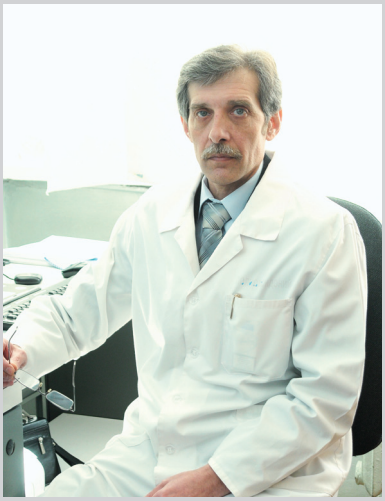
Национальный институт рака, Киев

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К АДОПТИВНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ КОЖИ (обзор литературы)



Ф.В. Фильчаков, С.И. Коровин

Адрес:
Фильчаков Феодосий Викторович
03022, Киев, ул. Ломоносова, 33/43
Национальный институт рака
Тел.: (044) 259-01-84
E-mail: labklimmun@i.ua

Ключевые слова: *меланома кожи, адоптивная клеточная иммунотерапия, меланомаспецифические Т-лимфоциты, истощение популяции Т-лимфоцитов, клиническая эффективность.*

Использование аутологичных опухолеспецифических Т-лимфоцитов, выделенных из опухоли или периферической крови, может быть мощным иммунотерапевтическим инструментом в лечении больных генерализованной меланомой кожи. Адоптивный перенос меланомаспецифических Т-лимфоцитов, активированных и размноженных вне организма в сочетании с высокими дозами интерлейкина-2, позволил добиться объективного ответа на терапию у 50–70% пациентов с генерализованной меланомой кожи. В обзоре приведены практические методы получения достаточного количества активированных Т-лимфоцитов в лабораторных условиях. Представлен критический анализ комплекса подготовительных мероприятий для более эффективной реализации противоопухолевого потенциала адоптивно перенесенных Т-лимфоцитов. Обсуждены клинико-лабораторные эффекты химиолучевой терапии, способствующие этому.

Результаты лечения больных меланомой кожи остаются неудовлетворительными из-за раннего метастазирования, быстрого прогрессирования и низкой чувствительности опухолевых клеток к химиотерапевтическим агентам. По данным Национального канцер-регистра, в Украине у 51,4% больных меланому кожи диагностируют во II–IV стадии заболевания, когда дальнейшее прогрессирование практически неизбежно [1].

В лечении больных генерализованной меланомой используют два стандартных подхода, основанных на применении дакарбазина и/или рекомбинантного интерлейкина-2 (ИЛ-2) [2, 3]. При этом доля объективных ответов для дакарбазина не превышает 16% без существенного влияния на выживаемость пациентов и 20–30% — для ИЛ-2-зависимой терапии с кратковременной регрессией метастазов, регистрируемой у 5–8% больных. Комбинация дакарбазина с низкими дозами ИЛ-2 не повышает эту эффективность [4]. Другие терапевтические подходы, используемые в лечении больных генерализованной меланомой, в том числе и вакцинотерапия, пока не дали клинически значимых результатов [5, 6]. Доля объективных ответов при использовании вакцинотерапии не превышает 8% [6].

Тем не менее особенности клинического течения меланомы кожи, включающие случаи спонтанной регрессии опухоли и развитие аутоиммунных паранеопластических синдромов (витилигоподобная депигментация, увеит, аутоиммунный тиреоидит), а также многочисленные факты выявления у пациентов меланомаспецифических иммунных реакций (клеточного и гуморального типа) [7–9], свидетельствуют о важной роли иммунных механизмов в патогенезе этого заболевания. На основании этих данных меланома кожи была отнесена к высокоиммуногенным опухолям. В связи с этим иммунотерапия приобретает приоритетное значение в лечении этой категории больных.

В настоящее время можно считать доказанным существование противоопухолевого иммунного ответа у больных меланомой кожи, что подтверждается следующими фактами [10]:

- инфильтрация первичной меланомы олигоклонами Т-лимфоцитов, свидетельствующая об их антигензависимой пролиферации в опухоли;
- возможность получения *in vitro* линий и клонов Т-лимфоцитов с цитотоксической или цитокин-продуцирующей активностью против аутологичных клеток меланомы;
- идентификация и молекулярное клонирование антигенов и пептидов, выделенных из этих антигенов для выявления HLA-рестриктированного Т-клеточного ответа.

Следует отметить, что такой характер иммунореактивности организма у больных меланомой кожи соответствует ранее

сформулированным критериям, предъявляемым к протоколам биотерапии, основанным на иммуно-опосредованной деструкции клинически детектируемых распространенных солидных опухолей [6]. Согласно этой концепции эффективное применение высокотехнологичных методов иммунотерапии возможно при наличии следующих условий:

- генерация *in vivo* достаточного количества иммунных Т-лимфоцитов, способных к высокоавидному распознаванию опухолевых антигенов;
- способность генерированных Т-лимфоцитов инфильтрировать строму опухоли;
- активация генерированных Т-лимфоцитов в опухолевом очаге для реализации эффекторных функций, направленных на разрушение опухоли.

По мнению авторов цитируемой работы, низкая эффективность вакцинотерапии у больных генерализованной меланомой может быть обусловлена генерацией небольшого количества меланомаспецифических Т-лимфоцитов, характеризующихся узкой специфичностью и низкой авидностью к опухолевым антигенам, ввиду использования для иммунизации минимального набора пептидов, выделенных из антигенов опухоли. Кроме того, развитие иммуносупрессивных механизмов, обусловленных как самой опухолью, так и регуляторными Т-лимфоцитами и супрессорами миелоидного происхождения, также вносит свой вклад в снижение эффективности вакцинотерапии [11, 12].

Ввиду этого многие исследователи связывают успехи лечения этой категории больных с внедрением в клиническую практику высокотехнологичных методов адоптивной клеточной иммунотерапии (АКИТ). Такая иммунотерапия основана на переносе *ex vivo* линий и клонов меланомаспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), выделенных из популяции лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (ЛИО) [13]. В настоящее время использование этого подхода позволило добиться объективного ответа у 50–70% больных генерализованной меланомой кожи [14–16].

АКИТ как метод биотерапии сформировался в 80-х гг. XX ст. благодаря усилиям научной группы под руководством S. Rosenberg [17]. Эволюция методов получения достаточного количества противоопухолевых клеток-эффекторов нужной специфичности, оценка терапевтической эффективности их переноса больным с солидными злокачественными новообразованиями, а также осложнения, связанные с этим, были проанализированы нами ранее [18, 19]. Здесь важно отметить следующее. В настоящее время точно установлена эффективность использования в клинической практике адоптивного переноса Т-лимфоцитов [20], разрабатываются иммунологические подходы для крупномасштабной технологии их активации и размножения *in vitro* [21, 22], ведется работа по стандартизации количества и активности вводимых клеток [23, 24].

При адоптивном переносе меланомаспецифические ЦТЛ, полученные из популяции ЛИО проходят селекцию при совместном культивировании *in vitro* с аутологичными клетками меланомы. Отобранные после активации линии ЦТЛ подвергаются клональной экспансии в присутствии фидерных клеток, анти-CD3-антител и ИЛ-2. Эти этапы технологического процесса в настоящее время оптимизированы в виде стандартизованного протокола получения меланомаспецифических ЦТЛ для клинического применения [23, 24], что позволило использовать с терапевтической целью большое количество высокоавидных меланомаспецифических Т-лимфоцитов, распознающих широкий спектр опухолеспецифических антигенов меланомы.

В кратком изложении лабораторный регламент получения меланомаспецифических ЦТЛ выглядит следующим образом. Лимфоциты, инфильтрирующие меланому, получают из фрагментов опухолевой ткани (1–3 мм^3) при помощи механической и ферментативной дезинтеграции. Выделенные из каждого фрагмента (используют 8–10 образцов) лимфоциты отдельно культивируют в присутствии ИЛ-2 (в концентрации 6000 МЕ/мл) в течение 21–36 дней, что позволяет нарастить достаточное количество клеток (5×10^6 /фрагмент ткани), необходимое для инициации крупномасштабного их размножения. На этом этапе технологического процесса отбирают только те линии ЦТЛ, которые отвечают активацией (продукция γ-интерферона — γ-ИФН) на аутологичные клетки меланомы *in vitro*. При этом уровень γ-ИФН должен превышать 200 пг/мл и отличаться (выше в 2 раза) от контроля, где тестируется супернатант смешанной культуры ЦТЛ с аллогенными клетками меланомы [25].

Для наращивания меланомаспецифических ЦТЛ используется метод, разработанный S.R. Riddell [21]. Многократное увеличение количества функционально активных Т-лимфоцитов достигается за счет их совместного культивирования с облученными (γ-излучение в дозе 33 Зв) аутологичными или аллогенными мононуклеарами периферической крови (в соотношении 1:200) в присутствии анти-CD3-антител (30 нг/мл) и ИЛ-2 (3000 МЕ/мл), что позволяет за 9–14 дней получить 5×10^{10} клеток.

Важно отметить, что среди всех иммунофенотипических маркеров, изученных в процессе анализа клонов меланомаспецифических ЦТЛ, подготовленных к адоптивному переносу, только длина теломер коррелирует с длительной персистенцией перенесенных клеток в организме пациентов [15] и объективным клиническим ответом на терапию [25]. Эти данные указывают на высокую информативность показателя пролиферативной активности переносимых клеток для планирования подобных протоколов АКИТ.

Как видно, описанная выше технология получения меланомаспецифических ЦТЛ достаточно трудоемка и занимает много времени, что ограничивает ее широкое внедрение в клиническую практику. В качестве альтернативного подхода предлагается использовать метод получения ЦТЛ с коротким периодом культивирования [26]. Как показано авторами цитируемой работы, краткосрочная культура инфильтрирующих меланому лимфоцитов без опухолеспецифической селекции (с неспецифической противоопухолевой активностью) может быть не менее эффективным терапевтическим инструментом, чем клетки, генерированные по стандартному протоколу, при назначении больным генерализованной меланомой кожи [27]. ЦТЛ, полученные таким образом, сохраняют длину теломер, а также высокий уровень экспрессии корецепторов CD27 и CD28 и могут применяться через 10–18 дней от начала культивирования [26, 27]. В плане обсуждаемого вопроса могут представлять интерес ранее полученные результаты клинических испытаний, проведенных в конце 80-х гг. [28, 29]. Научная группа S. Rosenberg использовала подход, основанный на генерации *in vitro* лимфокин-активированных киллеров из популяции лимфоцитов, инфильтрирующих меланому в присутствии ИЛ-2. Активированные таким образом лимфоциты, обладая неспецифической противоопухолевой активностью, при адоптивном переносе 86 пациентам генерализованной меланомой кожи в сочетании с введением ИЛ-2 (каждые 8 ч в дозе 720 000 МЕ/кг массы тела) индуцировали выраженный терапевтический эффект. Объективный ответ на АКИТ был получен в 34% случаев, однако длительность ремиссии оказалась короткой. Тем не менее в результате проведенных исследований стало очевидным, что краткосрочные культуры ЛИО могут быть использованы с терапевтической целью.

Вышеизложенное позволяет заключить, что методология, основанная на краткосрочном (10–18 дней) культивировании *in vitro* лимфоцитов, инфильтрирующих меланому, в сочетании с адекватными активационными стимулами, также может быть использована в клинических протоколах АКИТ этой категории больных. Такой подход существенно упрощает технологический процесс, снижает затраты и сокращает время на его выполнение.

Другое препятствие, ограничивающее внедрение АКИТ в клиническую практику, связано с возможностью полу-

чения ЛИО только от больных с операбельными опухолями. В случае меланомы кожи удается выделить Т-лимфоциты, инфильтрирующие опухоль, у 60–70% больных [30]. В связи с этим для неоперабельных больных и случаев с низким количеством ЛИО предлагается использовать альтернативный подход, основанный на поликлональной активации лимфоцитов периферической крови [31]. Для этого выделенные циркулирующие Т-лимфоциты активируют в смешанной культуре с аутологичными опухолевыми клетками *in vitro*, с последующим многократным увеличением их количества при помощи протокола быстрого размножения [21]. Адоптивный перенос больным генерализованной меланомой кожи активированных таким образом Т-лимфоцитов в сочетании с низкими дозами ИФН α показал выраженный ответ на терапию [32].

Проведенные в начале 80-х гг. доклинические исследования показали, что эффективность адоптивного Т-клеточного переноса существенно повышается на фоне предварительной химиотерапии [33, 34]. В клинических испытаниях немиелоаблативная системная химиотерапия (флударабин в комбинации с циклофосфамидом), проведенная перед АКИТ, повышала до 50% объективный ответ на лечение у больных генерализованной меланомой кожи, при этом длительность ремиссии также увеличилась [14, 35]. У части пациентов была отмечена быстрая и полная регрессия опухолевых очагов, даже при распространенном заболевании с множественными висцеральными метастазами.

На основании этих данных сформировалась новая парадигма о необходимости предварительного истощения пула циркулирующих лимфоцитов в комплексе подготовительных мероприятий для более эффективной реализации противоопухолевого потенциала адоптивно перенесенных Т-лимфоцитов. В связи с этим обсуждаются такие эффекты химио- и/или лучевой терапии, как элиминация супрессорных клеток, подавляющих противоопухолевый иммунный ответ, минимизация системных эффектов цитокинов (“cytokine sink”), при которых конкуренция перенесенных и присутствующих в организме иммунных клеток в условиях ограниченного количества цитокинов и ростовых факторов приводит к снижению выживаемости адоптивно перенесенных Т-клеток *in vivo*, а также неспецифическая активация антигенпрезентирующих клеток микроорганизмами-комменсалами, обусловленная нарушением барьерной функции слизистых оболочек [36].

Дальнейшее изучение роли лимфоидного истощения в адоптивном переносе проводили в контексте использования химиолучевой терапии [15]. Миелоаблативный режим с тотальным облучением всего тела в дозе 2 и 12 Гр был использован у больных генерализованной меланомой кожи (по 25 пациентов в каждой группе). В дозе 12 Гр облучение проводили фракциями по 2 Гр 2 раза в день на протяжении 3 дней. После адоптивного переноса все пациенты получали курс высокодозной терапии ИЛ-2. В качестве терапии сопровождения пациентам трансплантировали мобилизованные ГМ-КСФ аутологичные стволовые $CD34^+$-клетки периферической крови через день после адоптивного переноса Т-клеток. Анализ эффективности АКИТ был проведен с учетом результатов немиелоаблативной системной химиотерапии [14].

Доля объективных ответов составила: в группе немиелоаблативной химиотерапии — 48,8% (у 21 из 43 пациентов), в группе с облучением в дозе 2 Гр — 52% (13/25) и в дозе 12 Гр — 72% (18/25). Общая 2-летняя выживаемость составила 30% в группе немиелоаблативной химиотерапии и 42% при тотальном облучении тела в дозе 2 Гр. Период наблюдения за группой с тотальным облучением тела в дозе 12 Гр оказался коротким для оценки этого показателя. Тем не менее на момент окончания исследования 10 пациентов, у которых регистрировали полное исчезновение всех опухолевых очагов (по данным КТ/МРТ), оставались в полной ремиссии, длительность которой составляла от 8 до 63 мес.

Значительный интерес представляют данные о кратковременном истощении Т-клеточной популяции при помощи препаратов на основе моноклональных антител. Для селективной элиминации регуляторных Т-лимфоцитов ($CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$) в настоящее время апробируется рекомбинантный цитотоксический белок, состоящий из фрагментов А и В дифтерийного токсина, конъюгированного с рекомбинантным ИЛ-2 (DAB/IL-2) [37]. Этот препарат эффективно связывается с α-цепью рецептора ИЛ-2 (CD25) на поверхности Т-лимфоцитов, проникает внутрь клетки и ингибирует синтез белка, приводя к гибели клетки в течение нескольких часов. Результаты исследования DAB/IL-2 у больных генерализованной меланомой кожи [38] показали, что на фоне кратковременного истощения Т-лимфоцитов усиливается противоопухолевый иммунный ответ. В данном исследовании 16 пациентам препарат вводили внутривенно в дозе 12 мкг/кг массы тела 1 раз в сутки в течение 4 дней. Каждый пациент получил от 1 до 4 циклов введения препарата с интервалом в 3 нед. Количество $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов уменьшалось уже после первой инъекции более чем на 50% за 24–48 ч от начала лечения. В течение 72 ч практически полностью исчезали регуляторные Т-лимфоциты. Популяционный состав лимфоцитов периферической крови восстанавливался через 21 день от начала лечения. Генерация специфических ЦТЛ к антигену меланомы MART1 была изучена у 7 больных. До введения препарата MART1-специфические Т-лимфоциты в крови не определялись. Уже после окончания первого цикла антигенноспецифические $CD8^+$ Т-лимфоциты выявлялись у 4 из 7 пациентов, однако только у 2 из них наблюдалась регрессия метастазов. У двух других пациентов регрессия одних метастазов сопровождалась прогрессивным ростом других. В целом лечение DAB/IL-2 привело к частичному клиническому ответу у 5 пациентов (31%). Авторами цитируемой работы сделан вывод, что кратковременное истощение популяции Т-лимфоцитов у больных генерализованной меланомой при помощи DAB/IL-2 приводит к обновлению у части пациентов их состава в периферической крови и генерации меланомаспецифических ЦТЛ. Однако в другом клиническом исследовании [39] при введении DAB/IL-2 12 больным генерализованной меланомой не было зарегистрировано признаков регрессии или стабилизации заболевания, также как и существенного уменьшения в циркуляции количества регуляторных Т-лимфоцитов, что может быть связано с различиями в режимах введения препарата.

Блокада клеточного рецептора CTLA4 (антиген, ассоциированный с ЦТЛ) при помощи моноклональных антител (ипилимумаб) также рассматривается в качестве возможного инструмента для селективной элиминации регуляторных Т-лимфоцитов и усиления таким способом противоопухолевого иммунного ответа у больных генерализованной меланомой [40–43]. Следует отметить, что у части пациентов, получавших такое лечение, наряду с повышением противоопухолевой резистентности организма развились иммунопатологические осложнения. В частности, применение ипилимумаба в протоколах лечения 198 больных меланомой кожи в 21% случаев ассоциировалось с развитием аутоиммунного энтероколита, осложненного перфорацией кишечника у 5 пациентов [41]. В двух других сообщениях [42, 43] отмечено развитие аутоиммунного увеита на фоне блокады CTLA4 в условиях применения ИЛ-2-зависимой терапии или вакцинотерапии на основе антигена меланомы gp 100, что коррелировало с лучшим прогнозом. Исходя из этих данных, можно заключить, что перспектива применения таких иммунотропных препаратов в протоколах АКИТ пока четко не определена, а развитие тяжелых аутоиммунных осложнений, обусловленных в частности элиминацией регуляторных Т-лимфоцитов, требует детального изучения для принятия взвешенного решения по их использованию.

Вышеизложенное свидетельствует о том, что кратковременное обратимое лимфоидное истощение может существенно повысить эффективность адоптивного переноса Т-лимфоцитов. Такие мероприятия направлены не только на нивелирование механизмов иммуносупрессии, но и на элиминацию эндогенных лимфоцитов, которые могут конкурировать с перенесенными Т-лимфоцитами за ключевые факторы роста. С другой стороны, изменения гомеостатических механизмов могут повлечь за собой развитие иммунопатологических реакций, характер которых обусловлен антигенными свойствами опухоли, индивидуальной иммунореактивностью пациента и особенностями влияния на организм комплекса терапевтических мероприятий.

Так, адоптивный перенос меланомаспецифических ЦТЛ 13 больным генерализованной меланомой после проведенного курса немиелоаблативной химиотерапии осложнился аутоиммунным процессом у 5 пациентов [14]. Как отмечают авторы цитируемой работы, объективный ответ наблюдался у 6 больных, у 4 других пациентов уменьшение одних групп метастазов сопровождалось появлением новых. При этом у 5 больных с выраженной регрессией кожных и подкожных очагов меланомы регистрировались аутоиммунные реакции, связанные с разрушением меланоцитов (у 4 пациентов развилось витилиго, у 1 — увеит). Очевидно, что в основе этих реакций лежат механизмы, направленные на срыв иммунологической толерантности [44], которые в ряде случаев проявляются в виде паранеопластических синдромов.

В плане обсуждения важно отметить, что кардинальная проблема современных высокотехнологичных методов иммунотерапии в онкологии связана с тем, что многие антигены опухоли, являющиеся их целью, также выражены в нормальных тканях, предопределяя тем самым возможность формирования иммунозависимых реакций, и меланома кожи не является исключением. Описаны случаи развития аутоиммунного тиреоидита у больных меланомой кожи на фоне проведения интерфероно- или ИЛ-2-зависимой терапии [45, 46]. Согласно результатам рандомизированного исследования [47], включающего 200 больных меланомой кожи, которым в адъювантном режиме была проведена высокодозная интерферонотерапия, клинико-лабораторные проявления аутоиммунных реакций были обнаружены у 52 (26%) больных. Множественные реакции отмечены у 16 (8%) пациентов, витилиго развилось у 11 (6%) больных, другие клинические проявления аутоиммунной природы (гипотиреоз, тиреотоксикоз, аутоиммунная тромбоцитопеническая пурпура, ретинопатия, ревматоидный артрит, системная красная волчанка) зарегистрированы у 19 больных. Авторы данного исследования отмечают, что аутоиммунные проявления (клинические и/или лабораторные) коррелировали с повышением общей и безрецидивной выживаемости данной категории больных.

Подводя итог изложенному материалу, можно заключить, что АКИТ из метода экспериментальной биотерапии постепенно преобразовывается в метод терапии пациентов со злокачественными новообразованиями. Как показано в данном обзоре, клинически значимые результаты достигнуты при использовании этого метода в лечении больных генерализованной меланомой кожи. В отличие от вакцинотерапии этой категории больных методы АКИТ имеют существенное преимущество. При иммунизации больных пептидами, выделенными из антигенов меланомы, возрастает число антигеноспецифических предшественников ЦТЛ, однако до настоящего времени это не коррелировало с регрессией меланомы, что предполагает недостаточную степень активации эндогенных клеток-эффекторов. Напротив, методы АКИТ позволяют выделить из общей популяции Т-лимфоцитов меланома-реактивные субпопуляции и активировать их *in vitro*. Адоптивный перенос таких меланомаспецифических клонов Т-лимфоцитов в предварительно подготовленную среду организма, включающую кратковременное обратимое лимфоидное истощение и введение оптимального набора экзогенных цитокинов, позволяет обеспечить необходимые условия для их приживления и функционирования.

Есть основания надеяться, что весь накопленный опыт позволит уже в ближайшее время провести рандомизированные исследования и определить роль и место АКИТ в лечении больных меланомой кожи. Однако независимо от того, каким образом будут внедряться методы АКИТ в клиническую практику, очевидным является тот факт, что за такими высокотехнологичными методами биотерапии — будущее [48]. В этом убеждены исследователи, давшие следующее определение АКИТ [20]: форма трансфузионной терапии, основанная на введении различных субпопуляций зрелых Т-лимфоцитов с целью воздействия на первичную опухоль или для предотвращения развития рецидивов и метастазов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рак в Україні, 2008–2009 (2010) Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби України. / За ред. І.Б. Щепотіна. Бюл. Нац. канцер-реєстру. Київ, 11: 104.

2. Коровин С.И., Кукушкина М.Н., Паливец А.Ю. (2011) Опыт применения дакарбазина в лечении генерализованной меланомы кожи. Клин. онкология., 3(3): 26–27.

3. Rosenberg S.A., Yang J.C., White D.E. et al. (1998) Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response. An. Surgery., 228(3): 307–319.

4. Tsao H., Atkins M.B., Sober A.J. (2004) Management of cutaneous melanoma. N. Eng. J. Med., 351(10): 998–1042.

5. Hodi F.S., O'Day S.J., McDermott D.F. et al. (2010) Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. N. Eng. J. Med., 363(8): 711–723.

6. Rosenberg S.A., Yang J.C., Restifo N.P. (2004) Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. Nature Med., 10(9): 909–915.

7. Romero P., Cerottini J.C., Speiser D.E. (2006) The human T cell response to melanoma antigens. Adv. Immunol., 92: 187–224.

8. Stockert E., Jager E., Chen Y. et al. (1998) A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. J. Exp. Med., 187(8): 1349–1354.

9. Huang S.K., Okamoto T., Morton D.L. et al. (1998) Antibody responses o melanoma/melanocyte autoantigens in melanoma patients. J. Invest. Dermatol., 111(4): 662–667.

10. Platsoucas C.D., Fincke J.E., Pappas J. et al. (2003) Immune responses to human tumors: development of tumor vaccines. Anticancer Res., 23: 1969–1996.

11. Jones E., Dahm-Vicker M., Golgher D. et al. (2003) CD25$^+$ regulatory T cells and tumor immunity. Immunol. Lett., 85: 141–143.

12. Widen K., Mozaffari F., Choudhury A. et al. (2008) Overcoming immunosuppressive mechanisms. Ann. Oncol., 19(7): 241–247.

13. Rosenberg S.A., Yannelli J.R., Yang J.C. et al. (1994) Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. J. Natl. Cancer Inst., 86: 1159–1166.

14. Dadley M.E., Wunderlich J.R., Yang J.C. et al. (2005) Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. J. Clin. Oncol., 23(10): 2346–2357.

15. Dadley M.E., Yang J.C., Sherry R. et al. (2008) Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. J. Clin. Oncol., 26(32): 5233–5239.

16. Besser M.J., Shapira-Frommer R., Treves A.J. et al. (2010) Clinical responses in a phase II study using adoptive transfer of short-term cultured tumor infiltration lymphocytes in metastatic melanoma patients. Clin. Cancer Res., 16(9): 2646–2655.

17. Rosenberg S.A., Lotze M.T., Yang J.C. et al. (1993) Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alon or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. J. Nat. Cancer Inst., 85(8): 622–632.

18. Гриневич Ю.А., Фильчаков Ф.В. (2003) Адоптивная иммунотерапия и ее влияние на эффективность лечения больных онкологического профиля. Онкология, 5(2): 90–95.

19. Гриневич Ю.А., Фильчаков Ф.В. (2009) Адоптивный клеточный перенос иммунитета в биотерапии больных злокачественными новообразованиями. Иммунология, 30(2): 129–135.

20. June C.H. (2007) Principles of adoptive T-cell cancer therapy. J. Clin. Invest., 117(5): 1204–1212.

21. Riddell S.R., Greenberg P.D. (1998) Rapid expansion method (REM) for in vitro propagation of T-lymphocytes. US Patent 5,827,642, filed October 3, 1994, and issued October 27, 1998.

22. Dudley M.E., Wunderlich J.R., Shelton T.E. et al. (2003) Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients. J. Immunotherapy, 26(4): 332–342.

23. Besser M.J., Shapira-Frommer R., Treves A.J. et al. (2009) Minimally cultured or selected autologous tumor-infiltrating lymphocytes after a lympho-depleting chemotherapy regimen in metastatic melanoma patients. J. Immunotherapy, 32(4): 415–423.

24. Besser M.J., Treves A.J., Itzhaki O. et al. (2006) Adoptive cell therapy for metastatic melanoma patients: pre-clinical development at the Sheba Medical Centr. Israel Medical Association J., 8(3): 164–168.

25. Shen X., Zhou J., Hathcock K.S. et al. (2007) Persistence of tumor infiltrating lymphocytes in adoptive immunotherapy correlates with telomere length. J. Immunotherapy, 30(1): 123–129.

26. Tran K.Q., Zhou J., Durflinger K.H. et al. (2008) Minimally cultured tumor-infiltrating lymphocytes display optimal characteristics for adoptive cell therapy. J. Immunotherapy., 31(8): 742–751.

27. Besser M.J., Shapira-Frommer R., Treves A.J. et al. (2010) Clinical responses in a phase II study using adoptive transfer of short-term cultured tumor infiltration lymphocytes in metastatic melanoma patients. Clin. Cancer Res., 16(9): 2646–2655.

28. Rosenberg S.A., Packard B.S., Aebersold P.M. et al. (1988) Use of tumor infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. N. Engl. J. Med., 319: 1676–1680.

29. Rosenberg S.A., Yannelli J.R., Yang J.C. et al. (1994) Treatment of patients with metastatic melanoma

with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2. J. Natl. Cancer Inst., 86: 1159–1166.

30. Rosenberg S.A., Dudley M. (2009) Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. Curr. Opin. Immunol., 21: 233–240.

31. Mazzarella T., Cambiaghi V., Rizzo N. et al. (2011) *Ex vivo* enrichment of circulating anti-tumor T-cells from both cutaneous and ocular melanoma patients: clinical implications for adoptive cell transfer therapy. Cancer Immunol. Immunother. (doi: 10.007/s00262-011-1179-z), http://www.Springerlink.com.

32. Verdegaal E.M., Visser M., Ramwadhdoebe T.H. et al. (2011) Successful treatment of metastatic melanoma by adoptive transfer of blood-derived polyclonal tumor-specific $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cells in combination with low-dose interferon-alpha. Cancer Immunol. Immunother., 60: 953–963.

33. Cheever M.A., Greenberg P.D., Fefer A. (1980) Specificity of adoptive chemoimmunotherapy of established syngeneic tumors. J. Immunol., 125(2): 711–714.

34. North R.J. (1982) Cyclophosphamide-facilitated adoptive immunotherapy of an established tumor depends on elimination of tumor-induced suppressor T-cells. J. Exp. Med., 155(4): 1063–1074.

35. Dudley M.E., Wunderlich J.R., Robbins P.F. et al. (2002) Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. Science, 298(5594): 850–854.

36. Gattinoni L., Finkelstein S., Klebanoff C. et al. (2005) Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific $CD8^+$ T-cells. J. Exp. Med., 202: 907–912.

37. Frankel A., Surendranathan A., Black J. et al. (2006) Phase II clinical studies of denileukin diftitox diphtheria toxin fusion protein in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia. Cancer, 106: 2158–2164.

38. Rasku M., Clem A., Telang S. et al. (2008) Transient T-cell depletion causes regression of melanoma metastases. J. Transl. Med., 6: 12–30.

39. Attia P., Maker A., Haworth L. et al. (2005) Inability of a fusion protein of IL-2 and diphtheria toxin (Denileukin Diftitox, DAB389IL-2, ONTAK) to eliminate regulatory T-lymphocytes in patients with melanoma. J. Immunother., 28: 582–592.

40. Hodi F.S., Butler M., Oble D.A. et al. (2008) Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 105(8): 3005–3010.

41. Beck K.E., Blansfield J.A., Tran K.Q. et al. (2006) Enterocolitis in patients with cancer after antibody blockade of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4. J. Clin. Oncol., 24: 2283–2289.

42. Maker A.V., Phan G.Q., Attia P. et al. (2005) Tumor regression and autoimmunity in patients treated with cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 blockade and interleukin 2: a phase I/II study. Ann. Surg. Oncol., 12(12): 1005–1016.

43. Robinson M.R., Chan C.C., Yang J.C. et al. (2004) Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma: anew cause of uveitis. J. Immunother., 27(6): 478–479.

44. Caspi R.R. (2008) Immunotherapy of autoimmunity and cancer: the penalty for success. Nat. Rev. Immunol., 8(12): 970–976.

45. Ascierto P.A., Kirkwood J.M. (2008) Adjuvant therapy of melanoma with interferon: lessons of the past decade. J. Transl. Med., 6: 62–70.

46. Phan G.O., Attia P., Steinberg S.M. et al. (2001) Factors associated with response to hign-dose interleukin-2 in patients with metastatic melanoma. J. Clin. Oncol., 19: 3477–3482.

47. Gogas H., Ioannovich J., Dafni U. et al. (2006) Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon. N. Engl. J. Med., 354: 709–718.

48. Weber J., Atkins M., Hwu P. et al. (2011) White paper on adoptive cell therapy for cancer with tumor-infiltrating lymphocytes: a report of the CTEP subcommittee on adoptive cell therapy. Clin. Cancer Res., 17(7): 1664–1673.

Сучасні підходи до адоптивної імунотерапії хворих на генералізовану меланому шкіри

Ф.В. Фільчаков, С.І. Коровін

Національний інститут раку, Київ

Резюме. Застосування аутологічних пухлиноспецифічних Т-лімфоцитів, виділених з пухлини або периферичної крові, може бути потужним імунотерапевтичним інструментом у лікуванні хворих на генералізовану меланому шкіри. Адоптивне перенесення меланомаспецифічних Т-лімфоцитів, активованих і розмножених поза організмом у сполученні з високими дозами інтерлейкіну-2 дозволив досягти об'єктивної відповіді на терапію у 50–70% пацієнтів цієї категорії. В огляді літератури наведено практичні методи отримання достатньої кількості активованих Т-лімфоцитів у лабораторних умовах. Представлено критичний аналіз комплексу підготовчих заходів для більш ефективної реалізації протипухлинного потенціалу адоптивно перенесених Т-лімфоцитів. Розглянуто клініко-лабораторні ефекти хіміопроменевої терапії, що сприяють цьому.

Ключові слова: меланома шкіри, адоптивна клітинна імунотерапія, меланомаспецифічні Т-лімфоцити, виснаження популяції Т-лімфоцитів, клінічна ефективність.

Modern approaches to adoptive immunotherapy of metastatic skin melanoma patients

F.V. Fil'chakov, S.I. Korovin

National Cancer Institute, Kyiv

Summary. Use the autologous tumor-specific T-lymphocytes excreted from a tumour or peripheral blood can be the powerful immunotherapeutic agent in treatment of metastatic skin melanoma patients. Adoptive transfer of the melanoma-specific T-lymphocytes activated and propagated out of an organism in a combination to high doses of interleukin-2 (IL-2) has allowed to achieve the objective answer on therapy in 50–70% of metastatic skin melanoma patients. Practical methods of reception of enough quantity of the activated T-lymphocytes *in vitro* are resulted in the review. The critical analysis of a complex of preparatory measures for more effective realisation of antitumor potential of adoptive transferred T-lymphocytes is presented. Clinical-laboratory effects of the chemoradiotherapy promoting it are discussed.

Key words: skin melanoma, adoptive cellular immunotherapy, melanoma-specific T-lymphocytes, attrition of T-lymphocytes population, clinical efficacy.