., Tsukahara T., Kawaguchi S., Wada T. Peptide vaccination therapy for bone and soft tissue sarcoma // Nihon Rinsho. — 2011. — Vol. 69 (9). — P. 1670–1673.
9. Ferry J.A., Sohani A.R., Longtine J.A. et al. HHV8-positive, EBV-positive Hodgkin lymphoma-like large B-cell lymphoma and HHV8-positive intravascular large B-cell lymphoma // Mod. Pathol. — 2009. — Vol. 22 (5). — P. 618-626.
10. Geiger J.D., Hutchinson R.J., Hohenkirk L.F. et al. Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression // Cancer Research. — 2001. — Vol .61 (23). — P. 8513–8519.
11. Ida K., Kawaguchi S., Sato Y. et al. Crisscross CTL induction by SYT-SSX junction peptide and its HLA-A2402 anchor substitute // J.Immunol. — 2004. — Vol. 173(2). — P. 1436–1443.
12. Imyanitov E.N., Suspitsin E.N., Buslov K.G. et al. Isolation of nucleic acids from paraffin-embedded archival tissues and other difficult sources / in Kieleczawa J. (ed): The DNA Book: Protocols and Procedures for the Modern Molecular Biology Laboratory // Sudbury, MA, Jones and Bartlett Publishers, 2006. — P. 85–97.
13. Kawaguchi S., Wada T., Ida K. et al. Phase I vaccination trial of SYT-SSX junction peptide in patients with disseminated synovial sarcoma // J. Translational Med. — 2005. — Vol. 3. — P. 1.
14. Maki R.G. Soft tissue sarcoma as a model disease to examine cancer immunotherapy // Curr. Opin. Oncol. — 2001. — Vol. 13 (4). — P. 270-274.
15. Maki R.G. Future directions for immunotherapeutic intervention against sarcomas // Curr. Opin. Oncol. — 2006. — Vol. 18 (4). — P. 363-368.
16. Pollack S.M., Loggers E.T., Rodler E.T. et al. Immune-based therapies for sarcoma // Sarcoma. — 2011. — Vol. 2011. — P. 438940.
17. Robbins P.F., Morgan R.A., Feldman S.A. et al. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1 // J. Clin. Oncol. — 2011. — Vol. 1; 29 (7). — P. 917-924.
18. Skubitz K.M., Pambuccian S., Carlos J.C., Skubitz A.P.N. Identification of heterogeneity among soft tissue sarcomas by gene expression profiles from different tumors // J. Translational Medicine. — 2008. — Vol. 6. — P. 23.
19. Suminoe A., Matsuzaki A., Hattori H. et al. Immunotherapy with autologous dendritic cells and tumor antigens for children with refractory malignant solid tumors // Pediatric Transplantation. — 2009. — Vol. 13 (6). — P. 746–753.
20. Xie S., Wu X., Zhang G. et al. Remarkable regression of a lung recurrence from an undifferentiated embryonal sarcoma of the liver treated with a DC vaccine combined with immune cells: A case report // Cell Immunol.– 2014. — Vol. 290 (2). — P. 185-189.

Поступила в редакцию 30.10. 2014 г.

I.A.Baldueva, A.B.Danilova, A.V.Novik, Yu.I.Komarov, T.L.Nekhaeva, S.A.Protsenko, A.I.Semenova, N.P.Pipia, E.V.Vorobeichikov, A.P.Karitsky, V.F.Klimashevsky, E.N.Imyanitov, A.M.Belyaev

Dendritic cells activated by cancer-testis antigens (CTA+) in treatment of metastatic soft tissue sarcomas

N.N.Petrov Research Institute of Oncology
St. Petersburg

Results of clinical and immunological assessment of autologous dendritic cells (DC) primed with cancer-testis antigens (CTA+DC) are presented in this paper. Nine patients were treated from 2012 to 2014. CTA+DC were obtained from adhesive CD14+ monocytes fraction from peripheral blood of patients. Tumor cell lysate of autologous and/or allogeneic tumor cells expressing immunogenic CTA were used for immature CD1a+ DC load. Mature CD83+ DC were injected intradermal 3 days after IM injection of 300 mg of cyclophosphamide for T-regulatory cells depletion. Interleukin-1beta (Betaleukin) was used as immunologic adjuvant (40000 ME). Nine patients received from 1 to 24 injections of CTA+DC (average – 7) and were evaluable for toxicity and efficacy (bot clinical and immunologic). No objective responses were seen. Stable disease was obtained in 5 (56%) patients. In 4 patients (44%) disease was stable >6 month, in 2 (22%) patients - >12 month. One patient was stable for 17 month. Neither serious adverse events nor grade 3 or 4 adverse events (AE) were registered. Grade 1 or 2 AE were seen in 6/9 patients. No therapy for this AE was needed. DHT reactions was registered in 7/9 patients (78%). Tendency for increasing number of activated T-cells and decreasing of regulatory T-cells was seen in peripheral blood during patients' vaccination.

Key words: dendritic cells, immunotherapy, vaccinotherapy, cancer-testis antigens, soft tissue sarcoma