

Котрансплантация ГСК и ММСК, вопреки ожиданиям исследователей, не приводила к стимуляции восстановления кроветворения. Возможно, это было связано с недостаточным количеством ММСК, пересаженных пациентам. В других клинических исследованиях было показано, что при котрансплантации с аллогенными ГСК ММСК в количестве  $1,0-2,8 \times 10^6$  клеток на килограмм веса пациента достигается ускоренное восстановление кроветворения в сравнении с контрольной группой [10].

Несмотря на то, что это клиническое исследование было пилотным и в нём приняло участие всего 30 пациентов с разными заболеваниями, его результаты указывают на опережающий риск подобных котрансплантаций при онкогематологических заболеваниях. При этом подтверждаются данные доклинических экспериментов на клетках животных и более ранних клинических исследований, в которых была

показана способность ММСК снижать риск развития и остроту РТПХ [14,15].

Исследователи предполагают, что ММСК могут препятствовать развитию реакции «трансплантат против опухоли», подавляя иммунокомпетентные клетки, образующиеся из трансплантированных пациенту ГСК. Этим также может быть объяснено повышение частоты рецидивов основного заболевания. Авторы считают, что котрансплантация ММСК может быть более эффективна и иметь больший терапевтический эффект при незлокачественных заболеваниях крови, делая на основании полученных данных вывод об опасности трансплантации ММСК в случае присутствия в организме пациента опухолевых клеток. Таким образом, для подтверждения данных настоящего исследования требуется проведение более широкомасштабного рандомизированного клинического исследования.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Armitage J.O. Bone marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.* 1994; 330: 827-38.
2. Yeager A.M.. Allogeneic hematopoietic cell transplantation in inborn metabolic diseases. *Ann. Hematol.* 2002; 81: 16-9.
3. Burt R.K., Traynor A.E., Craig R., Marmont A.M. The promise of hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases. *Bone Marrow Transplant.* 2003; 31: 521-4.
4. Wingard J.R., Vogelsang G.B., Deeg H.J. Stem cell transplantation: supportive care and long-term complications. *Hematology* 2002, 422-44.
5. Tabbara I.A., Zimmerman K., Morgan C., Nahleh Z. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: complications and results. *Arch. Intern. Med.* 2002; 162: 1558-66.
6. Antin J.H., Chen A.R., Couriel D.R. et al. Novel approaches to the therapy of steroid-resistant acute graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2004; 10: 655-68.
7. Ferrara J.L., Deeg H.J.. Graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med.* 1991; 324: 667-74.
8. Marmont A.M., Horowitz M.M., Gale R.P. et al. Depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood* 1991; 78: 2120-30.
9. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-7.
10. Koc O.N., Gerson S.L., Cooper B.W. et al. Rapid hematopoietic recovery

after co-infusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 2000; 18: 307-16.

11. Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M. et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp. Hematol.* 2002; 30: 42-8.
12. Krampera M., Glennie S., Dyson J. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003; 101: 3722-9.
13. Tse W.T., Pendleton J.D., Beyer W.M. et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow Leukemia stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 2003; 75: 389-97.
14. Frassoni F., Labopin M., Bacigalupo A. et al. Expanded mesenchymal stem cells (MSC), coinfused with HLA identical hematopoietic stem cells transplants, reduce acute and chronic graft-versus-host disease: a matched pair analysis in hematologic malignancy patients. *Bone Marrow Transplant.* 2002; 29 (suppl 2): S2 [Abstract 75].
15. Le Blanc K., Rasmusson I., Sundberg B. et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004; 363: 1439-41.
16. Djouad F., Plence P., Bony C. et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003; 102: 3837-44.

Подготовила А.С. Григорян

По материалам: Ning H., Yang F., Jiang M. et al. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. *Leukemia* 2008; 22: 593-9

## Кратковременная селективная деплеция Т-лимфоцитов может приводить к регрессии метастазов у пациентов с меланомой

Одной из наиболее приоритетных прикладных задач современной иммунологии является разработка новых методов лечения злокачественных новообразований. Несмотря на то, что прогресс в данной области пока невелик, в настоящее время сформировалось несколько направлений противоопухолевой иммунотерапии, находящихся на стадии клинических испытаний или уже внедренных в клиническую практику. Наиболее эффективным из них является адаптивная клеточная терапия (адаптивная иммунотерапия) [1].

Адаптивная клеточная терапия (АКТ) заключается в идентификации *ex vivo* ауто- или аллогенных лимфоцитов с противоопухолевой активностью, их экспансию и последующее введение пациентам совместно с факторами роста,

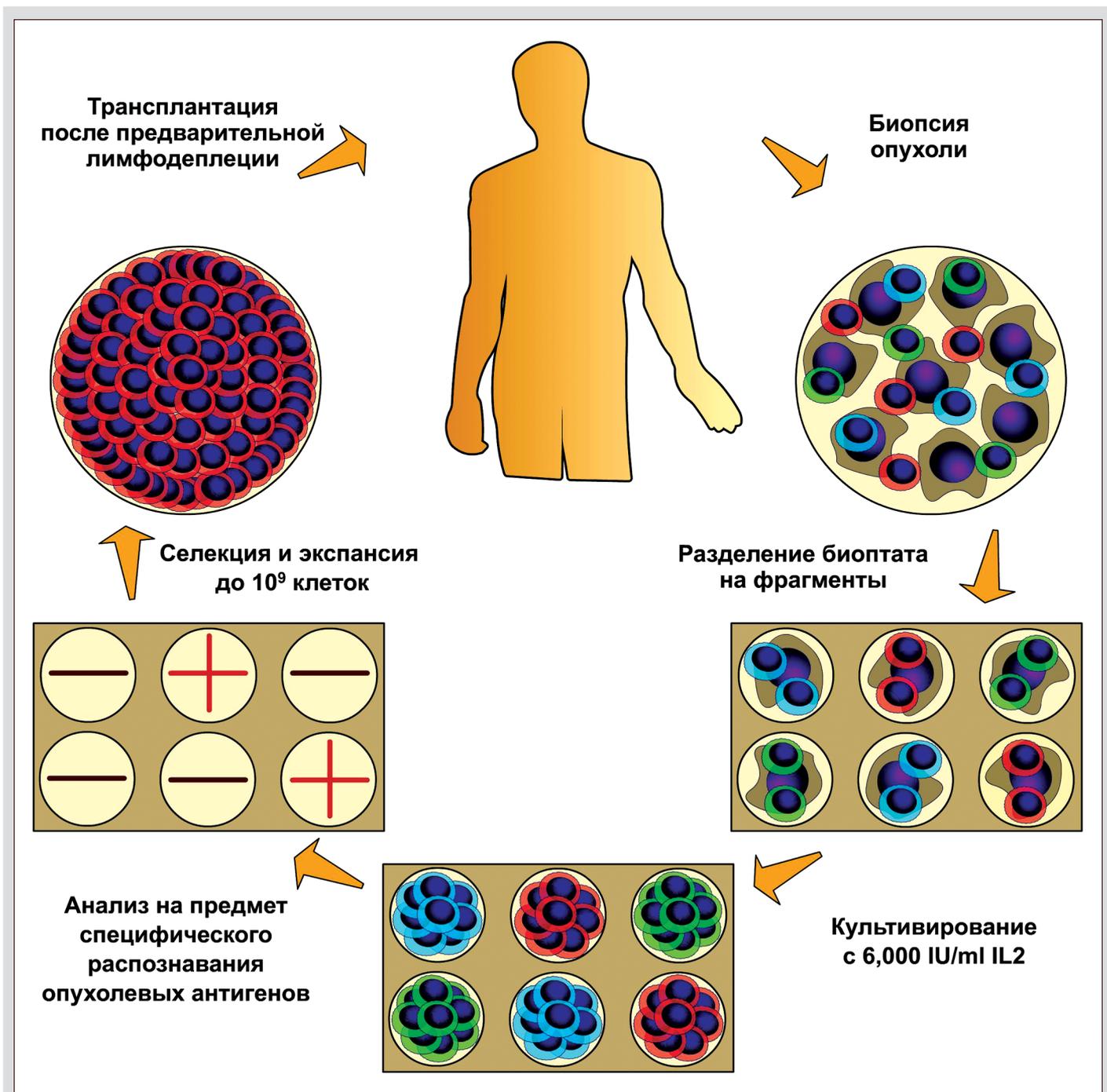
стимулирующими выживание и пролиферацию клеток *in vivo* (рис.). Важным этапом в разработке АКТ стала публикация в 1987 году научной группой S. Rosenberg результатов исследования, согласно которым специфичные в отношении опухолевых антигенов лимфоциты, инфильтрирующие меланому (tumour-infiltrating lymphocytes, TIL), были подвергнуты экспансии *in vitro* в присутствии IL-2 [2]. Первые клинические испытания показали относительно высокую эффективность АКТ у тяжелых пациентов с IV стадией меланомы, частота объективного клинического ответа у которых достигала 35% [3]. Однако, в этих же испытаниях был обнаружен ряд существенных недостатков АКТ с использованием TIL, одним из которых являлась короткая продолжительность

жизни трансплантированных лимфоцитов [4]. Кроме того, важная информация была получена в исследованиях на экспериментальных моделях новообразований у мышей. Было показано, что противоопухолевый иммунный ответ активно подавляется регуляторными Т-клетками [5]. Более того, деплеция  $CD4^+/CD25^{high}$  регуляторных Т-клеток с использованием анти- $CD25$  антител приводила к индукции выраженного Т-клеточного иммунного ответа против прогрессирующей меланомы у мышей [6, 7], а также ряда других злокачественных новообразований [8, 9].

Таким образом, эти данные служили основанием для важного вывода о том, что перед трансплантацией лимфоцитов необходимо проведение подготовительных мероприятий в

виде обратимой лимфодеплеции, целью которой является удаление как регуляторных Т-лимфоцитов, так и эндогенных лимфоцитов, которые могут конкурировать с введенными Т-клетками за ключевые факторы роста [10]. Это привело к разработке современных клинических протоколов АКТ, включающих предварительную немиелоаблятивную химиотерапию, которые позволили повысить частоту клинического ответа у больных с IV стадией меланомы до 50% [11].

Перспективным направлением дальнейшего совершенствования АКТ является разработка селективных методов деплеции лимфоцитов, направленных, в первую очередь, на уничтожение  $CD4^+/CD25^{high}/Foxp3^+$  регуляторных Т-клеток. Одним из препаратов, которым можно добиться подобного



эффекта, является Denileukin diftotox (DAB/IL2), который представляет собой рекомбинантный цитотоксический белок, состоящий из фрагментов А и В дифтерийного токсина и молекулы IL-2. DAB/IL2 эффективно связывается с CD25 ( $\alpha$ -цепь рецептора к IL-2) на поверхности Т-лимфоцитов, проникает внутрь клетки и ингибирует синтез белка, приводя к гибели клетки в течение нескольких часов [12].

Результаты исследования, опубликованного научной группой J. Chesney в Journal of Translational Medicine свидетельствуют, что введение DAB/IL2 пациентам с IV стадией меланомы не только приводит к кратковременной деплеции Т-лимфоцитов, но и может стимулировать выраженный противоопухолевый иммунный ответ.

В исследовании принимали участие 16 человек с меланомой кожи и/или слизистых оболочек с наличием множественных метастазов. Для оценки клинического ответа все пациенты подвергались обследованию на компьютерном (КТ) и позитронно-эмиссионном (ПЭТ) томографах за 1 месяц перед началом приема и через 1 месяц после последнего приема препарата. DAB/IL2 применялся в следующем режиме – внутривенное введение 12 мкг/кг 1 раз в сутки в течение 4 суток. Каждый пациент получил от 1 до 4 циклов введения препарата, с перерывом между циклами в 3 недели. Клинический ответ оценивался по критериям RECIST (The Response Evaluation Criteria in Solid Tumours) [13].

Уже первое введение препарата вызывало значительное снижение абсолютного количества Т-лимфоцитов в крови. Уровни CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов падали более чем на 50% в течение 28–42 часов после начала лечения. В течение 72 часов практически полностью исчезали CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup>/Foxp3<sup>+</sup> регуляторные Т-лимфоциты. Субпопуляция CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> Т-клеток также снижалась в численности, хотя и в менее значительных масштабах, возможно, благодаря не-прямому механизму из-за гибели CD25<sup>+</sup> лимфоцитов. В течение 21 дня количество клеток всех популяций лимфоцитов приходило в норму.

4 пациента получили 4 цикла введения препарата. При проведении 2–4 циклов лечения у них отмечалось менее выраженное снижение количества лимфоцитов, чем при проведении первого цикла. Это явление ассоциировалось с появлением в крови анти-DAB/IL2 IgG. После проведения 4 циклов уровень CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup>/Foxp3<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток снижался в значительно большей степени относительно CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (70-е сут. после начала лечения – CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup>/Foxp3<sup>+</sup> Т клетки = 37±16% от контроля; CD8<sup>+</sup> Т-клетки = 128±48% от контроля; n=4; p=0,031).

У 7 пациентов, принимавших участие в испытании, анализировалось наличие в крови CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, специфичных к антигену меланомы MART1. До начала лечения DAB/IL2 данная субпопуляция CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в крови не определялась. Тем не менее, формирование *de novo* MART1-специфичных CD8<sup>+</sup> Т-клеток наблюдалось у 4 из 7 пациентов уже после окончания первого цикла введения препарата. Эти данные свидетельствуют, что кратковременная деплеция Т-лимфоцитов в дальнейшем может сопровождаться экспансией эффекторных Т-лимфоцитов, специфичных к опухолевому антигену.

Лечение DAB/IL2 привело к частичному клиническому ответу у 5 пациентов и прекращению опухолевой прогрессии у 1 пациента (31%). Лишь у 2 из 4 пациентов с форми-

рованием *de novo* MART1-специфичных CD8<sup>+</sup> Т-клеток наблюдалась регрессия метастазов. У двоих пациентов регрессия одних групп метастазов одновременно сопровождалась прогрессией других групп. У одного пациента с полной регрессией многочисленных метастазов печени, легких и средостения два резидуальных метастаза были удалены хирургическим путем. Гистологическое и иммуногистохимическое исследование резецированного материала показало, что опухоль была инфильтрирована CD8<sup>+</sup>, при отсутствии CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Однако клетки меланомы не экспрессировали молекулы HLA-A, В или С, необходимые для распознавания опухолевых клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами.

В целом введение препарата в указанных режиме и дозах характеризовалось малой токсичностью и единичными осложнениями (слабость, эритема, дерматит, артрит).

Учитывая полученные результаты, авторы предположили, что DAB/IL2 может иметь прямой цитотоксический эффект на клетки меланомы. Тем не менее, экспозиция препарата с пролиферирующими клетками меланомы *in vitro* в концентрациях, превышающих в 15 раз максимальную концентрацию препарата в плазме, не имело какого-либо эффекта.

Таким образом, кратковременная деплеция CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у пациентов с меланомой, опосредованная введением DAB/IL2, приводила к обновлению Т-клеток крови и (у части пациентов) формированию *de novo* CD8<sup>+</sup> Т-клеток, специфичных к антигенам меланомы. Тем не менее, не у всех пациентов появление специфичных к антигенам меланомы Т-лимфоцитов приводило к регрессии опухоли. Более того, у 2 пациентов наблюдался смешанный клинический ответ – одни метастазы регрессировали, тогда как другие прогрессировали. Это явление может объясняться различием в экспрессии клетками опухоли молекул МНС, наличие которых необходимо для их распознавания Т-лимфоцитами. В пользу данного предположения свидетельствует отсутствие молекул HLA-A, В или С у опухолевых клеток резидуальных метастазов одного из пациентов.

Ранее уже были опубликованы результаты клинического исследования с введением DAB/IL2 12 пациентам с IV стадией меланомы [14]. Однако в этом исследовании не было обнаружено каких-либо признаков регрессии или стабилизации заболевания, а также значительного снижения экспрессии специфического для регуляторных Т-клеток фактора транскрипции Foxp3 и подавления супрессивной активности CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup> лимфоцитов. Причина возникших противоречий может быть объяснена разными режимами и дозами введения препарата, а также небольшим количеством пациентов, участвующих в испытании.

Полученные в исследовании результаты могут стать существенным стимулом для разработки новых, более эффективных клинических протоколов АКТ. Подготовительные мероприятия в виде специфической кратковременной деплеции преимущественно CD25<sup>+</sup> Т-лимфоцитов могут иметь существенный терапевтический эффект, чего не наблюдается при проведении немиелоаблятивной химиотерапии. Более того, существуют веские основания для мнения, что предшествующая кратковременная деплеция Т-лимфоцитов, особенно регуляторных Т-клеток, может значительно усилить терапевтические эффекты введения противоопухолевых вакцин [15].

ЛИТЕРАТУРА:

1. Rosenberg S., Restifo N., Yang J., Morgan R., Dudley M. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. Nat. Rev. Cancer 2008; 8: 299–308.
2. Muul L., Spiess P., Director E., Rosenberg, S. Identification of specific cytolytic immune responses against autologous tumor in humans bearing malignant melanoma. J. Immunol. 1987; 138: 989–95.

3. Rosenberg S., Yannelli J., Yang J. et al. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. J. Natl. Cancer Inst. 1994; 86: 1159–66.
4. Rosenberg S., Aebersold P., Cornetta K. et al. Gene transfer into humans—immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. N. Engl. J. Med. 1990; 323: 570–8.

5. Jones E., Dahm-Vicker M., Golgher D., Gallimore A. CD25<sup>+</sup> regulatory T cells and tumor immunity. *Immunol. Lett.* 2003; 85:141–3.
6. Jones E., Dahm-Vicker M., Simon A. et al. Depletion of CD25<sup>+</sup> regulatory cells results in suppression of melanoma growth and induction of autoreactivity in mice. *Cancer Immun.* 2002; 2: 1.
7. Turk M., Guevara-Patino J., Rizzuto G. et al. Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2004; 200: 771–82.
8. Onizuka S., Tawara I., Shimizu J. et al. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res.* 1999; 59: 3128–33.
9. Shimizu J., Yamazaki S., Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J. Immunol.* 1999; 163: 5211–8.
10. Gattinoni L., Finkelstein S., Klebanoff C. et al. Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med.* 2005; 202: 907–12.
11. Dudley M., Wunderlich J., Yang J. et al. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 2005; 10: 2346–57.
12. Frankel A., Surendranathan A., Black J. et al. Phase II clinical studies of denileukin diftotox diphtheria toxin fusion protein in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2006, 106: 2158–64.
13. Therasse P., Eisenhauer E., Verweij J. RECIST revisited: a review of validation studies on tumour assessment. *Eur. J. Cancer.* 2006; 42: 1031–9.
14. Attia P., Maker A., Haworth L., Rogers-Freezer L., Rosenberg S. Inability of a fusion protein of IL-2 and diphtheria toxin (Denileukin Diftotox, DAB389IL-2, ONTAK) to eliminate regulatory T lymphocytes in patients with melanoma. *J. Immunother.* 2005; 28: 582–92.
15. Dannull J., Su Z., Rizzieri D. et al. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J. Clin. Invest.* 2005, 115: 3623–33.

Подготовил В.С. Сергеев

По материалам: Rasku M., Clem A., Chesney J. et al. *Transient T cell depletion causes regression of melanoma metastases. J. Translat. Med.* 2008; 6: 12

## Технология АСІ или ССІ: рандомизированное клиническое исследование трансплантации аутогенных хондроцитов при травмах коленного сустава

Несмотря на то, что клинический опыт применения аутохондробластов по технологии АСІ (autologous chondrocytes implantation) скоро отметит 15-летний юбилей, споры об эффективности метода не утихают, хотя проведено более 22 различных рандомизированных клинических исследований [12 000 пациентов], показавших большую эффективность данного метода по сравнению с традиционными методами лечения [1–4]. Ряд биотехнологических компаний разработали и уже более 13 лет эффективно применяют данную технологию для лечения суставных повреждений и дегенеративных заболеваний хрящевой ткани. Тем не менее, каждый новый коммерческий продукт проходит все этапы тестирования, прежде чем получит широкое применение. Увеличение количества научных данных о безопасности и эффективности данной технологии приводит к появлению на рынке новых продуктов, что усиливает конкурентную борьбу между биотехнологическими компаниями.

Одной из модификаций АСІ является технология ССІ – Characterized Chondrocyte Implantation (TiGenix). Отличие этого технологического процесса заключается в генетическом контроле фенотипа клеточной культуры на выходе. Компания TiGenix (Бельгия) под эгидой Американского общества спортивной медицины провела мультицентровое исследование эффективности и безопасности клеточного продукта ChondroSelect, созданного для технологии АСІ.

В международном мультицентровом рандомизированном клиническом исследовании приняло участие 118 человек с травматическими повреждениями суставной поверхности бедренной или большеберцовой костей (61 – стандартное лечение, 57 – АСІ). Во время артроскопии производилась первичная обработка места повреждения хряща, получение тканевого материала, после чего пациенты распределялись

в случайном порядке в одну из групп. Через месяц проводились трансплантации.

Обе группы пациентов в течение первых двух недель воздерживались от противовоспалительных средств. Конечность иммобилизовалась на 8 недель с разгрузкой сустава, а после биопсии еще на 6 недель. Под контролем физиотерапевта пациенты проходили курс реабилитации.

Через 12 мес. проводилось гистологическое исследование тканей в области трансплантации с определением гистологической структуры и иммуногистохимическое исследование внеклеточного матрикса. Безопасность оценивалась по клиническому и лабораторному мониторингу функционирования основных систем организма.

В результате скорость реабилитации и наступления выздоровления были быстрее в группе трансплантации. Ни у одного пациента не было отмечено серьезных осложнений, требующих дополнительных вмешательств и исключения из исследования. Были получены статистически достоверные данные об отсутствии гиперплазии хрящевой ткани в месте трансплантации, тогда как в группе сравнения она наблюдалась. Гистоморфологическое исследование продемонстрировало наличие типичной зрелой хрящевой ткани в месте трансплантации и отсутствие признаков фиброза в группе с ССІ в отличие от группы сравнения. Анализ данных других рандомизированных клинических исследований технологии АСІ также демонстрирует недостаточность данных по гистологической характеристике хрящевой ткани, полученной после трансплантации, что, по мнению авторов, представляет данное исследование более выигрышным, а результат прогнозируемым.

Таким образом, проведенное исследование показало, что новое поколение ауто трансплантатов для восстановления целостности хрящевой ткани, так же безопасно и эффективно как и технология АСІ. Ее появление на рынке высоких био-