

Противоопухолевая вакцинация в качестве системной терапии 4-ой линии у пациента с рецидивирующей рабдомиосаркомой



Мащиц В.Д., Мелешко А.Н., Вашкевич Е.П., Фролова Р.Л., Ласюков Е.А., Киселев Л.П.

Актуальность

Саркомы мягких тканей (СМТ) занимают 3 место в структуре заболеваемости экстракраниальными солидными опухолями детей 0-14 лет после опухолей ЦНС и нейробластомы.

Рабдомиосаркомы – наиболее частые новообразования среди СМТ у пациентов детского возраста.

Известно, что на сегодняшний день долгосрочные показатели выживаемости составляют 60-80% для локализованных форм заболевания (хуже для альвеолярного подтипа). Большинство пациентов с метастатическими формами так же, как и с рецидивом заболевания, имеют неблагоприятный прогноз при использовании стандартных лечебных методик и требуют поиска новых терапевтических подходов.

Одним из таких направлений является иммунотерапия, в том числе вакцинация при наличии известных опухоль-ассоциированных антигенов.

Цель

Отработать метод ex vivo генерации дендритных клеток (ДК), праймирования и экспансии Т-лимфоцитов пациента с использованием пептидной библиотеки опухоль-ассоциированных антигенов для расширения возможностей в терапии солидных опухолей.

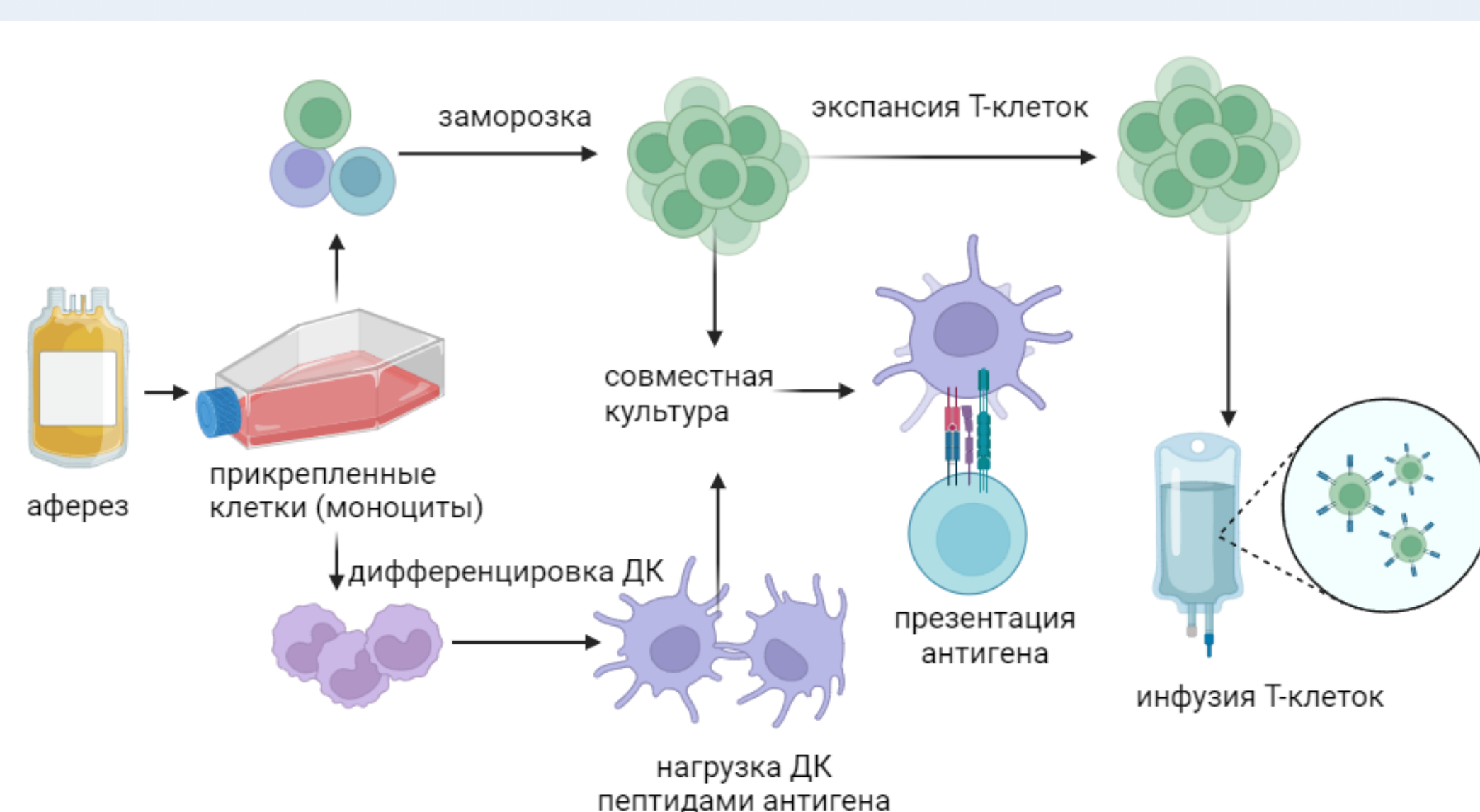


Рис.1 Принцип получения Т-лимфоцитов, стимулированных ex vivo пептидными антигенами

Материалы и методы

Экспрессия опухоль-ассоциированных антигенов выполнялась методами иммуногистохимии и количественной ПЦР с использованием материала удаленной опухоли непосредственно при прогрессировании новообразования после 3-й линии системной полихимиотерапии (ПХТ). Материал для клеточной вакцины получали методом афереза лимфоцитов пациента с последующим выделением на гистопаке мононуклеарных клеток. ДК получали из фракции адгезионных клеток путем стимуляции дифференцировки с GM-CSF (100нг/мл) и IL-4 (25 нг/мл) в течение 6 дней. Полученные незрелые ДК стимулировали TNF α (20 нг/мл), IL-1 β (10 нг/мл), IL-6 (3 нг/мл) в присутствии GM-CSF (100нг/мл) и IL-4 (25 нг/мл) в течении суток, после чего ДК нагружали пептидной библиотекой антигенов PRAME и MAGE-A3 10 мкг/мл и инкубировали в течение суток.

Суспензионную фракцию лимфоцитов размораживали и помещали в совместную культуру с ДК в соотношении 20 : 1 (200 млн. лимфоцитов с 10 млн. ДК), инкубировали пять дней в среде RPMI1640 с 10% ЭТС в присутствии IL-7 (10 нг/мл), IL-15 (5 нг/мл) и далее с IL-2 (300 Ед/мл).

Популяционный состав крови пациента и клеточного продукта показан на рисунке 2.

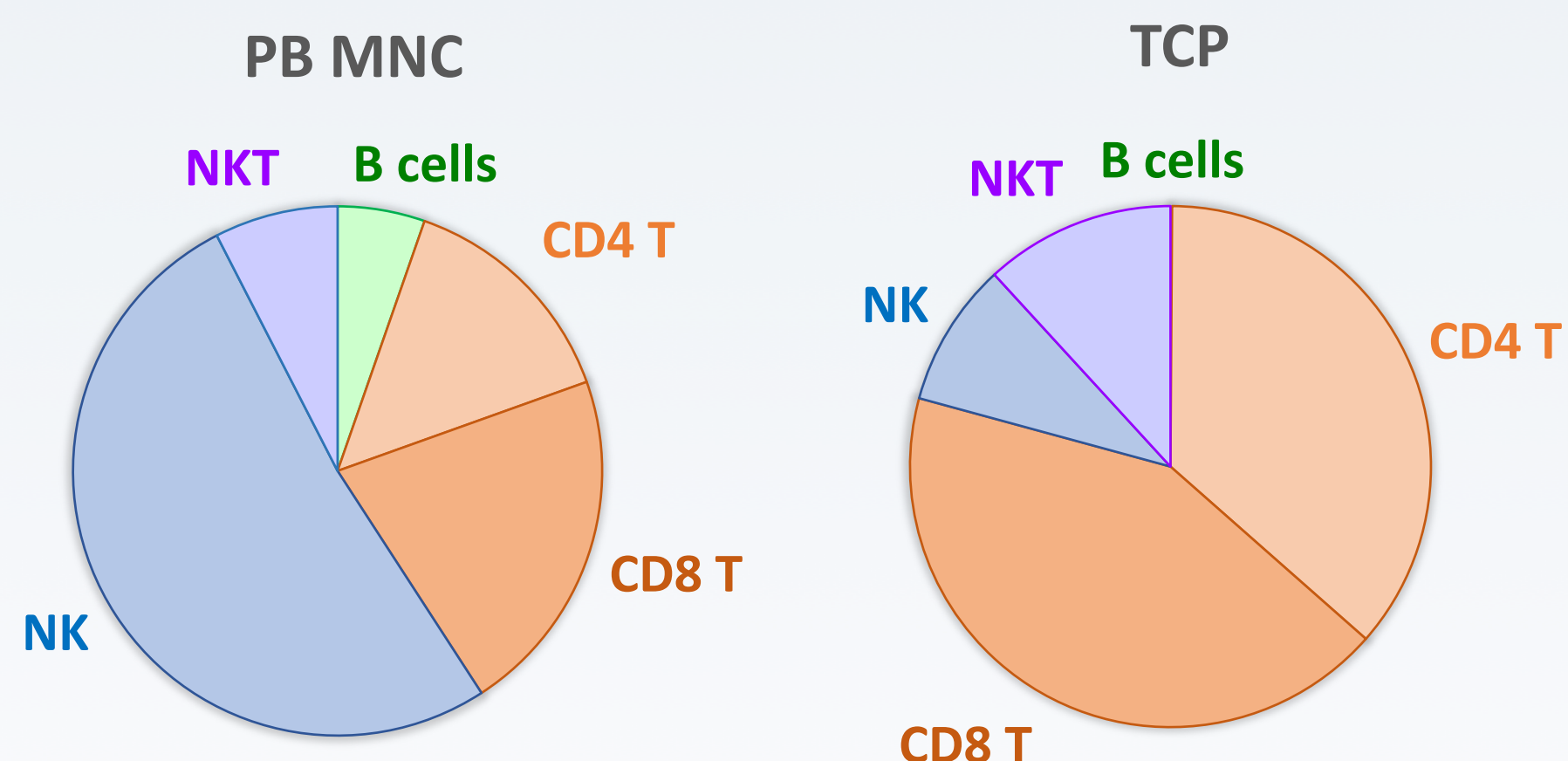


Рис.2 Состав клеточного продукта: PB MNC – лимфоциты в день афереза; TCP – Т-клеточный продукт

Фенотип созревания лимфоцитов

Стадии дифференцировки лимфоцитов оценивали по экспрессии поверхностных маркеров CD45RA и CCR7 в следующем порядке по уровню созревания: наивные Т-клетки (T_N) и стволовые Т-клетки памяти (T_{SCM}), клетки центральной памяти (T_{CM}), эффекторныe клетки памяти (T_{EM}) и терминальные эффекторы (T_{EFF}). Оценивали фенотип отдельно CD4 и CD8 клеток (рисунок 3). Т-клеточный продукт сохранил профиль дифференцировки относительно исходных лимфоцитов без вызревания в терминальные эффекторы, с небольшим дозреванием наивных CD4+ лимфоцитов до клеток памяти, и приростом T_{SCM} CD8 клеток.

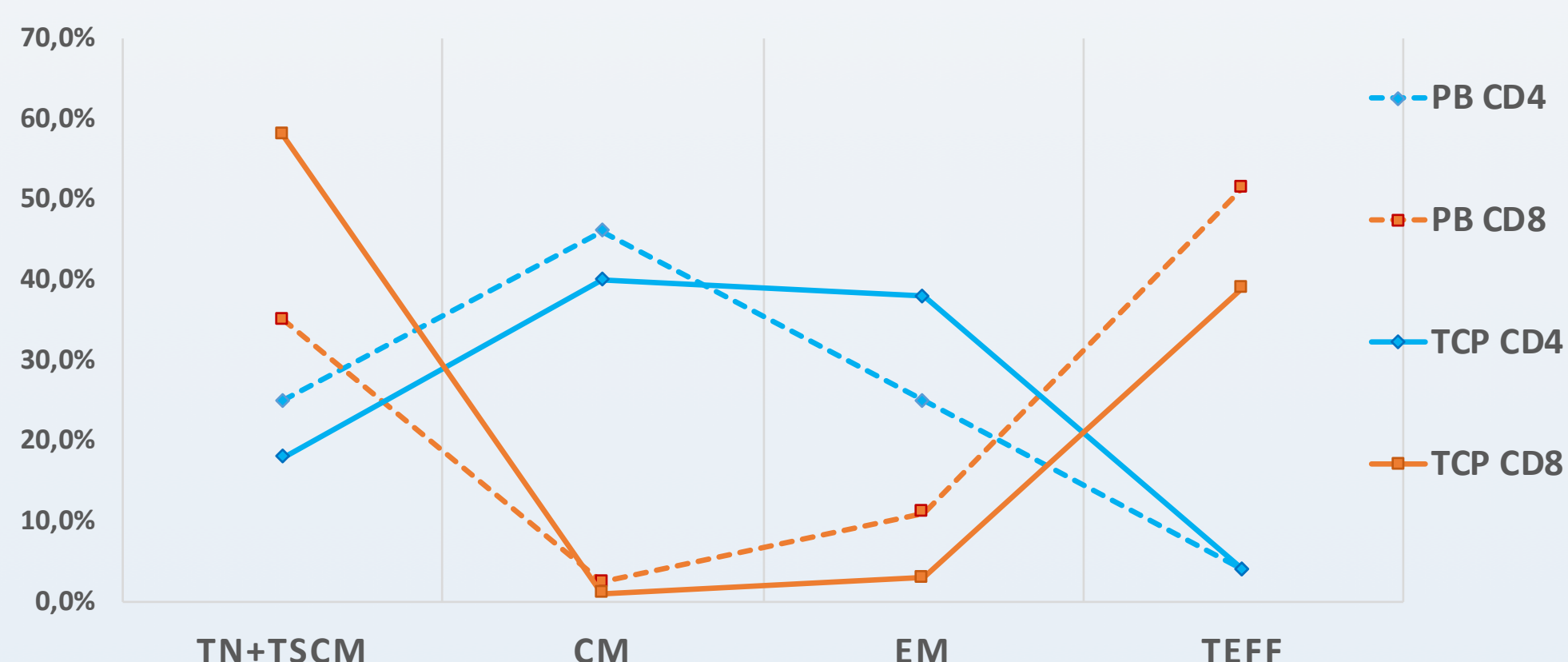


Рис.3 Дифференцированный состав Т-лимфоцитов клеточного продукта

Фенотип активации лимфоцитов

Стадии активации Т-лимфоцитов оценивали по экспрессии поверхностных маркеров 4-1BB (CD137) и CD40L (CD154), а также CD69. Оценивали фенотип отдельно CD4 и CD8 клеток (рисунок 4). Т-клеточный продукт приобрел резко увеличенное содержание CD4⁺ CD40L (CD154)⁺ активированных Th1 и CD8⁺ 4-1BB (CD137)⁺ – активированных CTL.

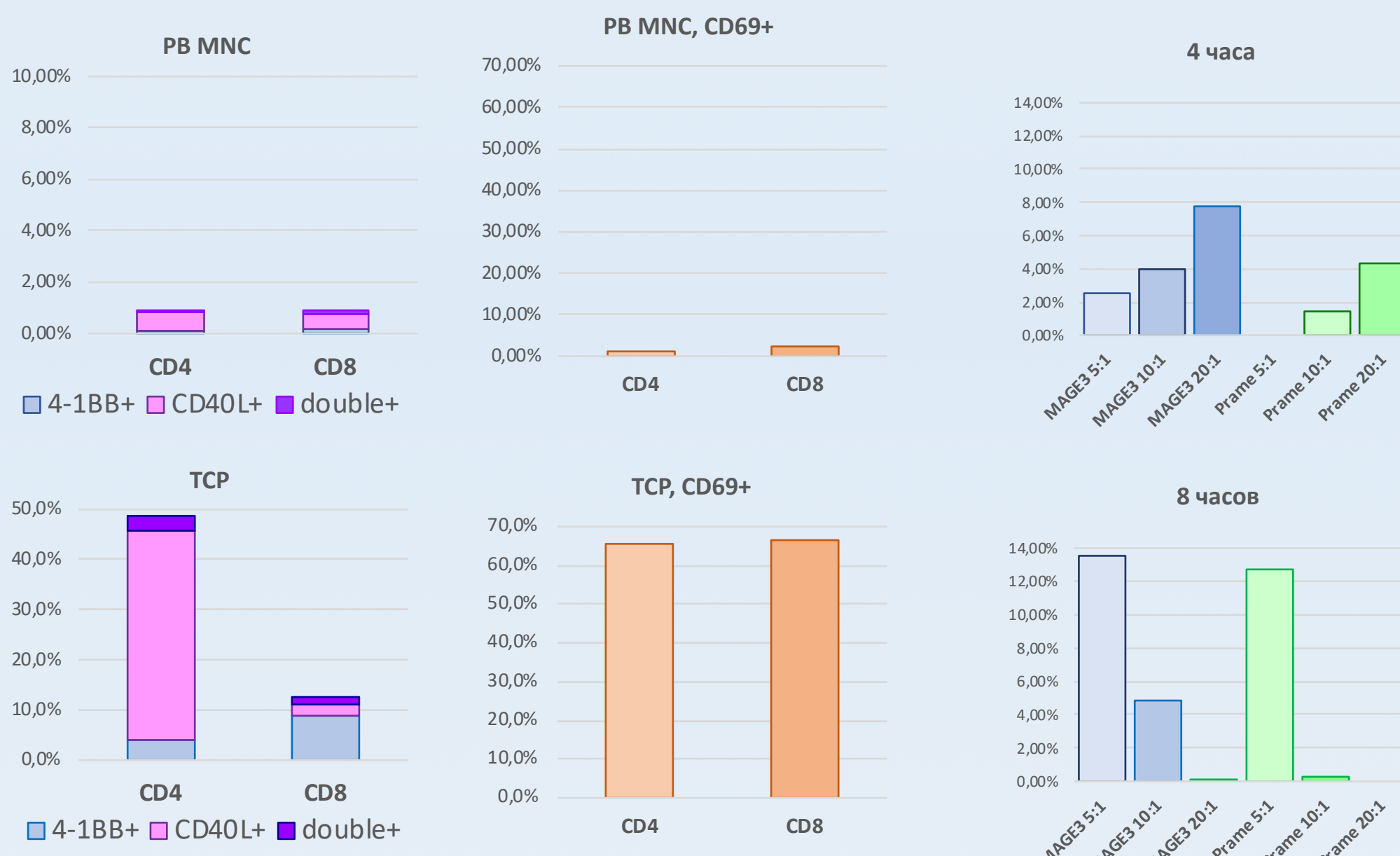


Рис.4 Функциональная активность Т-лимфоцитов клеточного продукта

Цитотоксический тест

В качестве мишеней использовали аутологичные ФГА-бласты, нагруженные пептидами. Тест длился 4 и 8 часов (рисунок 4). Расчет цитотоксической активности проводили по формуле:

$$\frac{\% \text{ 7AAD+ Клеток (опыт)} - \% \text{ 7AAD+ Клеток (спонт)}}{100\% - \% \text{ 7AAD+ Клеток (спонт)}} \times 100\%$$

Результаты

Пациенту с эмбриональной рабдомиосаркомой правого яичка, прогрессированием процесса после орхфуникулэктомии справа, рецидивом после первой линии ПХТ (винкристин, ифосфамид, актиномицин Д), удаления образования мошонки справа с пахово-бедренной лимфодиссекцией, II линии ПХТ (топотекан, циклофосфан, доксорубин, карбоплатин), лучевой терапии (ЛТ) на ложе опухоли, поддерживающей терапии, II рецидивом в паховой области спустя 1 год после окончания спецтерапии, продолжающимся ростом после курса ПХТ (винкристин, иринотекан, темодал), удаления опухоли малого таза R1 с лимфодиссекцией подвздошных лимфоузлов, ЛТ на ложе удаленной опухоли малого таза был выполнен забор опухолевой ткани. В настоящий момент пациенту проведены 3 дозы клеточной вакцины вместе с сопроводительной терапией (циклофосфан, пропранолол, леналидомид). При контрольном исследовании через 2 месяца от начала вакцинотерапии данных за рецидив нет. Проявления токсичности терапии расценены как умеренные.

Выводы

Адаптивная иммунотерапия с экспансированными антиген-стимулированными Т-лимфоцитами хорошо переносится пациентом и может являться частью терапии рецидивирующих рабдомиосарком.