

ОПТИМИЗАЦИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ ДЕНДРИТНО-КЛЕТОЧНЫХ ВАКЦИН ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ

Т.Л. Нехаева

ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург
197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68,
e-mail: oncl@rion.spb.ru

Исследованы иммунобиологические характеристики дендритных клеток (ДК) для оптимизации технологии получения дендритно-клеточных вакцин (ДК-вакцин). Проведен сравнительный анализ иммунологического фенотипа незрелых и зрелых ДК, дифференцированных *in vitro* в присутствии ростового фактора GM-CSF (CellGenix, Германия) и ГМ-КСФ (Фармсинтез, Россия) в ранее изученной концентрации 72 нг/мл, и IL-4 (CellGenix, Германия) в интервале концентраций от 0 до 45 нг/мл. Для стандартизации технологического процесса получения вакцинных ДК рекомендуется использовать оптимальную панель моноклональных антител: CD14, CD1a, CD83, CD86, CD80, CCR7, HLA DR. Результаты проточной цитометрии и иммуноцитохимического анализа показали отсутствие достоверных различий в экспрессии маркеров зрелых ДК ($p > 0,05$), что свидетельствует о целесообразности использования ростового фактора ГМ-КСФ (Фармсинтез, Россия) для приготовления противоопухолевых вакцин на основе ДК. С помощью однофакторных полиномиальных моделей второго порядка установлен оптимальный интервал концентрации IL-4 для дифференцировки ДК от 5 до 15 нг/мл.

Ключевые слова: иммунотерапия, дендритные клетки, вакцина, оптимизация.

AUTOLOGOUS DENDRITIC CELL VACCINE OPTIMIZATION FOR THERAPY OF PATIENTS WITH DISSEMINATED MALIGNANT NEOPLASMS

T.L. Nehaeva

N.N. Petrov Research Institute of Oncology
68, Leningradskaya Street, 197758-St. Petersburg, Pesochny, Russia
e-mail: oncl@rion.spb.ru

Immunobiological features of the dendritic cells (DC) were studied for the production of DC-vaccine (DCV) optimization. DC were differentiated *in vitro* in GM-CSF (previously studied concentration 72 ng/ml and IL-4 0–45 ng/ml containing medium. GM-CSF compounds by Pharmsynthez (Russia) and Cell Genix (Germany) and IL-4 by Cell Genix (Germany) were used. Comparative assays of mature and immature DC immunophenotype using different GM-CSF compounds was performed. CD1a, CD83, CD86, CD80, CCR7 и HLA DR are recommended optimal markers of DC for the standardization of technologic process. Flow cytometry and immunocytochemistry assays revealed no differences in mature DC markers expression ($p > 0,05$). This indicates the expediency of Pharmsynthez (Russia) GM-CSF usage for DCV production. Optimal IL-4 concentrations (5–15 ng/ml) providing qualitative characteristics for DCV production were found using second level one-way polynomial model.

Key words: immunotherapy, dendritic cell, DC-vaccine, optimization.

Создание терапевтических вакцин на основе дендритных клеток (ДК) рассматривается как один из перспективных подходов в комплексной терапии злокачественных новообразований, результаты международных и отечественных клинических исследований свидетельствуют о клинической эффективности данного метода лечения у некоторых категорий больных [1, 2, 5]. Вместе с тем использование ДК-вакцин, обладающих эффективностью, безопасностью и надлежащим уровнем качества

в рутинной клинической практике, предполагает оптимизацию и стандартизацию рекомендованных методик [3, 8, 9].

Дифференцировка вакцинных ДК из моноцитов периферической крови *in vitro* с использованием различных питательных сред, ростовых факторов и факторов дифференцировки различной активности в ряде случаев препятствует получению стандартного клеточного продукта охарактеризованного качества. В частности, появление на фармацевти-

ческом рынке гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) Неостим отечественного производства (Фармсинтез, Россия) для клинического использования позволяет заменить дорогостоящий импортный аналог GM-CSF (CellGenix, Германия) и значительно удешевить стоимость изготовления ДК-вакцин. Вместе с тем предполагаемый технологический переход не изучен. Более того, не определена оптимальная концентрация интерлейкина-4 (IL-4), в присутствии которого осуществляется дифференцировка ДК из моноцитов периферической крови. Более чем в 200 клинических исследованиях были использованы различные концентрации IL-4 без достаточно аргументированного обоснования, чаще в диапазоне от 6,75 нг/мл до 180 нг/мл [7, 11]. Несомненно, это затрудняет стандартизацию ДК-вакцин, что определило проблему научного поиска и цель настоящего исследования.

Целью исследования является изучение иммунологического фенотипа незрелых и зрелых ДК, дифференцированных из моноцитов периферической крови больных злокачественными новообразованиями в присутствии фиксированной концентрации GM-CSF (CellGenix, Германия) или ГМ-КСФ (Фармсинтез, Россия), и различных концентраций IL-4 (CellGenix, Германия).

Материал и методы

Дифференцировку ДК из адгезионной моноцитарной фракции мононуклеаров периферической крови больных меланомой кожи проводили в сбалансированной бессывороточной среде «Cell-Gro DC», приготовленной в условиях надлежащей производственной практики GMP (Cell Genix, Германия), адгезионных культуральных флаконах с вентилируемыми крышками (Sarstedt, Германия) в условиях CO₂ инкубатора «Heracel» (Termo Electron LTD GmbH, Германия) при 37°C, 5 % CO₂ и 98 % влажности. В исследовании использовали ростовой фактор GM-CSF (CellGenix, Германия) и ГМ-КСФ (Фармсинтез, Россия) в ранее изученной концентрации 72 нг/мл и IL-4 (CellGenix, Германия) в интервале концентраций от 0 до 45 нг/мл. Ростовые факторы и фактор дифференцировки вносили на 1, 3 и 5-й день культивирования (незрелые ДК). На 7-й день вносили коктейль лизированных охарактеризованных аутологичных и/или аллогенных опухолевых клеток (клеточные линии Mel 226, Mel 515, Mel 519, Mel 520), экспрессирующих иммуногенные раково-тестикулярные антигены (NY-ESO-1⁺, MAGE⁺, HAGE⁺, GAGE⁺) и фактор некроза опухоли (TNFα) 20 нг/мл (BD, США). Инкубацию с опухолевым лизатом проводили в течение 48 ч.

Таблица 1

Иммунофенотип зрелых ДК, выращенных в присутствии ростового фактора GM-CSF различных производителей и IL-4, M±m, δ

Дифференцировочные/ линейноспецифические антигены	GM-CSF Фармсинтез, Россия	GM-CSF CellGenix, Германия	Критерий Фишера (F), уровень значимости (p)
CD14 ⁺	2,02 ± 0,91 %; 3,18	6,12 ± 2,34 %; 5,17	F=3,91; p=0,07 (>0,05)
CD1a ⁺	24,03 ± 9,11 %; 26,22	20,08 ± 9,13 %; 23,01	F=0,07; p=0,79 (>0,05)
CD83 ⁺	82,15 ± 6,07 %; 18,34	66,14 ± 4,21 %; 10,12	F=3,85; p=0,07 (>0,05)
CD1a ⁺ CD83 ⁻	13,11 ± 5,01 %; 15,12	13,23 ± 6,16 %; 15,32	F=0,001; p=0,97 (>0,05)
CD1a ⁺ CD83 ⁺	10,12 ± 4,06 %; 13,10	8,12 ± 4,21 %; 11,15	F=0,08; p=0,78 (>0,05)
CD1a ⁻ CD83 ⁺	72,22 ± 9,12 %; 27,15	59,41 ± 7,26 %; 17,16	F=1,10; p=0,31 (>0,05)
CD83 ⁺ CD86 ⁺	47,05 ± 7,11 %; 21,14	51,24 ± 6,12 %; 15,16	F=0,11; p=0,74 (>0,05)
CD83 ⁺ CD80 ⁺	78,23 ± 5,07 %; 15,10	65,25 ± 4,12 %; 9,06	F=3,63; p=0,08 (>0,05)
CCR7 ⁺	83,23 ± 8,02 %; 24,14	82,56 ± 11,31 %; 28,31	F=0,01; p=0,94 (>0,05)
CCR7 ⁺ CD83 ⁺	76,16 ± 9,13 %; 23,43	64,14 ± 7,16 %; 13,05	F=0,74; p=0,41 (>0,05)
HLA DR ⁺	93,03 ± 2,11 %; 6,23	91,31 ± 5,33 %; 12,14	F=0,17; p=0,68 (>0,05)

Примечание: M – среднее значение экспрессии иммунофенотипического маркера, m – ошибка среднего значения, δ – стандартное отклонение, концентрация GM-CSF – 72 нг/мл, IL-4 – 45 нг/мл.

Подсчет количества и оценку жизнеспособности ДК осуществляли с помощью автоматического счетчика клеток «Countess™» («Invitrogen», США) и 0,4 % трипанового синего (Sigma, США). Экспрессию линейноспецифических и дифференцировочных антигенов на моноцитах, незрелых и зрелых ДК изучали с помощью моноклональных антител (ДАКО, Дания) и системы визуализации «In vision» (ДАКО, Дания) для иммуоцитохимического метода; напрямую меченных флуорохромами моноклональных антител (anti-CD83-PE-Cy5, anti-CD1a-PE, anti-CD80-FITC, anti-CD86-FITC, anti-CD14-FITC, anti-CCR7-FITC, anti-HLA-DR-Per CP-Cy5.5), для метода лазерной проточной цитофлуориметрии («BD Biosciences», США). В последнем случае использовали программное обеспечение CellQuest Pro (tm).

Оценку результатов исследования проводили с помощью описательной статистики, однофакторного дисперсионного и регрессионного анализа [4].

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ экспрессии иммунофенотипических маркеров зрелых ДК, дифференцированных в присутствии фиксированной концентрации ростового фактора GM-CSF (CellGenix, Германия) или ГМ-КСФ (Фармсинтез, Россия) 72 нг/мл в сочетании с IL-4 (CellGenix, Германия) 45 нг/мл (табл. 1), не выявил статистически значимых различий ($p > 0,05$), что свидетельствует

о сопоставимой активности ростовых факторов импортного и отечественного производства. Вместе с тем интересным является изучение особенностей дифференцировки ДК на разных стадиях созревания в присутствии ГМ-КСФ отечественного производства.

Результаты исследования (табл. 2) демонстрируют дифференцировку моноцитов в незрелые ДК: появление на клеточной мембране молекулы CD1a ($71 \pm 4,01$ %) и утрату CD14 ($3,02 \pm 1,01$ %). Зрелые ДК характеризуются высокой экспрессией маркера дифференцировки CD83 ($76,1 \pm 4,01$ %) и утратой CD1a антигена ($22,03 \pm 6,02$ %), а также статистически достоверным усилением экспрессии костимулирующих молекул CD80 с $31,01 \pm 12,02$ % до $73,03 \pm 4,02$ % ($p = 0,0003$) и CD86 с $8,01 \pm 2,02$ % до $49,11 \pm 5,03$ % ($p = 0,00001$). Высокий уровень экспрессии молекул хемокинового рецептора (CCR7), обеспечивающего миграцию зрелых ДК в лимфатические узлы, и белков, участвующих в презентации антигена (HLA DR) на 7-й и 9-й день культивирования, свидетельствует о созревании ДК.

Уровень зрелости ДК определяли по коэкспрессии антигенов CD1a и CD83. Анализ результатов свидетельствует о снижении содержания незрелых ДК ($CD1a^+CD83^-$) с $52,01 \pm 11,02$ % до $13,01 \pm 4,02$ % ($p = 0,0003$) и увеличении зрелых ДК ($CD1a^+CD83^+$) с $11,01 \pm 4,04$ % до $67,05 \pm 6,02$ % ($p = 0,00001$) ДК к 9-му дню культивирования. Низкое содержание ДК промежуточной степени зрелости ($CD1a^+CD83^+$) в

Таблица 2

Сравнительный анализ иммунофенотипа ДК на разных стадиях созревания, М±m, δ

Дифференцировочные/ линейноспецифические антигены	ДК незрелые (7-й день)	ДК зрелые (9-й день)	Критерий Фишера (F), уровень значимости (p)
CD1a ⁺	71,12 ± 4,01 %; 11,21	22,03 ± 6,02 %; 24,36	F=25,73; p=0,00001 (<0,05)
CD14 ⁺	3,02 ± 1,01 %; 3,18	4,04 ± 1,02 %; 4,13	F=0,25; p=0,62 (>0,05)
CD83 ⁺	32,02 ± 12,1 %; 33,26	76,1 ± 4,01 %; 17,41	F=17,18; p=0,0005 (<0,05)
CD1a ⁺ CD83 ⁻	52,01 ± 11,02 %; 29,42	13,01 ± 4,02 %; 14,21	F=18,59; p=0,0003 (<0,05)
CD1a ⁺ CD83 ⁺	21,03 ± 9,04 %; 23,17	9,02 ± 3,03 %; 12,25	F=2,79; p=0,11 (>0,05)
CD1aCD83 ⁺	11,01 ± 4,04 %; 11,31	67,05 ± 6,02 %; 24,43	F=34,07; p=0,00001 (<0,05)
CD83 ⁺ CD86 ⁺	8,01 ± 2,02 %; 6,24	49,11 ± 5,03 %; 19,32	F=31,56; p=0,00001 (<0,05)
CD83 ⁺ CD80 ⁺	31,01 ± 12,02 %; 31,11	73,03 ± 4,02 %; 14,34	F=19,574 p=0,0003 (<0,05)
CCR7 ⁺	63,03 ± 14,1 %; 38,32	82,02 ± 6,01 %; 25,18	F=2,044 p=0,17 (>0,05)
HLA-DR ⁺	91,01 ± 3,13 %; 8,26	92,02 ± 2,02 %; 9,02	F=0,16; p=0,68 (>0,05)

Примечание: М – среднее значение экспрессии иммунофенотипического маркера, m – ошибка среднего значения, δ – стандартное отклонение.

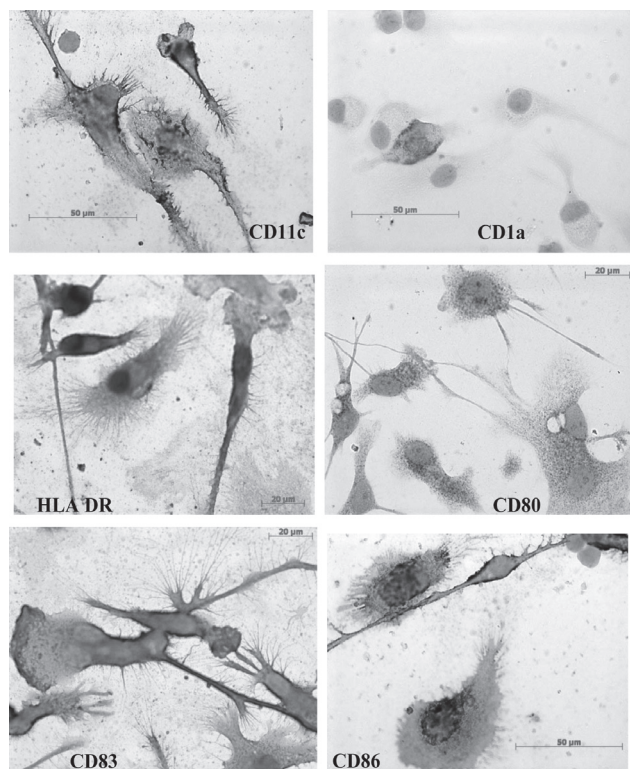


Рис. 1. Микрофото. Иммунофенотип зрелых вакцинных ДК (CD1a⁻, CD83⁺, CD11c⁺, HLA DR⁺, CD86⁺), выращенных *in vitro* в присутствии ростового фактора GM-CSF (72 нг/мл), Фармсинтез (Россия) и IL-4 (45 нг/мл), CellGenix (Германия), нагруженных опухолевым лизатом и активированных TNF- α (20 нг/мл, BD (США), (световой микроскоп, $\times 100$)

указанные сроки свидетельствует об их высокой функциональной активности.

Признаком функциональной активности ДК является повышение уровня экспрессии костимулирующих молекул CD80, CD86, молекул адгезии CD209, антигена CD83, характерного для терминальной степени созревания ДК по сравнению с незрелыми ДК.

На рис. 1 представлен иммунофенотип вакцинных ДК, изученный с помощью иммуноцитохимического метода. Маркеры активированных ДК (HLA DR^{high}, CD1a^{low}, CD80^{high}, CD86^{high}) экспрессируют 65–80 % клеток, что сопоставимо с результатами, полученными методом проточной цитофлуориметрии.

Для дифференцировки ДК из моноцитов периферической крови чаще используют GM-CSF в сочетании с IL-4 и их синергизм в индукции

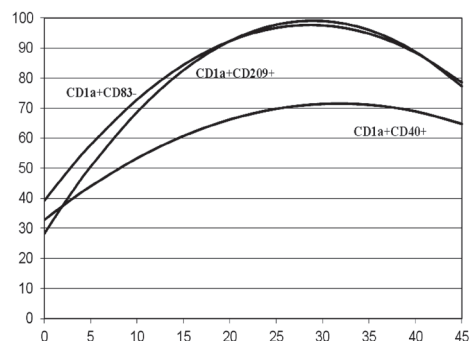


Рис. 2А. Зависимость экспрессии иммунофенотипических маркеров незрелых ДК от концентрации IL-4. Ось абсцисс – концентрации IL-4, нг/мл. Ось ординат – уровень экспрессии иммунофенотипических маркеров, %

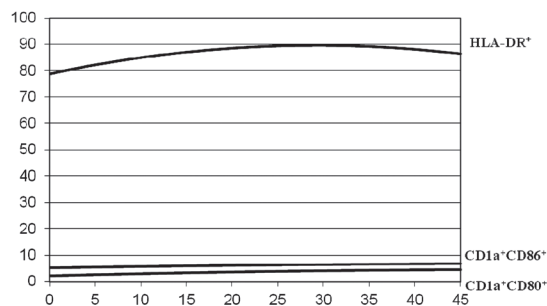


Рис. 2Б. Отсутствие зависимости экспрессии иммунофенотипических маркеров незрелых ДК от концентрации IL-4. Ось абсцисс – концентрации IL-4, нг/мл. Ось ординат – уровень экспрессии иммунофенотипических маркеров, %

созревания [6, 10]. При этом используются различные концентрации IL-4 и GM-CSF без достаточно обоснованной аргументации, что свидетельствует о широком диапазоне их активности. На основе однофакторного регрессионного анализа нами проведена оценка влияния различных концентраций IL-4 на экспрессию иммунофенотипических маркеров незрелых и зрелых ДК. В результате были получены полиномиальные модели второго порядка: $Y_i = A_0 + A_1 \times C + A_2 \times C^2$ (1), где Y_i – уровень экспрессии иммунофенотипического маркера (%), соответственно для Y_1 (CD1a⁺CD83⁺), Y_2 (CD1a⁺CD86⁺), Y_3 (CD1a⁺CD80⁺), Y_4 (CD1a⁺CD40⁺), Y_5 (CD1a⁺CD209⁺), Y_6 (HLA-DR⁺); A_0 , A_1 , A_2 – численные значения коэффициентов моделей; C – концентрация IL-4, нг/мл. Коэффициенты детерминации моделей (R^2) составили от 70,0 до 82,0. Это свидетельствует о возможности

корректного применения выражения (1) для определения зависимости изменений соответствующей величины (Y_i) от параметра (C).

На рис. 2А представлено наличие зависимостей экспрессии маркеров CD1a⁺CD83⁺; CD1a⁺CD40⁺ и CD1a⁺CD209⁺ от концентрации IL-4 от 0 до 45 нг/мл. На рис. 2Б демонстрируется отсутствие существенных изменений уровня экспрессии маркеров CD1a⁺CD86⁺; CD1a⁺CD80⁺ и HLA-DR⁺. Расчеты показывают, что оптимальный интервал концентрации IL-4 при дифференцировке ДК находится в пределах от 5 до 15 нг/мл. Дальнейшее увеличение этой концентрации не приводит к значимому повышению уровня экспрессии изучаемых маркеров.

Таким образом, незрелые и зрелые ДК, дифференцированные из моноцитов периферической крови в присутствии изученных концентраций GM-CSF и IL-4, обладают выраженной функциональной активностью, определяемой по экспрессии молекул активации, миграции и костимулирующих сигналов.

Выводы

Применение для созревания ДК ростового фактора GM-CSF отечественного производства (Фармсинтез, Россия) обеспечивает получение результатов, сопоставимых с таковыми при использовании GM-CSF импортного производства (CellGenix, Германия).

Оптимальный интервал концентрации IL-4 для дифференцировки ДК находится в пределах от 5 до 15 нг/мл.

Для стандартизации технологического процесса получения вакцинных ДК рекомендуется исполь-

зовать оптимальную панель моноклональных антител: CD14, CD1a, CD83, CD86, CD80, CCR7, HLA DR, метод проточной цитометрии или иммуноцитохимическое окрашивание.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балдуева И.А., Новик А.В., Моисеенко В.М., Нехаева Т.Л. Клиническое исследование (II фаза) вакцины на основе аутологичных дендритных клеток с иммунологическим адъювантом у больных с меланомой кожи // Вопросы онкологии. 2012. Т. 58, № 2. С. 212–221.
2. Леплина О.Ю., Насонова Г.В., Тихонова М.А. и др. IFN-индуцированные дендритные клетки у больных множественной миеломой // Сибирский онкологический журнал. 2009. № 6 (36). С. 37–43.
3. Моисеенко В.М., Балдуева И.А. Принципы создания и использования лечебных вакцин в онкологии // Российский онкологический журнал. 2011. № 2. С. 49–53.
4. Медик В.А., Токмачев М.С., Фишман Б.Б. Статистика в медицине и биологии. М.: Медицина, 2000. Т. 1. 454 с.
5. Семилетова Ю.В., Анисимов В.В., Вагнер Р.И. Лечение больных первичной меланомой кожи. Современное состояние проблемы // Сибирский онкологический журнал. 2010. № 4 (40). С. 71–77.
6. Ahn J.S., Agrawal B. IL-4 is more effective than IL-13 for in vitro differentiation of dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells // Int. Immunol. 2005. Vol. 17 (1). P. 1337–1346.
7. Bohnenkamp H.R., Holl T. Development of a standardized protocol for reproducible generation of matured monocyte-derived dendritic cells suitable for clinical application // Cytotechnology. 2003. Vol. 42 (3). P. 121–131.
8. Chiang C.L., Maier D.A., Kandalaft L.E. et al. Optimizing parameters for clinical-scale production of high IL-12 secreting dendritic cells pulsed with oxidized whole tumor cell lysate // J. Transl. Med. 2011. Vol. 9. P. 198–230.
9. Draube A., Klein-Gonzalez N., Mattheus S. et al. Dendritic Cell Based Tumor Vaccination in Prostate and Renal Cell Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis // PLoS One. 2011. Vol. 6 (4). E. 18801. doi: 10.1371/journal.pone.0018801.
10. Hettihewa L.M. Prolonged expression of MHC class I - peptide expression in bone marrow derived retrovirus transfected matured dendritic cells by continuous centrifugation in the presence of IL-4 // Ind. J. Med. Res. 2011. Vol. 134 (5). P. 672–678.
11. Ning J., Morgan D., Pamphilon D. A Rapid Culture Technique Produces Functional Dendritic-Like Cells from Human Acute Myeloid Leukemia Cell Lines // J. Biomed. Biotechnol. 2011. Vol. 2011. 172965. doi: 10.1155/2011/172965. Epub. 2011. Dec 5.

Поступила 5.04.13