

Вакциноterapia на основе дендритных клеток у больных почечно-клеточным раком

Д.А. Носов, А.А. Борунова, Г.З. Чкадуа, В.Б. Матвеев, Е.С. Яковлева,
М.Ю. Федянин, З.Г. Кадагидзе, Т.Н. Заботина, С.А. Тюлядин

ГУРОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контакты: Дмитрий Александрович Носов nosov@mail.ru

Цель исследования — определить эффективность и переносимость аутологичной вакцинотерапии на основе дендритных клеток (ДК) у больных почечно-клеточным раком (ПКР). Изучить динамику иммунологических показателей и их связь с эффективностью лечения.

Материалы и методы. В период с 2002 по 2008 г. 29 больных ПКР получили аутологичную вакциноterapia на основе ДК. У 16 пациентов с наличием отдаленных метастазов терапия проведена в индукционном режиме до прогрессирования болезни и у 13 — в адъювантном режиме (8 вакцинаций) после выполнения радикальной нефрэктомии (III степени) или радикальной метастазэктомии. Для приготовления вакцины использовали культивированные из моноцитов периферической крови ДК, обработанные аутологичным опухолевым лизатом.

Результаты. В группе из 16 больных с наличием отдаленных метастазов у 2 (12,5%) зафиксированы частичные регрессии, еще у 2 (12,5%) пациентов наблюдались длительные стабилизации опухолевого процесса (>6 мес). Медиана времени до прогрессирования составила 3 (1,5–12+) мес. У 13 больных, получавших адъювантное лечение, медиана времени до прогрессирования не достигнута: 4 пациента после метастазэктомии наблюдаются без признаков прогрессирования болезни от ≥ 12 до ≥ 25 мес. У больных с клиническим эффектом (регрессия или длительная стабилизация болезни) наблюдалось достоверное увеличение популяции $CD3^+CD8^+$ и $CD3^+CD16^+$ (натуральные киллеры — НК) Т-лимфоцитов после 3 вакцинаций с 23,3 до 27,2% ($p=0,018$) и с 15,17 до 20,3% ($p=0,03$) соответственно. У больных с прогрессирующим течением заболевания число $CD3^+CD16^+$ -НКТ-лимфоцитов до начала вакцинотерапии в 3 раза превышало значение этого показателя в донорской группе — 11,2 и 3,5% соответственно. Исходное содержание $CD4^+CD25^+$ -популяции Т-лимфоцитов у пациентов с прогрессированием болезни также было достоверно выше, чем у больных с клиническим эффектом — 12,01 и 5,6% соответственно.

Выводы. Вакциноterapia, проведенная на основе ДК, способна индуцировать специфический противоопухолевый иммунный ответ у больных ПКР, который в отдельных случаях трансформируется в клинический эффект. Исходное содержание супрессорных популяций Т-лимфоцитов (НКТ и Т-reg) может являться фактором, прогнозирующим эффективность проведения вакцинотерапии на основе аутологичных ДК у больных ПКР. Целесообразно дальнейшее изучение данного иммунотерапевтического подхода с определением показаний к его использованию у больных ПКР.

Ключевые слова: вакциноterapia, дендритные клетки, иммунотерапия, рак почки, почечно-клеточный рак

Dendritic cell-based vaccine therapy in patients with renal cell carcinoma

D.A. Nosov, A.A. Borunova, G.Z. Chkadua, V.B. Matveyev, E.S. Yakovleva,
M.Yu. Fedyanin, Z.G. Kadagidze, T.N. Zabolina, S.A. Tyulyandin

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Objective: to study the efficiency and tolerance of autologous vaccine therapy based on dendritic cells (DC) in patients with renal cell carcinoma (RCC) and to examine changes in immunological parameters and their association with the efficiency of the therapy.

Subjects and methods. Twenty-nine patients with RCC received autologous vaccine therapy based on DC in 2002 to 2008. Therapy was performed in the induction mode in 16 patients before disease progression and in the adjuvant mode (8 vaccinations) in 13 patients after radical nephrectomy (grade III) or radical metastasectomy. Peripheral blood monocyte-derived DCs treated with autologous tumor lysate were used to prepare the vaccine.

Results. In a group of 16 patients with distant metastases, partial regressions were recorded in 2 (12.5%) patients and long (> 6 -month) stabilizations of a tumor process were observed in other 2 (12.5%) patients. The median time prior to progression was 3 (range 1.5–12) months. Thirteen patients on adjuvant treatment did not achieve the median time to progression: 4 patients showed no signs of disease progression ≥ 12 to ≥ 25 months after metastasectomy. Patients with a clinical effect (disease regression or long stabilization) showed a significant increase in the populations of $CD3^+CD8^+$ and $CD3^+CD16^+$ T lymphocytes (natural killers (NK) cells) after 3 vaccinations from 23.3 to 27.2% ($p = 0.018$) and from 15.17 to 20.3%, respectively ($p = 0.03$). Prior to vaccine therapy, the count of $CD3^+CD16^+$ -NK cells was thrice greater in patients with the progressive disease than that in the donor group — 11.2 and 3.5%, respectively. The baseline count of $CD4^+CD25^+$ T lymphocytes in patients with progressive disease was also significantly higher than that in patients with the clinical effect — 12.01 and 5.6%, respectively.

Conclusion. *In patients with RCC, DC-based vaccine therapy is able to induce a specific anti-tumor immune response that is transformed into the clinical effect in some cases. The baseline count of suppressor T lymphocyte (NKT and T-reg) populations may be a factor that predicts the efficiency of autologous DC-based vaccine therapy in patients with RCC. This immunotherapeutic approach merits further study, by defining the indications for its application in patients with RCC.*

Key words: *vaccine therapy, dendritic cells, immunotherapy, renal cancer, renal cell carcinoma*

Введение

Известно, что биологическое течение метастатического почечно-клеточного рака (мПКР) характеризуется целым рядом особенностей, основными из которых являются спонтанная регрессия и продолжительная стабилизация болезни. Несмотря на то что данные явления регистрируются редко, не более чем в 1–3 и 20% случаев соответственно, сама вероятность их возникновения указывает как на важную роль иммунной системы в развитии данного заболевания, так и на возможность формирования спонтанного или индуцированного лекарственными методами противоопухолевого иммунного ответа у отдельных больных [1]. На протяжении последних 20 лет неспецифическая иммунотерапия (ИТ) с включением интерферона- α (ИФН- α) и/или интерлейкина-2 (ИЛ-2) считалась стандартным подходом в лечении метастатического рака почки (РП) с эффективностью, как правило, не превышающей 15–20% и временем до прогрессирования 5–7 мес для всей популяции больных [2]. Более высокая эффективность цитокинотерапии наблюдалась в группе больных мПКР с благоприятными прогностическими характеристиками, определяемыми в соответствии с критериями Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC), где полные или частичные регрессии регистрировались в 30–35% случаев [3, 4]. У отдельных пациентов с мПКР (3–5%) с помощью данного метода удавалось достигнуть длительной полной ремиссии заболевания, что свидетельствовало об излечении. Однако в целом эффективность неспецифической ИТ с использованием различных цитокинов или их комбинаций так и осталась невысокой, особенно при лечении больных мПКР с плохим прогнозом. В клинических исследованиях проведение цитокинотерапии в адъювантных целях после выполнения радикальной нефрэктомии также не способствовало увеличению безрецидивной выживаемости [5–7].

Одновременно с цитокинотерапией в клинических исследованиях изучалась эффективность более специфического ИТ-подхода — вакцинотерапии. Вакцинотерапия — это метод формирования специфического иммунного ответа с помощью различных иммуногенных антигенов. Использование одного из наиболее простых методов вакцинации — клеточной вакцины, созданной на основе аутологичных опухо-

левых клеток, — в адъювантном режиме у пациентов, подвергшихся радикальной нефрэктомии, продемонстрировало снижение частоты развития рецидивов на 10% (с 33 до 23%) в течение 5 лет [8]. В то же время у больных с диссеминацией опухолевого процесса данный подход оказался малоэффективным в более ранних клинических исследованиях [9–11]. Возможно, более высокая эффективность применения этого метода в адъювантном режиме связана с тем, что иммунный ответ у пациентов на ранних стадиях болезни и при минимальной опухолевой массе скомпрометирован в меньшей степени. К сожалению, авторами не представлен анализ мониторинга иммунологических показателей и их связи с клиническими результатами.

Неэффективность противоопухолевого иммунного ответа организма может быть обусловлена многими причинами, одна из которых — нарушение механизма представления опухолевых антигенов Т-лимфоцитам. Зрелые дендритные клетки (ДК) являются «профессиональными» антигенпрезентирующими клетками, которые играют важную роль в формировании противоопухолевого иммунного ответа. Посредством миграции в лимфатический узел (ЛУ) из опухолевой ткани они способны представлять опухолевые антигены, связанные с молекулами главного комплекса гистосовместимости I и II класса, специфическим Т-лимфоцитам. Костимуляторные молекулы, находящиеся на поверхности ДК (CD40, CD80, CD86), взаимодействуют с соответствующими рецепторами (CD40L, CD28) лимфоцитов, после чего происходит их активация с дальнейшей пролиферацией и дифференцировкой в цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ). В результате активированные ЦТЛ приобретают способность распознать опухолевый антиген и уничтожить опухолевую клетку [12, 13]. Несмотря на то что у больных ПКР в опухолевой ткани может обнаруживаться большое число ДК, их функциональная активность значительно подавлена за счет супрессорных факторов, которые секретирует опухоль (ИЛ-10, трансформирующий фактор роста- β — ТФР- β и др.). Это выражается в сниженной миграции ДК в ЛУ, а также в отсутствии адекватной презентации антигенов специфическим Т-лимфоцитам [14–17]. Другой причиной, препятствующей правильной модуляции иммунного ответа,

может служить высокая активность различных субпопуляций супрессорных Т-лимфоцитов: регуляторных Т-лимфоцитов, НКТ-клеток (НК — натуральные киллеры) и др. [18–22].

Предполагается, что вакцинация зрелыми ДК, нагруженными опухолевым лизатом (ОЛ) или опухолевыми пептидами, позволяет преодолеть иммунологическую толерантность организма к опухоли. В ряде небольших клинических исследований продемонстрирована безопасность и противоопухолевая активность данного подхода у больных мПКР. Объективные эффекты, частота которых в рамках клинических исследований I–II фазы колебалась от 7 до 41%, как правило, сопровождалась получением иммунологического ответа [23–28]. Такая большая разница в показателях эффективности может объясняться как особенностями отбора больных для вакцинотерапии, так и модификациями самой вакцины, ее дозовыми режимами и способами введения.

Нами представлен собственный опыт клинического использования аутологичной вакцины, созданной на основе ДК, у больных ПКР, а также приведен анализ иммунологических параметров, выполненный в процессе терапии.

Материалы и методы

Критерии включения больных

В данное исследование включены больные диссеминированным ПКР с наличием отдаленных метастазов после выполнения паллиативной нефрэктомии, пациенты, подвергшиеся радикальному хирургическому удалению метастазов, а также больные ПКР с высоким риском развития рецидива после радикальной нефрэктомии (T3b–T4N0–2M0 или T(любая)N1–2M0). У всех пациентов забор опухолевого материала осуществлялся в процессе выполнения паллиативной/радикальной нефрэктомии или метастазэктомии. Основными критериями включения также являлись подписание пациентом информированного согласия, возможность получения опухолевого материала после хирургического лечения (в объеме 1–2 см³), общее состояние по шкале ECOG 0–2 балла, отсутствие выраженных (III–IV степень) нарушений костномозгового кроветворения и изменений биохимического анализа крови, отсутствие в анамнезе других злокачественных опухолей и аутоиммунных заболеваний, ВИЧ-инфекции (ВИЧ — вирус иммунодефицита человека).

Приготовление вакцины

Получение ОЛ

Фрагмент опухоли механически измельчали, тщательно отмывали от дебриса, затем определяли число опухолевых клеток. Суспензию клеток переносили в ампулы и замораживали в жидком азоте. Для получения ОЛ клеточную суспензию замораживали и размораживали 3 раза, разрушенные клетки осаждали

центрифугированием (2 мин при 12 000 об/мин), супернатант собирали, стерилизовали фильтрованием через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм и разливали по аликвотам. Аликвоты хранили при температуре –20°C.

Генерирование аутологичных LR

LR культивировали из моноцитов, которые выделяли из цельной крови путем центрифугирования в градиенте Ficoll–Paque ($p=1,077$) с последующей адгезией моноцитов на чашки Петри. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 («MP Biomedicals», США), содержащей 2% сыворотки человека IV группы крови и цитокины: гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор — ГМ-КСФ («Shering-Plough», США) — конечная концентрация 80 нг/мл, и ИЛ-4 («R&D Systems», США) — конечная концентрация 10 нг/мл. На 2-е сутки культивирования добавляли 1 мл свежей среды, содержащей 800 нг ГМ-КСФ и 100 нг ИЛ-4. На 4-е сутки культивирования проводили нагрузку ДК ОЛ. Для этого осуществляли полную замену среды, после чего в культуру вносили ОЛ (соотношение 1 ДК на 1,5–2 лизированные опухолевые клетки) и инкубировали в течение 2 ч. Для созревания ДК в культуральную среду включали фактор некроза опухоли- α — ФНО- α («MP Biomedicals», США) — конечная концентрация 20 нг/мл и простагландин E₂ («MP Biomedicals», США) — конечная концентрация 500 нг/мл. Через 48 ч зрелые и нагруженные ДК собирали, отмывали от культуральной среды, определяли общее их число и проводили криоконсервацию. Для этого клетки ресуспендировали в замораживающей среде (95% полиглюкин и 5% диметилсульфоксид) и переносили в криопробирки. Криопробирки в контейнере помещали в пары жидкого азота, спустя 1–1,5 ч ампулы с клетками переносили в жидкий азот для длительного хранения.

Характеристика вакцины, созданной на основе ДК

Основным способом оценки качества вакцины, созданной на основе ДК, являлся метод проточной цитофлуориметрии. Главными характеристиками, по которым оценивали ДК, были иммунофенотип и процентное содержание живых клеток. Ключевыми маркерами, указывающими на то, что ДК зрелые, были следующие антигены: CD83, костимуляторные молекулы CD80 и CD86, хемокиновый рецептор CCR7. Об экспрессии исследуемых антигенов судили по числу антигенположительных клеток в сравнении с изотипическим контролем. Жизнеспособность оценивали по окрашиванию ДК Annexin V. Вводимые больным клетки были жизнеспособными, а также обладали иммунофенотипом зрелых ДК, что выражалось в экспрессии основных маркеров.

Схема вакцинации, мониторинг иммунного ответа

Всем больным вакцинация проводилась с интервалом 2 нед в течение первых 6 нед (4 вакцинации)

и далее каждые 4 нед. Пациенты с наличием отдаленных метастазов (лечебная группа) получали терапию до прогрессирования болезни. В группе больных, которым вакциноterapia проводилась в адьювантном режиме, вакцинация начиналась в течение 2–8 нед после выполнения радикальной нефрэктомии или метастазэктомии и продолжалась в течение 22 нед (4 вакцинации с интервалом 2 нед и 4 – с интервалом 4 нед) или до регистрации прогрессирования, если оно наступало раньше (рис. 1). Введение осуществлялось внутривенно в 4–5 точек в межлопаточную область, область плеча или живота. Суммарная доза, вводимая в процессе одной вакцинации, составляла $1-11 \times 10^6$ ДК и была равномерно распределена между точками введения.

Забор крови у онкологических больных для оценки иммунологических параметров осуществлялся в течение 1 нед до первой вакцинации, далее после 3-й (6-я неделя) и 5-й (14-я неделя) вакцинации в периоды контрольного обследования пациентов. В качестве контроля исследовали фенотип лимфоцитов периферической крови 20 здоровых доноров.

Для определения иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови онкологических больных и здоровых доноров применяли коммерческие моноклональные антитела («Becton Dickinson», США) к CD3, CD8, CD4, CD16, CD25, CD28 и CD45-антигенам, конъюгированные FITC, PE и PE-Cy5. В работе использовано трехцветное окрашивание поверхностных антигенов лимфоцитов.

Проточно-цитофлуориметрический анализ проводили с помощью проточного цитофлуориметра FACSscan («Becton Dickinson», США). Выделение «гейтов» клеток для анализа осуществляли по параметрам прямого и углового светорассеяния (FSC против SSC) в смешанных линейно-логарифмических режимах (SSC против FL1, FL2, FL3) или только с применением параметров флуоресценции с логарифмическим усилением сигнала (log/log). В каждом образце проводили сбор не менее 10 000 событий. Использовали гистограммный и DotPlot-анализ, учитывали относительное число позитивных клеток (%) и интенсивность среднего канала флуоресценции (mean fluorescence intensity – MFI).

Реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) в месте введения измеряли в течение 48 ч после введения и считали положительной, в случае если размеры индукции и/или покраснения кожи превышали 5 мм.

Оценка клинической эффективности

Анализ клинической эффективности лечения проводился в соответствии с критериями RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors). Динамический контроль (компьютерно-томографическое — КТ- и ультразвуковое исследование) осуществлял-

ся перед выполнением 4-й и 6-й вакцинаций и далее каждые 2 или 3 мес при проведении терапии в индукционном или адьювантном режиме соответственно, а также при появлении клинических признаков, указывающих на прогрессирование болезни.

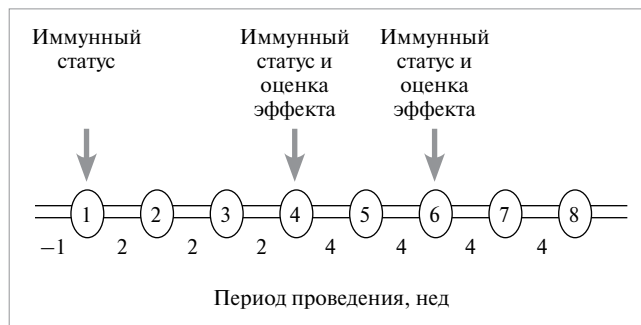


Рис. 1. Схема проведения вакцинации и забора крови для определения иммунологических показателей

Статистический анализ: обработка данных выполнялась с помощью программы Statistica. При сравнении иммунологических показателей использовали непараметрический критерий Вилкоксона и ANOVA-тест. Сравнение клинических показателей проводилось с помощью точного теста Фишера. Различия считались значимыми при $p < 0,05$. Время до прогрессирования и общую выживаемость определяли с помощью метода Каплана – Майера.

Результаты

За период с 2002 по 2008 г. в данное исследование были включены 29 пациентов с ПКР. Общая характеристика больных представлена в табл. 1. Средний возраст пациентов составил 56 (26–67) лет. Всем им в различные сроки до начала вакцинотерапии была выполнена радикальная или паллиативная нефрэктомия. У 27 больных наблюдался светлоклеточный гистологический вариант ПКР и у 2 – смешанный вариант (хромофобный, папиллярный) с преобладанием светлоклеточного подтипа. Системную ИТ с включением ИФН- α и/или ИЛ-2 ранее получали 12 пациентов. У 16 больных на момент вакцинации определялись отдаленные метастазы различной локализации и, соответственно, терапия в данной подгруппе проводилась в индукционном режиме. Еще 13 пациентов получали вакцинотерапию в адьювантном режиме, поскольку к началу лечения у них отсутствовали какие-либо видимые проявления болезни после выполнения радикальной нефрэктомии или радикального хирургического удаления отдаленных метастазов. Признаков токсичности II–IV степени не зарегистрировано. У 5 пациентов отмечены артралгия и лихорадка I степени. Реакция ГЗТ развилась в общей сложности у 15 больных.

Таблица 1. Общая характеристика больных ПКР

Показатель	Число больных
Пол:	
мужчины	23
женщины	6
Гистологический вариант	
светлоклеточный	27
светлоклеточный + хромофобный	1
светлоклеточный + папиллярный	1
Соматический статус по шкале ECOG, баллы	
0	19
1	6
2	4
Предшествующая ИТ	12
Адъювантная вакциноterapia:	13
после радикальной нефрэктомии	6
после радикальной метастазэктомии	7
Наличие отдаленных метастазов на момент начала вакцинации (индукционная вакциноterapia)	16

Клиническая эффективность и токсичность вакцинотерапии в индукционном режиме

В данной группе предшествующую терапию ИФН-α, проводившуюся по поводу метастатического ПКР, ранее получали 8 из 16 пациентов. К моменту начала вакцинотерапии у 12 (75%) больных отмечалось метастатическое поражение легких, у 5 (31%) — ЛУ различной локализации, у 3 (19%) — костей, у 2 (13%) — печени. У 8 (50%) больных метастатическое поражение было локализовано в 2 органах и более. Медиана времени от момента диагностирования отдаленных метастазов до начала вакцинотерапии составила 4,5 (2,5–25) мес. У 13 пациентов опухолевый материал был получен в результате проведения паллиативной нефрэктомии. У 3 больных, ранее подвергшихся радикальной нефрэктомии, для получения опухолевого материала была выполнена резекция доступных для паллиативного удаления метастазов. Подробная характеристика больных и результаты лечения представлены в табл. 2.

На фоне проведения вакцинотерапии у 2 (12,5%) больных зафиксированы частичные регрессии продолжительностью 10 и ≥12 мес соответственно. Еще у 2 (12,5%) пациентов отмечены длительные периоды (6 мес) стабилизации болезни. Таким образом,

Таблица 2. Характеристика больных и результаты вакцинотерапии в индукционном режиме

№ пациента	локализация метастазов	статус по шкале ECOG, баллы	наличие предшествующей терапии	Характеристика			эффект	время до прогрессирования, мес
				число вакцинаций	средняя доза ДК	наличие ГЗТ		
1	Легкие	1	Да	3	2,4–10	Да	Прогрессирование	—
2	Печень	0	Нет	7	3,5–9	Да	Стабилизация	6
3	Кости, легкие	2	Да	5	3,5–11	Нет	Стабилизация	3,5
4	Легкие, ЛУ	0	Да	7	2–6	Да	Стабилизация	6
5	Легкие, ЛУ, кости	1	Да	4	4,5–9	Нет	Прогрессирование	—
6	Легкие, ЛУ, семенной канатик	0	Нет	6	2,5–4	Нет	Стабилизация	4,5
7	Легкие	2	Да	3	2,4–2,5	Нет	Прогрессирование	—
8	Легкие, кости	1	Нет	3	3,4–9,6	Да	Прогрессирование	—
9	Легкие	0	Да	3	2–3,4	Да	Прогрессирование	—
10	Легкие	0	Нет	11	0,8–2,7	Да	Частичная регрессия	10
11	Печень	1	Нет	2	2,5–2,6	Нет	Прогрессирование	—
12	Легкие, ЛУ	0	Да	3	2,3–9,2	Нет	Прогрессирование	—
13	Легкие, ЛУ, надпочечник	1	Нет	14	2–8	Да	Частичная регрессия	12+
14	Легкие	1	Нет	2	2,5–3,5	Нет	Прогрессирование	—
15	ЛУ	0	Нет	6	1,5–8	Да	Стабилизация	4,5
16	ЛУ, легкие	0	Да	3	2–6,5	Нет	Прогрессирование	—

общая клиническая эффективность вакцинотерапии с учетом объективных эффектов и длительных периодов стабилизации в данной группе ($n=16$) составила 25%, медиана времени до прогрессирования — 3 мес. При этом у 3 больных с клиническим эффектом непосредственно перед началом терапии зафиксировано прогрессирование процесса на фоне предшествующей терапии ИФН- α или после выполнения паллиативной нефрэктомии. Реакция ГЗТ развилась у 8 пациентов — в основном после осуществления 2-й вакцинации (рис. 2). Не отмечено достоверной корреляции между развитием ГЗТ и клиническим эффектом ($p=0,076$), хотя такая тенденция в данной подгруппе больных прослеживалась.



Рис. 2. Развитие реакции ГЗТ после проведения 3-й вакцинации у пациента №10

Клиническая эффективность и токсичность вакцинотерапии в адъювантном режиме

В группе больных, получавших лечение в адъювантном режиме, у 6 пациентов вакцинотерапия проводилась после выполнения радикальной нефрэктомии (Т3b—сN0—2M0) и у 7 — после осуществления метастазэктомии (IV стадия). С учетом стадии заболевания на момент выполнения радикальной операции все больные были отнесены к группе высокого риска развития рецидива и, соответственно, основной целью терапии в данной подгруппе являлось снижение частоты возникновения рецидивов болезни. Медиана времени от операции до начала вакцинотерапии составила 4 (2,5—8) нед. В полном объеме (8 вакцинаций) терапия была проведена 8 больным. Еще у 5 пациентов проведение терапии было прервано в различные сроки от его начала (2—4,5 мес) в связи с ранним прогрессированием болезни. Медиана времени до прогрессирования для всей группы не достигнута. После осуществления метастазэктомии 4 пациента продолжают наблюдаться на протяжении от 12 до 25 мес и более без признаков прогрессирования болезни. Характеристика больных и результаты терапии представлены в табл. 3. Развитие реакции ГЗТ после осуществления 2-й вакцинации зарегистрировано у 7 пациентов.

Таблица 3. Характеристика больных и результаты проведения адъювантной вакцинотерапии

№ пациента	стадия/локализация метастазов	наличие предшествующей терапии	Характеристика		наличие ГЗТ	время до прогрессирования, мес
			число вакцинаций	средняя доза ДК		
1	T3bN0M0	—	8	4	Да	≥24
2	T3cN2M0	—	8	1,2—2,2	Нет	16
3	T3bN0M0	—	5	2,5—3,9	Нет	3
4	T3bN1M0	—	4	1—8	Да	2
5	T3bN0M0	—	8	1,9—3,5	Да	≥24
6	T2N1M0	—	8	2,1—3,4	Да	≥24
7	Легкие	Да	5	3—3,4	Нет	2,5
8	Легкие	Да	8	2,5—2,8	Нет	≥25
9	Местный рецидив	Нет	8	1,6—2,6	Да	≥18
10	Местный рецидив	Нет	8	2,2—2,4	Да	≥24
11	Местный рецидив	Да	3	2	Нет	2
12	Ключица	Нет	8	2—6	Да	≥12
13	Легкие	Да	7	2,1—2,4	Нет	4,5

Анализ иммунологических показателей

На I этапе мы оценили влияние вакцинотерапии на различные популяции Т-лимфоцитов во всей группе больных. После проведения 3 вакцинаций на момент первичной оценки эффективности лечения иммунологические показатели были изучены у 24 из 29 больных. После осуществления 3-й вакцинации отмечено достоверное увеличение популяции $CD3^+CD8^+$ -клеток с 28 до 30,6% (рис. 3). Перед проведением 6-й вакцинации число лимфоцитов с данным фенотипом существенно не изменялось, но этот показатель мы смогли оценить только у 17 больных, поскольку у 7 пациентов терапия была прекращена после осуществления 3 вакцинаций в связи с ранним прогрессированием болезни.

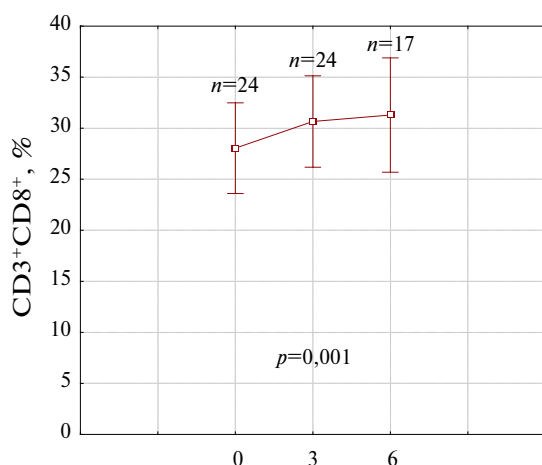


Рис. 3. Содержание $CD3^+CD8^+$ -Т-лимфоцитов до начала лечения (0), после проведения 3-й (3) и 6-й (6) вакцинации у всех больных

В дальнейшем мы разделили всех больных на 2 группы в зависимости от эффективности терапии. В группу пациентов с прогрессированием болезни, развившихся на фоне вакцинотерапии, были включены больные ($n=15$), у которых зафиксировано прогрессирование в ранние сроки (<6 мес) от начала лечения. В другой группе ($n=9$) отмечали либо объективный эффект, либо длительную стабилизацию болезни: >6 мес при индукционном или >12 мес — при адьювантном режиме.

На следующем этапе было проведено сравнение исходных популяций лимфоцитов между группами, а также с донорскими показателями и оценена динамика показателей внутри каждой группы в зависимости от эффективности лечения.

При исследовании популяции $CD3^+CD8^+$ -Т-лимфоцитов выявлено, что у пациентов с ранним прогрессированием заболевания число лимфоцитов с данным фенотипом до начала лечения было достоверно выше донорских показателей, а в процессе проведения вакцинотерапии — оставалось без существенных изменений (рис. 4). В группе больных с на-

личием клинического эффекта после 3-й вакцинации наблюдалось достоверное увеличение данной популяции лимфоцитов с 23,3 до 27,2% ($p=0,018$).

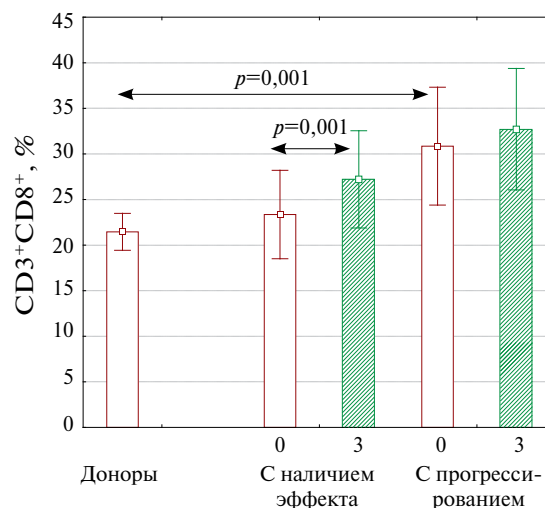


Рис. 4. Содержание $CD3^+CD8^+$ -Т-лимфоцитов у доноров, больных с наличием клинического эффекта и пациентов с прогрессированием заболевания до начала лечения (0) и после 3 (3) вакцинаций

При анализе популяции $CD3^+CD16^+$ -НК-лимфоцитов до начала проведения вакцинотерапии не выявлено значительных различий между исходными показателями в обеих группах (независимо от наличия или отсутствия клинического эффекта) и у здоровых доноров. На фоне проводимой терапии у больных с прогрессирующим течением заболевания эта субпопуляция клеток оставалась без динамики, в то время как у пациентов с наличием клинического эффекта число $CD3^+CD16^+$ -НК-клеток достоверно увеличивалось с 15,17 до 20,3% ($p=0,03$) после осуществления 3 вакцинаций, что может косвенно свидетельствовать о развитии неспецифического клеточного иммунного ответа в этой подгруппе больных (рис. 5).

При изучении популяции лимфоцитов с одновременной экспрессией Т-клеточного антигена CD3 и НК-клеточного — CD16 (НКТ-лимфоциты) отмечена следующая особенность. У пациентов с прогрессирующим течением заболевания еще до начала проведения вакцинотерапии число $CD3^+CD16^+$ -клеток в 3 раза превышало значение донорской группы — 11,2 и 3,5% соответственно. На фоне проводимой терапии субпопуляция НКТ-лимфоцитов у больных этой группы оставалась без динамики (рис. 6). Следует отметить, что в группе пациентов с наличием клинического эффекта популяция $CD3^+CD16^+$ -клеток как до начала лечения, так и после осуществления 3-й вакцинации существенно не изменялась (3,1 и 4,5% соответственно) и оставалась в пределах донорских показателей.

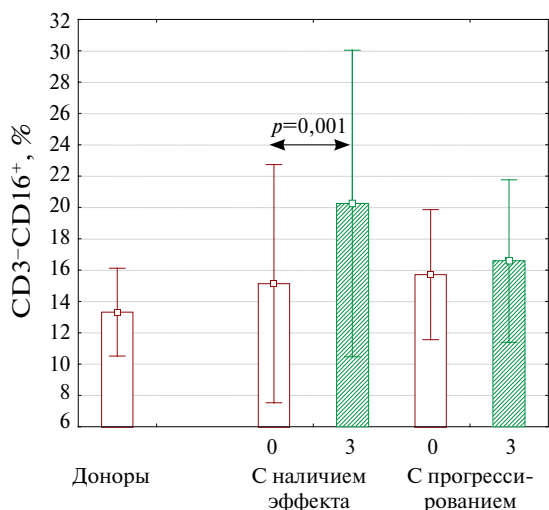


Рис. 5. Содержание $CD3^+CD16^+$ -клеток в периферической крови доноров, больных с наличием клинического эффекта и пациентов с прогрессирующим заболеванием до начала лечения (0) и после проведения 3 (3) вакцинаций

Изучение популяции $CD4^+CD25^+$ -лимфоцитов показало, что в группе больных с наличием клинического эффекта до начала вакцинотерапии число этих клеток было достоверно ниже (5,6%), чем в группе доноров (11,7%). При этом у пациентов с прогрессирующим течением заболевания содержание данной субпопуляции Т-лимфоцитов до начала лечения соответствовало данным донорской группы (12,01%). В процессе проведения терапии не было зафиксировано существенной динамики $CD4^+CD25^+$ -лимфоцитов в обеих группах (рис. 7).

Число $CD20^+$ -В-лимфоцитов периферической крови в группе больных с наличием клинического эффекта до начала вакцинотерапии было достовер-

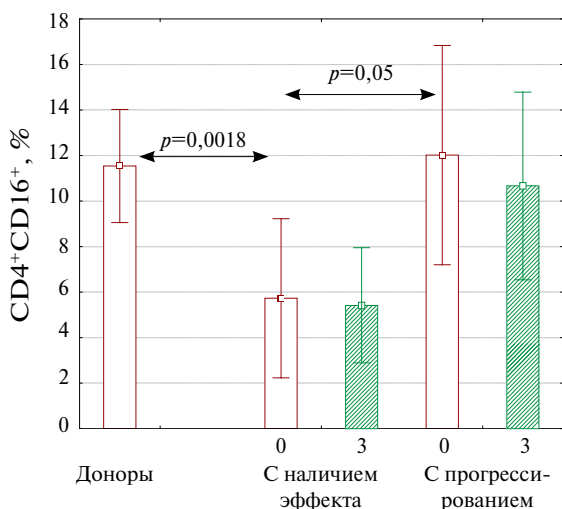


Рис. 7. Содержание $CD4^+CD25^+$ -клеток в периферической крови доноров, больных с наличием клинического эффекта и пациентов с прогрессирующим заболеванием до начала лечения (0) и после проведения 3 (3) вакцинаций

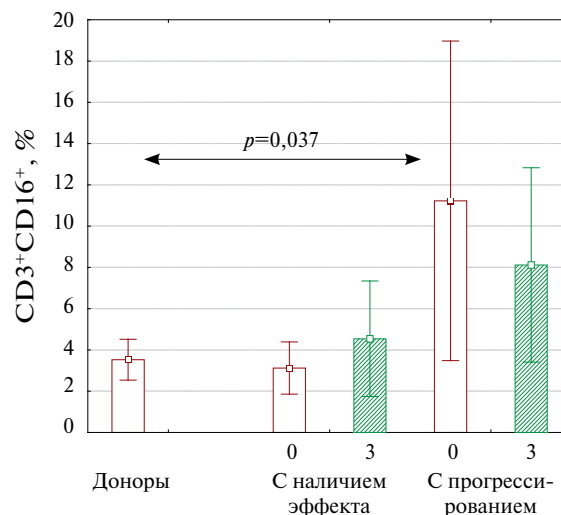


Рис. 6. Содержание $CD3^+CD25^+$ -клеток в периферической крови доноров, больных с наличием клинического эффекта и пациентов с прогрессирующим заболеванием до начала лечения (0) и после проведения 3 (3) вакцинаций

но выше (9,2%) по сравнению с таковым у пациентов с прогрессирующим заболеванием (4,8%). При этом также не отмечено существенной динамики этого показателя в обеих группах на фоне лечения.

Обсуждение

Несмотря на то что в последние годы таргетные подходы с включением новых биологических субстанций, преимущественно антиангиогенного механизма действия, приобретают все большую популярность при лечении больных мПМКР и постепенно вытесняют ИТ с использованием цитокинов, пока остается неясным значение более специфических методов ИТ-воздействия при данном заболевании [29–31]. Кроме того, в настоящее время у нас нет надежных молекулярно-генетических или иммунологических параметров, позволяющих выделить те группы больных ПКР, которые могли бы получить максимальный выигрыш от использования таргетной терапии или ИТ, т.е. отсутствуют четкие критерии прогнозирования эффективности того или иного подхода. Не совсем понятно, могут ли полные ремиссии, достигнутые при использовании таргетных препаратов, трансформироваться в полное излечение пациентов. Не изучена целесообразность применения адъювантной терапии с включением данных препаратов у больных после радикального удаления первичной опухоли и пациентов с высоким риском развития рецидива болезни. Также не вполне определены оптимальная последовательность использования таргетных препаратов и место ИТ-подходов при комбинированном или последовательном их применении с таргетными агентами. В связи с этим представляется вполне оправданным дальнейшее развитие более специфичных и менее токсичных

ИТ-методов с одновременным изучением иммунологических факторов, прогнозирующих эффективность лечения в той или иной популяции больных ПКР.

В нашем исследовании анализ динамики иммунологических параметров демонстрирует, что данный ИТ-подход способен индуцировать специфический противоопухолевый иммунный ответ у больных ПКР, который в отдельных случаях трансформируется в клинический эффект. Частичные регрессии зафиксированы у 2 (12,5%) больных, и еще у 2 (12,5%) пациентов с наличием отдаленных метастазов наблюдались длительные периоды стабилизации опухолевого процесса на фоне осуществления вакцинации. При этом непосредственно до начала терапии у 3 из 4 пациентов с наличием клинического эффекта зарегистрировано прогрессирование болезни. У 4 из 7 больных после выполнения радикальной резекции отдаленных метастазов или местных рецидивов сохраняются ремиссии заболевания в течение ≥ 12 (12–25) мес. Трое из 6 больных с местно-распространенными опухолями и высоким риском развития рецидива заболевания после проведения у них радикальной нефрэктомии наблюдаются на протяжении ≥ 24 мес без признаков прогрессирования. Мы не отметили достижения клинического эффекта ни у одного больного с соматическим статусом 2 по шкале ECOG, что может свидетельствовать о неэффективности вакцинотерапии у больных с плохим прогнозом и наличием большого объема опухоли, вызывающего появление выраженных симптомов паранеоплазии. Эффективность вакцинотерапии на основе ДК в нашем исследовании оказалась сопоставимой с данными литературы [23–28].

На фоне осуществления вакцинотерапии наблюдалось увеличение популяции $CD3^+CD8^+$ -лимфоцитов во всей группе, преимущественно за счет больных, у которых было отмечено наличие клинического эффекта. Прирост данной популяции, вероятнее всего, обусловлен увеличением содержания субпопуляции ЦТЛ. Более того, у пациентов с наличием клинического эффекта в процессе проведения вакцинотерапии имело место увеличение НК-клеток ($CD3-CD16^+$), что также может косвенно свидетельствовать об эффективной презентации опухолевых антигенов зрелыми ДК и активации клеточного звена иммунитета. Увеличение числа тех или иных субпопуляций клеток не всегда коррелирует с их функциональной активностью, поэтому в дальнейшем необходимо проведение анализа цитотоксической состоятельности эффекторных лимфоцитов и их влияния на эффективность вакцинотерапии [32, 33].

Неэффективность иммунного ответа в подгруппе с ранним прогрессированием может быть обусловлена несколькими факторами, одним из которых является преобладание $CD3^+CD16^+$ -НКТ-лимфоцитов, обладающих супрессорным действием. Эта минорная субпопуляция клеток в данной подгруппе еще до начала лечения в 3 раза превышала донорские показатели. Другим возможным объяснением отсутствия клинического эффекта может служить популяция $CD4^+CD25^+$ -лимфоцитов, которая представлена различными субпопуляциями, в том числе Т-регуляторными клетками, обладающими иммуносупрессивными свойствами. Несмотря на то что $CD4^+CD25^+$ -лимфоцитов у пациентов с прогрессирующим течением заболевания до начала лечения было практически в пределах донорских показателей, у больных с наличием клинического эффекта до начала проведения вакцинотерапии эта субпопуляция клеток была в 2 раза меньше. Возможно, для осуществления эффективной вакцинотерапии содержание этих клеток должно быть низким. В многочисленных работах зарубежных авторов показано, что элиминация или инактивация $CD4^+CD25^+$ -лимфоцитов приводит к усилению иммунного ответа на аллоантигены и опухолевые клетки [34–36]. Мы планируем проведение дальнейшего более подробного анализа различных субпопуляций $CD4^+CD25^+$ -Т-лимфоцитов и их влияния на эффективность вакцинотерапии. Возможно, определение исходного уровня НКТ-лимфоцитов и Т-рег может иметь прогностическое значение и, помимо уже известных клинических факторов [3, 4, 37], являться ориентиром для проведения вакцинотерапии с индукционной или адъювантной целью в определенной популяции больных ПКР.

В целом вакцинотерапия на основе ДК при ПКР представляется перспективным и удобным подходом, так как ДК можно культивировать из моноцитов крови в присутствии ГМ-КСФ/ИЛ-4 в достаточном количестве [38]. В качестве источника антигенов возможно использование не только лизата из аутологических опухолевых клеток, получение которых ограничено хирургическими возможностями, но и синтезированных *in vitro* иммуногенных пептидов опухолеассоциированных антигенов (MUC1, с-MET, G250 и др.). Возможно, данный метод лечения при грамотном определении показаний к его использованию и правильном отборе больных на основе клинических и иммунологических параметров не будет уступать по своей эффективности современным таргетным подходам.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Oliver R.T.D. Unexplained spontaneous regression and its relevance to the clinical behavior of renal cell carcinoma and its response to interferon, abstract 383. Proc Am Soc Clin Oncol 1987;6:98.
2. Bukowski R.M. Natural history and therapy of metastatic renal cell carcinoma. The role of interleukin-2. Cancer 1997;80:1198–220.
3. Motzer R.J., Masumdar M., Bacik J. et al. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. J Clin Oncol 1999;17(8):2530–40.
4. Motzer R.J., Bacik J., Murphy B.A. et al. Interferon- α as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. J Clin Oncol 2002;20(1):289–96.
5. Messing E.M., Manola J., Wilding G. et al. Phase III study of interferon α -NL as adjuvant treatment for resectable renal cell carcinoma: An Eastern Cooperative Oncology Group/Intergroup Trial. J Clin Oncol 2003;21(7):1214–22.
6. Atzpodien J., Schmitt E., Gertenbach U. Adjuvant treatment with interleukin-2- and interferon- α 2a-based chemioimmunotherapy in renal cell carcinoma post tumour nephrectomy: Results of a prospectively randomised Trial of the German Cooperative Renal Carcinoma Chemioimmunotherapy Group (DGCIN). Br J Cancer 2005;92(5):843–6.
7. Clark J., Atkins M., Urba W. et al. Adjuvant high-dose bolus interleukin-2 for patients with high-risk RCC: A Cytokine Working group randomized trial. J Clin Oncol 2003;21(16):3133–40.
8. Jocham D., Richter A., Hoffmann L. et al. Adjuvant autologous renal tumor cell vaccine and risk of tumor progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: phase III, randomised controlled trial. Lancet 2004;363:594–9.
9. Schärfe T., Müller S., Riedmiller H. et al. Immunotherapy of metastasizing renal cell carcinoma. Results of a multicentered trial. Urol Int 1989;44:1–4.
10. Galligioni E., Quai M., Merlo A. et al. Adjuvant immunotherapy treatment of renal carcinoma patients with autologous tumor cells and bacillus Calmette-Guérin: 5-year results of a prospective randomized study. Cancer 1996;77:2560–6.
11. Schwaab T., Heaney J.A., Schned A.R. et al. A randomized phase II trial comparing two different sequence combinations of autologous vaccine and human recombinant interferon gamma and human recombinant interferon α 2B therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: clinical outcome and analysis of immunological parameters. J Urol 2000;163:1322–7.
12. Steinman R.M. The dendritic cells system and its role in immunogenicity. Ann Rev Immun 1991;9:271–96.
13. Mulders P., Tso C.L., Gitlitz B. et al. Presentation of renal tumor antigens by human dendritic cells activates tumor-infiltrating lymphocytes against autologous tumor: implications for live kidney cancer vaccines. Clin Cancer Res 1999;5:445–54.
14. Thurnher M., Radmayr C., Ramoner R. et al. Human renal-cell carcinoma tissue contains dendritic cells. Int J Cancer 1996;68:1–7.
15. Troy A.J., Summers K.L., Davidson P.J.T. et al. Minimal recruitment and activation of dendritic cells within renal cell carcinoma. Clin Cancer Res 1998;4:585–93.
16. Knoefel B., Nuske K., Steiner T. et al. Renal cell carcinomas produce IL-6, IL-10, IL-11, and TGF- β 1 in primary cultures and modulate T lymphocyte blast transformation. J Interfer Cytok Res 1997;17:95–102.
17. Chau P., Favre N., Martin M. et al. Tumor-infiltrating dendritic cells are defective in their antigen-presenting function and inducible B7 expression in rats. Int J Cancer 1997;72:619–24.
18. Jiang H., Chess L. An integrated view of suppressor T cells subsets in immunoregulation. J Clin Invest 2004;114(9):1198–208.
19. Thronton A.M., Picirilli C.A., Shevach E.M. Activation requirements for the induction of CD4⁺CD25⁺ T cell suppressor function. Eur J Immunol 2004;24:366–73.
20. Mars L.T., Novak J., Liblau R.S., Lehuen A. Therapeutic manipulation of iNKT cells in autoimmunity: modes of action and risks. Trends Immunol 2004;25:471–82.
21. Terabe M., Matsui S., Park J.M. et al. Transforming growth factor- β production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. J Exp Med 2003;198:1741–50.
22. Кадагидзе З.Г., Черткова А.И., Славина Е.Г. Иммунорегуляторные CD25⁺CD4⁺-клетки. Биотер журн 2005;(2):13–21.
23. Kugler A., Stuhler G., Walden P. et al. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell dendritic cell hybrids. Nat Med 2000;6:332–6.
24. Nestle F.O., Aljagie S., Gilliet M. et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. Nat Med 1998;4:328–32.
25. Holt L., Zelle-Rieser C., Gander H. et al. Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. Clin Cancer Res 2002;8:3369–76.
26. Wierocky J., Muller M.R., Wirths S. et al. Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients. Cancer Res 2006;66:11.
27. Marten A., Flieger D., Renoth S. et al. Therapeutic vaccination against metastatic renal cell carcinoma by autologous dendritic cells: preclinical results and outcome of a first clinical phase I/II trial. Cancer Immunol Immunother 2002;51:637–44.
28. Gitlitz B., Belldegrun A., Zisman A. et al. A pilot trial of tumor lysate-loaded dendritic cells for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. J Immunother 2003;26(5):412–9.
29. Motzer R., Thomas M., Hutson E. et al. Sunitinib versus interferon α in metastatic renal-cell carcinoma. N Engl J Med 2007;356:115–24.
30. Escudier B., Eisen T., Stadler W. et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. N Engl J Med 2007;356:125–34.
31. Escudier B., Koralewski P., Pluzanska A. et al. A randomized, controlled, double-blind phase III study (AVOREN) of bevacizumab/interferon-2-a vs placebo/interferon-2a as first-line therapy in metastatic renal cell carcinoma. J Clin Oncol 2007;25:2(suppl; abstr 3).
32. Борунова А.А., Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н. Перфорин-опосредованная цитотоксичность CD16⁺-лимфоцитов. Иммунология 2006;(1):4–6.
33. Борунова А.А., Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Кадагидзе З.Г. Перфорин-опосредованный потенциал эффекторных клеток у онкологических больных при вакцинотерапии. Вестн ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 2005;(3–4):7–9.
34. Sakaguchi S. Naturally arising FoxP3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. Nat Immunol 2005;6:345–52.
35. Yu P., Lee Y., Liu W. et al. Intratumor depletion of CD4⁺ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. J Exp Med 2005;201:779–91.
36. Ярилин А.А., Донецкова Д.Д. Естественные регуляторные Т-клетки и фактор FOXP. Иммунология 2006;(3):176–88.
37. Zisman A., Pantuck A., Dorey F. et al. Improved prognostication of renal cell carcinoma using an integrated staging system. J Clin Oncol 2001;19:1649–57.
38. Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Буркова А.А. и др. Адаптирование методики культивирования дендритных клеток человека из моноцитов периферической крови для клинического применения. Рос биотер журн 2002;(3):56–62.