

*И.А. Балдуева¹, А.В. Новик¹, Т.Л. Нехаева¹, А.Б. Данилова¹, С.А. Проценко¹,
М.Л. Гельфонд^{1,2}, Н.П. Пупин¹, Н.В. Емельянова¹, Н.А. Авдонкина¹, О.А. Галиуллина¹,
А.И. Семёнова¹, Г.М. Телетаева¹, Д.Х. Латипова¹, Ю.И. Комаров¹, Е.М. Анохина¹,
З.С. Котова¹, Т.Ю. Семглазова^{1,2}, А.М. Щербаков^{1,2}, А.М. Беляев^{1,2}*

Перспективы активной специфической иммунотерапии аутологичными незрелыми костномозговыми дендритными клетками с фотодинамической терапией и циклофосфамидом у больных диссеминированной меланомой, резистентных к стандартным методам лечения

¹ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России,
²ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России,
Санкт-Петербург

Представлены результаты клинического и иммунологического исследования активной специфической иммунотерапии аутологичными незрелыми костномозговыми дендритными клетками (ДК) с фотодинамической терапией (ФДТ) и циклофосфамидом (ЦФ) больных диссеминированной меланомой, резистентных к стандартным методам лечения. В исследование включено 27 больных, получавших лечение в НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова с 2007 по 2016 г. Иммунотерапию ДК-вакциной проводили в режиме 21-дневных циклов. Методология проведения терапии заключалась в 1) приготовлении вакцинного препарата на основе костномозговых ДК с иммунофенотипом CD34/CD14/CD1a⁺/CD83/CD80⁺/CD86⁺/HLA-DR⁺; 2) введения за 3 дня до начала лечения ЦФ в дозе 300 мг внутримышечно для элиминации Т-лимфоцитов с иммуносупрессирующей активностью; 3) сеанса фотодинамической терапии 4) 5-кратном введении вакцинного препарата в облученные опухолевые очаги (разовая доза 1x10⁶ ДК-клеток/кг массы тела больного).

Клиническая и иммунологическая оценка эффективности ДК-ФДТ иммунотерапии была проведена у 27 больных диссеминированной меланомой, из них 14 (52%) получили 1-2 цикла ДК-ФДТ иммунотерапии, 13 (48%) – 3 и более циклов. Полный регресс не был зарегистрирован. Частичный регресс – у 2 пациентов (7,4%), стабилизация опухолевого процесса – у 8 больных (29,6%). У 17 (63%) пациентов наблюдалось прогрессирование заболевания. Установлено, что ДК-ФДТ иммунотерапия не вызывает нежелательных явлений (НЯ) 4-5 ст., у 4% пациентов зарегистрированы лейкоцитоз или лихорадка 3 ст., у 54% пациентов отмечены НЯ 1-2 ст.

Иммунологический мониторинг выявил достоверное снижение иммунорегуляторного индекса за счет преобладания цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) в периферической крови больных с положительной клинической динамикой и тенденцию к увеличению абсолютного содержания активированных Т-хелперов и ЦТЛ на фоне низкого содержания регуляторных Т-лимфоцитов. Использование иммуномодулирующих эффектов ФДТ и ЦФ перед каждым 21-дневным циклом ДК-ФДТ иммунотерапии позволило достичь увеличения медианы общей выживаемости в 8,4 мес. у больных с исчерпанными возможностями стандартного лечения.

Ключевые слова: дендритные клетки, иммунотерапия, фотодинамическая терапия, диссеминированная меланома

Принципиально новые аспекты в индукции противоопухолевого иммунного ответа возникают в связи с изучением роли «высокопрофессиональных» дендритных клеток (ДК) в презентации опухолеассоциированных антигенов (ОАА). Установлено, что опухоли могут уклоняться от прямого действия цитотоксических Т-лимфоцитов в результате дефектов их «опухолераспознающих» рецепторов, а также из-за недостаточной эффективности перекрестной презентации опухолевых антигенов антиген-презентирующими ДК.

Показано, что Т-клетки распознают иммуногенный (пептид-МНС) комплекс на поверхностной мембране ДК в результате агрегации рецепторов с образованием центрального супрамолекулярного активационного комплекса в зрелом иммунологическом синапсе. Индукция адаптивных иммунных ответов требует прямого взаимодействия высокоспецифических ДК

с «наивными» Т-лимфоцитами. ДК являются чрезвычайно интересной мишенью для терапевтических манипуляций иммунной системой, способной изменить соотношение «опухоль – организм хозяина» в пользу хозяина и увеличить интенсивность иммунного ответа, направленного на опухоль. Вместе с тем, вакциноterapia ДК может быть неэффективной вследствие узкой специфичности иммунизирующих эпитопов или одного иммуногенного эпитопа.

Установлено, что использование полиэпитопных иммуногенных ОАА облегчает индукцию/активацию Т-лимфоцитов с различными специфичностями их клеточных рецепторов, которые могут лучше контролировать заболевание и предотвращать уклонение опухоли от иммунобиологического надзора; способ введения ДК-вакцины является очень важным фактором успешной противоопухолевой вакцинотерапии. Несмотря на то, что ДК, нагруженные антигеном, могут непосредственно активировать Т-клетки в местах их введения, необходимо принимать во внимание способ введения ДК, так как от этого может зависеть качество иммунного ответа [7, 9, 11, 14, 16, 25].

В ранних работах М. Korbelik и соавт. [12,13] было показано, что вакцинация СЗН/HeN мышей, подвергавшихся фотодинамической терапии (ФДТ), слабоиммуногенной культурой опухолевых клеток плоскоклеточного рака SCCVII в апоптозе приводит к активации цитотоксических Т-лимфоцитов, регрессу опухоли и устойчивости к повторной прививке этой формы рака. Введение незрелых ДК в ФДТ «леченую» аденокарциному С-26, растущую в BALB/c мышях, активирует CD8⁺ цитотоксические Т-клетки, NK-клетки и вызывает полный регресс опухоли у большинства экспериментальных животных.

В пилотном исследовании В.М. Моисеенко и соавт. [6] было показано, что введение незрелых костномозговых ДК в опухолевые очаги, доступные для ФДТ, у больных с диссеминированной меланомой кожи, резистентных к химиотерапии и иммунотерапии, вызывало стабилизацию заболевания, частичный или полный регресс отдельных метастатических очагов у 2 (40%) из 5 больных. Это, наряду с безопасностью и клинической эффективностью метода, его последующей стандартизацией и регистрацией медицинской технологии [5], позволило считать костномозговые ДК, сенсibilизированные фотомодифицированными опухолевыми клетками в иммуногенной апоптотической форме, перспективными кандидатами для активной специфической иммунотерапии пациентов с распространенной меланомой, резистентных к стандартному лекарственному лечению.

Материалы и методы

В исследование после подписания информированного согласия включено 27 больных: 7 (25,9%) мужчин и 20 (74,1%) женщин с верифицированным гистологическим диагнозом метастатической формы меланомы, получавших лечение в ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России в период с 2007 по 2016 год. Критериями включения в исследование были: возраст старше 18 лет, общее удовлетворительное состояние (ECOG<3), наличие доступных для ДК-ФДТ-терапии опухолевых очагов. Критериями невключения были метастатические поражения центральной нервной системы с неврологической симптоматикой, активный аутоиммунный процесс, наличие признаков острого или обострение хронического инфекционного заболевания, нарушение функции печени, почек, костного мозга, беременность или лактация. Четырнадцать больных (52%) получили 1 или 2 цикла ДК-ФДТ иммунотерапии, 13 (48%) пациентов – 3 и более циклов ДК-ФДТ иммунотерапии.

В табл. 1 представлена клиническая характеристика пациентов, получавших ДК-ФДТ иммунотерапию.

Средний возраст пациентов 48,9 лет (от 25 до 74 лет). Все больные ранее получали лекарственное лечение. Хирургические операции были выполнены у 25 (93%) пациентов, лучевая терапия – у 6 (22%). Предшествующая иммунотерапия проведена у 17 (63%) больных: 1) цитокинотерапия, преимущественно интерферон-альфа – у 14 (52%) пациентов; 2) ингибиторы контрольных точек: CTLA-4 (ипилиумаб или тремелиумаб) – у 6 (22%) больных, PD-1 ингибиторов (ниволумаб у 1 (4%) больного); 3) иммуномодуляторы: рефнол или ингарон; 4) BRAF ингибиторы применялись у 4 (15%) пациентов до начала терапии (вемурафениб или дабрафениб – у 3 больных, комбинация дабрафениба и траметиниба у 1 пациента). Химиотерапия была проведена у 19 (70%) больных, преимущественно, в виде монотерапии дакарбазином (14 больных, 52%). Также пациенты получали полихимиотерапию и химиоиммунотерапию (комбинации интерферона-альфа и полихимиотерапии на основе алкилирующих агентов) у 5 (19%) больных.

На момент начала ДК-ФДТ иммунотерапии у 20 (74%) больных были выявлены висцеральные метастазы либо повышение уровня ЛДГ (M1c стадия), у 2 (7,4%) пациентов метастазы в легких (M1b), у 3 (11,1%) больных – изолированное поражение кожи и/или метастазы в лимфатических узлах (M0 неоперабельные или M1a стадия). У 2 больных подстадия M не установлена вследствие отсутствия сведений об уровне ЛДГ при наличии изолированного поражения кожи и периферических лимфатических узлов.

Все пациенты проходили комплексное обследование, включающее стандартные клинические, лабораторные, рентгенологические и ультразвуковые методы исследования до начала терапии и регулярно в течение всего лечения в соответствии с выбранными методами оценки безопасности и эффективности терапии.

Исследование иммунологических показателей проводилось перед каждым циклом иммунотерапии с помощью современных технологий: 1) иммуноцитохимии, 2) проточной цитометрии, 3) ELISpot анализа, 4) иммуноферментного анализа, а также 5) оценки реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) через 24 и 48 часов после внутривенной инъекции пула стандартизированных раково-тесткулярных антигенов собственного производства.

Технология приготовления вакцины на основе костномозговых дендритных клеток заключалась в мобилизации миелоидных предшественников ДК из костного мозга в периферическую кровь с помощью гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора (5 мкг/кг массы тела подкожно в течение 4-5 дней), операции афереза, дифференцировки миелоидных предшественников в незрелые ДК в течение

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов, получавших ДК-ФДТ иммунотерапию

Характеристика абс.		1-2 цикла		3 и более циклов		p	Всего	
		абс.	%	абс.	%		абс.	%
Всего больных		14	52	13	48	-	27	100
Количество циклов терапии		21	27	57	73	0,001	78	100
Медиана длительности наблюдения, мес.		4,1		9,6		-	4,8	
Количество цензурированных наблюдений (время до прогрессирования)		1	7,1	2	15,4	0,49	3	11,1
Количество цензурированных наблюдений (общая выживаемость)		5	35,7	5	38,5	0,88	10	37
Пол	мужчины	3	21,4	4	30,8	0,58	7	25,9
	женщины	11	78,6	9	69,2		20	74,1
Возраст, лет	средний	47,6		50,2		0,61	48,9	
	диапазон	25-74		28-64			25-74	
Стадия М	0	1	7,1	0	0	0,5	1	3,7
	1 ¹	1	7,1	1	7,7		2	7,4
	1a	1	7,1	1	7,7		2	7,4
	1b	0	0	2	15,4		2	7,4
	1c	11	78,5	9	61,5		20	74,1
Локализация метастазов	Кожа и мягкие ткани	13	92,9	10	76,9	0,23	23	85,2
	Отдаленные лимфатические узлы	8	51,7	9	69,2	0,51	17	63
	Печень	3	21,4	3	23,1	0,91	6	22,2
	Легкие	5	35,6	7	53,8	0,34	12	44,4
	Надпочечник	3	21,4	2	15,4	0,69	5	18,5
	Кости	1	7,1	1	7,7	0,95	2	7,4
	Головной мозг	2	14,3	3	23,1	0,55	5	18,5
Линия терапии	1	2	14,3	5	38,5	0,36	7	25,9
	2	1	7,1	2	15,4		3	11,1
	3	5	35,7	2	15,4		7	25,9
	4	5	35,7	3	23,1		8	29,6
	≥5	1	7,1	1	7,7		2	7,4
Линия иммунотерапии	1	2	14,3	5	38,5	0,28	7	25,9
	2	1	7,1	2	15,4		3	11,1
	3	5	35,7	2	15,4		7	25,9
	≥4	6	42,8	4	30,8		10	37
Вид предшествующего лечения	Лучевая терапия	5	36	1	8	0,25	6	22
	Хирургическое лечение	14	100	11	85		25	93
	Иммунотерапия	10	71	7	54		17	63
	-Интерферон-альфа	7	50	7	54		14	52
	- ДК-вакцины	7	50	0	0		7	26
	- Ингибиторы CTLA-4	1	7	5	38		6	22
	- Ингибиторы PD-1	1	7	0	0		1	4
	-Прочее	6	43	0	0		6	22
	BRAF ингибиторы	3	21	1	8		4	15
	Химиотерапия	12	86	7	54		19	70
-Дакарбазин	9	64	5	38	14	52		
-Полихимио-терапия	3	21	0	0	3	11		
-Химиоиммуно-терапия	1	7	1	8	2	7		

M^{1*} – выделение подстадии не представляется возможным

5 дней. Использовали безывороточную сбалансированную питательную среду «CellGro DC» (CellGenix, Германия), ростовые факторы и факторы дифференцировки: гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (72 нг/мл, Фармсинтез, Россия) и интерлейкин-4 (20 нг/мл CellGenix, Германия), которые вносились на 1-й и 3-й день культивирования. При соблюдении вышеуказанных условий получали от 2 до 5x10⁹ и более клеток с жизне-

способностью не менее 98% и иммунофенотипом CD34⁻/CD14⁻/CD1a⁺/CD83⁻/CD80⁺/CD86⁺/HLA DR⁺.

Дифференцировку вакцинных ДК регистрировали с помощью иммуноцитохимического метода или проточной цитометрии, которые позволяют оценить процесс созревания клеток и экспрессию дифференцировочных антигенов.

При введении в ФДТ-облученный опухолевый очаг ДК ресуспендировались в 1,0-4,5 мл 0,9% раствора NaCl,

содержащего альбумин человека (конечная концентрация 2%). Разовая доза ДК [$1,0 \times 10^6$ клеток/кг массы тела больного ($7-10 \times 10^7$ клеток)] вводилась по периферии ФДТ-модифицированного опухолевого очага, в общей сложности в 9 точек по 0,5 мл. В очаг вводилось не менее 1 мл вакцинного препарата на 1 см опухолевого очага.

Остальные ДК помещались в криосреду (90% аутологичной плазмы и 10% диметилсульфоксида) (Sigma, США) и индивидуальные маркированные криопробирки (NuncCryoTube, США). В дальнейшем проводилась криоконсервация с помощью программного замораживателя «Ice-Cube 14S» (Австрия) с контролируемой скоростью охлаждения, составляющей $-1^\circ\text{C}/\text{мин}$ в диапазоне от $+4^\circ\text{C}$ до -4°C , и $-5^\circ\text{C}/\text{мин}$ в диапазоне от -40 до -12°C . После этого образцы помещались в жидкий азот (-196°C), где хранились до использования.

Иммунотерапия ДК-вакциной проводилась в режиме 21-дневных циклов. В день 0 пациенты получали 300 мг циклофосфида внутримышечно с целью элиминации Т-лимфоцитов с иммуносупрессирующей активностью. В день 4 21-дневного цикла проводилась фотодинамическая терапия с введением солей хлорина в дозе 1 мг/кг массы тела, облучением опухолевого очага красным светом с длиной волны 662 нм в дозе 400 Дж через 2 часа после введения фотосенсибилизатора. Через 6 час свежие или размороженные ДК вводили в ФДТ-облученный опухолевый очаг. Введение продолжалось ежедневно с 4-го по 8-й дни 21-дневного цикла ДК-ФДТ иммунотерапии.

Токсичность оценивали по шкале NCI CTC AE v.3. Оценка эффективности лечения осуществлялась по критериям RECIST. Время до прогрессирования определяли как время от первого введения лекарственных средств в 1 цикле (начало лечения) до выявления признаков прогрессирования заболевания, общую выживаемость — от начала лечения до смерти больного от любой причины. При отсутствии данных за прогрессирование на момент смерти наблюдение оставалось неполным.

Статистическую обработку осуществляли с помощью пакета программ SPSS 18. Для анализа использовались описательные статистики, точный критерий Фишера, метод Каплана-Майера и метод пропорциональных рисков Кокса.

Результаты и обсуждение

В исследование были включены пациенты с распространенным опухолевым процессом, низкой ожидаемой эффективностью зарегистрированного в РФ лекарственного лечения и низкой

ожидаемой продолжительностью жизни. Вместе с тем, понимание возможности увеличения времени до прогрессирования и общей выживаемости, повышение эффективности системы организации медицинской помощи на основе обеспечения доступности для населения эффективных технологий оказания медицинской помощи (Государственная программа развития здравоохранения, Концепция-2020) позволило провести клиническую и иммунологическую оценку перспективной технологии у этой категории больных.

Применение ДК-ФДК иммунотерапии позволяло достичь клинического эффекта у 37% больных и объективного ответа у 7,4% пациентов. Клиническая эффективность ДК-ФДТ иммунотерапии представлена в табл. 2.

Судя по представленным данным, медиана времени до прогрессирования в целом по двум группам больных (1 гр. получила 1-2 цикла иммунотерапии; 2 гр. — 3 и более циклов), составила 2,5 мес. (1,8 и 4 мес. соответственно); медиана общей выживаемости, соответственно 2,5 и 8,4 мес. (рис. 1 и 2).

При сравнении 2-х групп больных статистически значимых различий не было получено. Вместе с тем, обращает на себя внимание большая интенсивность предшествующего лечения у этих пациентов, что позволяет предположить наличие у них более резистентных форм заболевания.

ДК-ФДТ иммунотерапия удовлетворительно переносилась большинством пациентов. Серьезных нежелательных явлений, нежелательных явлений 4-5 ст., связанных с терапией, не наблюдалось, за исключением 4% больных, у которых были выявлены лейкоцитоз или лихорадка 3 ст., а также болезненность в месте введения, требовавшая обезболивания слабыми опиатами. Наиболее частым нежелательным явлением был гриппоподобный синдром 1–2 ст., отмечавшийся у 54% пациентов.

Таблица 2. Клиническая эффективность ДК-ФДТ иммунотерапии у больных диссеминированной меланомой с исчерпанными возможностями лекарственного лечения

Показатель	1-2 цикла	3 и более циклов	p	Всего
Полный регресс (%)	0	0	0,018	0
Частичный регресс (%)	1 (7,1%)	1 (7,7%)		2 (7,4%)
Объективный ответ (%)	1 (7,1%)	1 (7,7%)		2 (7,4%)
Стабилизация (%)	1 (7,1%)	7 (53,8%)		8 (29,6%)
Клинический эффект (%)	2 (14,3%)	8 (61,5%)		10 (37%)
Прогрессирование (%)	12 (85,7%)	5 (38,5%)		17 (63%)
Время до прогрессирования (медиана, мес.)	1,8	4	0,001	2,5
95% ДИ	0,4-3,3	2,7-5,3		1,7-3,3
1-летняя выживаемость без прогрессирования	0	9	40	5
Общая выживаемость (медиана, мес.)	4,8	10,9	0,036	8,4
95% ДИ	3,3-6,3	1,3-20,6		4,2-20,6
1-летняя общая выживаемость	26	47		37

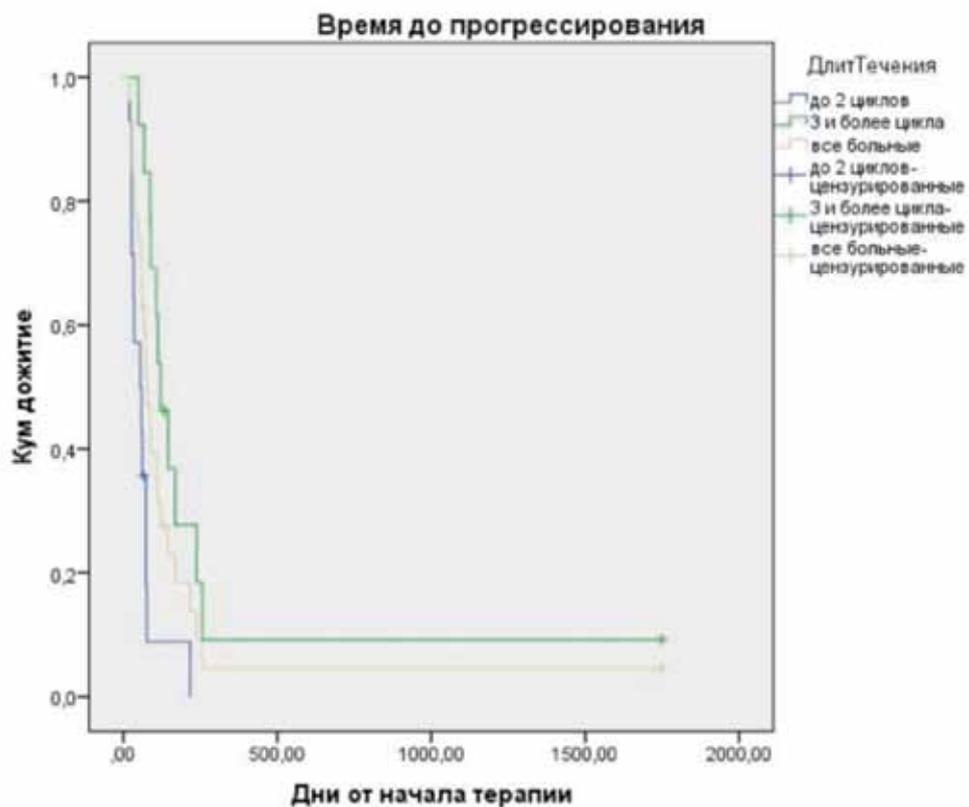


Рис. 1. Кривые времени до прогрессирования опухолевого процесса у больных диссеминированной меланомой, получавших ДК-ФДТ иммунотерапию

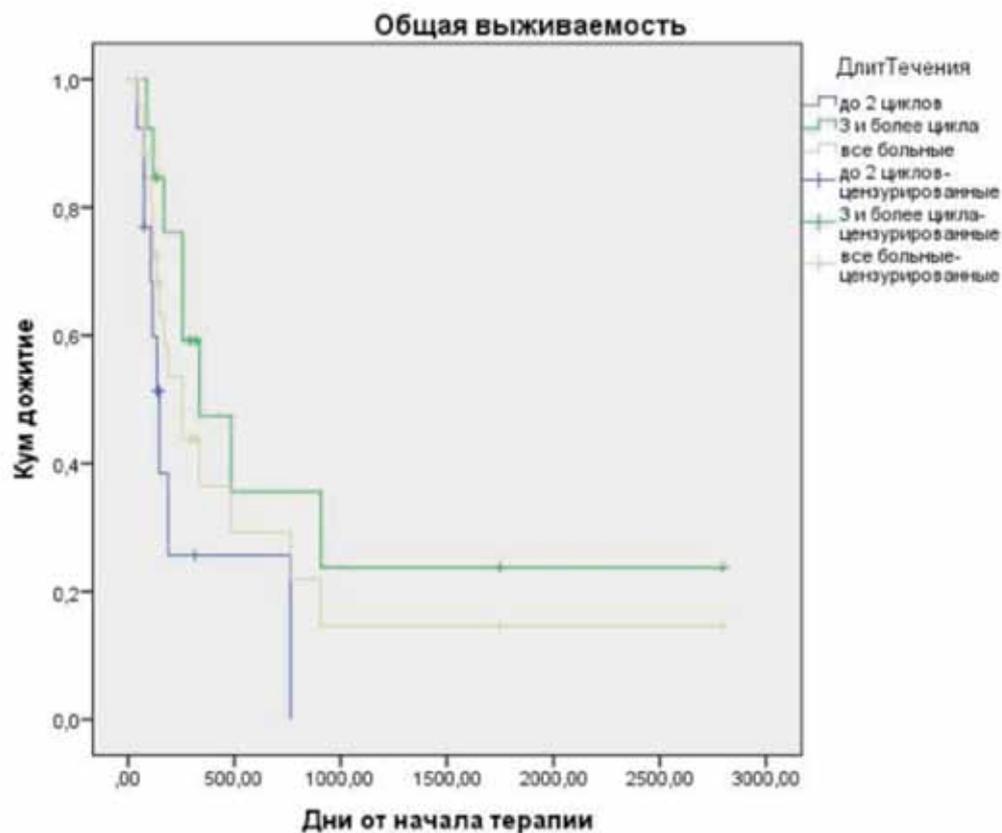


Рис. 2. Кривая общей выживаемости больных диссеминированной меланомой, получавших ДК-ФДТ иммунотерапию

Заслуживающими внимания оказались наблюдения за пациентами, которым было продолжено лечение. Так, у одной пациентки (А., 55 лет) из 2-х больных, достигших частичного регресса, была произведена неполная циторедуктивная операция и вакциноterapia продолжена с помощью зрелых аутологичных ДК, нагруженных раково-тестикулярными антигенами, которая продолжалась в течение последующих 2,5 лет. Эффект терапии без признаков прогрессирования опухолевого процесса у этой пациентки сохраняется уже более 4-х лет. У другой больной (К., 54 лет), получившей 3 цикла ДК-ФДТ иммунотерапии, наблюдалось прогрессирование опухолевого процесса через 3 мес. от начала лечения. Однако продолжительность ее жизни составила более 7 лет.

Результаты клинической эффективности, полученные в нашем исследовании, полностью согласуются с результатами работ, основанных на применении дендритноклеточных технологий, использующих полиэпитопные антигены и зрелые ДК (на сегодняшний день в доступной литературе нет аналогов клинических исследований по использованию незрелых костномозговых ДК).

Так, в работе С. Oshita и соавт. [15] частота объективных ответов составила 4% (95% ДИ 0-15%), а клинический эффект был достигнут у 29% (95% ДИ 11-47%) пациентов. В исследовании Е. Ellbaek и соавт. [10] не наблюдали объективных ответов, но у 56% пациентов была отмечена стабилизация заболевания. Медиана общей выживаемости больных в этом исследовании составила 9,4 мес. R. Teriakis и соавт. [21] отмечали стабилизацию заболевания у 24% пациентов, при этом медиана общей выживаемости была 9 мес. Похожие результаты были получены А. Ribas с соавт. – контроль роста опухоли у 27% больных [17]. Наши собственные данные свидетельствуют о схожей эффективности подобных вакцин: у пациентов с диссеминированной меланомой, получавших ДК-вакцину на основе зрелых ДК, нагруженных раково-тестикулярными антигенами, частота объективного ответа составила 4%, клиническая эффективность – 38% при медиане общей выживаемости в 11,5 мес [1]. Несколько выпадает из этого ряда работ исследование R.O. Dillman с соавт. [8], где 24% больных имели 4 стадию заболевания, при этом медиана общей выживаемости составила 18,8 мес. и авторы отмечают высокую безопасность данной технологии.

Необходимо отметить, что в настоящее время, достигнут существенный прорыв в лечении диссеминированной меланомы благодаря новым лекарственным препаратам – ингибиторам иммунологического синапса (immune checkpoint

inhibitor). Так, эффективность ингибиторов PD1, в настоящее время, приближается к 26-32% при использовании их во 2-й и последующих линиях лекарственного лечения [19, 23, 24]; медиана общей выживаемости превышает 24 мес. Вместе с тем, возможность терапии ингибиторами контрольных точек не снижает значимость описываемой нами технологии, которая обладает принципиально иным механизмом действия – стимулирует образование выраженной лимфоидной инфильтрации в отдаленных, не подвергнутых облучению, опухолевых очагах (рис. 3.) [5]. Именно такая лимфоидная инфильтрация является необходимым условием для достижения эффекта ингибиторов PD-1 [22].

Тезис о возможном отсроченном эффекте вакцинотерапии и влиянии его на эффективность последующего лечения поддерживается результатами исследования R. Ridolfi и соавт. [18], где эффективность химиоиммунотерапии больных меланомой кожи после вакцинотерапии составила 63,6%, тогда как без этой комбинации эффект описан только для 30% случаев [20].

При анализе результатов лабораторного иммунологического обследования наблюдали различную динамику иммунологических показателей у больных с положительным клиническим эффектом (частичный регресс или стабилизация процесса) (КЭ) и прогрессированием заболевания (ПЗ), которые получили 2 и более цикла иммунотерапии. В процессе лечения обнаружили отличия в количественном изменении содержания Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) и цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) (CD3⁺CD8⁺) у пациентов с КЭ и ПЗ, что нашло выражение в определении иммунорегуляторного индекса (табл. 3, рис. 4), этот показатель был достоверно выше у больных с PD на протяжении нескольких циклов вакцинотерапии, что свидетельствовало о преобладании субпопуляции ЦТЛ у больных с положительной клинической динамикой. При этом у больных с КЭ на протяжении трех циклов вакцинотерапии количественное содержание активированных ЦТЛ (CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺) было существенно выше, чем у больных с ПЗ, а затем этот показатель снижался, что можно объяснить вероятной миграцией активированных ЦТЛ в тканевые структуры опухоли (рис. 4).

Что касается изменений количества Т-хелперов, экспрессирующих на своей поверхности антигены HLA-DR, их содержание увеличивалось в периферической крови пациентов с КЭ к завершению лечения, что свидетельствует о нарастании их активности, и снижалось у больных с ПЗ (рис. 6).

В нашем исследовании наблюдалось достоверное увеличение абсолютного содержания НКТ-клеток (CD3⁺CD16⁺CD56⁺), в том числе

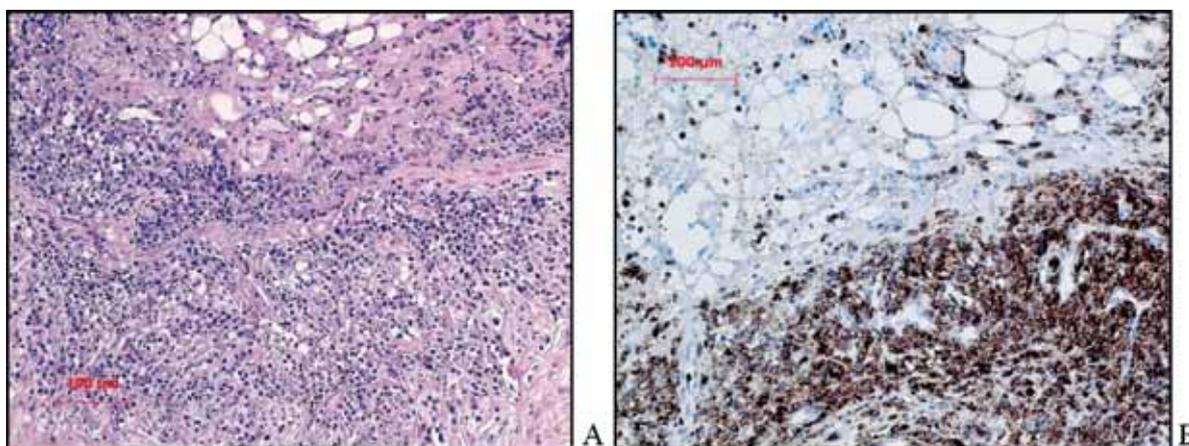


Рис. 3. Инфильтрация лимфоцитами опухолевого очага после проведения 2-х циклов ДК-ФДТ иммунотерапии. А – гематоксилин-эозин, Б – иммуногистохимическое окрашивание на общий лейкоцитарный антиген (LCA) [5]

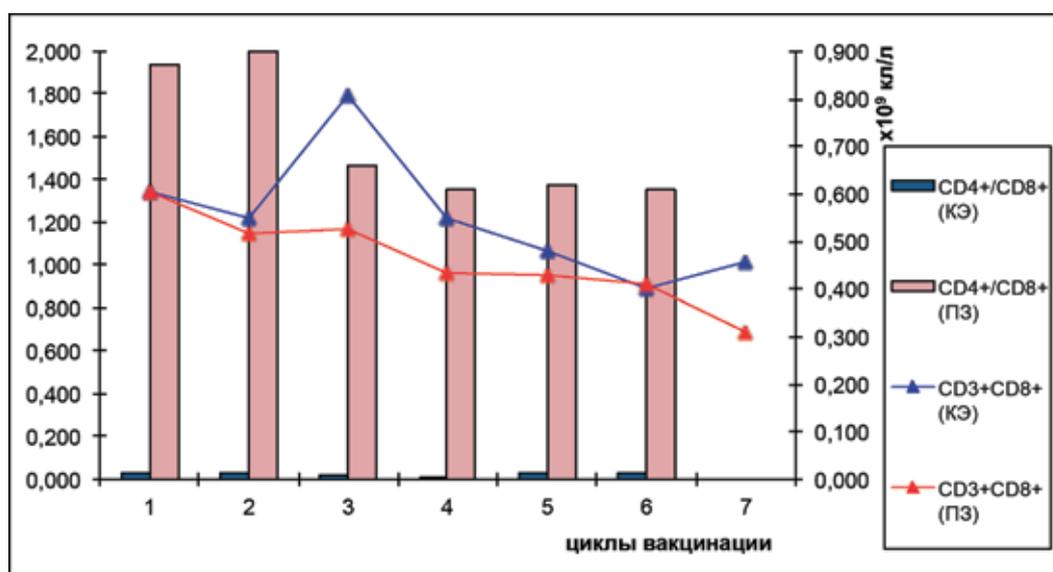


Рис. 4. Динамика количественного содержания ЦТЛ в периферической крови больных диссеминированной меланомой с различным клиническим эффектом и регуляторного индекса, выражающегося в отношении количества CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов (различия достоверны, 0,0001<p<0,02)

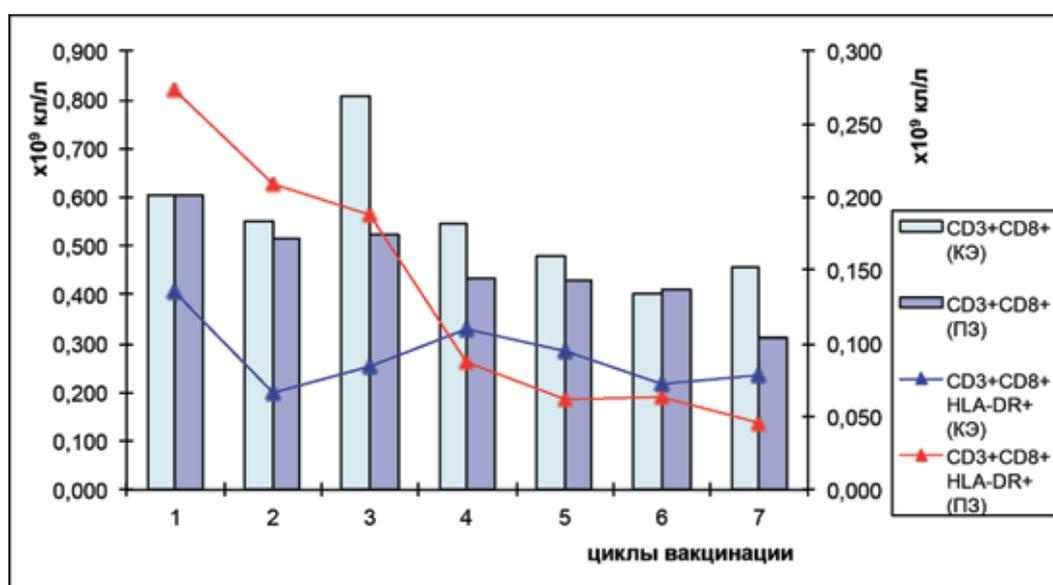


Рис. 5. Динамика абсолютного содержания цитотоксических Т-лимфоцитов и активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (HLA-DR⁺) в периферической крови больных диссеминированной меланомой с различным клиническим эффектом в процессе ДК-ФДТ иммунотерапии

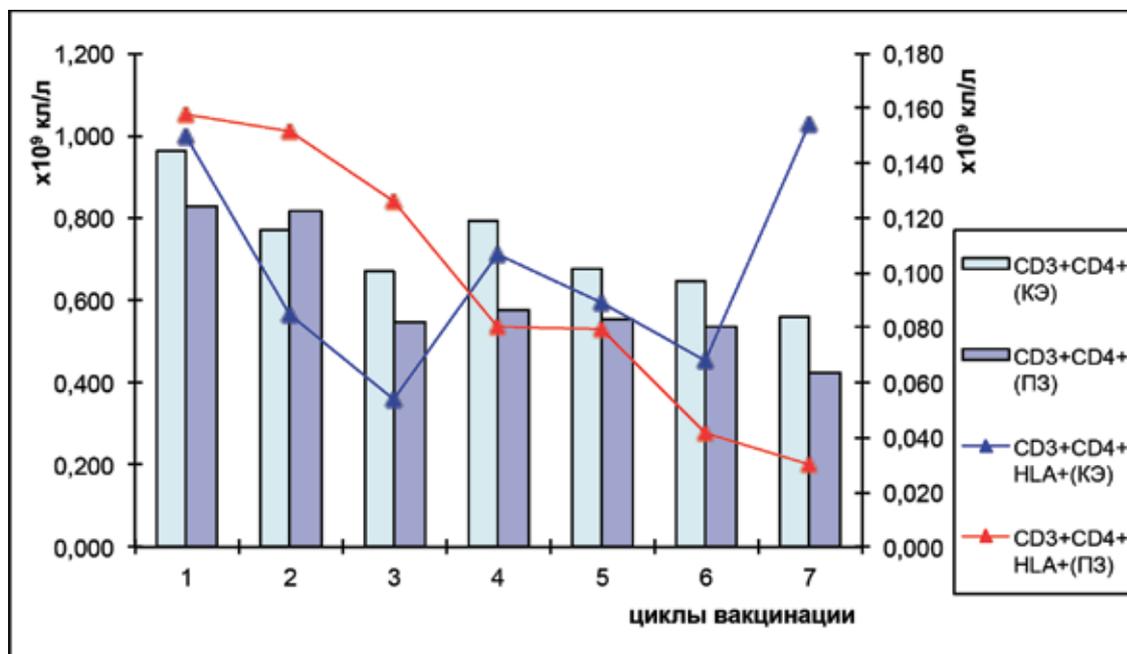


Рис. 6. Динамика абсолютного содержания Т-хелперов и активированных Т-хелперов (HLA-DR⁺) в периферической крови больных диссеминированной меланомой с различным клиническим эффектом в процессе ДК-ФДТ иммунотерапии

Таблица 3. Анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови больных диссеминированной меланомой в процессе иммунотерапии ДК-ФДТ

Измеряемый показатель (x10 ⁹ кл/л)	КЭ (n=7)					ПЗ (n=10)				
	1	2	3	4	6	1	2	3	4	6
CD3+CD19-	1,31±0,318	1,28±0,236	1,07±0,286	1,22±0,236	0,91±0,139	1,40±0,417	1,26±0,095	1,04±0,160	1,05±0,150	0,68±0,075
CD3+CD19+	0,19±0,047	0,23±0,045	0,15±0,038	0,17±0,055	0,19±0,075	0,17±0,068	0,09±0,025	0,11±0,031	0,10±0,040	0,09±0,020
CD3+CD4+	0,97±0,167	0,77±0,131	0,68±0,176	0,80±0,118	0,64±0,158	0,83±0,257	0,81±0,144	0,54±0,084	0,57±0,075	0,53±0,015
CD3+CD4+HLA-DR+	0,15±0,029	0,09±0,025	0,05±0,014	0,107±0,015	0,06±0,016	0,15±0,026	0,15±0,034	0,12±0,028	0,08±0,060	0,04±0,029
CD3+CD8+	0,60±0,087	0,55±0,141	0,81±0,425*	0,547±0,120	0,40±0,053	0,60±0,118	0,51±0,070	0,52±0,099*	0,43±0,065	0,41±0,070
CD3+CD8+HLA-DR+	0,14±0,048	0,07±0,041	0,09±0,012	0,110±0,010	0,07±0,013	0,27±0,123	0,20±0,058	0,18±0,079	0,08±0,043	0,06±0,003
CD3+CD16+CD56+	1,06±0,021*	0,04±0,019	0,19±0,157	0,026±0,010	0,05±0,032	0,21±0,095*	0,17±0,046	0,21±0,060	0,11±0,045	0,13±0,005
CD3-CD16+CD56+	0,35±0,054*	0,39±0,085	0,35±0,134	0,251±0,076	0,26±0,099	0,51±0,998*	0,34±0,101	0,29±0,089	0,09±0,010	0,13±0,005
CD4+CD25 ^{bright} CD127 ^{low}	0,06±0,003	0,05±0,024	0,03±0,005	0,041±0,009	0,04±0,002	0,04±0,011	0,04±0,006	0,03±0,005	0,03±0,015	0,03±0,008
CD3+CD4+CD8+	0,03±0,005	0,03±0,004	0,02±0,003	0,012±0,002	0,03±0,014	0,04±0,014	0,02±0,007	0,02±0,009	0,020	0,02±0,004
CD4+/CD8+	0,034±0,005*	0,03±0,004*	0,02±0,003*	0,012±0,002*	0,03±0,014*	1,93±0,600*	2,08±0,486*	1,47±0,209*	1,35±0,050*	1,35±0,250*

* — 0,0001<p<0,05

КЭ — клинический эффект (частичный регресс или стабилизация опухолевого процесса); ПЗ — прогрессирование заболевания

увеличение референсных значений, у больных с ПЗ до начала лечения; далее, в процессе ДК-ФДТ иммунотерапии, их количество снижалось и сохранялось на определенном уровне, причем у больных с КЭ, их содержание было более низким (табл. 3). В литературе нет единого мнения по поводу роли НКТ-клеток в противоопухолевом иммунитете, но тем не менее, клинические наблюдения позволяют рассматривать увеличение количества НКТ-клеток как неблагоприятный прогностический признак [4].

Абсолютное содержание естественных киллерных клеток (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) до начала ле-

чения было достоверно выше у больных с ПЗ, но затем существенно снижалось в процессе терапии, в то время как у больных с положительной клинической динамикой не наблюдали негативных количественных изменений этой популяции клеток. Учитывая, что НК-клетки рассматриваются как играющие важную роль в индукции противоопухолевого иммунного ответа, можно рассматривать тенденцию снижения численности этой субпопуляции клеток у больных с ПЗ, как неблагоприятную [3].

Субпопуляция регуляторных Т-лимфоцитов, определяемая триадой антигенов CD4⁺CD25^{bright}CD127^{low}, характеризовалась малой

численностью, не превышающей референсных значений у обеих групп пациентов, что говорит о достаточном влиянии вводимой дозы циклофосфамида, и имела более выраженную тенденцию к снижению у больных с КЭ.

Таким образом, у больных диссеминированной меланомой ДК-ФДТ иммунотерапия безопасна и не сопровождается нежелательными явлениями 3–5 ст. Направленность изменений иммунологических и клинических параметров часто оказывается неоднозначной, но позволяет в целом говорить об усилении опухолеспецифического иммунного ответа и его корреляции с клинической эффективностью.

Прогресс в этой области может быть связан с дальнейшим изучением молекулярно-генетических особенностей развития противоопухолевого иммунного ответа у пациентов с диссеминированной меланомой.

Выводы:

1. Иммунотерапия на основе аутологичных незрелых костномозговых дендритных клеток в сочетании с фотодинамической терапией и низкими дозами циклофосфамида является эффективным методом активной специфической иммунотерапии и оказывает клинически значимый противоопухолевый эффект у больных диссеминированной меланомой [частичный регресс у 7,4% больных, стабилизация опухолевого процесса у 37% пациентов].

2. ДК-ФДТ иммунотерапия хорошо переносится больными и не вызывает тяжелых местных и общих токсических реакций 4-5 ст. У 4% больных были выявлены лейкоцитоз или лихорадка 3 ст., а также болезненность в месте введения, требовавшая обезболивания слабыми опиатами. Наиболее частым нежелательным явлением был гриппоподобный синдром 1-2 ст., наблюдаемый у 54% пациентов.

3. Использование иммуномодулирующих эффектов фотодинамической терапии и циклофосфамида перед каждым 21-дневным циклом иммунотерапии аутологичными незрелыми костномозговыми дендритными клетками позволяет повысить эффективность лечебной вакцинотерапии, достичь клинической эффективности у 37% (95% ДИ 14-61%) больных и увеличения медианы общей выживаемости в 8,4 мес. у больных с исчерпанными возможностями стандартного лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балдуева И.А., Новик А.В., Нехаева Т.Л. и соавт. Успехи и перспективы клеточной иммунотерапии метастатической меланомы кожи // Злокачественные опухоли. – 2015. – № 4. – С. 19-19.
2. Балдуева И.А., Моисеенко В.М., Гельфонд М.Л. и соавт. Разработка вакцины на основе костномозговых предшественников дендритных клеток (ДК), сенсibilизированных фотомодифицированной опухолью для лечения больных с диссеминированной меланомой кожи // Мед. иммунол. – 2011. – Т. 13. – С. 447.
3. Борунова А.А., Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Кадагидзе З.Г. Изучение популяции CD16+ лимфоцитов у онкологических больных на фоне вакцинотерапии // Мед. иммунол. – 2006. – Т. 8. – № 2–3. – С. 334.
4. Кадагидзе З.Г., Черткова А.И., Славина Е.Г. НКТ-клетки и противоопухолевый иммунитет // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10. – №3. – С. 9-15.
5. Моисеенко В.М., Балдуева И.А., Гельфонд М.Л. и соавт. Иммунотерапия костномозговыми предшественниками дендритных клеток, сенсibilизированных фотомодифицированными опухолевыми клетками in vivo, больных с диссеминированными солидными опухолями. – Медицинская технология, СПб., 2011. – 23 с.
6. Моисеенко В.М., Гельфонд М.Л., Балдуева И.А. и соавт. Лечение диссеминированной меланомы вакциной на основе дендритных клеток, активированных опухолевыми клетками в состоянии фотоиндуцированного фотодитазином апоптоза // Рос. Биотер. Журнал. – 2009. – Т. 8. – № 2. – С. 37–38.
7. Bora C.R., Martinez L. Clinical development in dendritic cell based immunotherapy // J. Stem Cell Res. and Therap. – 2016. – Vol. 1. – Issue 2.
8. Dillman R. O., McClay E. F., Barth N. M. et al. Dendritic versus tumor cell presentation of autologous tumor antigens for active specific immunotherapy in metastatic melanoma: Impact on long-term survival by extent of disease at the time of treatment // Cancer Biother Radiopharm. – 2015. – Vol. 30. – Issue 5. – P.187-194.
9. Dillman R.O., Nistor G.I., Cornforth A.N. Dendritic cell vaccines for melanoma: past, present and future // Melanoma Management – 2016. – Vol.3. – № 4. – P. 273-289.
10. Ellebaek E., Engell-Noerregaard L., Iversen T. Z. et al. Metastatic melanoma patients treated with dendritic cell vaccination, interleukin-2 and metronomic cyclophosphamide: Results from a phase II trial // Cancer Immunol Immunother. – 2012. – Vol. 61– Issue 10. – P. 1791-1804.
11. Hanks B.A. Immune evasion pathways and the design of dendritic cell-based cancer vaccines // Discovery Med. – 2016. – Published on February.
12. Korbely M. PDT-associated host response and its role in the therapy outcome // Lasers Surg Med. – 2006. – Vol. 38. – Issue 5. – P. 500-508.
13. Korbely M., Stott B., Sun J. Photodynamic therapy-generated vaccines: relevance of tumour cell death expression // Br J Cancer. – 2007. – Vol. 97 (10). – P. 1381-1387.
14. Lesterhuis W.L., de Vries J.M., Schreiber G. et al. Route of administration modulates the induction of dendritic cell vaccine-induced antigen-specific T cells in advanced melanoma patients // Clin. Cancer Res. – 2016. – Vol. 17. – № 17. – P.5725-5735.
15. Oshita C., Takikawa M., Kume A. et al. Dendritic cell-based vaccination in metastatic melanoma patients: Phase II clinical trial // Oncol Rep. – 2012. – Vol. 28. – Issue 4. – P. 1131-1138.

16. Radomski M., Zeh H.J., Edington H.D. et al. Prolonged intralymphatic delivery of dendritic cells through implantable lymphatic ports in patients with advance cancer // *J. ImmonoTher. Cancer* – 2016. – Vol. 4. – P. 24.
17. Ribas A., Camacho L. H., Lee S. M. et al. Multicenter phase ii study of matured dendritic cells pulsed with melanoma cell line lysates in patients with advanced melanoma // *J. Transl. Med.* – 2010. – Vol. 8. – I. 89.
18. Ridolfi L., Petrini M., Fiammenghi L. et al. Unexpected high response rate to traditional therapy after dendritic cell-based vaccine in advanced melanoma: Update of clinical outcome and subgroup analysis // *Clin Dev Immunol.* – 2010. – Vol. 2010. – I. 504979.
19. Robert C., Ribas A., Wolchok J. D. et al. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: A randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial // *Lancet.* – 2014. – Vol. 384. – I. 9948. – P. 1109-1117.
20. Sasse A. D., Sasse E. C., Clark L. G. et al. Chemoimmunotherapy versus chemotherapy for metastatic malignant melanoma // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2007. – Vol. 1. – P. CD005413.
21. Trepiakas R., Berntsen A., Hadrup S. R. et al. Vaccination with autologous dendritic cells pulsed with multiple tumor antigens for treatment of patients with malignant melanoma: Results from a phase i/ii trial // *Cytotherapy.* – 2010. – Vol. 12. – I. 6. – P. 721-734.
22. Tumeh P. C., Harview C. L., Yearley J. H. et al. Pd-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance // *Nature.* – 2014. – Vol. 515. – I. 7528. – P. 568-571.
23. Weber J. S., Kudchadkar R. R., Gibney G. T. et al. Phase i/ii trial of pd-1 antibody nivolumab with peptide vaccine in patients naive to or that failed ipilimumab // *J. Clin. Oncol.* – 2013. – Vol. 31. – abstr 9011.
24. Weber J. S., Kudchadkar R. R., Gibney G. T. et al. Updated survival, toxicity, and biomarkers of nivolumab with/without peptide vaccine in patients naive to, or progressed on, ipilimumab (ipi) // *J. Clin. Oncol.* – 2014. – Vol. 32. – abstr 3009.
25. Zheng Y., Yin G., Le V. et al. Photodynamic-therapy Activates Immune Response by disrupting Immunity Homeostasis of Tumor Cells, which Generates Vaccine for Cancer Therapy // *Int. J. Biol. Sci.* – 2016. –Vol. 12 (1). – P. 120-132.

Поступила в редакцию 16.01.2017 г.

*I.A. Baldueva¹, A.V. Novik¹, T.L. Nekhaeva¹,
A.B. Danilova¹, S.A. Protsenko¹, M.L. Gelfond^{1,2},
N.P. Pipia¹, N.V. Emelyanova¹, N.A. Avdonkina¹,
O.A. Galiullina¹, A.I. Semenova¹, G.M. Teletaeva¹,
D.Kh. Latipova¹, Yu.I. Komarov¹, E.M. Anokhina¹,
Z.S. Kotova¹, T.Yu. Semiglazova^{1,2}, A.M. Shcherbakov^{1,2},
A.M. Belyaev^{1,2}*

Perspectives in active specific immunotherapy with autologous immature dendritic cells combined with photodynamic therapy and cyclophosphamide in patients with disseminated melanoma resistant to standard therapy

¹N.N. Petrov Research Institute of Oncology,
²I.I. Mechnikov North-West State Medical University,
St. Petersburg

There are described the results of clinical and immunological efficacy assessment of active specific immunotherapy with autologous immature dendritic cells (DC) combined with photodynamic therapy (PDT) and cyclophosphamide (C) in disseminated melanoma patients, resistant to standard therapy. 27 patients treated in the N.N. Petrov Research Institute of Oncology were included in the study from 2007 till 2016. Immunotherapy was conducted in a 21-day cycles. Therapy included following steps: 1) preparation of individual vaccine preparation from bone-marrow derived DC with immune phenotype CD34⁺/CD14⁺/CD1a⁺/CD83⁺/CD80⁺/CD86⁺/HLA-DR⁺; 2) Intramuscular 300 mg C injection in day 1 of treatment cycle for elimination T-lymphocytes with immunosuppressing activity; 3) PDT with chlorin salts at day 4 six hours before start of vaccinotherapy; 4) Daily intralesional injections of DC vaccine in irradiated lesions in the dose 1x10⁶ DC cells/kg. Clinical and immunological efficacy was assessed in 27 patients. Fourteen (52%) patients received 1-2 cycles of therapy, 13(48%) received 3 or more cycles. No complete response was seen. Partial response (RECIST 1.1) was found in 2 (7,4%) patients, stable disease in 8 (29,6%) patients. Seventeen (63%) patients progressed. Median time to progression (TTP) was 2.5 month, median overall survival (OS) 8.4 month. One-year survival was 5% and 37% for TTP and OS, respectively. No adverse events (AE) of grade 4-5 (CTC AE v4) were seen. Grade 3 fever was registered in 4% of patients. Grade 1-2 AE were found in 54% of patients. Immunologic assessment revealed significant decline of immunoregulatory index (CD/CD8) caused by prevalence of cytotoxic T-lymphocytes in peripheral blood of responding patients (patients with clinical benefit). Tendency for elevation of absolute number of activates T-helpers and cytotoxic T-lymphocytes together with low T-regulatory cells concentration was also found. Combination therapy using immunomodulatory effects of C, PDT and DC vaccine in 21-day treatment cycles produce promising activity and favorable toxicity profile in heavily pretreated disseminated melanoma patients.

Key words: dendritic cells, immunotherapy, photodynamic therapy, disseminated melanoma