

## Отдаленные результаты применения комбинированной иммунотерапии в комплексном лечении больных со злокачественными глиомами головного мозга

Ступак В.В.<sup>1</sup>, Черных Е.Р.<sup>2</sup>, Пендюрин И.В.<sup>1</sup>, Леплина О.Ю.<sup>2</sup>, Мишинов С.В.<sup>1</sup>

### The results of combined immunotherapy in integrated treatment of patients with malignant brain glioma

Stupak V.V., Chernykh Ye.R., Pendyurin I.V., Leplina O.Yu., Mishinov S.V.

<sup>1</sup> НИИ травматологии и ортопедии Росмедтехнологий, г. Новосибирск

<sup>2</sup> НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск

© Ступак В.В., Черных Е.Р., Пендюрин И.В. и др.

Проблема поиска и разработки новых подходов в комплексном лечении больных со злокачественными глиомами головного мозга остается одним из актуальнейших вопросов современной нейрохирургии и нейроонкологии. Несмотря на усилия, предпринимаемые в этой области, результаты комплексной терапии злокачественных глиом, особенно глиобластом, остаются крайне неудовлетворительными. Одним из направлений является иммунотерапия, направленная на генерацию цитотоксических клеток, способных лизировать опухоль. При этом наибольшие перспективы связывают с комбинацией различных иммунотерапевтических подходов. В клинике нейрохирургии НИИ травматологии и ортопедии (г. Новосибирск) с 1999 г. проводились клинические испытания комбинированной иммунотерапии в комплексном лечении больных со злокачественными глиомами головного мозга по двум протоколам.

The problem of search and development of new approaches to integrated treatment of patients with malignant brain glioma remain one of the most urgent issues for contemporary neurosurgery and neurooncology. In spite of the applied efforts the results of a complex therapy for malignant glioma, especially for glioblastoma, are utterly unsatisfactory. Immunotherapy is one of the directions searching for a generation of cytotoxic cells able to lyse the tumor. Combination of various immunotherapeutic approaches is regarded the most perspective way. Since 1999 Neurosurgical Clinic of Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics was carrying out clinical trials of combined immunotherapy within complex therapy of patients with malignant brain glioma in compliance with two protocols.

#### Введение

Проблема поиска и разработки новых подходов в комплексном лечении больных со злокачественными глиомами головного мозга (ЗГГМ) остается одним из актуальнейших вопросов современной нейрохирургии и нейроонкологии. По данным различных авторов, среди первичных опухолей головного мозга глиомы составляют в среднем 40–55%, причем наиболее часто (до 55–60% случаев) встречаются анапластические астроцитомы (АА) и глиобластомы (ГБ) [6, 15]. Эта группа внутримозговых опухолей объединяется как общим происхождением из

астроцитарной глии, так и рядом специфических особенностей: отсутствием четких границ с мозгом, частым рецидивированием, низкой чувствительностью к химио- и радиотерапии. Сегодня не вызывает сомнений, что наилучшие результаты терапии этого вида опухолей обеспечиваются комплексным лечебным подходом, включающим микрохирургическое удаление максимально возможного объема опухоли, а в дальнейшем — радио- и химиотерапию (в том числе с использованием темозоломида) [11]. В качестве адъювантных методов лечения в последние годы также апробируются методы ла-

зерной фотодинамической деструкции. Несмотря на усилия, предпринимаемые в этой области, результаты комплексной терапии злокачественных глиом, особенно глиобластом, остаются крайне неудовлетворительными. Медиана выживаемости у больных глиобластомой составляет 11 мес после установления диагноза и 5–6 мес после рецидива. Лишь немногие выживают в течение 2 лет, а 5-летняя выживаемость не превышает 2% [1, 2, 6–8, 12], что делает актуальным поиск новых терапевтических стратегий [13].

Одним из таких направлений является иммунотерапия, направленная на генерацию цитотоксических клеток, способных лизировать опухоль. При этом наибольшие перспективы связывают с комбинацией различных иммунотерапевтических подходов.

## Материал и методы

В клинике нейрохирургии НИИ травматологии и ортопедии (НИИТО) (г. Новосибирск) с 1999 г. проводились клинические испытания комбинированной иммунотерапии (КИТ) в комплексном лечении больных ЗГГМ по двум протоколам, которые были утверждены ученым советом института и одобрены локальным этическим комитетом. Лечение во всех случаях проводилось после подписания пациентом информированного согласия.

Исследуемую группу по двум протоколам составили 100 больных злокачественными глиомами головного мозга (ЗГГМ) в возрасте от 14 до 69 лет, из них 61 больной с анапластической астроцитомой и 39 больных с глиобластомой. При этом пациенты с впервые выявленными ЗГГМ в данной группе составили 66%, а с рецидивом ЗГГМ — 34%, проходившие в период с 1999 по 2007 г. обследование и лечение в клинике нейрохирургии. Хронология лечения больных была следующей: после верификации диагноза на базе нейрохирургического отделения НИИТО проводился хирургический этап лечения — микрохирургическое удаление опухоли. В конце операции в ложе удаленной опухоли устанавливался хлорвиниловый катетер, который выводился наружу через контрапертуру. Затем, на 5–7-е сут в зависимости от протокола КИТ, произво-

дилось локорегиональное введение клеточной взвеси. Далее, после выписки из нейрохирургического стационара, проводился курс лучевой терапии (СОД 50–60 Гр), после чего осуществлялся третий этап КИТ (10–15 подкожных инъекций аутологичных цитокинов либо шестикратная вакцинация дендритными клетками, нагруженными опухолевыми антигенами) на базе НИИКИ СО РАМН.

Комбинированная иммунотерапия по первому протоколу (КИТ-1) проводилась в соответствии с ранее разработанным патентом [3]. Она включала три этапа. На первом этапе с помощью комплекса нативных цитокинов в виде препарата «Лейкинферон» (НПФ «Интекор», г. Москва) проводили индукторную фазу КИТ, направленную на коррекцию иммунных дисфункций. Второй этап представлял собственно адаптивную иммунотерапию и включал введение лимфокинактированных клеток (ЛАК) и антиген-специфических Т-лимфоцитов (общее количество клеток  $(2,5 \pm 0,12) \cdot 10^9$ ) в комбинации с интерлейкином-2 (ИЛ-2) в ложе удаленной опухоли с целью элиминации оставшихся опухолевых клеток. В качестве ИЛ-2 использовали препарат «Ронколейкин» (ООО «Биотех», г. Санкт-Петербург). На завершающем этапе пациентам вводили комплекс аутологичных цитокинов, полученных при культивировании лимфоцитов больного с опухолевыми антигенами в присутствии ИЛ-2, с целью поддержания противоопухолевой активности сенсibilизированных Т-клеток (курс 10–15 подкожных инъекций).

Предложенная схема была разработана с учетом данных литературы, а также полученных ранее следующих фактов: 1) течение злокачественных глиом сопряжено с развитием выраженной иммунодепрессии, которая проявляется не только дефектом  $\text{NK}$ -клеток и Т-лимфоцитов, но и нарушением функциональной активности моноцитов; 2) иммунодепрессия носит стойкий характер; 3) наряду с прямым супрессивным действием опухолевых клеток важную роль в развитии иммунодепрессии играют моноциты, которые, с одной стороны, приобретают супрессорную активность, а с другой — в силу дефекта ко-стимуляторных молекул способствуют усилению

активационного апоптоза Т-клеток [1]. Поскольку на этом фоне эффективность генерации эффекторных клеток может быть снижена, первый этап КИТ был посвящен коррекции иммунных дисфункций. Использование с этой целью лейкинферона, содержащего в своем составе провоспалительные и  $T_{H1}$ -цитокины, представлялось вполне обоснованным, поскольку указанные цитокины активируют клетки моноцитарного ряда,  $NK$ -клетки и протектируют развитие активационного апоптоза Т-клеток.

Сочетанное использование ЛАК и цитотоксических клеток на втором этапе терапии было предложено в силу следующих обстоятельств. Известно, что цитотоксический потенциал и резистентность к супрессорному влиянию опухолевых клеток выше у цитотоксических Т-лимфоцитов. С другой стороны, продуцируемый  $NK$ -клетками интерферон- $\gamma$  подавляет в опухолевых клетках продукцию ИЛ-10, ослабляя тем самым супрессорное действие опухоли. Поэтому совместное использование ЛАК и цитотоксических Т-клеток (ЦТК) может иметь синергический эффект. Наконец, целью третьего этапа стало поддержание противоопухолевой активности сенсibilизированных Т-лимфоцитов.

Комбинированную иммунотерапию по второму протоколу (КИТ-2) проводили в соответствии с разработанным патентом [2]. Новизной данного протокола было включение в него иммунотерапии дендритными клетками (ДК). Традиционно ДК генерируют путем культивирования прилипающей фракции моноклеарных клеток (МНК) в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) и ИЛ-4 с последующим добавлением созревающих стимулов [7]. Однако в последнее время было показано, что частично зрелые ДК могут быстро генерироваться при культивировании моноцитов с ГМ-КСФ и интерфероном- $\alpha$ , и такой путь генерации представляется более физиологичным [8]. Полученные в этом случае «интерфероновые» ДК имеют ряд преимуществ – генерируются быстрее по времени, характеризуются высокой способностью к захвату антигена, сохраняют стабильность в отсутствие цитокинов, имеют более высокую миграци-

онную активность и эффективно стимулируют  $T_{H1}$ -ответ [8, 12]. Именно такой тип ДК был апробирован при проведении комбинированной иммунотерапии. При этом ДК использовались как для генерации ЦТК, так и для курса подкожных вакцинаций.

КИТ-2 включала курс адаптивной иммунотерапии и курс вакцинаций дендритными клетками. Адаптивная иммунотерапия заключалась в 2-кратном локорегиональном введении лимфокинактивированных киллерных клеток и цитотоксических Т-клеток в ложе удаленной опухоли. Для генерации ЛАК моноклеарные клетки культивировали с рекомбинантным ИЛ-2 (50 МЕ/мл, ронколейкин) в течение 48 ч, после чего вводили через катетер в ложе удаленной опухоли в комбинации с ронколейкином в дозе 250 тыс. МЕ. ЦТК получали путем культивирования МНК больных с ДК, нагруженными опухолевыми антигенами, в присутствии ронколейкина (50 МЕ/мл) в течение 5 дней, после чего вводили в ложе удаленной опухоли в комбинации с ронколейкином в дозе 250 тыс. МЕ. Количество вводимых в ложе удаленной опухоли ЛАК и ЦТК составило в среднем  $(1,69 \pm 0,4) \cdot 10^9$  клеток. Антигенный материал (лизат опухолевых клеток) для загрузки ДК получали из фрагмента аутологичной опухоли больного в результате 5-кратного замораживания и размораживания суспензии опухолевых клеток. Курс вакцинации, включающий 6 подкожных инъекций ДК, нагруженных опухолевыми антигенами ( $10 \cdot 10^6$  на введение), начинали через 2 нед после завершения радиотерапии и проводили с кратностью

1 раз в 2 нед.

Группу сравнения составил 91 пациент в возрасте от 15 до 69 лет, в том числе 52 больных с анапластической астроцитомой и 39 больных с глиобластомой, которым проводилось хирургическое удаление опухоли с последующей радиотерапией. Количество пациентов с впервые выявленными ЗГГМ в этой группе составило 85%, с рецидивом ЗГГМ – 15%.

Оценка результатов лечения проведена на основании изучения средней продолжительно-

сти жизни, медианы выживаемости больных в обеих группах.

Математическая обработка полученных результатов проводилась методами описательной, параметрической и непараметрической статистики на персональном компьютере с использованием программы Statistica 6.0.

## Результаты и обсуждение

Иммунотерапия по первому протоколу была проведена 68 больным в возрасте от 14 до 69 лет, в том числе 41 пациенту с АА и 27 пациентам с ГБ. Средняя продолжительность жизни (СПЖ) у больных АА группы исследования составила  $(41,3 \pm 4,5)$  мес и достоверно превышала таковую у больных АА в группе сравнения  $((20,0 \pm 2,3)$  мес, 52 человека;  $p = 0,000023$ ). Медиана выживаемости (МВ) у больных АА в исследуемой группе также была достоверно выше, чем в группе сравнения (38 против 14,5 мес). Продолжительность жизни в группе больных ГБ, получивших КИТ-1, составила  $(21,4 \pm 5,1)$  мес и была достоверно выше, чем у пациентов с ГБ в группе сравнения  $((9,5 \pm 2,5)$  мес; 27 человек;  $p = 0,026$ ). Соответственно МВ больных ГБ в исследуемой группе была в 2 раза выше, чем в группе сравнения (12 против 6 мес). В целом по группе больных с КИТ-1 показатели СПЖ и МВ составили  $(33,4 \pm 3,6)$  и 27,5 мес, что существенно превышало аналогичные показатели в контрольной группе  $((15,5 \pm 1,76)$  и 11 мес соответственно). Трехлетний рубеж в группе больных, получивших КИТ-1, преодолели 45,6% (31 из 68) больных, тогда как в группе сравнения только 7,7% (7 из 91). Пятилетняя выживаемость в исследуемой группе достоверно констатирована у 19,2% (10 из 52) пациентов. В то же время в группе сравнения пятилетняя выживаемость составила только 1,2% (1 из 83 больных). Следует отметить, что среди всех пациентов, преодолевших пятилетний рубеж, из контрольной группы к настоящему моменту жив 1 человек, в то время как из исследуемой группы живы 7 пациентов.

Второй протокол иммунотерапии был проведен в группе 32 больных в возрасте от 16 до 65

лет, включая 20 больных с АА и 12 — с ГБ. В исследуемой группе больных АА СПЖ составила  $(30,7 \pm 3,1)$  мес, МВ — 33,5 мес; что достоверно превышало аналогичные показатели в группе сравнения  $((20,0 \pm 2,3)$  и 14,5 мес соответственно, 52 человека). У больных ГБ, получивших КИТ-2, СПЖ составила  $(12,8 \pm 1,9)$  мес, а МВ 12 мес, что также было достоверно выше, чем в группе сравнения  $((7,23 \pm 0,78)$  и 6 мес соответственно). Таким образом, в целом у больных, получивших КИТ-2, средняя продолжительность жизни  $((24,0 \pm 2,6)$  мес) и медиана выживаемости (22,5 мес) значительно превышали соответствующие показатели в контрольной группе  $((14,6 \pm 1,5)$  и 11 мес). Ни один из пациентов исследуемой группы с ГБ не преодолел трехлетний рубеж. Среди больных с АА в исследуемой группе через 36 мес были живы 66,7% (10 из 15) больных, тогда как в контрольной группе этот показатель составил 13,5%

(7 из 52). Следует отметить, что к настоящему времени срок наблюдения у больных, получивших КИТ-2, составляет менее 5 лет, что не позволяет проанализировать уровень пятилетней выживаемости.

## Заключение

Полученные данные однозначно свидетельствуют, что включение КИТ в комплексное лечение больных злокачественными глиомами ассоциировано с достоверным увеличением общей продолжительности жизни и медианы выживаемости данной категории больных. Эффективность КИТ проявляется как у больных анапластическими астроцитомами, так и глиобластомами. При этом в группе АА это позволяет преодолеть пятилетний рубеж 13,5% пациентам. Сравнение результатов КИТ по первому и второму протоколу позволило также наметить некоторые пути оптимизации КИТ с целью дальнейшего повышения ее эффективности.

Суммируя представленные выше данные, можно заключить, что имеющиеся на сегодняшний день результаты иммунотерапии пока далеки от совершенства. Тем не менее прорыв в области молекулярной биологии и осмысление

**Материалы 5-й Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы неврологии»**

тонких механизмов взаимодействия опухоли и иммунной системы является основой для разработки новых стратегий иммунотерапии и вселяет надежду, что результаты лечения злокачественных опухолей в будущем могут быть существенно улучшены.

**Литература**

1. *Олюшин В.Е.* Комплексное лечение больных злокачественными глиомами полушарий большого мозга // Материалы 7-го Международного симпозиума «Новые технологии в нейрохирургии». СПб., 27–29 мая 2004. С. 164–165.
2. *Острейко О.В., Можжев С.В., Олюшин В.Е. и др.* Специфическая противоопухолевая иммунотерапия в составе комплексного лечения у нейроонкологических больных // Материалы Всерос. науч.-практ. конф. «Поленовские чтения VII», СПб., 27–30 апреля 2008. С. 284.
3. *Пат.* 2197985 РФ. Способ комбинированной иммунотерапии злокачественных опухолей головного мозга / С.Д. Никонов, Е.Р. Черных, А.А. Останин и др. Приоритет от 10.05.2000 г.
4. *Пат.* 2262941 РФ. Способ иммунотерапии злокачественных опухолей головного мозга / Е.Р. Черных, О.Ю. Леплина, А.А. Останин и др. Приоритет от 05.01.2004 г.
5. *Хонина Н.А., Центнер М.И., Леплина О.Ю. и др.* Характеристика и механизмы иммунных нарушений у больных со злокачественными опухолями головного мозга // Вопросы онкологии. 2002. Т. 48. № 2. С. 65–75.
6. *Bernstein M., Berger M.S.* (Ed.) Neuro-oncology The Essentials. New York: Thieme Medical Publishers Inc., 2000. 508 p.
7. *Harsh G.R., Levin V.A., Gutin P.H. et al.* Reoperation for recurrent glioblastoma and niplastic astrocytoma // Neurosurgery. 1987. V. 21. P. 615–620.
8. *Legler J.M., Ries L.A., Smith M.A. et al.* Cancer surveillance series [corrected]: brain and other central nervous system cancers. Recent trends in incidence and mortality // J. Natl. Cancer. Inst. 1999. V. 91. P. 1382–1390.
9. *Parlato S., Santini S., Lapenta C. et al.* Expression of CCR-7, MIP-3b, and Th1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells — importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities // Blood. 2001. V. 98. P. 3022–3029.
10. *Santini S.M., Belardelli F.* Advances in the use of dendritic cells and new adjuvants for the development of therapeutic vaccines // Stem. Cells. 2003. V. 21. P. 495–505.
11. *Stupp R., Mason W.P., Van der Bent M.J. et al.* Radiotherapie plus temozolamide concomitant et adjuvant pour le glioblastome // The New England Journal of Medicine. 2005. V. 352. № 10. P. 987–997.
12. *Surawicz T.S., Davis F., Freels S. et al.* Brain tumor survival: results from the National Cancer Data Base // J. Neurooncol. 1998. V. 40. P. 151–160.
13. *Tjoa B.A., Salgaller M.L.* Progress in active-specific immunotherapy of brain malignancies // Expert Opin. Investig. Drugs. 2000. V. 9. P. 2093–2101.
14. *Thurner B., Roder C., Dieckmann D. et al.* Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical applications // J. Immunol. Meth. 1999. V. 223. P. 1–15.
15. *Wrensch M.R., Minn Y., Bondy M.L.* Epidemiology // Neuro-Oncology The Essentials / Ed. by Mark Bernstein & Mitchel S. Berger. New York: Thieme Medical Publishers Inc. 2000. P. 2–17.