АУТОЛОГИЧНАЯ ВАКЦИНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ (19) RU (11)2392946 (13)C2



(51) МПК
A61K35/00 (2006.01)
A61P35/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ, ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: по данным на 18.08.2010 - действует

(21), (22) Заявка: **2008131594/15, 30.07.2008**
(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
30.07.2008
(43) Дата публикации заявки: **10.02.2010**
(46) Опубликовано: **27.06.2010**
(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RU 2309753 C1, 10.11.2007. RU 2267326 C2, 10.01.2006. МОСКАЛЕВА Е.Ю. и др. Перспективы создания противоопухолевых вакцин с использованием дендритных клеток человека. Иммунология, 2002, №1, с. 8-15.**
Адрес для переписки:
634050, г. Томск, Московский тракт, 2, СибГМУ, отдел ИС и В, Н.Г. Зубаревой

(72) Автор(ы):
Волгушев Сергей Анатольевич (RU),
Богдашин Игорь Викторович (RU),
Теплова Надежда Владимировна (RU),
Ванчугова Наталья Леонидовна (RU),
Завьялов Александр Александрович (RU),
Тузиков Сергей Александрович (RU)
(73) Патентообладатель(и):
Закрытое акционерное общество "Томские клеточные технологии" (ЗАО "Клеточные технологии") (RU)

(54) АУТОЛОГИЧНАЯ ВАКЦИНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к области онкологии. Аутологичная клеточная вакцина состоит из двух частей: в одну входит прикрепляющаяся фракция - это зрелые ДК, полученные путем инкубирования незрелых ДК с лизатом опухоли, во вторую входит не прикрепляющаяся фракция - это Т-лимфоциты, специфически активированные интерлейкином 2, зрелыми ДК и ЛАК-клетками. Использование заявленной вакцины позволяет провести эффективное лечение онкологической патологии. 2 н.п. ф-лы, 4 табл.

Изобретение относится к области медицины, онкологии и может быть использовано для лечения онкологических заболеваний различных локализаций.

Несмотря на огромное количество разрабатываемых и используемых методов лечения онкологических заболеваний эта проблема до сих пор остается практически нерешенной. Повышенный интерес вызывает вопрос об эффективности иммунного ответа на опухоль у человека. Одной из гипотез возникновения злокачественного процесса является несостоятельность иммунной системы [1, 2, 3]. Многочисленные исследования показали, что важная роль в защите организма отведена клеточному звену иммунного ответа, представленному в организме рядом эффекторных клеток [1]. Изначально особый интерес вызвала роль натуральных киллеров (НК), относящихся к лимфоидным клеткам, но отличающихся по фенотипу от Т- и В-лимфоцитов.

Была обнаружена способность этих клеток оказывать цитотоксическое действие на опухолевые клетки, что было подтверждено в ряде экспериментов in vitro. В частности, выявлена корреляция между частотой развития опухолевого процесса и количественным уровнем НК у мышей. Механизм действия НК опосредован их способностью распознавать антигены главного комплекса гистосовместимости 1 класса

(МНС 1) на поверхности клеток и останавливать их лизис. Опухолевые клетки могут отличаться от нормальных сниженной экспрессией МНС 1, и тогда такие клетки становятся мишенями для НК. В ряде случаев уровень экспрессии на опухолевых клетках может быть нормальным такие опухоли ускользают из-под контроля НК [1, 4].

Изучение активности клеток лимфоидного ряда под воздействием различных цитокинов показало, что важную роль в активности Т-лимфоцитов и НК играет ИЛ2. В 1980 году было опубликовано сообщение о том, что лимфоциты, культивированные в присутствии ИЛ2, способны лизировать опухолевые клетки саркомы. Это явление получило название ЛАК-феномена. В дальнейшем было выяснено, что лимфокинактивированные киллеры (ЛАК) происходят из субпопуляции НК и обладают специализированной цитотоксичностью по отношению к опухолевым клеткам. Образование ЛАК является результатом активации НК под действием ряда факторов, главным из которых является интерлейкин-2 (ИЛ2). Этот цитокин способствует генерации и усилению цитотоксичности ЛАК-клеток, участвует в регуляции иммунного ответа и направляет его по Т-хелпер первому клеточному пути развития. В организме ИЛ-2 способствует пролиферации и дифференцировке Т-лимфоцитов, стимулирует клональную пролиферацию В-лимфоцитов и антителообразование, увеличивает функциональную активность фагоцитов и клеток натуральных киллеров [1, 5, 6,].

Изучение ЛАК-феномена быстро перешло в клинику. За весь период его изучения (20 лет) применялись как аллогенные, так и аутологичные ЛАК, культивированные в различных условиях. ЛАК вводили как системно, так и локально, изолированно и в комплексе с цитокинами, в том числе с ИЛ2, однако эти методы терапии не оправдали возложенных на него надежд. Лишь в 50% случаев наблюдалась клиническая эффективность лечения, результат оказался статистически недостоверным, но в ряде случаев достоверно снижалась частота метастазирования. Кроме того, были отработаны наиболее эффективные методы получения ЛАК и введения их в организм [1].

В последние годы исследователи различных специальностей уделяют большое внимание разработке и изучению противоопухолевых вакцин. Вакцинация - это способ создания активного специфического иммунитета с помощью вакцины, содержащей иммуногенный антиген [3, 7].
Антигенами при опухолях являются компоненты опухолевых клеток, измененные по структуре относительно нормальных клеток организма.

В последнее время стало ясно, что в процессе опухолевой прогрессии важную роль играют дендритные клетки (ДК). Природа этого феномена связана со способностью ДК презентировать опухолевые антигены цитотоксическим Т-лимфоцитам (ЦТК). Установлено, что по причине отсутствия ДК в опухоли или слабой экспрессии молекул МНС 1 и 2 классов, а также CD80 и CD86 костимулирующих молекул на ДК, инфильтрирующих опухоль, не создается устойчивый антигенспецифический Т-клеточный ответ [9, 10]. Это может быть следствием продукции злокачественной опухолью факторов (ИЛ-10, ТФР-бета, фактор роста эндотелия и др.), угнетающих дифференцировку, созревание и функциональную активность периферических ДК [11].

Критическим фактором в запуске иммунной реакции является созревание ДК. Оно может быть инициировано различными стимулами, в том числе опухолевыми антигенами, микробными продуктами и продуктами воспаления (цитокины: ИЛ-1, ИЛ-6, ГМ-КСФ, ФНО-а, ЛПС). В процессе созревания антигензахватывающая функция ДК снижается, а способность активировать Т-клетки повышается. Окончательно дифференцированная ДК способна эффективно активировать Т-клетки, после чего последние могут осуществлять иммунный ответ [1, 9, 30].
In vivo ДК участвуют в формировании иммунной реакции в лимфоидных органах. Там они взаимодействуют со всеми основными классами Т-клеток и стимулируют развитие сильного Т-клеточного иммунного ответа [1, 9, 10].

В последнее время ДК рассматривают в качестве основного адъюванта при создании вакцин для лечения рака [3, 12, 13]. Есть основания полагать, что использование нагруженных антигеном «профессиональных» антигенпрезентирующих дендритных клеток поможет создать сильный специфический иммунный ответ. Было показано, что ДК, инкубированные с антигенами опухоли, способны генерировать формирование Т-клеточного защитного ответа как против опухолевых клеток, вторично введенных в организм, так и против имевшихся опухолей. Возможность выделения опухолеспецифических антигенов позволила реализовать стратегию иммунотерапии, основанную на представлении этих антигенов молекулами МНС одного класса

ДК с генерированием цитотоксических CD8+ Т-клеток, способных вызывать отторжение опухоли [3, 12, 13].

Важную роль также играет источник получения опухолевого антигена. До сих пор ДК чаще стимулировали отдельными пептидами и белками. Однако недостатком такого подхода является недстаточная лечебная эффективность вакцины, обусловленная ее гетерогенностью и неизученностью антигенного состава опухолевых клеток. Лизат, полученный из собственной опухоли пациента, содержит широкий спектр антигенов, в том числе и не известные в настоящий момент [14].

Немаловажен и способ введения ДК. Так было показано, что подкожно введенные ДК, обладают большей иммуногенностью и способностью к миграции в отличие от ДК, введенных внутривенно [12, 13].
К настоящему времени проведен ряд испытаний противоопухолевых вакцин на основе ДК. Имеются данные об опыте применения вакцины при фолликулярной лимфоме, меланоме, миеломе, раке простаты, молочной железы, шейки матки, толстой кишки, щитовидной железы [15, 16, 17].

Наиболее близким к предлагаемому является способ получения вакцины для лечения онкологических заболеваний - комбинированного клеточного трансплантата на основе лимфокинактивированных киллеров (ЛАК-клеток) и дендритных клеток (ДК) [18]. ДК получают из аутологичных моноцитов периферической крови или костного мозга и in vitro активируют аутологичным опухолевым лизатом и ростовыми факторами. ЛАК-клетки получают из мононуклеаров крови и активируют ИЛ 2. В последующем ДК вводят в организм подкожно, внутривенно, интерартериально или регионально (в полости), а ЛАК-клетки вводят внутривенно. Известная вакцина обладает недостаточной клинической эффективностью вследствие отсутствия специфически активированных in vitro Т-лимфоцитов.
Новая техническая задача - разработка новой вакцины для эффективного лечения онкологической патологии на основе аутологичных мононуклеарных клеток крови: антигенактивированных дендритных клеток, специфически активированных «обученных» и неспецифически активированных лимфоцитов, сочетающей одновременное воздействие на специфическое и неспецифическое звено противоопухолевого иммунного ответа, и способа ее получения.

Для решения поставленной задачи предложена группа изобретений, объединенная общим изобретательским замыслом.

Предложена аутологичная вакцина для лечения онкологических заболеваний, содержащая лимфоциты, активированные интерлейкином 2, дендритные клетки, полученные путем инкубирования незрелых ДК с лизатом опухоли, причем она дополнительно содержит Т-лимфоциты, специфически активированные зрелыми ДК.

Предложен способ получения аутологичной вакцины для лечения онкологических заболеваний, включающий выделение мононуклеаров (МНК) из периферической крови пациента, культивирование МНК в среде DMEM, разделение клеток на моноциты, прикрепляющиеся к подложке, и лимфоциты, не прикрепляющиеся к подложке, помещение МНК в культуральную среду, отделение не прикрепляющихся лимфоцитов и добавление к ним ИЛ2 для получения лимфокинактивированных киллеров (ЛАК-клеток), добавление к оставшимся прикрепляющимся моноцитам ростового фактора, стимуляцию созревания ДК аутологичным опухолевым лизатом in vitro и последующим добавлением созревающих факторов в течение 1 суток, в котором для получения прикрепляющихся моноцитов МНК культивируют в среде, дополненной FCS 10% в течение одного часа, после чего для получения незрелых дендритных клеток (нДК) проводят культивацию прикрепляющихся моноцитов в среде, дополненной нейпогеном 50 нг/мл в течение 48 часов, после чего для получения зрелых дендритных клеток нДК культивируют в среде, содержащей 2000 МЕ/мл реоферона и 50 нг/мл беталейкина, при этом параллельно культивируют ЛАК-клетки из неприкрепляющейся фракции МНК в среде, содержащей 100 ЕД/мл ронколейкина в течение 72 часов, и далее полученные зДК и ЛАК-клетки отмывают центрифугированием в физиологическом растворе 10 минут при 1500 об/мин, после чего проводят совместную культивацию зДК с ЛАК-клетками в среде, дополненной 100 ЕД/мл ронколейкином в течение 24 часов, затем снимают прикрепляющуюся фракцию и не прикрепляющуюся фракцию клеток и раздельно отмывают центрифугированием в физиологическом растворе 10 минут при 1500 об/мин, получая вакцину.

Способ осуществляют следующим образом:
1) выделяют МНК из крови человека, нуждающегося в лечении онкологического заболевания,
2) инкубируют выделенные МНК в среде в течение 1 часа,

3) разделяют МНК на 2 фракции: прикрепляющиеся моноциты и не прикрепляющиеся к подложке лимфоциты,
4) обрабатывают прикрепляющиеся МНК ростовыми факторами для получения незрелых ДК (нДК)в течение 48 часов,
5) обрабатывают нДК лизатом опухолевых клеток и цитокинами для получения зрелых ДК (зДК) в течение 24 часов,
6) культивируют неприкрепляющуюся фракцию МНК с ИЛ-2 для получения не специфически активированных лимфоцитов - ЛАК-клеток в течение 72 часов,
7) проводят отмывку зДК и ЛАК-клеток центрифугированием в физиологическом растворе 10 минут при 1500 об/мин.
8) проводят совместное культивирование зДК и ЛАК-клеток в свежей среде, дополненной 100 ЕД/мл ронколейкином в течение 24 часов, для получения специфически активированных лимфоцитов-киллеров.
9) снимают прикрепляющуюся фракцию и не прикрепляющуюся фракцию клеток и раздельно отмывают центрифугированием в физиологическом растворе 10 минут при 1500 об/мин, получая вакцину.

Выделяют мононуклеары из периферической крови на градиенте фикол-урографина (р=1,077 г/см^3) при соотношении крови и градиента 2:1 соответственно. Мононуклеарную фракцию клеток в количестве 2×10^6 /мл ресуспендируют в среде DMEM, дополненной FCS 10%, HEPES 5 мМ, глутамином 2 мМ, 2-меркаптоэтанолом 5×10-5М. гентамицином 1000 мкг/мл (рассчитанные на 100 мл DMEM), помещают во флаконы для культивирования и инкубируют 1 час при температуре 37°С в атмосфере 5% CO_2. Далее, мононуклеары разделяют на прикрепляющуюся и неприкрепляющуюся фракции. Прикрепляющуюся фракцию помещают в упомянутую среду с добавлением нейпогена 50 нг/мл на 48 часов для получения незрелых дендритных клеток (нДК), которые способны к активному захвату антигена, путем фагоцитоза и макропиноцитоза. Затем добавляют лизат опухолевых клеток с концентрацией 100 мкг/мл, беталейкин 50 нг/мл и реоферон 2000 МЕ/мл, проводят культивирование в течение 24 часов для получения зрелых дендритных клеток (зДК).

К не прикрепляющейся фракции добавляют ронколейкин 100 ЕД/мл и культивируют 72 часа для получения ЛАК-клеток. После чего полученные зДК и ЛАК-клетки отмывают центрифугированием 10 минут при 1500 об/мин. После 72 часов проводят совместную культивацию зДК и ЛАК-клеток в свежей среде, дополненной 100 ЕД/мл ронколейкином в течение 24 часов. После чего снимают прикрепляющуюся фракцию и не прикрепляющуюся фракцию клеток и раздельно отмывают центрифугированием в физиологическом растворе 10 минут при 1500 об/мин, получая вакцину.

DMEM - среда с высоким содержанием аминокислот и витаминов, включает в свой состав трасферрин, лейцин, глюкоза, пируват и ряд других веществ. Обладает высокой биологической стабильностью, обеспечивает нормальную жизнедеятельности многих типов и линий клеток, в том числе и лимфоидных.

HEPES - буфер, нетоксичный для клеток. Широко применяется для поддержания pH среды от 6,8-8,2 в культуральных исследованиях по выращиванию лимфоидных клеток. Концентрация подобрана авторами опытным путем.

2-меркаптоэтанол - антиоксидант, вызывает реактивацию многих ферментов, используется в качестве добавки при культивировании лимфоидных клеток, увеличивает выход клеток гранулоцит - макрофагального ряда.

FCS - эмбриональная телячья сыворотка, инактивированная в течение 30 минут при температуре 60°С для снижения вероятности неспецифической антигенной стимуляции. Поддерживает рост клеток за счет содержащихся в ней факторов роста, интерлейкинов. гормонов, альбумина и других биологически активных веществ. Используется при выращивании различных типов гемопоэтических и лимфоидных клеток. Глутамин - незаменимая аминокислота, необходимая для питания растущих клеток. Гентамицин - антибиотик, подавляет рост бактериальной флоры, добавляется в концентрации, нетоксичной для растущей культуры клеток, рассчитанной экспериментально.

Нейпоген является рекомбинантным аналогом гранулоцит - макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ). Препарат зарегистрирован и разрешен к применению на территории РФ. ГМ-КСФ - гликопротеин, гемопоэтический ростовой фактор, который регулирует образование и функционирование иммунокомпетентных клеток: дендритных клеток, макрофагов и гранулоцитов. В периферической крови человека содержится всего лишь около 1% дендритных клеток, и поэтому получение достаточного

количества ДК in vitro для терапевтического использования в практике из моноцитов периферической крови возможно путем культивирования в присутствии ростовых факторов, основным из которых является ГМ-КСФ [8, 9, 19, 20]. Время культивации и концентрация подобраны авторами экспериментально с учетом максимального выхода незрелых ДК, фенотип которых определен по основным маркерам CD83 и CD 86.

Беталейкин - препарат человеческого рекомбинантного интерлейкина-1бета. Препарат зарегистрирован и разрешен к применению на территории РФ. При культивации незрелых дендритных клеток in vitro ИЛ-1 стимулирует созревание дендритных клеток и приобретение последних фенотипа, соответствующего зрелым ДК, которые способны к эффективной презентации антигена и активации Т-лимфоцитов [21, 22].

Реоферон - препарат человеческого рекомбинантного интерферона-альфа. Препарат зарегистрирован и разрешен к применению на территории РФ. Интерферон-альфа является главным сигналом для дифференцировки и созревания дендритных клеток. Интерферон-альфа in vitro обеспечивает быструю дифференцировку моноцитов крови, предварительно культивируемых в среде с ГМ-КСФ, в дендритные клетки с высокой функциональной активностью и способностью эффективно презентировать антиген Т-лимфоцитам.

Поэтапное культивирование моноцитов, выделенных из периферической крови пациента, способствует получению сначала незрелых дендритных клеток с выраженной способностью только поглощать антиген, а затем после добавления лизата опухоли и вышеперечисленных препаратов, стимулирующих созревание дендритных клеток, способствует получению зрелых ДК, которые эффективно презентируют антигены и активируют Т-хелперы. Время, необходимое и достаточное для эффективной культивации зрелых и незрелых ДК, определены авторами экспериментально.

Не прикрепляющуюся фракцию клеток культивируют с Ронколейкином 100 ЕД/мл в течение 72 часов. Ронколейкин - препарат рекомбинантного человеческого интерлейкина-2. Интерлейкин-2 вызывает поликлональную активацию Т-лимфоцитов и генерацию лимфокинактивированных киллеров in vitro. Образование ЛАК является результатом активации натуральных киллеров под действием ИЛ-2. Этот цитокин способствует генерации и усилению цитотоксичности ЛАК-клеток, которые более специфичны по отношению к опухолевым клеткам нежели НК-клетки. Концентрацию ронколейкина и время культивации не прикрепляющейся фракции клеток в среде, содержащей этот препарат, подобраны авторами экспериментально.

Совместное культивирование прикрепляющейся и не прикрепляющейся фракций клеток проводят в свежей среде с добавлением ронколейкина 100 ЕД/мл в течение 24 часов. На данном этапе запускается презентация антигена в составе аутологичных антигенактивированных зрелых дендритных клеток наивным Т-лимфоцитам хелперам. В присутствии ронколейкина процесс дифференцировки Т-хелперов направляется по первому пути, что приводит к развертыванию специфического противоопухолевого иммунного ответа. Образуются активированные цитотоксические Т-киллеры (CD8) и Т-лимфоциты гиперчувствительности замедленного типа (Т-ГЗТ (CD4)). которые являются основными эффекторами клеточного пути иммунного ответа. Время культивации подобрано авторами экспериментально.

Отличием предлагаемого способа является осуществление этапа совместного культивирования аутологичных антигенактивированных зрелых дендритных клеток и неспецифически активированных лимфоцитов - ЛАК-клеток, что позволяет смоделировать in vitro специфический противоопухолевый иммунный ответ и избежать супрессирующего воздействия на процесс презентации антигена наивным Т-лимфоцитам метаболитов опухолевых клеток в организме пациента. Для культивации клеток в предлагаемом способе используются препараты, разрешенные к применению на территории Российской Федерации и имеющие регистрационные номера. Использование реоферона в качестве компонента среды для получения зДК позволяет сократить время, необходимое для созревания нДК [20, 23, 24, 25].

Культивирование МНК проводят в среде с добавлением инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (FCS), что позволяет нивелировать развитие аллергической реакции на антигены, содержащиеся в сыворотке доноров. Кроме того, использование FCS исключает возможность супрессивного воздействия на клетки вакцины продуктов опухолевого роста, содержащихся в сыворотке пациента с онкопатологией.
Приводим результаты тестов, подтверждающих эффективность вакцины in vitro.

Фенотип ДК

Для анализа фенотипических характеристик дендритных клеток использовались моноклональные антитела anti-CD83-PE (BD Pharmingen), anti-CD86-FITC (BD Pharmingen), anti-HLA-DR-FITC («Сорбент», Москва) с последующим анализом на проточном цитометре FACSCalibur (BD Biosciense). Признаком функциональной зрелости дендритных клеток (зДК) считалось повышение уровня экспрессии вышеперечисленных маркеров по сравнению с незрелыми ДК (нДК).

В табл.1 приведены фенотипические характеристики дендритных клеток, полученных из моноцитов периферической крови пациентов, больных раком различной локализации (n=47), (* - различия достоверны ($p<0.05$) по сравнению с незрелыми дендритными клетками)

Через 72 часа созревания нДК приобретают фенотип зрелых дендритных клеток, увеличивая экспрессию CD83+CD86+HLA-DR+.

Пролиферативная активность

Для определения эффективности модуляции противоопухолевого иммунного ответа оценивалась пролиферативная активность мононуклеарных клеток с использованием системы APO-BRDU Flow Kit на проточном цитометре FACSCalibur (BD Biosciense). Тестирование проводилось через 72 часа культивирования МНК + зДК, с лизатом опухолевых клеток и без него. В табл.2 приведены данные по пролиферативному ответу мононуклеарных клеток пациентов, больных раком различной локализации, культивированных с антигенактивированными ДК (n=47), * - различия достоверны ($p<0.05$) по сравнению с группой МНК.

Таким образом, антигенактивированные дендритные клетки повышают пролиферативную активность мононуклеарных клеток больных раком различной локализации in vitro.

Продукция IFN-γ

Для определения эффективности ответа на опухолевые антигены оценивали количество клеток, продуцирующих IFN-γ, с использованием системы BD FastImmune Cytokine на проточном цитометре FACSCalibur (BD Biosciense). Определение уровня продукции IFN- γ в культуральных супернатантах МНК проводили с помощью иммуноферментного анализа («Вектор-Бест») через 72 часа культивирования МНК активированных зДК. Под действием аутологичных антигенактивированных дендритных клеток больных раком различной локализации достоверно повышается количество IFN- γ - секретирующих клеток и уровень продукции цитокина мононуклеарными клетками в ответ на опухолевый антиген (лизат) по сравнению с клетками исходной популяции. В табл.3 приведены данные по продукции IFN γ МНК пациентов, больных раком различной локализации, культивированных с антигенактивированными ДК (n=47), * - различия достоверны ($p<0.05$) по сравнению с группой МНК.

Цитотоксическая активность

Одним из основных эффективных способов борьбы иммунокомпетентных клеток с опухолевыми является цитолиз, опосредованный цитотоксическими Т-лимфоцитами и натуральными киллерами (NK-клетки). Исследование цитотоксической активности МНК, культивированных в присутствии ДК, презентирующих антигены опухолевого лизата. проводилось с помощью проточной цитофлюориметрии по включению ядерного красителя 7-аминоактиномицина D. В табл.4 приведены данные по цитотоксической активности МНК+ДК у больных раком различной локализации (n=47), * - различия достоверны ($p<0.05$) по сравнению с группой МНК.

Показано, что использование аутологичных ДК усиливает цитотоксическую активность МНК против клеток опухоли.

Статистическая обработка результатов

Результаты представлены в виде среднего и ошибки среднего при $p<0.05$. Статистическая достоверность различий определялась с использованием программы Statistica 6.0.

Таким образом, в результате проведенных исследований показана возможность индукции специфического противоопухолевого иммунного ответа с помощью антигенактивированных дендритных клеток и «обученных» мононуклеарных клеток in vitro. Совместное культивирование специфических аутологичных ДК и МНК больных раком различной локализации приводит к активации МНК, что проявляется в усилении их пролиферативного потенциала, повышении количества цитотоксических клеток и их функциональной активности.

Таблица 1

Уровень экспрессии маркеров (% позитивных клеток)	Стадия развития ДК	
	Незрелые ДК (%)	Зрелые ДК (%)
CD 83+/CD 86+	18,59±1,05	31,33±1,56
CD 83+/HLA-DR+	7,67±0,45	22,26±1,12*:

Таблица 2

Группы	Спонтанный пролиферативный ответ (%)	Антигенстимулированный пролиферативный ответ (%)
МНК	100	99±5,95
МНК + ДК (без антигена)	205±10,25*	240±12,01*
МНК + ДК (с антигеном)	275±13,75*	245±19,05*

Таблица 3

Группы	Количество IFN-γ продуцирующих клеток (%)		Содержание IFN-γ в супернатантах МНК (пг/мл)	
	Спонтанная	Антигенстимулированная	Спонтанная	Антигенстимулированная
МНК	32±1,3	64±3,2	65±3,25	135±6,75
МНК + ДК (без антигена)	81±14,05	97±15,1	105±15,25	381±49,05
МНК + ДК (с антигеном)	84±4,02*	16±8,15*	618±30,91	885±44,25*

Таблица 4

№	Нозология	МНК (%)	МНК, в присутствии ДК, (%)
1	рак легкого (n=12)	2,24±0,12	7,65±0,43*
2	рак желудка (n=20)	2,87±0,14	6,02±0,31*
3	рак кишки (n=15)	6,9±0,35	11,75±0,58*

Источники информации

1. Бережная Н.М. Иммунология злокачественного роста / Н.М.Бережная, В.Ф.Чехун. Киев: Наукова думка, 2005. - 791 с.
2. Kremetz E. Clinical experience in the immunotherapy of cancer / E.Kremetz, M.Samuel. J.Wallace // Surg. Gynecol. Obstet. - 1971. - Vol.133. - P.209-217.
3. Балдуева И.А. Противоопухолевые вакцины // Практическая онкология. Биотерапия злокачественных опухолей. - 2003. - №4(3). - С.66-70.
4. Self-tolerance, dendritic cell (DC)-mediated activation and tissue distribution of natural killer (NK) cells // Ivan Zanoni, Francesca Granucci, Maria Foti and et al. // Immunology letters. 2007. - №110. - С.6-17.
5. Опыт применения интерлейкина-2 и лимфокинактивированных клеток-киллеров в терапии онкогематологических заболеваний у детей / М.В.Киселевский, Г.В.Казанова, С.Р.Варфоломеева и др. // Иммунология. - 2002. - Т.23, №1 - С.56-59.
6. Цитокины в лечении рака / И.В. Киселева, С.Ф. Протасова, В.В.Жунко, С.М.Щеканова // Русский журнал ВИЧ/СПИД и родственные проблемы. - 1999. - Т.3, №1. - С.48-52.
7. Моисеенко В.М. Вакцинотерапия злокачественных опухолей / В.М.Моисеенко, И.Л.Балдуева, К.П.Хансон // Вопросы онкологии. - 1999. - Т.3, №1. - С.327-332.
8. Москалева Е.Ю. Перспективы создания противоопухолевых вакцин с использованием дендритных клеток человека / Е.Ю.Москалева, С.Е.Северин // Иммунология. - 2002. - №1. - С.8-15.
9. Птушкин В.В. Дендритные клетки и роль цитокинов в их дифференцировке и функционировании / В.В.Птушкин // Клиническая онкогематология: Руководство для врачей. - Москва, 2001. - С.6-72.
10. Пащенков М.В. Основные свойства дендритных клеток / М.В.Пащенков, Б.В.Пинегин // Иммунология. - 2001. - №4. - С.7-16.

11. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance / F.M.Marincola, E.M.Jaffee, D.J.Hicklin and et al. // Adv. Immunol. - 2000. - Vol.74. - P.181-273.
12. Коростелев С.А. Противоопухолевые вакцины // Современная онкология. - 2003. №4(3). - С.9-15.
13. Москалева Е.Ю. Перспективы создания противоопухолевых вакцин с использованием дендритных клеток человека / Е.Ю.Москалева, С.Е.Северин // Иммунология, - 2002. - №1. - С.8-15.
14. A phase 1 trial of tumor lysate-pulsed dendritic cells in the treatment of advanced cancer / A.E.Chag, B.G.Redman, J.R.Whitfield et al. // Clin. Cancer Res. - 2002, - Vol.8. - P.1021-1032.
15. Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma / R.Soiffer, T.Lynch, M.Mihm, et al. // Proc Natl. Acad Sci USA. - 1998. - №95. - P.13141-13146.
16. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells / F.J.Hsu, C.Benike, F.Fagnoni, et al. // Nat. Med. - 1996. - P.52-58.
17. Прокопович С.К. Дендритные клетки и перспективы их использования в иммунотерапии злокачественных новообразований / С.К.Прокопович, В.Б.Винницкий // Онкология. - 2001. - Т.3. - №2-3. - С.126-131.
18. Патент РФ №2309753 Комбинированный клеточный трансплантат на основе лимфокинактивированных киллеров и дендритных клеток, способ его получения и способ лечения и профилактики онкологических, инфекционных заболеваний и иммунодефицитных состояний / Д.В.Гольдштейн, А.В.Макаров, И.В.Арутюняна и соавт. - №2309753; Заявлено 2006.05.05; Опубликован 2007.11.10 (прототип).
19. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor ameliorates DSS-induced experimental colitis / Satheesh K. Sainathan, Eyad M. Hanna, Qingqing Gong et al. // Inflamm Bowel Disease. - 2008. - Vol.14. - №1. - P.88-99.
20. Expression of CCR-7, MIP-3, and Th-1chemokines in type I IFN-induced monocytederived dendritic cells: importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities / S.Parlato, Stefano M.Santini, C.Lapenta, et al. // Blood. - 2001. - Vol.98. - №10. - P.3022-3029.
21. Generation of dendritic cells from positively selected CD14+ monocytes for anti-tumor immunotherapy / A.Curti, A.Isidori, E.Ferri, et al. // Leukemia and Lymphoma. - 2004. - Vol.45. - №7. - P.1419-1428.
22. Simplified method to generate large quantities of dendritic cells suitable for clinical applications / B.Goxe, N.Latour, M.Chokri // Immunological investigations. - 2000. - Vol.29. - №3. - P. 319-336.
23. A new type I IFN-mediated pathway for the rapid differentiation of monocytes into highly active dendritic cells / S.M.Santini, Di T.Pucchio, C.Lapenta, et al. // Stem Cells. - 2003. - Vol.21. - №3. - P.357-362.
24. Type 1 interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-scid mice / S.M.Santini, C.Lapenta, M.Logozzi. et al. // J Exp Med. - 2000. - №191. - P.1777-1788.
25. Частично-зрелые дендритные клетки как потенциальная основа для индукции противоопухолевого ответа у больных злокачественными глиомами / О.Ю.Леплина, М.А.Тихонова, Ю.П.Козлов и соавт. // Медицинская Иммунология. - 2005. - Т.7. - №4. - С.365-374.
26. Златник Е.Ю. Изучение возможности применения Ронколейкина для LAK-терапии рака яичника / Е.Ю.Златник, Л.Ю.Голотина // Цитокины и воспаление. - 2005. - Т.4. №2. - С.54-58.

Формула изобретения

1. Аутологичная вакцина для лечения онкологических заболеваний, содержащая лимфоциты, активированные интерлейкином 2, дендритные клетки (ДК), полученные путем инкубирования незрелых ДК с лизатом опухоли, отличающаяся тем, что вакцина состоит из двух частей, в одну входит прикрепляющаяся фракция - это зрелые ДК, во вторую входит неприкрепляющаяся фракция - это Т-лимфоциты, специфически активированные зрелыми ДК (зДК) и ЛАК-клетками.
2. Способ получения аутологичной вакцины для лечения онкологических заболеваний, включающий выделение мононуклеаров (МНК) из периферической крови пациента, культивирование МНК в среде DMEM, разделение клеток на моноциты, прикрепляющиеся к подложке, и лимфоциты, не прикрепляющиеся к подложке, помещение МНК в культуральную среду, отделение не прикрепляющихся лимфоцитов и добавление к ним ИЛ2 для получения лимфокинактивированных киллеров (ЛАК-клеток), добавление к оставшимся прикрепляющимся моноцитам ростового фактора, стимуляцию созревания ДК аутологичным опухолевым лизатом in vitro и последующим добавлением созревающих факторов в течение 1 сут, отличающийся тем, что для получения прикрепляющихся моноцитов МНК культивируют в среде, дополненной FCS 10% в течение одного часа, после чего для получения незрелых дендритных клеток (нДК) проводят культивацию прикрепляющихся моноцитов в среде, дополненной нейпогеном 50 нг/мл в течение 48 ч, после чего для получения зрелых дендритных клеток нДК культивируют в среде, содержащей 2000 МЕ/мл реоферона и 50 нг/мл беталейкина, при этом параллельно культивируют ЛАК-клетки из неприкрепляющейся фракции МНК в среде, содержащей 100 ЕД/мл ронколейкина, в течение 72 ч, и далее полученные зДК и ЛАК-клетки отмывают центрифугированием в физиологическом растворе 10 мин при 1500 об/мин, после чего проводят совместную культивацию зДК с ЛАК-клетками в среде, дополненной 100 ЕД/мл ронколейкином, в течение 24 ч, затем снимают прикрепляющуюся фракцию и неприкрепляющуюся фракцию клеток и раздельно отмывают центрифугированием в физиологическом растворе 10 мин при 1500 об/мин, получая вакцину.