

УДК 612.118 – 616-006 – 576.5 – 571.27

©Назаркина, Лактионов

ПОЛУЧЕНИЕ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ИММУНОТЕРАПИЙ РАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Ж.К. Назаркина, П.П. Лактионов*

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8; тел.: (383)363-51-44; факс: (383)363-51-53;
эл. почта: zha_naz@niboch.nsc.ru

Разработка новых, эффективных методов терапии рака является одним из наиболее востребованных направлений развития современной медицины. Наряду с хирургическим вмешательством, химиотерапией и радиотерапией, индукция иммунного ответа против клеток опухоли представляется перспективным подходом терапии рака, особенно метастазирующих, медленно делящихся и стволовых клеток опухолей. Индукция противоопухолевого Т-клеточного иммунного ответа подразумевает активацию антигенпрезентирующих клеток, способных эффективно представлять раковые антигены и активировать Т-лимфоциты. Для активации иммунного ответа могут быть использованы дендритные клетки, нагруженные опухолевыми антигенами, такими как опухолеспецифичные белки, лизаты опухолевых клеток, апоптотические или некротические опухолевые клетки, а также нуклеиновые кислоты, кодирующие опухолевые антигены. Вне зависимости от выбора источника опухолевого антигена получение зрелых дендритных клеток является принципиальным этапом разработки противораковых вакцин, направленных на индукцию Т-клеточного цитотоксического иммунного ответа. В течение последних лет разными группами исследователей было предложено несколько способов получения зрелых дендритных клеток, отличающихся по набору используемых агентов. Показано, что способ активации ДК влияет как на их фенотип, так и на способность индуцировать иммунный ответ. В представленном обзоре проанализированы результаты работ, посвященных исследованию различных способов получения зрелых ДК.

Ключевые слова: дендритные клетки, онкологические заболевания, противоопухолевая терапия.

ВВЕДЕНИЕ

Для формирования устойчивого иммунного ответа против опухолевых клеток необходима активация как антиген-специфичных цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов, лизирующих клетки опухолей, так и Т-клеток иммунологической памяти. Для активации наивных Т-лимфоцитов необходимо их взаимодействие с антигенпрезентирующими клетками, в частности дендритными клетками (ДК), основная функция которых заключается в презентации антигенов (АГ) Т-клеткам. После процессинга антигенов ДК представляют их на своей поверхности в комплексе с молекулами МНС (Major Histocompatibility Complex – главный комплекс

гистосовместимости) I или II классов [1], в таком комплексе АГ опознаются Т-клетками, что приводит к активации антиген-специфичных Т-клеток.

Презентация антигенов в дендритных клетках может осуществляться с участием МНС I или II класса, которые взаимодействуют с цитотоксическими CD8⁺ Т-лимфоцитами или с хелперными CD4⁺ Т-лимфоцитами, соответственно (рис. 1). Эндогенные белковые антигены представляются по МНС I-зависимому пути, в котором АГ сначала направляется в протеасомы [2], где гидролизуются до пептидов. Образующиеся пептиды связываются с молекулами МНС I класса в эндоплазматическом ретикулуле и затем транспортируются на поверхность

* - адресат для переписки

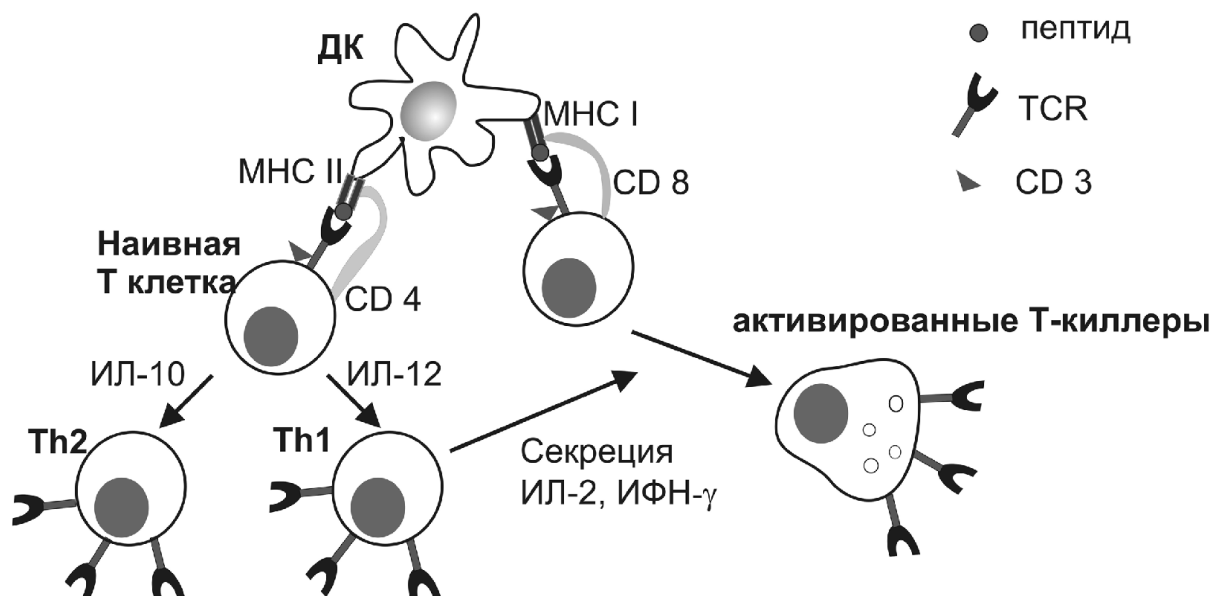


Рисунок 1. Взаимодействие Т-лимфоцитов с дендритными клетками. Пептиды, образующиеся в результате процессинга экзогенных белков, представляются на поверхности ДК в комплексе с молекулами МНС II. Эндогенные пептиды представляются в комплексе с молекулами МНС I. Комплексы пептид+МНС распознаются специфичными Т-клеточными антиген-распознающими рецепторами (TCR). Т-хелперы активируются при связывании TCR с комплексом пептид+МНС II, при этом CD4 Тх взаимодействует с МНС II. Т-киллеры активируются при связывании TCR с комплексом пептид+МНС I, при этом CD8 взаимодействует с МНС I. Цитокины, выделяемые ДК, влияют на тип Тх. ИЛ-12 тормозит образование Тх2, а ИЛ-10 ингибирует образование Тх1. Тх1 запускает иммунный ответ 1 типа, продуцируя ИЛ-2 и ИФН-γ, что приводит к активации Т-киллеров.

клетки. Экзогенные АГ представляются по МНС II-зависимому пути. Антиген захватывается клеткой по механизму эндоцитоза, затем везикулы, содержащие АГ, сливаются с лизосомами, что приводит к деградации АГ. Образующиеся везикулы сливаются с везикулами, содержащими молекулы МНС II, затем белковые комплексы МНС II/АГ транспортируются на поверхность клетки.

Для того чтобы ДК эффективно активировали цитотоксические Т-клетки, необходимо, чтобы, наряду с представлением антигена в комплексе с МНС на поверхности ДК, ДК экспрессировали костимуляторные молекулы и продуцировали в достаточном количестве интерлейкин-12 (ИЛ-12). Костимуляторные молекулы CD80 и CD86 обеспечивают взаимодействие с Т-клетками. ИЛ-12 существует в двух формах: димер ИЛ-12p70, который регулирует ответ Т-хелперов по принципу положительной обратной связи, и димер ИЛ-12p40, регулирующий ответ по принципу отрицательной обратной связи. ИЛ-12p70 направляет развитие наивных Т-лимфоцитов по пути формирования CD4⁺ Т-хелперов 1 типа (Th1), которые, в свою очередь, стимулируют пролиферацию и дифференцировку CD8-клеток и превращение их в зрелые Т-киллеры.

Иммуноterapia дендритными клетками включает несколько этапов [3] (рис. 2). Используемые для терапии ДК, как правило, получают *ex vivo* из моноцитов периферической крови пациента. Незрелые ДК, которые, в отличие от зрелых ДК, способны поглощать АГ и представлять его на своей поверхности [4] инкубируют *in vitro* с опухолевыми антигенами. В качестве антигенов используют опухолеспецифичные белки, пептиды, лизаты опухолевых клеток, апоптотические или некротические опухолевые клетки, а также нуклеиновые кислоты, кодирующие опухолевые антигены [5]. По мере накопления, АГ внутри клеток стимулируют созревание ДК. Для получения зрелых ДК предложено и опробовано множество цитокинов и неспецифических иммуностимуляторов, их комбинаций, однако до сих пор не выработан унифицированный набор иммуностимуляторов и единый протокол получения ДК. Зрелые ДК также могут быть заморожены и введены пациентам после размораживания спустя различные временные промежутки. Вакцинацию пациентов зрелыми ДК выполняют, инъецируя ДК подкожно, внутрикожно, в опухоли, в лимфоузлы или внутривенно.

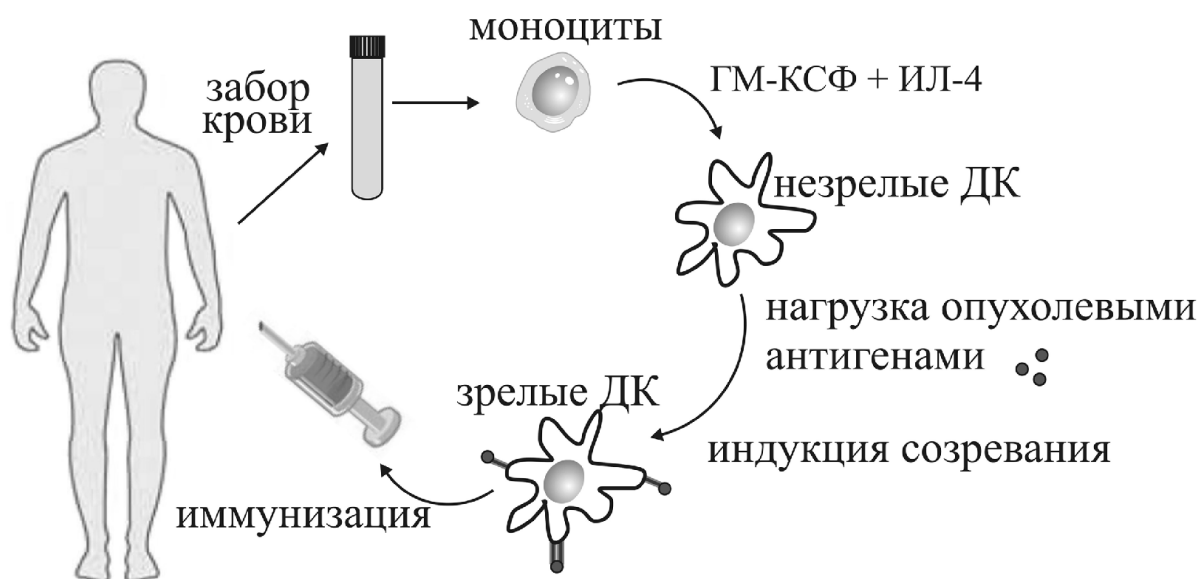


Рисунок 2. Использование дендритных клеток для иммунотерапии онкологических заболеваний. Из крови пациента выделяют моноциты, которые культивируют в присутствии ГМ-КСФ и ИЛ-4. Полученные незрелые ДК нагружают опухолевыми антигенами. Для получения зрелых ДК в культуральную среду добавляют цитокины и неспецифические иммуностимуляторы. Зрелые ДК вводят пациентам в виде инъекций.

В настоящее время существует несколько стратегий получения зрелых дендритных клеток, способных вызывать специфический противоопухолевый иммунный ответ, из моноцитов периферической крови [5, 6]. Наиболее часто используемый протокол получения ДК для противораковой иммунотерапии состоит из двух стадий: 1) индукции дифференцировки моноцитов в незрелые дендритные клетки и 2) стимуляции “созревания” дендритных клеток (рис. 2).

1. ПОЛУЧЕНИЕ НЕЗРЕЛЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ИЗ КЛЕТОК ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ

ДК могут быть выделены в ограниченном количестве непосредственно из периферической крови человека [7, 8] или получены из клеток предшественников. В качестве клеток предшественников используют CD34⁺ клетки предшественники гемопоэза, которые получают из периферической крови, костного мозга или пуповинной крови [9, 10]. Наиболее часто ДК получают из моноцитов периферической крови человека [6, 11]. Для получения моноцитов из периферической крови используют несколько подходов: выделение клеток крови, обладающих повышенной адгезией к поверхности культурального пластика [12], позитивную магнитную селекцию клеток, экспрессирующих

рецептор CD14, с последующей негативной магнитной селекцией клеток, экспрессирующих рецепторы CD2 и CD19 [13], центрифугирование в градиенте плотности [12] и флотационные методы [14]. Количество и чистота моноцитов зависит от способа выделения. Так, например, из 100 мл крови позитивной магнитной селекцией можно выделить в среднем 25 миллионов клеток, 95% которых составляют моноциты, а при адгезии на пластик – 9 миллионов клеток из которых только 80-90% являются моноцитами [15]. Dohnal с соавторами показали, что способ выделения в большей степени определяет количество получаемых клеток и удельное содержание моноцитов, однако, статистически значимых различий в фенотипе и функциональной активности ДК, полученных из моноцитов, выделенных разными способами, не обнаружено [16].

Незрелые ДК обычно получают, культивируя моноциты в присутствии цитокинов ГМ-КСФ (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор) и ИЛ-4 (интерлейкин-4). ГМ-КСФ поддерживает жизнеспособность и пролиферацию миелоидных предшественников, стимулирует их дифференцировку в гранулоциты и макрофаги. ИЛ-4 блокирует развитие макрофагов [17]. ГМ-КСФ в низких концентрациях поддерживает жизнеспособность клеток, однако для стимуляции пролиферации и дифференцировки необходимо

культивировать клетки в присутствии существенно более высоких концентраций ГМ-КСФ [18]. Показано, что дифференцировка моноцитов в дендритные клетки в ответ на стимуляцию ГМ-КСФ зависит от уровня экспрессии рецепторов ГМ-КСФ в моноцитах-предшественниках [18]. С другой стороны, уровень экспрессии рецепторов ГМ-КСФ не оказывает существенного влияния на дифференцировку моноцитов в ДК под действием коктейля из ГМ-КСФ и ИЛ-4, что свидетельствует о том, что ИЛ-4 увеличивает эффективность действия ГМ-КСФ и является важным фактором, который повышает эффективность получения незрелых ДК из моноцитов [14]. Культивирование моноцитов с ГМ-КСФ и ИЛ-4 приводит к появлению незрелых дендритных клеток с фенотипом МНС^{lo}, CD80/CD86⁺ и CD83⁻ [19]. Такие клетки не способны к фагоцитозу, миграции и эффективной презентации антигена, и, следовательно, не могут быть использованы для индукции цитотоксичных Т-клеток. К тому же, замена среды с ГМ-КСФ и ИЛ-4 на среду без цитокинов приводит к появлению у культивируемых незрелых ДК признаков макрофагов [20]. Однако, незрелые ДК, полученные из моноцитов при помощи ГМ-КСФ/ИЛ-4, могут быть стимулированы к дальнейшей дифференцировке в зрелые ДК при помощи набора интерлейкинов.

Наряду с ГМ-КСФ/ИЛ-4 для дифференцировки моноцитов в ДК могут быть использованы интерферон-α (ИФН-α), фактор некроза опухоли-α (ФНО-α) или ИЛ-15. ДК, полученные с использованием этих факторов, отличаются фенотипически и функционально. Замена ИЛ-4 на ИФН-α (в составе ИЛ-4/ГМ-КСФ коктейля) приводит к быстрому увеличению экспрессии молекул МНС класса II, костимуляторных молекул CD80 и CD86, а также маркеров созревания CD40 и CD83 [21]. ИФН-α индуцирует дифференцировку ДК эффективнее чем ИЛ-4, что выражается в сокращении времени дифференцировки [21]. Последующая замена среды с ГМ-КСФ и ИФН-α на среду без цитокинов не приводит к изменению фенотипа клеток в отличие от клеток, обработанных ГМ-КСФ/ИЛ-4. Несмотря на высокий уровень экспрессии молекул CD80, CD86 и CD83, стимулированные ГМ-КСФ/ИФН-α клетки сохраняют способность к эндоцитозу и фагоцитозу, и могут быть стимулированы к дальнейшей дифференцировке. В результате длительного культивирования моноцитов в среде с ГМ-КСФ и ИФН-α (более 3 дней) получают клетки с фенотипом, характерным для более зрелых ДК, по сравнению

с ДК, культивируемыми в среде с ГМ-КСФ/ИЛ-4. ДК, полученные обработкой моноцитов ГМ-КСФ/ИФН-α активируют Т-клеточный ответ, эффективнее чем ДК, полученные при помощи ГМ-КСФ/ИЛ-4 [22]. Зрелые дендритные клетки, полученные при культивировании моноцитов в среде с ГМ-КСФ/ИФН-α, характеризуются пониженным уровнем продукции ИЛ-12 и высоким уровнем продукции ИЛ-10, ИЛ-4 и ИФН-α [21]. Как следствие, такие ДК стимулируют продукцию Т-клетками цитокинов 1 (ИФН-γ) и 2 типа (ИЛ-10, ИЛ-4). Следует отметить, что зрелые ДК, полученные из моноцитов, культивируемых в среде с ГМ-КСФ/ИЛ-4, индуцируют поляризацию Т-клеток только Th1 типа.

При культивировании CD14⁺ моноцитов в присутствии ГМ-КСФ и ФНО-α в течение 6 дней получают незрелые ДК с фенотипом CD80/CD86⁺ CD83⁻ CD1a^{lo}, которые обладают способностью к умеренной стимуляции Т-клеток [23]. При последующем культивировании этих клеток в присутствии липополисахарида (ЛПС) в течение 2 дней получают зрелые CD70⁺ ДК, способные стимулировать Th1 и Th17 иммунный ответ. Т-хелперы 17 характеризуются экспрессией ИЛ-17, ИЛ-6, ФНО-α и ИЛ-22 [24]. Функцией Th17 является защита от внеклеточных патогенов, которые не могут эффективно элиминироваться Т-хелперами 1 и 2-го типов. Кроме того, Т-хелперы 17 часто ассоциированы с различными аутоиммунными процессами, в том числе и с аллергическими реакциями. Данные об участии Th17 в регуляции противоопухолевого иммунного ответа противоречивы. На мышинных моделях показано, что Th17 хелперы могут оказывать как противоопухолевое, так и опухолевостимулирующее действие в зависимости от типа рака и функционального состояния клеток Th17 [25].

Культивирование моноцитов в среде, содержащей ГМ-КСФ и ИЛ-15, приводит к дифференцировке моноцитов в дендритные клетки с фенотипом CD1a⁺, HLA-DR⁺ и CD14⁻, часть из которых продуцирует Е-кадгерин, лангерин и CCR6 [26]. В отличие от дифференцировки в присутствии ИЛ-4, дифференцировка в присутствии ИЛ-15 приводит к формированию незрелых ДК, которые способны индуцировать пролиферацию CD8⁺ Т-клеток в отсутствии дополнительных факторов, индуцирующих созревание ДК [27]. Вероятно, причиной этого является связанный с мембраной ИЛ-15, который способен стимулировать пролиферацию Т-клеток *in vitro* [28].

2. ИНДУКЦИЯ СОЗРЕВАНИЯ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК

Зрелость ДК определяется по их морфологии и по присутствию или отсутствию ряда маркерных молекул на их поверхности. Морфологически дендритные клетки – крупные клетки (15-20 мкм) круглой, овальной или полигональной формы с эксцентрически расположенным ядром, многочисленными разветвлёнными отростками мембраны (подобно дендритам нейронов) [1]. ДК также содержат большое количество эндосом и лизосом, необходимых для процессинга антигена.

Отсутствие специфического маркера, характерного только для зрелых ДК, затрудняет их детекцию. На поверхности зрелых ДК отсутствуют такие маркеры как CD3, CD14, CD19, CD56 и CD66b характерные для Т-клеток, моноцитов, В-клеток, натуральных киллеров и гранулоцитов, соответственно. При этом на поверхности зрелых ДК в большом количестве экспонированы молекулы МНС II; молекулы межклеточной адгезии CD11a (LFA-1), CD11c, CD50 (ICAM-2), CD54 (ICAM-1), CD58 (LFA-3), и CD102 (ICAM-3); костимуляторные молекулы CD80 (B7.1), CD86 (B7.2); рецепторы компонентов клеточной стенки бактерий и нуклеиновых кислот микроорганизмов – toll-like рецепторы (TLR) и рецепторы к компонентам комплемента (рис. 3) [1, 29]. Уровни экспрессии костимуляторных молекул изменяются по мере созревания ДК. CD86 синтезируется на ранних стадиях

созревания ДК, тогда как CD80 появляется лишь в зрелых ДК. CD86 – поверхностный белок антигенпрезентирующих клеток, который обеспечивает передачу костимуляторных сигналов Т-клеткам. CD86 является лигандом молекул CD28 (обеспечивает межклеточное взаимодействие, активацию Т-клеток) и CTLA-4 (обеспечивает диссоциацию клеток, подавление иммунного ответа), расположенных на поверхности Т-клеток. CD86 работает в тандеме с CD80 [30]. Дополнительными маркерами зрелых дендритных клеток человека являются CD83 и CMRF-44, причём CD83 экспонированы и на поверхности В-клеток, а CMRF-44 – на поверхности макрофагов и моноцитов.

Незрелые ДК, в отличие от зрелых ДК, способны к эндоцитозу, могут захватывать антиген и представлять его на своей поверхности, поэтому именно незрелые ДК “нагружают” антигеном [5]. После “нагрузки” антигеном ДК культивируют с индукторами созревания. В процессе созревания дендритные клетки утрачивают маркеры, характерные для моноцитов, приобретают маркеры специфичные для ДК, и начинают продуцировать цитокины. В ранних работах для индукции созревания ДК использовали кондиционную среду мононуклеарных клеток периферической крови, стимулированных иммуноглобулинами человека или инактивированными формалином бактериями (*Staphylococcus aureus* Cowan I strain), которая содержала смесь не идентифицированных цитокинов [20].

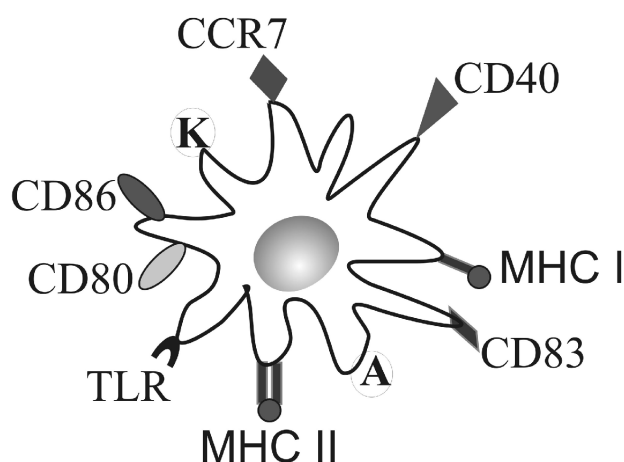


Рисунок 3. Поверхностные молекулы зрелых дендритных клеток. Дендритные клетки представляют антигены в комплексе с молекулами МНС I и II классов, которые могут быть распознаны CD8⁺ и CD4⁺ Т-лимфоцитами, соответственно. Костимуляторные молекулы CD86 и CD80 обеспечивают передачу костимуляторных сигналов Т-клеткам. CD83 является маркером зрелых дендритных клеток. CCR7 обуславливает миграцию зрелых ДК в лимфатический узел. CD40 взаимодействует молекулами CD40L, присутствующими на поверхности Th-лимфоцитов, что приводит к увеличению продукции ИЛ-12 и ИФН-γ. На поверхности зрелых ДК также присутствуют молекулы межклеточной адгезии (A), рецепторы компонентов клеточной стенки бактерий и нуклеиновых кислот микроорганизмов (TLR), рецепторы к компонентам комплемента (K).

ПОЛУЧЕНИЕ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ИММУНОТЕРАПИИ РАКА

В настоящее время, как уже упоминалось ранее, для получения зрелых ДК используют цитокиновые коктейли. Наиболее часто для стимуляции применяют: 1) фактор некроза опухоли ФНО- α ; 2) комбинации ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6 и PGE2 (простагландин E2); 3) коктейли, содержащие ФНО- α , ИЛ-1 β , интерфероны (ИФН) и лиганды TLR, например poly I:C; 4) коктейли, содержащие ЛПС и ИФН- γ , и 5) коктейли, содержащие лиганды рецептора CD40 (CD40L) [31]. Выделяют три типа индукторов созревания ДК (таблица). Поскольку провоспалительные молекулы являются естественными стимуляторами созревания ДК, цитокиновые коктейли часто содержат ФНО- α , ИЛ-1 β , ИФН- γ , ИФН- α , ИЛ-6 или PGE2 [5]. Второй тип индукторов созревания – лиганды TLR: poly I:C (лиганд TLR3), ЛПС (лиганд TLR4), пептидогликан, монофосфорил липид А (MPLA), R848 (лиганд TLR8). Индукция лигандами TLR приводит к созреванию ДК и активации продукции интерлейкинов ИЛ-12, ИЛ-23 и ИЛ-10. ЛПС взаимодействует с TLR4, что приводит к активации различных транскрипционных факторов, включая ядерный фактор- κ B (NF- κ B), p38 митоген активируемую протеинкиназу (p38 MAPK), c-Jun N-терминальную киназу (JNK) и протеинкиназы (ERK1/2) [34]. К третьему типу относятся лиганды рецептора CD40. Взаимодействие CD40 и CD40L приводит к увеличению продукции ИЛ-12 [32, 33]. Хотя CD40L и ФНО- α тоже активируют NF- κ B, эта активация осуществляется по разным, лишь частично перекрывающимся, сигнальным каскадам. ИФН- γ и ИФН- α запускают сигнальные каскады через киназу JNK и тирозинкиназу (ТК), что приводит к активации трансдукторов сигналов и активаторов транскрипции (STAT-белки).

В 1997 году было предложено культивировать незрелые ДК в присутствии ФНО- α (в концентрации 50-100 нг/мл) для получения зрелых ДК моноцитарного происхождения [35]. Полученные таким образом ДК продуцировали преимущественно ИЛ-12p40 и практически не продуцировали ИЛ-12p70, необходимый для активации цитотоксических Т-лимфоцитов [35]. Одновременно, другими авторами было предложено использовать цитокиновый коктейль, состоящий из ФНО- α (10 нг/мл), ИЛ-1 β (10 нг/мл) и ИЛ-6 (1000 ед/мл) [36], который индуцирует созревание ДК и полностью замещает кондиционную среду, описанную в работе [20]. Эти же авторы продемонстрировали, что добавление PGE2 (1 мкг/мл) в цитокиновый коктейль увеличивает количество, качество и миграционную способность ДК [36]. Комбинация ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6 и PGE2 используется наиболее часто, и считается “стандартным” или “классическим” коктейлем для индукции созревания ДК. В литературе клетки, полученные с использованием этого протокола, часто называют стандартными ДК (сДК). сДК индуцируют иммунный ответ Th2-типа [37]. Следует отметить, что PGE2 стимулирует секрецию ИЛ-10 дендритными клетками, что может приводить к формированию регуляторных Т-клеток, подавляющих иммунный ответ [37]. Obermaier с коллегами [15] предложили способ получения зрелых ДК за 2 дня с использованием коктейля из ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6 и PGE2, тогда как, в большинстве работ незрелые ДК получают при культивировании моноцитов с ГМ-КСФ и ИЛ-4 в течение 5-6 дней. Они показали, что культивирование с ГМ-КСФ и ИЛ-4 в течение 24 ч достаточно для формирования

Таблица. Индукторы созревания ДК.

Тип	Индуктор	Рецептор ДК
Провоспалительные молекулы	ИФН- α	IFNA R1, IFNA R2
	ИФН- γ	IFN- γ Rc, IFN- γ R β
	ФНО- α	TNFR
	ИЛ-1 β	IL-1R/TLR
	PGE2	PTGER2
	ИЛ-6	GP130IL-6R
Лиганды TLR	ЛПС, МФЛ	TLR4
	poly I:C	TLR3
	оцPHK	TLR7
	R848	TLR8
	СрG-богатые олигонуклеотиды	TLR9
Лиганды костимуляторных молекул	CD40L	CD40

незрелых ДК, которые способны захватывать антиген. Авторы сравнили уровни экспрессии поверхностных маркеров ДК, полученных в условиях одновременного культивирования моноцитов с ГМ-КСФ/ИЛ-4 и предложенным коктейлем, и ДК, полученных при последовательном культивировании моноцитов сначала в течение 24 ч с ГМ-КСФ/ИЛ-4 и затем с предложенным коктейлем. Было показано, что при последовательном культивировании уровень экспрессии молекул CD83 дендритными клетками выше, и такие ДК секретируют больше ИЛ-12, что делает второй способ более приемлемым для получения ДК, стимулирующих Т-цитотоксический иммунный ответ.

В 2004 году Mailliard с соавторами [38] исследовали влияние цитокиновых коктейлей, состоящих из различных комбинаций ФНО- α , ИЛ-1 β , ИФН- α , ИФН- γ , poly I:C, ИЛ-6 и PGE2, на фенотип получаемых ДК, их миграционную способность и способность индуцировать цитотоксический иммунный ответ. На основании полученных данных авторы предложили использовать коктейль, состоящий из ФНО- α (50 нг/мл), ИЛ-1 β (25 нг/мл), ИФН- α (1000 ед/мл), ИФН- γ (3000 ед/мл), poly I:C (25 мкг/мл). Клетки, полученные по этому протоколу, в литературе принято называть дендритными клетками, поляризованными по типу α (α -ДК). α -ДК имеют фенотип зрелых ДК и характеризуются высоким уровнем синтеза ИЛ-12p70 в ответ на стимуляцию лигандом рецептора CD40. Однако, по сравнению с сДК, способность к миграции α -ДК несколько ниже. Авторы показали, что высокий уровень продукции ИЛ-12p70 обеспечивается добавлением в состав коктейля poly I:C, ИФН- α и, в большей степени, ИФН- γ . Следует отметить, что ни poly I:C, ни ИФН- α ни ИФН- γ по отдельности, ни в комбинации с ФНО- α и ИЛ-1 β , не обеспечивали высокий уровень ИЛ-12p70. В то же время, уровень продукции ИЛ-12p70 дендритными клетками, стимулированными коктейлем из ФНО- α , ИЛ-1 β , и ИФН- γ был в 10 раз ниже, чем ДК, стимулированными ФНО- α , ИЛ-1 β , и ИФН- γ , poly I:C и ИФН- α . Было выяснено, что добавление poly I:C является критичным для экспрессии маркера миграционной способности CCR7, характерного для зрелых ДК. Уровень индукции антиген-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов дендритными клетками α типа в 40 раз выше, чем стандартными ДК, что обусловлено высоким уровнем продукции ИЛ-12p70 в α -ДК.

Zobywalski с коллегами [39] предложили использовать коктейль, содержащий ФНО- α (10 нг/мл), ИЛ-1 β (10 нг/мл), ИФН- γ (5000 ед/мл),

R848 (1 мкг/мл), PGE2 (250 нг/мл) с добавлением или без добавления poly I:C (25 мкг/мл). Основной особенностью этого коктейля является наличие R848 – лиганда TLR8. Полученные таким способом ДК содержат маркеры зрелых ДК и маркер миграционной способности CCR7. Они сохраняют фенотип зрелых ДК в течение двух дней после замены среды на среду без цитокинов. Показано, что добавление poly I:C приводит к почти 40-кратному увеличению продукции ИЛ-12, по сравнению с коктейлем не содержащим poly I:C. Однако ДК, культивированные в присутствии poly I:C, не способны экспрессировать антиген, кодируемый экзогенной РНК, доставленной в клетку методом электропорации. Дендритные клетки, полученные в присутствии лиганда TLR8, вне зависимости от наличия в коктейле poly I:C, способны индуцировать вирус специфичный Т-клеточный иммунный ответ. Авторы сравнили предложенный ими коктейль с коктейлями, предложенными в работах [36] и [38]. Клетки, полученные этими тремя способами, были сходны фенотипически, но различались по продукции ИЛ-12 и ИЛ-10 [39]. В “стандартных” дендритных клетках ИЛ-12p70 практически не секретируется, а уровень продукции ИЛ-10 составляет десятки пг/мл. Максимальный уровень продукции ИЛ-12p70 наблюдается в α -ДК и в TLR-индуцированных ДК, стимулированных ФНО- α , ИЛ-1 β , ИФН- γ , R848, PGE2 и poly I:C (40000-50000 пг/мл). Концентрация ИЛ-10, секретируемого этими клетками, составляет несколько сотен пг/мл. Таким образом, α -ДК и ДК, стимулированные коктейлем, содержащим R848 и poly I:C, лучше индуцируют формирование цитотоксических Т-лимфоцитов, чем сДК.

Lichtenegger с коллегами [40] исследовали влияние экспрессии костимуляторных молекул и секреции цитокинов дендритными клетками на активацию Т-лимфоцитов и натуральных киллеров (НК). Авторы сравнили ДК культивированные в присутствие трёх разных коктейлей: ИЛ-1 β , PGE2, ФНО- α , ИФН- γ , poly I:C и R848 (TLR-индуцированные ДК); ИЛ-1 β , PGE2, ФНО- α , ИЛ-6 (сДК) и ИЛ-10 (ДК, не способные индуцировать иммунный ответ). Ранее было показано, что культивирование зрелых дендритных клеток в присутствии ИЛ-10 приводит к уменьшению способности ДК стимулировать CD4⁺ Т-клеточный ответ, причём наблюдаемый эффект зависит от дозы ИЛ-10 [41]. TLR-индуцированные ДК характеризовались преобладанием костимуляторных молекул над ингибирующими, а также высоким уровнем секреции ИЛ-12p70 и низким уровнем секреции ИЛ-10 [40]. Уровень экспрессии маркера CD40

TLR-индуцированными дендритными клетками был в 2 раза выше, по сравнению с сДК. Уровень экспрессии CD80 и CD86 в TLR-индуцированных ДК был также выше, чем в сДК. В ДК, культивированных в присутствии ИЛ-10, наблюдался высокий уровень экспрессии CD14 и низкий уровень CD80 и CD86. Эти клетки не секретируют ИЛ-12p70. Было исследовано влияние ДК, полученных в разных условиях, на активацию и поляризацию Т-клеток. При совместном культивировании ДК и CD3⁺ Т-клеток концентрация ИФН-γ в культуральной среде была в 5 раз выше при использовании TLR-индуцированных ДК, по сравнению с сДК, что свидетельствует о Th1 поляризации Т-клеток. Показано, что активация и поляризация Т-клеток зависит от ИЛ-12p70 и CD86. сДК преимущественно индуцируют формирование регуляторных Т-клеток в то время, как TLR-индуцированные ДК активируют Th1-лимфоциты и НК [40].

Другая группа исследователей использовала комбинацию ЛПС (200 ед/мл) и ИФН-γ (50 нг/мл) в качестве коктейля для получения зрелых ДК [42]. В качестве критерия оценки ДК, который определяет эффективность ДК как компонента противораковых вакцин, было предложено использовать концентрацию ИЛ-12p70, продуцируемого 1 млн клеток за 24 ч которая должна составлять не менее 100 пг/мл среды. Концентрация ИЛ-12p70, продуцируемого клетками, стимулированными ЛПС и ИФН-γ составляет 30000 пг/мл. Поскольку ранее было показано, что ЛПС-стимулированные ДК секретируют ИЛ-12p70 только в первые 24 ч [43], было предложено использовать для вакцинации ДК, культивированные в течение 6 ч в присутствии ЛПС и ИФН-γ [42] и находящиеся в процессе созревания, но не обладающие фенотипом зрелых ДК. Такие ДК могут храниться в жидком азоте и при последующей иммунизации пациентов размороженными ДК, наблюдается высокий уровень секреции ИЛ-12p70 *in vivo*. При проведении I фазы клинических испытаний было показано, что ДК, полученные таким образом, способны вызывать иммунный ответ лишь при интранодальном введении, что свидетельствует о низкой миграционной способности этих ДК [42].

Возможно, низкая миграционная способность ДК, полученных при помощи ЛПС и ИФН-γ обусловлена влиянием ИФН-γ. Действительно, было показано, что уровень экспрессии маркера миграционной способности CCR7 и сама миграционная способность ДК снижаются при добавлении ИФН-γ в состав цитокинового

коктейля [44]. В то же время, ИФН-γ существенно увеличивает уровень секреции ИЛ-12p70. При добавлении PGE2 в коктейль, содержащий ИФН-γ, получали ДК, способные к миграции и продуцирующие ИЛ-12p70. При использовании комбинации PGE2 (0,1 мкМ), ИФН-γ (1000 ед/мл) и R848 (10 мкг/мл) получали ДК, способные и к миграции, и к секреции ИЛ-12p70 [44]. Положительное влияние PGE2 на миграционную способность ДК было продемонстрировано в работах [36] и [45]. Как было отмечено ранее, полученные в присутствии ФНО-α, ИЛ-1β, ИЛ-6 и PGE2 стандартные ДК характеризуются низким уровнем секреции ИЛ-12p70 и высокой миграционной способностью [36]. В работе [45] было показано, что при использовании комбинации poly I:C и R848 получают ДК с низкой миграционной способностью и высоким уровнем секреции ИЛ-12p70. Добавление PGE2 к этому коктейлю позволяет получить ДК, которые не отличаются по миграционной способности от сДК, при этом продукция ИЛ-12p70 снижается незначительно. По сравнению с сДК уровень секреции ИЛ-10 дендритными клетками, индуцированными poly I:C и R848, был в 6 раз выше, однако добавление PGE2 позволяет уменьшить секрецию ИЛ-10 в 2 раза [45]. Данные об ингибировании секреции ИЛ-10 под действием PGE2 расходятся с данными, приведенными в работе [37]. Вполне вероятно, что в данном случае действие PGE2 зависит от других иммуномодуляторов, входящих в состав коктейля.

В работе [46] было предложено использовать комбинацию монофосфорил липида А (МФЛ) и ИФН-γ. МФЛ широко используется в качестве адъюванта в течение многих лет, безопасность его применения подтверждена клинически. Показано, что зрелые ДК, полученные при использовании МФЛ (10 мкг/мл) и ИФН-γ (1000 ед/мл) не отличаются по фенотипу от α-ДК и сДК; 2) секретируют ИЛ-12p70 и, следовательно, индуцируют Th1-лимфоциты; 3) обладают высокой миграционной способностью. Эти данные позволяют рассматривать применение МФЛ и ИФН-γ как перспективный способ получения зрелых ДК

В работе [11] проведено сравнение свойств ДК, полученных из моноцитов периферической крови, культивированных в присутствии ГМ-КСФ/ИЛ-4 (ИЛ-4 ДК) и ГМ-КСФ/ИЛ-15 (ИЛ-15 ДК) 2-3 дня или 6-7 дней. Для получения зрелых ДК, незрелые ДК культивировали в течение 24 ч в присутствии ФНО-α/ИЛ-1β/ИЛ-6/PGE2 ("стандартный" коктейль) или ФНО-α/ИФН-γ/R848/PGE2 (коктейль, содержащий лиганд TLR 7/8).

Авторы сравнивали фенотип разных популяций ДК, их способность к миграции, уровни продукции цитокинов и способность стимулировать Т-клетки. Незрелые ДК, полученные в присутствии ГМ-КСФ/ИЛ-4 и ГМ-КСФ/ИЛ-15, отличались по фенотипу. Так, в незрелых ИЛ-15 ДК сохранялся базовый уровень экспрессии поверхностного маркера CD14, характерного для моноцитов, не зависимо от длительности культивирования клеток. В незрелых ДК, полученных в присутствии ИЛ-4, маркер CD14 практически не детектировался. В незрелых ИЛ-15 ДК наблюдалась экспрессия костимуляторных молекул CD80, тогда как в незрелых ИЛ-4 ДК нет. Помимо этого, на поверхности незрелых ИЛ-15 ДК присутствовал маркер CD56, характерный для натуральных киллеров. Оба типа клеток: незрелые ИЛ-15 ДК и незрелые ИЛ-4 ДК, обладают способностью к фагоцитозу, тогда как в зрелых ДК эта способность значительно снижается. Оптимальный уровень созревания ИЛ-15 ДК достигался при использовании коктейля, содержащего TLR 7/8 лиганд, что выражалось в повышении уровня экспрессии CD83, CD70, CD80, CD86. Преимущества использования коктейля, содержащего TLR 7/8 лиганд, по сравнению со “стандартным” коктейлем, заключаются в том, что полученные таким образом ДК обладают (1) высокой миграционной способностью; (2) продуцируют большее количество ИЛ-12p70 и активируют секрецию ИФН- γ Т-клетками; (3) гораздо эффективнее стимулируют аутологичный антиген-специфический Т-клеточный иммунный ответ [11]. При этом TLR 7/8-активированные зрелые ДК, полученные при кратковременном культивировании (2-3 дня) моноцитов в среде с ГМ-КСФ/ИЛ-15, обладают повышенной миграционной способностью и эффективнее активируют Т-клетки, по сравнению с ДК которые культивировали в течение 6-7 дней. Продукция ИЛ-12p70 в ответ на стимуляцию лигандом CD40, напротив, была выше для ИЛ-15 ДК, культивированных 6-7 дней. Использование ГМ-КСФ/ИЛ-15 позволяет сократить время созревания ДК по сравнению с культивированием в присутствии ГМ-КСФ/ИЛ-4. Однако не было обнаружено существенных различий в уровне секреции ИЛ-12p70 и способности активировать антигенспецифические CD8⁺ Т-лимфоциты зрелыми ИЛ-15 ДК и ИЛ-4 ДК, которые были получены с использованием “стандартного” коктейля. К сожалению, в статье [11] отсутствуют данные об иммуногенности ИЛ-4 ДК, для созревания которых использовался коктейль, содержащий TLR 7/8 лиганд.

В работе [31] проведено сравнение 5 разных типов цитокиновых коктейлей: (1) – ФНО- α ; (2) ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6 и PGE2; (3) – ФНО- α , ИЛ-1 β , ИФН- γ , R848 и PGE2; (4) – ЛПС и ИФН- γ ; (5) – R848 и ИФН- γ . Для получения незрелых ДК авторы использовали комбинацию ГМ-КСФ/ИЛ-4. Показано, что при использовании разных типов индукторов созревания получаются различные по фенотипу и функциональным характеристикам ДК, отличающиеся по способности индуцировать цитотоксический иммунный ответ. При использовании коктейлей (1) и (2) формируются ДК с низкими уровнями экспрессии костимуляторных молекул и CD83, не способные секретировать ИЛ-12p70 и, следовательно, обладающие низкой способностью активировать Т-клетки. Использование комбинации ЛПС и ИФН- γ приводит к образованию зрелых ДК с максимальной способностью активировать цитотоксические Т-лимфоциты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммунотерапия дендритными клетками является безопасной и нетоксичной для организма, но пока не получила широкого распространения в клинической практике в том числе из-за сложности получения ДК и отсутствия стандартов получения и контроля качества терапевтических препаратов, основанных на ДК. Действительно, необходимо регламентировать по меньшей мере следующие стадии получения ДК: среду для культивирования клеток, состав цитокинового коктейля для созревания ДК, длительность/условия культивирования, условия хранения препаратов, способ оценки качества ДК, способ их введения, и применения.

К сожалению, количество работ, в которых проведено сравнение свойств ДК, полученных в разных условиях, не велико. На наш взгляд, недостатком большинства работ, в которых предлагаются новые способы созревания ДК, является использование в качестве контроля “стандартного” коктейля, который, как было показано в ряде работ, не является оптимальным для получения иммуногенных ДК, так как сДК не продуцируют ИЛ-12p70. На основании литературных данных наиболее перспективным для получения зрелых иммуногенных ДК представляется использование следующих коктейлей: 1) ФНО- α , ИЛ-1 β , ИФН- γ , R848, PGE2, poly I:C [39]; 2) ЛПС и ИФН- γ [42], 3) ФНО- α , ИЛ-1 β , ИФН- α , ИФН- γ , poly I:C [38]; 4) МФЛ и ИФН- γ [46].

Клинические исследования фазы I/II показали, что вакцинация сДК является безопасной и не токсичной для пациентов [5]. Однако, нет данных, достоверно подтверждающих эффективность вакцинации этим типом ДК. Вероятно, это обусловлено тем, что сДК преимущественно активируют регуляторные Т-клетки. Поскольку в экспериментах *in vitro* было показано, что ДК, полученные с использованием четырех перечисленных выше коктейлей, способны вызывать цитотоксический иммунный ответ есть надежда, что использование таких ДК *in vivo* позволит добиться заметного клинического эффекта.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (Соглашение № 8289) и Российского фонда фундаментальных исследований (12-04-31365 мол-а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ueno H., Klechevsky E., Morita R., Asford C., Cao T., Matsui T., Di Pucchio T., Connolly J., Fay J.W., Pascual V., Palucka A.K., Banchereau J. (2007) *Immunol. Rev.*, **219**, 118-142.
2. Hung C.-F., Monie A., Alvarez R., Wu T.-C. (2007) *Exp. Mol. Med.*, **39**(6), 679-689.
3. Mantia-Smaldone G., Chu C. (2013) *BioDrugs*, **27**, 453-468. DOI: 10.1007/540259-013.0030-9
4. Santini S., Lapenta C., Santodonato L., D'Agostino G., Belardelli F., Ferrantini M. (2009) *Handb. Exp. Pharmacol.*, **188**, 295-317.
5. Skalova K., Mollova K., Michalek J. (2010) *Vaccine*, **28**, 5153-5160.
6. Schuler G. (2010) *Eur. J. Immunol.*, **40**, 2123-2130.
7. Figdor C., de Vries I., Lesterhuis W., Melief C. (2004) *Nat. Med.*, **10**, 475-480.
8. Berger T., Strasser E., Smith R., Carste C., Schuler-Thurner B., Kaempgen E., Schuler G. (2005) *J. Immunol. Methods*, **298**, 61-72.
9. Luft T., Pang K., Thomas E., Bradley C., Savoia H., Trapani J., Cebon J. (1998) *ExpHematol.*, **26**, 489-500.
10. Lim F., Kanhai H., Falkenburg J. (2005) *Haematologica*, **90**, 173-179.
11. Anguille S., Smits E., Cools N., Goossens H., Berneman Z., Van Tendeloo V. (2009) *J. Transl. Med.*, **18**(7), 109.
12. Berger T., Feuerstein B., Strasser E., Hirsch U., Schreiner D., Schuler G., Schuler-Thurner B. (2002) *J. Immunol. Methods*, **268**, 131-140.
13. Felzmann T., Witt V., Wimmer D., Ressmann G., Wagner D., Paul P., Hüttner K., Fritsch G. (2003) *Cytotherapy*, **5**, 391-398.
14. Cobb A., Roberts L., Palucka A., Mead H., Montes M., Ranganathan R., Burkeholder S., Finholt J., Blankenship D., King B., Sloan L., Harrod A., Lévy Y., Banchereau J. (2011) *J. Immunol. Methods*, **365**, 27-37.
15. Obermaier B., Dauer M., Herten J., Schad K., Endres S., Eigler A. (2003) *Biol. Proced. Online*, **5**, 197-203.
16. Dohnal A., Gra Y., Witt V., Eichstill C., Wagner D., Ul-Haq S., Wimmer D., Felzmann T. (2009) *J. Cell. Mol. Med.*, **13**, 125-135.
17. Romani N., Gruner S., Brang D., Kämpgen E., Lenz A., Trockenbacher B., Konwalinka G., Fritsch P., Steinman R., Schuler G. (1994) *J. Exp. Med.*, **180**, 83-93.
18. Conti L., Cardone M., Varano B., Puddu P., Belardelli F., Gessani S. (2008) *Eur. J. Immunol.*, **38**, 750-762.
19. Zhou L., Tedder T. (1995) *J. Immunol.*, **154**, 3821-3835.
20. Romani N., Reider D., Heuer M., Ebner S., Kämpgen E., Eibl B., Niederwieser D., Schuler G. (1996) *J. Immunol. Meth.*, **196**, 137-151.
21. Della Bella S., Nicola S., Riva A., Biasin M., Clerici M., Villa M.L. (2004) *J. Leukoc. Biol.*, **75**, 106-116.
22. Lapenta C., Santini S., Logozzi M., Spada M., Andreotti M., Di Pucchio T., Parlato S., Belardelli F. (2003) *J. Exp. Med.*, **198**, 361-367.
23. Iwamoto S., Iwai S., Tsujiyama K., Kurahashi C., Takeshita K., Naoe M., Masunaga A., Ogawa Y., Oguchi K., Miyazaki A. (2007) *J. Immunol.*, **179**, 1449-1457.
24. Reiner S. (2007) *Cell*, **129**, 33-36.
25. Ye J., Livergood R., Peng G. (2012) *Am. J. Pathol.*, **182**(1), 10-20.
26. Dubsky P., Saito H., Leogier M., Dantin C., Connolly J., Banchereau J., Palucka A. (2007) *Eur. J. Immunol.*, **37**, 1678-1690.
27. Morelli A., Thomson A. (2003) *Immunol. Rev.*, **196**, 125-146.
28. Musso T., Calosso L., Zucca M., Millesimo M., Ravarino D., Giovarelli M., Malavasi F., Ponzi A., Paus R., Bulfone-Paus S. (1999) *Blood*, **93**(10), 3531-3539.
29. Decker W., Xing D., Shpall E. (2006) *Biol. Blood. Marrow. Transplant.*, **12**, 113-125.
30. Dilioglou S., Cruse J., Lewis R. (2003) *Exp. Mol. Pathol.*, **75**, 217-227.
31. Vopenkova K., Mollova K., Buresova I., Michalek J. (2012) *J. Cell. Mol. Med.*, **16**, 2827-2837.
32. Bevan M.J. (2004) *Nat. Rev. Immunol.*, **4**, 595-602.
33. Guernonprez P., Valladeau J., Zitvogel L., Thiry C., Amigorena S. (2002) *Annu. Rev. Immunol.*, **20**, 621-667.
34. Castiello L., Sabatino M., Jin P., Clayberger C., Marincola F., Krensky A., Stroncek D. (2011) *Cancer Immunol. Immunother.*, **60**(4), 457-466.
35. Morse M., Zhou L., Tedder T., Lysterly H., Smith C. (1997) *Ann. Surg.*, **226**, 6-16.
36. Jonuleit H., Kühn U., Müller G., Steinbrink K., Paragnik L., Schmitt E., Knop J., Enk A. (1997) *Eur. J. Immunol.*, **27**, 3135-3142.
37. Kalantari T., Kamali-Sarvestani E., Ciric B., Karimi M., Kalantari M., Faridar A., Xu H., Rostami A. (2011) *Immunol. Res.*, **51**, 153-160.
38. Mailliard R., Wankowicz-Kalinska A., Cai Q., Wesa A., Hilkens C., Kapsenberg M., Kirkwood J., Storkus W., Kalinski P. (2004) *Cancer Res.*, **64**, 5934-5937.

39. Zobywalski A., Javorovic M., Frankenberger B., Pohla H., Kremmer E., Bigalke I., Schendel D. (2007) *J. Transl. Med.*, **5**, 18.
40. Lichtenegger F., Mueller K., Otte B., Beck B., Hiddemann W., Schendel D., Subklewe M. (2012) *PLoS One.*, **7**, e44266. doi: 10.1371/journal.pone.0044266.
41. Steinbrink K., Wölfl M., Jonuleit H., Knop J., Enk A. (1997) *J. Immunol.*, **159**, 4772-4780.
42. Dohnal A., Witt V., Hügel H., Holter W., Gadner H., Felzmann T. (2007) *Cytotherapy*, **9**, 755-770.
43. Langenkamp A., Messi M., Lanzavecchia A., Sallusto F. (2000) *Nat. Immunol.*, **1**, 311-316.
44. Lehner M., Stilper A., Morhart P., Holter W. (2008) *J. Leukoc. Biol.*, **83**, 883-893.
45. Boullart A., Aarntzen E., Verdijk P., Jacobs J., Schuurhuis D., Benitez-Ribas D. (2008) *Cancer Immunol. Immunother.*, **57**, 1589-1597.
46. Ten Brinke A., Karsten M., Dieker M., Zwaginga J., van Ham S. (2007) *Vaccine*, **25**, 7145-7152.

Поступила: 28. 06. 2013.

PREPARATION OF DENDRITIC CELLS FOR CANCER IMMUNOTHERAPY

Zh.K. Nazarkina, P.P. Laktionov

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine,
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
8 Lavrent'eva, Novosibirsk, 630090 Russia; tel. (383) 363-51-44; fax: (383) 363-51-53;
e-mail: zha_naz@niboch.nsc.ru

Development of new effective method for cancer therapy is one of the most important trends in the modern medicine. Along with surgery, chemotherapy and radiotherapy, induction of an immune response against the tumor cells is a promising approach for therapy of cancer, particularly metastatic, slowly dividing tumors and cancer stem cells. Induction of the antitumor T-cell immune response involves activation of antigen-presenting cells, which can efficiently present the cancer antigens and activate T-lymphocytes. The immune response may be activated by dendritic cells (DC) loaded with tumor antigens, such as tumor-specific proteins, tumor cell lysates, apoptotic or necrotic tumor cells, as well as nucleic acids encoding tumor antigens. Regardless of the selected source of the tumor antigen, preparation of mature DC is a principal step in the development of anticancer vaccines aimed at the induction of the cytotoxic T-cell immune response. Recently, various research groups have proposed several strategies for producing mature DC, differed by the set of agents used. It has been shown that the maturation strategy influences both their phenotype and the ability to induce the immune response. In this review we have analyzed the results of studies on the various strategies of preparation of mature DCs.

Key words: dendritic cells, cancer, anticancer therapy.