



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2004100550/14, 05.01.2004

(24) Дата начала действия патента: 05.01.2004

(43) Дата публикации заявки: 10.06.2005

(45) Опубликовано: 27.10.2005 Бюл. № 30

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: ХОНИНА Н.А. и др. Новые подходы в лечении злокачественных опухолей головного мозга. Новые направления в клинической медицине. Мат. Всерос. конф. Ленинск-Кузнецкий, 2000, с.79-80. RU 2111007 С1, 20.05.1998. RU 2192263 С2, 10.11.2002. US 6,645,487, 11.11.2003. СКВОРЦОВ С.В. и др. Дендритные клетки - новые перспективы в лечении злокачественных(см. прод.)

Адрес для переписки:

630099, г.Новосибирск, ул. Ядринцовская, 14,  
ГУ НИИКИ СО РАМН

(72) Автор(ы):

Черных Е.Р. (RU),  
Леплина О.Ю. (RU),  
Останин А.А. (RU),  
Никонов С.Д. (RU),  
Ступак В.В. (RU),  
Козлов Ю.П. (RU)

(73) Патентообладатель(ли):

Государственное учреждение Научно-исследовательский институт клинической иммунологии СО РАМН (RU),  
Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии МЗ РФ (RU)

C 2  
1 4 1  
2 6 2  
2 2 1  
R U

R U  
2 2 6 2 9 4 1

C 2

## (54) СПОСОБ ИММУНОТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к способам лечения онкологических заболеваний. Способ характеризуется тем, что после удаления злокачественной опухоли головного мозга последовательно проводят курсы: цитокинотерапии, включающей в себя 3 внутримышечные инъекции лейкинфераона с интервалом 48 ч, адоптивной иммунотерапии лимфокин-активированными киллерными клетками (ЛАКК), генерированными в присутствии рекомбинантного интерлейкина-2 (ИЛ-2). При этом ЛАКК вводят в ложе удаленной опухоли в комбинации с ИЛ-2 в виде 2 процедур с интервалом 24 ч. Затем проводят курс адоптивной иммунотерапии цитотоксическими лимфоцитами (ЦТЛ), генерированными путем культивирования мононуклеарных клеток крови больного с дендритными клетками, нагруженными опухолевым

антигеном, в присутствии рекомбинантного ИЛ-2, и вводят их в комбинации с ним в ложе удаленной опухоли в виде двух процедур с интервалом 48 ч. Для получения дендритных клеток у больного до операции из крови выделяют моноциты и культивируют с гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором и интерфероном- $\alpha$  с дозреванием дендритных клеток в присутствии кондиционной среды моноцитов и инкубацией дендритных клеток в присутствии антигенного материала опухоли для их нагрузки опухолевым антигеном. После иммунотерапии ЦТЛ проводят курс вакцинации дендритными клетками, нагруженными опухолевым антигеном, в сочетании с подкожными инъекциями ИЛ-2. Способ позволяет индуцировать высокий специфический противоопухолевый иммунный ответ с улучшением качества жизни и увеличением продолжительности безрецидивного периода. 2 з.п. ф-лы.

(56) (продолжение):

опухолей головы и шеи. Опухоли головы и шеи. Диагностика. Лечение. Мат. межрег. науч.-практ. конф. с междунар. Барнаул, 1999, с.178-180.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

## (12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 2004100550/14, 05.01.2004

(24) Effective date for property rights: 05.01.2004

(43) Application published: 10.06.2005

(45) Date of publication: 27.10.2005 Bull. 30

Mail address:

630099, g.Novosibirsk, ul. Jadrintsovskaja,  
14, GU NIIKI SO RAMN

(72) Inventor(s):

Chernykh E.R. (RU),  
Leplina O.Ju. (RU),  
Ostanin A.A. (RU),  
Nikonov S.D. (RU),  
Stupak V.V. (RU),  
Kozlov Ju.P. (RU)

(73) Proprietor(s):

Gosudarstvennoe uchrezhdenie Nauchno-  
issledovatel'skij institut klinicheskoy  
immunologii SO RAMN (RU),  
Nauchno-issledovatel'skij institut  
travmatologii i ortopedii MZ RF (RU)

## (54) METHOD FOR IMMUNOTHERAPY OF CEREBRAL MALIGNANT TUMORS

(57) Abstract:

FIELD: medicine, oncology.

SUBSTANCE: after removing malignant cerebral tumor one should conduct successive course of: cytokinotherapy consisting of 3 intramuscular injections of leukineferon at 48-h-long interval, adaptive immunotherapy with lymphokine-activated killer cells (LAKC) generated in the presence of recombinant interleukin-2 (IL-2). Moreover, LAKC should be introduced into the channel of removed tumor in combination with IL-2 as 2 procedures at 24-h-long interval. Then comes the course of adaptive immunotherapy with cytotoxic lymphocytes (CTL) generated due to cultivating patient's mononuclear blood cells together with dendritic cells loaded with a tumor antigen, in the presence of recombinant IL-2 to be introduced in combination with it into the channel of removed

tumor as 2 procedures at 48-h-long interval. For obtaining dendritic cells in patients before operation it is necessary to isolate monocytes to cultivate with granulocytic-macrophageal colony-stimulating factor and interferon- $\alpha$  at maturing dendritic cells in the presence of monocytic conditioned medium and incubation of dendritic cells in the presence of tumor antigenic material for their loading with a tumor antigen. After immunotherapy with CTL one should conduct the course of vaccinotherapy with dendritic cells loaded with a tumor antigen in combination with subcutaneous injections of IL-2. The method enables to induce high specific anti-tumor immune response along with improved quality of life and prolonged duration of relapse-free period.

EFFECT: higher efficiency of immunotherapy.

2 cl, 2 ex

R U  
2 2 6 2 9 4 1  
C 2  
1  
4  
9  
2  
6  
2  
2  
UR U  
2 2 6 2 9 4 1  
C 2

Изобретение относится к медицине, а именно к способам лечения онкологических заболеваний, и может быть использовано в иммунотерапии злокачественных опухолей головного мозга.

Существует два подхода к иммунотерапии злокачественных опухолей -

- 5 неспецифическая и антиген-специфическая иммунотерапия.

В рамках первого подхода наиболее широко в настоящее время используются цитокины при лечении опухолей различной локализации. Так, известен способ лечения полипов желудка (патент №2111007, А 61 К 38/20, 1998 г.), в котором используют иммунокорригирующую терапию с помощью лейкинферона, который вводят в 10 подслизистый слой желудка, сочетая местное лечение лейкинфероном с введением его в прямую кишку. Однако полипы желудка относятся к доброкачественным заболеваниям, и местное введение лейкинферона в данном способе было направлено на усиление лейкоцитарно-макрофагальной инфильтрации в области роста полипа, что может приводить к нарушению его кровоснабжения или к развитию неспецифических иммунных 15 реакций, блокирующих дальнейший рост доброкачественной опухоли. Тем не менее, такой подход может оказаться неэффективным при злокачественных опухолях, поскольку не позволяет индуцировать специфический противоопухолевый иммунный ответ.

В рамках второго подхода известен способ лечения опухолей головного мозга (патент RU №2192263, А 61 К 35/14, 2000 г.), по которому из периферической крови больного 20 выделяют моноциты и культивируют с ростовыми факторами, далее в среду к полученным из моноцитов дендритным клеткам, а также путем электрокорпорации внутрь клеток добавляют антигенный материал, приготовленный из опухоли больного, затем дендритные клетки вводят внутрикожно, и дополнительно проводят иммуномодуляцию, используя активированные с помощью фитогемагглютина лимфоциты больного. Данный способ 25 позволяет стабилизировать состояние больного по шкале социальной адаптации Карновского и достичь 5-месячного периода, свободного от прогрессии опухоли. Однако при этом способе не в полном объеме действуют существующие в организме механизмы противоопухолевой защиты. Кроме того, из описания патента не ясно какова эффективность предложенного способа в отношении индукции противоопухолевого 30 иммунного ответа, развитие которого было бы подтверждено соответствующими лабораторными тестами.

Наиболее близким к заявляемому способу является способ лечения злокачественных опухолей головного мозга, при котором используется комбинированный подход, сочетающий в себе элементы неспецифической и антиген-специфической иммунотерапии 35 (RU 2197985 С2, 10.05.2000 г.). По данному способу послеоперационная локорегиональная (в ложе удаленной опухоли) иммунотерапия аутологичными лимфокин-активированными киллерными клетками (ЛАК-клетками) в сочетании с интерлейкином-2 (ИЛ-2) комбинируется с введением цитотоксических лимфоцитов, стимулированных опухолевым антигеном в присутствии ИЛ-2, после чего проводится курс иммунотерапии аутологичными 40 иммуностимулирующими факторами. Однако при этом способе для генерации цитотоксических лимфоцитов не используются «профессиональные» антиген-презентирующие клетки (дендритные клетки), и отсутствуют доказательства индукции эффективного противоопухолевого специфического иммунного ответа, за счет чего достигается улучшение качества жизни и увеличение продолжительности безрецидивного 45 периода у больных с внутримозговыми опухолями.

Задача заявляемого изобретения: создать способ лечения злокачественных опухолей головного мозга, основанный на применении новых методов антиген-специфической иммунотерапии, позволяющий увеличить продолжительность безрецидивного периода у больных, повышающий уровень качества их жизни..

50 Технический результат состоит в эффективной индукции противоопухолевого иммунного ответа как на местном уровне - в ложе удаленной опухоли и перифокальной зоне, так и на системном уровне. Это достигается за счет того, что после нейрохирургического вмешательства и удаления опухолевого субстрата проводят курс цитокинотерапии,

включающий в себя 3 внутримышечные инъекции лейкинфераона в дозе 10000 МЕ интерферона- $\alpha$  с интервалом 48 ч, за ним следует курс адоптивной иммунотерапии лимфокин-активированными киллерными клетками, которые генерируют в присутствии рекомбинантного интерлейкина-2 в дозе 50 ЕД/мл, и вводят в ложе удаленной опухоли в комбинации с интерлейкином-2 в дозе 250 000 ЕД, причем курс адоптивной иммунотерапии включает в себя две процедуры генерации и локорегионального введения лимфокин-активированных киллерных клеток, которые проводят с интервалом 24 ч; затем курс адоптивной иммунотерапии цитотоксическими лимфоцитами, которые генерируют в результате 5-дневного культивирования мононуклеарных клеток периферической крови больного в соотношении 50:1 с дендритными клетками, нагруженными опухолевым антигеном, в присутствии рекомбинантного интерлейкина-2 в дозе 50 ЕД/мл, и вводят в ложе удаленной опухоли в комбинации с интерлейкином-2 в дозе 250 000 ЕД, причем курс адоптивной иммунотерапии включает в себя две процедуры генерации и локорегионального введения антиген-специфических цитотоксических лимфоцитов, которые проводят с интервалом 48 ч; для получения дендритных клеток у больного до операции из 250-300 мл периферической крови выделяют моноциты, которые культивируют с гранулоцитарно-макрофагальным колониостимулирующим фактором и интерфероном-альфа в течение 72 ч, затем проводят дозревание дендритных клеток в присутствии кондиционной среды моноцитов в течение 24 ч, после чего дендритные клетки инкубируют 1 ч при 37°C в присутствии антигенного материала из опухолевого субстрата, который получают от больного в результате выполнения нейрохирургического вмешательства; и после завершения иммунотерапии цитотоксическими лимфоцитами проводят курс вакцинотерапии дендритными клетками, нагруженными опухолевым антигеном, в виде 4-6 подкожных инъекций с интервалом 2 недели в сочетании с подкожными инъекциями интерлейкина-2 в дозе 250 000 ЕД.

Полученные дендритные клетки, нагруженные опухолевым антигеном, криоконсервируют в концентрации  $20,0 \times 10^6$  мл и хранят при -80°C до последующего использования для генерации антиген-специфических цитотоксических лимфоцитов, а также при проведении курса вакцинотерапии.

В качестве антигенного материала для нагрузки дендритных клеток используют лизат опухолевых клеток в концентрации по белку 0,1 мг/мл.

Способ осуществляется следующим образом. После нейрохирургического вмешательства и удаления опухолевого субстрата больному проводится курс цитокиновой терапии в виде 3-х внутримышечных инъекций лейкинфераона в дозе 10 000 МЕ интерферона- $\alpha$  через 48 ч. После завершения цитокинотерапии лейкинфераоном проводят курс адоптивной иммунотерапии с использованием аутологичных ЛАК-клеток, которые генерируются в результате 48-часового культивирования мононуклеарных клеток периферической крови больного. В стерильный флакон вводят 10 тыс. ЕД гепарина, забирают 300 мл венозной крови больного, добавляют 60 мл раствора желатиноля и инкубируют 45 мин при 37°C. Отмытую эритроцитарную массу возвращают больному в день гемоэксфузии. Собранную лейковзвесь собирают в отдельный флакон, центрифигируют при 1000 об/мин 20 мин и удаляют надосадок. Клетки лейковзвеси однократно отмывают фосфат-забуференным физиологическим раствором, насылаивают на градиент плотности фиколла-верографина и центрифигируют в течение 20 мин при 3000 об/мин. Собранные из интерфазы мононуклеарные клетки (МНК) дважды отмывают, и ресусцидируют в культуральной среде RPMI-1640, дополненной 5% сыворотки доноров АВ (IV) группы, 5 мМ HEPES-буфера и гентамицином в дозе 80 ЕД/мл. Клетки доводят до концентрации  $1,5 \times 10^6$  мл и культивируют в течение 48 ч с рекомбинантным ИЛ-2 в дозе 50 ЕД/мл. Курс адоптивной иммунотерапии включает в себя две процедуры получения ЛАК-клеток, которые проводятся с интервалом 24 ч. Полученные клетки вводятся локорегионально через катетер в ложе удаленной опухоли в комбинации с ИЛ-2 (препаратом «Ронколейкин») в дозе 250 000 ЕД.

Необходимым условием осуществления курса адоптивной иммунотерапии с

использованием антиген-специфических цитотоксических лимфоцитов является получение дендритных клеток и их нагрузка опухолевым антигенным материалом, которые выполняются на предварительном этапе. Для генерации дендритных клеток у больного за 1-2 дня до нейрохирургического вмешательства проводится гемоэксфузия в объеме 250-300 мл венозной крови. МНК, выделенные из крови больного по описанной выше методике, в концентрации  $3 \times 10^6$  мл инкубируются 2 ч при 37°C в полной культуральной среде в стерильных пластиковых чашках Петри (d=90 мм). Прилипающая к пластику фракция клеток моноцитарного ряда далее культивируется в течение 72 ч в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (препарат «Лейкомакс») и интерферона-альфа (препарат «Реаферон») в дозе по 1000 ЕД/мл.

Дозревание дендритных клеток проводится в течение дополнительных 24 ч в присутствии кондиционной среды моноцитов (30% v/v). Полученные дендритные клетки нагружают опухолевым антигеном (0,1 мг/мл) во время часов инкубации при 37°C. Затем дендритные клетки, нагруженные опухолевым антигеном, криконсервируются в растворе 10% DMSO и 90% альбумина в концентрации  $20,0 \times 10^6$  мл и хранятся при -80°C до последующего использования для генерации антиген-специфических цитотоксических лимфоцитов, а также при проведении курса вакцинотерапии. Антигенный материал для нагрузки дендритных клеток, получают из фрагмента аутологичной опухоли больного, удаленной во время нейрохирургического вмешательства. Суспензию выделенных опухолевых клеток подвергают 5-кратному замораживанию/размораживанию (соответственно, в жидким азоте и при 37°C), затем опухолевый лизат центрифицируют, надсадок собирают и определяют концентрацию антигенного материала (в мг/мл по белку). Полученный раствор опухолевых антигенов хранят в замороженном виде.

Непосредственно сам курс адоптивной иммунотерапии с использованием антиген-специфических цитотоксических лимфоцитов начинают через 72 ч после завершения курса ЛАК-терапии. Для этого МНК, выделенные из 300 мл крови больного по описанной выше методике, в соотношении 50: 1 культивируют совместно с дендритными клетками, нагруженными опухолевым антигеном, в присутствии рекомбинантного ИЛ-2 в дозе 50 ЕД/мл в течение 5 сут. Курс адоптивной иммунотерапии включает в себя две процедуры получения антиген-специфических цитотоксических лимфоцитов, которые проводятся с интервалом 48 ч. Полученные клетки вводятся локорегионально, через катетер в ложе удаленной опухоли в комбинации с ИЛ-2 (препаратор «Ронколейкин») в дозе 250 000 ЕД.

Завершающий этап сочетанной иммунотерапии предусматривает проведение курса вакцинотерапии в виде подкожных инъекций дендритных клеток, нагруженных антигенным материалом из опухоли больного. При этом используется от 4 до 6 инъекций дендритных клеток в дозе  $10 \times 10^6$ /введение с кратностью вакцинаций - 1 раз в 2 недели. Введение дендритных клеток больному может проводиться как в условиях стационара, так и в амбулаторном режиме. При этом каждая вакцинация дендритными клетками комбинируется с одновременным использованием ИЛ-2 (препарата «Ронколейкин»), который в дозе 250 000 ЕД вводится также подкожно в область, близлежащую к месту введения дендритных клеток.

Данный способ лечения злокачественных опухолей головного мозга был проверен в клинических условиях на базе нейрохирургического отделения НИИ травматологии и ортопедии МЗ РФ, г. Новосибирск. Предложенным способом было пролечено 12 больных (7 мужчин и 5 женщин в возрасте от 23 до 62 лет) с гистологически верифицированным диагнозом анапластической астроцитомы (10 пациентов) и глиобластомы (2 больных). Всем больным было проведено оперативное лечение - была выполнена субтотальная резекция опухоли, которая осуществлялась в пределах визуально определяемых границ. После костно-пластической трепанации черепа в проекции опухоли под увеличением  $\times 4,4$  патологический опухолевый субстрат удаляли с использованием микрохирургической техники и ультразвукового аспиратора. Затем осуществляли тщательный гемостаз и производили пластику твердой мозговой оболочки гомотрансплантом. Через контраперттуру (в 1 см от основного разреза) в ложе удаленной опухоли устанавливался

хлорвиниловый катетер, который фиксировался лигатурами. В послеоперационном периоде проводилась сочетанная иммунотерапия в соответствии с разработанным способом. Курсовое лечение по предложенному протоколу было хорошо переносимым и не сопровождалось развитием каких-либо серьезных побочных или токсических реакций.

- 5 Напротив, многие больные отмечали субъективное улучшение, что проявлялось статистически значимым увеличением среднего индекса качества жизни по шкале Карновского.

Оценку противоопухолевого иммунного ответа проводили перед началом курса цитокинотерапии лейкинфероном (исходный уровень) и после завершения адоптивной клеточной иммунотерапии с использованием ЛАК-клеток/цитотоксических Т-лимфоцитов при проведении вакцинаций дендритными клетками. Выраженность специфического иммунного ответа против опухолевых антигенов оценивали в кожном тесте (по образованию папул в месте внутрикожного введения аутологичного опухолевого антигена в дозе 0,1 мг/мл) и/или в культуре *in vitro* по усилиению функциональной активности 15 эффекторных клеток, опосредующих реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ-эффекторов), в ответ на стимуляцию специфическим антигеном из аутологичной опухоли в дозе 0,1 и 0,01 мг/мл [1]. На начальном этапе проведения сочетанной иммунотерапии у больных не выявлялся какой-либо значимый уровень антиген-специфического иммунного ответа ни в кожном teste, ни в культуре *in vitro*. В то же 20 время индукция эффективного противоопухолевого иммунного ответа по результатам кожной пробы и/или по усилинию активности ГЗТ-эффекторов в культуре *in vitro* после завершения курса клеточной адоптивной иммунотерапии либо на этапе проведения вакцинаций дендритными клетками была документирована в 75% случаев (у 9 из 12 больных). По предложенному способу частота развития антиген-специфических иммунных 25 реакций была на 30,6% выше, чем, например, при изолированном проведении курса вакцинотерапии дендритными клетками, нагруженными опухолевым антигеном (44,4%) [2]. Таким образом, использование предложенного способа позволяет более эффективно индуцировать противоопухолевый иммунный ответ у больных со злокачественными опухолями головного мозга.

- 30 Ниже приведены клинические примеры, поясняющие данный способ лечения злокачественных опухолей головного мозга.

Пример 1. Больной З., 62 года, ИБ №455/03, находился в клинике нейрохирургии с диагнозом: внутримозговая злокачественная опухоль правой теменно-затылочной области (полиморфно-клеточная глиобластома).

- 35 Поступил в клинику 20.02.2003 с жалобами на слабость в левых конечностях, головную боль преимущественно в лобной и затылочной областях, снижение зрения, неуверенность при ходьбе. Анамнез заболевания: течение заболевания прогredientное. Считает себя больным с осени 2002, когда начали беспокоить головные боли, шаткость при ходьбе. Через месяц после манифестации заболевания пациент заметил быстро нарастающую 40 слабость в левой ноге, затем в руке. Лечился в стационаре г. Нижневартовска, где на компьютерной томографии выявлена опухоль в глубинных отделах правой теменной доли.

В неврологическом статусе: В сознании. Контактен. Глазные щели D=S. Зрачки D=S, фотопререкция живая. Слабость конвергенции слева. Парез мимической мускулатуры слева по центральному типу. Язык по средней линии. Глубокий левосторонний гемипарез с 45 плегией в руке: сила в левой руке - 0, в левой ноге - 2,5 балла. Рефлексы с рук живые, S>D, брюшные низкие, коленные оживлены, S>D, ахилловы и подошвенные средней живости, S>D. Симптом Маринеску-Радовичи с обеих сторон. Астереогноз в левой руке. Чувствительность в норме. Координаторные пробы справа выполняет удовлетворительно, слева проверить невозможно. Оценка по шкале Карновского 60 50 баллов. Осмотр окулиста: Vis OD/OS=0,4/0,1. Глазное дно: начальные застойные диски зрительных нервов обоих глаз. ЭЭГ: Диффузная дизритмия, дисфункция неспецифических срединных структур. В правом полушарии регистрируются патологические медленные колебания тета-диапазона, которые интенсифицируются при гипервентиляции. ЭхоЭС:

смещение М-эха справа налево в средних отделах на 9 мм, в передних отделах - на 5 мм. Признаки внутричерепной гипертензии. ЯМРТ с контрастным усилением "Омнисканом": внутримозговая опухоль с кистозными включениями в правой теменной доле с выраженным масс-эффектом, вызывающая компрессию правого бокового желудочка и

5 смещение срединных структур.

27.02.2003 выполнена операция: костно-пластика трепанация черепа в правой теменно-затылочной области, субтотальная резекция внутримозговой опухоли.

После нейрохирургического вмешательства больному проведена сочетанная иммунотерапия по предложенному способу. 10.03.2003, 12.03.2003 и 14.03.2003 выполнен

10 курс цитокиновой терапии в виде внутримышечных инъекций лейкинфера (по 1 ампуле, №3, с интервалом 48 ч). 18.03.2003 и 19.03.2003 проведены гемоэксфузии в объеме 300 мл крови для генерации ЛАК-клеток. Через 48 ч (20.03.2003 и 21.03.2003) путем стереотаксической пункции в асептических условиях в ложе удаленной опухоли введены

15 аутологичные лимфокин-активированные киллерные клетки в общей дозе  $380 \times 10^6$  в комбинации с интерлейкином-2 (Ронколейкин, 250 000 ЕД).

Через 72 ч начат курс адоптивной иммунотерапии с использованием антиген-специфических цитотоксических лимфоцитов. 24.03.2003 проведена гемоэксфузия в объеме 300 мл крови, через 48 ч (26.03.2003) - повторная гемоэксфузия в том же объеме. После 5-суточного культивирования выделенных из крови МНК в соотношении 50:1

20 с дендритными клетками, нагруженными опухолевым антигеном, в присутствии рекомбинантного ИЛ-2 в дозе 50 ЕД/мл, полученные антиген-специфические цитотоксические Т-лимфоциты путем стереотаксической пункции в асептических условиях введены (29.03.2003 и 31.03.2003) в ложе удаленной опухоли в общей дозе  $277 \times 10^6$  в комбинации с интерлейкином-2 (Ронколейкин, 250 000 ЕД).

25 Завершающий курс вакцинации в виде подкожных инъекций ИЛ-2 (Ронколейкин по 250 000 ЕД) и дендритных клеток ( $10 \times 10^6$ ), нагруженных аутологичным опухолевым антигеном, начал 10.04.2003 г. Было проведено 6 вакцинаций с интервалом в 2 недели (10.04; 24.04; 08.05; 22.05; 05.06; и 19.06.2003). Курс вакцинации проводился в амбулаторном режиме, поскольку больной был выписан из стационара 04.04.2003 в

30 удовлетворительном состоянии с оценкой по шкале Карновского 90 баллов.

Исходный уровень противоопухолевого иммунного ответа определяли перед началом курса цитокинотерапии лейкинфероном (06.03.2003). Наличие у больного специфических иммунных реакций против аутологичных опухолевых антигенов не было выявлено ни в кожном teste, ни в культуре *in vitro* при исследовании активности ГЗТ-эффекторов. При этом не отмечалось образование папулы в месте внутрикожного введения антигена, а индекс стимуляции опухолевым антигеном ГЗТ-эффекторов составлял 0,62 расч.ед. После завершения курса адоптивной клеточной иммунотерапии с использованием ЛАК-клеток/цитотоксических Т-лимфоцитов у больного появился специфический противоопухолевый иммунный ответ, который регистрировался по усиление активности ГЗТ-эффекторов в ответ на стимуляцию опухолевым антигеном (03.04.2003, накануне выписки больного из стационара, индекс антигенной стимуляции составлял 2,6 расч.ед.). Развитие противоопухолевых иммунных реакций в кожной пробе было выявлено после третьей вакцинации дендритными клетками. У больного в месте внутрикожного введения опухолевого антигена (20.05.2003) через 48 ч в день проведения 4-ой процедуры

40 вакцинации (22.05.2003) было отмечено папулообразование. Диаметр папулы - 7 мм.

45

В настоящее время больной находится под диспансерным наблюдением, данных за рецидив нет. Спустя 10 мес после операции состояние пациента компенсированное. Головные боли не беспокоят. Отмечается значительный регресс неврологической симптоматики, восстановление силы в левых конечностях. Оценка по шкале Карновского -

50 90 баллов.

Пример 2. Больная К., 30 лет, ИБ №572/03, находилась в клинике нейрохирургии с диагнозом: внутримозговая злокачественная опухоль правой теменной области (фибриллярно-протоплазматическая астроцитома I степени анаплазии).

Поступила в клинику 11.03.2003 с жалобами на затруднения при произнесении слов, повышенную утомляемость, раздражительность. Анамнез заболевания: считает себя больной с октября 2001, когда впервые отметила приступы подергиваний в пальцах рук, без потери сознания, без предвестников. Обратилась к невропатологу по месту

5 жительства, по его рекомендации принимала фенобарбитал. Вышеописанные приступы повторялись по несколько раз в день. С 26.01.03 - несколько фокальных эпилептических припадков в виде фасцикуляций в кистях рук, в бедрах. На ЯМРТ обнаружена опухоль правой теменной доли с ростом в правую височную долю с кистозным и солидным компонентами.

10 В неврологическом статусе очаговой патологии не выявлено. Оценка по шкале Карновского - 80 баллов. Осмотр окулиста; visus OD/OS=1,0/1,0. Поля зрения в норме. Глазное дно: диски зрительных нервов бледно-розовые, границы стушеваны. Застойные диски зрительных нервов. ЭЭГ: Диффузные изменения биоэлектрической активности головного мозга с признаками ирритации срединных структур, брадидизритмия. ЭхоЭГ: 15 смещение М-эха справа налево на 3,5 мм в средних отделах. ЯМРТ: Кистозно-солидное образование правой теменной доли с распространением на правую височную долю со сдавлением заднего рога правого бокового желудочка.

12.03.2003 выполнена операция: костно-пластика трепанация черепа в правой теменно-височной области с удалением костного лоскута, удаление внутримозговой опухоли, пластика твердой мозговой оболочки гомотрансплантом.

20 После нейрохирургического вмешательства больной проведена сочетанная иммунотерапия по предложенному способу. 19.03.2003, 21.03.2003 и 23.03.2003 выполнен курс цитокиновой терапии в виде внутримышечных инъекций лейкинфера (по 1 ампуле, №3, с интервалом 48 ч). 25.03.2003 и 26.03.2003 проведены гемоэксфузии в объеме 300 25 мл крови для генерации ЛАК-клеток. Через 48 ч (27.03.2003 и 28.03.2003) путем стереотаксической пункции в асептических условиях в ложе удаленной опухоли введены аутологичные лимфокин-активированные киллерные клетки в общей дозе  $350 \times 10^6$  в комбинации с интерлейкином-2 (Ронколейкин, 250 000 ЕД).

25 Через 72 ч начат курс адоптивной иммунотерапии с использованием антиген-специфических цитотоксических лимфоцитов. 31.03.2003 проведена гемоэксфузия в объеме 300 мл крови, через 48 ч (02.04.2003) - повторная гемоэксфузия в том же объеме. После 5-суточного культивирования выделенных из крови МНК в соотношении 50: 1 с дендритными клетками, нагруженными опухолевым антигеном, в присутствии рекомбинантного ИЛ-2 в дозе 50 ЕД/мл, полученные антиген-специфические 35 цитотоксические Т-лимфоциты путем стереотаксической пункции в асептических условиях введены (05.04.2003 и 07.04.2003) в ложе удаленной опухоли в общей дозе  $280 \times 10^6$  в комбинации с интерлейкином-2 (Ронколейкин, 250 000 ЕД).

30 Завершающий курс вакцинотерапии в виде подкожных инъекций ИЛ-2 (Ронколейкин по 250 000 ЕД) и дендритных клеток ( $10 \times 10^6$ ), нагруженных аутологичным опухолевым антигеном, начал 14.04.2003 г. Было проведено 6 вакцинаций с интервалом в 2 недели (14.04; 28.04; 12.05; 26.05; 09.06 и 23.06.2003). Курс вакцинотерапии проводился в амбулаторном режиме, поскольку больная была выписана из стационара 09.04.2003 в удовлетворительном состоянии с оценкой по шкале Карновского 90 баллов.

35 Исходный уровень противоопухолевого иммунного ответа определяли перед началом курса цитокинотерапии лейкинфероном (17.03.2003). Наличие у больной специфических иммунных реакций против аутологичных опухолевых антигенов не было выявлено ни в кожном teste, ни в культуре *in vitro* при исследовании активности ГЗТ-эффекторов. При этом не отмечалось образование папулы в месте внутрикожного введения антигена, а индекс стимуляции опухолевым антигеном ГЗТ-эффекторов составлял 1,0 расч.ед. 50 Появление у больной специфического противоопухолевого иммунного ответа в виде усиления активности ГЗТ-эффекторов, стимулированных *in vitro* опухолевым антигеном, было зарегистрировано на этапе проведения курса вакцинотерапии. Так, 28.04.2003 (т.е. в день выполнения 2-ой вакцинации дендритными клетками) индекс антигенной стимуляции

ГЗТ-эффекторов составлял 2,7 расч.ед. Развитие противоопухолевых иммунных реакций в каждой пробе было выявлено после третьей вакцинации дендритными клетками. У больной в месте внутрикожного введения опухолевого антигена (24.05.2003) через 48 ч в день проведения 4-ой процедуры вакцинации (26.05.2003) было отмечено папулообразование, 5 диаметр папулы 6 мм.

В настоящее время, спустя 10 мес после операции: пациентка находится в удовлетворительном, полностью компенсированном состоянии, трудоспособна. Головные боли не беспокоят. Оценка по шкале Карновского - 100 баллов.

Таким образом, проверка предложенного подхода в клинических условиях позволяет 10 сделать вывод, что данный способ за счет использования сочетанной иммунотерапии, включающей курсы цитокинотерапии, локорегиональной адоптивной иммунотерапии ЛАК-клетками и цитотоксическими лимфоцитами, а также вакцинации дендритными клетками позволяет эффективно индуцировать специфический противоопухолевый иммунный ответ у пациентов со злокачественными опухолями головного мозга, что 15 сопровождается улучшением качества жизни больных и увеличением продолжительности безрецидивного периода.

#### Литература.

1. Лозовой В.П., Кожевников В.С. Методы оценки клеточных эффекторных функций гиперчувствительности замедленного типа//Методические рекомендации МЗ СССР. - 1990, 20 10 с.
2. Yu J.S., Wheeler C.J., Zeltzer P.M., et al. Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration.//Cancer Res. - 2001. - Vol. 61. - P. 842-847.

#### 25 Формула изобретения

1. Способ иммунотерапии злокачественных опухолей головного мозга, включающий локорегиональное введение аутологичных лимфокинактивированных киллерных клеток (ЛАКК) в комбинации с интерлейкином-2 (ИЛ-2) и цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ), стимулированных опухолевым антигеном в присутствии ИЛ-2, в ложе опухоли после ее 30 оперативного удаления, отличающийся тем, что после удаления опухоли проводят курс цитокинотерапии, включающий в себя 3 внутримышечные инъекции лейкинфераона в дозе 10 000 МЕ интерферона- $\alpha$  с интервалом 48 ч, затем курс адаптивной иммунотерапии ЛАКК, генерированными в присутствии рекомбинантного ИЛ-2 в дозе 50 ЕД/мл, которые вводят в ложе удаленной опухоли в комбинации с ИЛ-2 в дозе 250 000 ЕД, причем этот курс 35 включает две процедуры генерации и локорегионального введения ЛАКК с интервалом 24 ч, затем проводят курс адаптивной иммунотерапии ЦТЛ, генерированных путем 5-дневного культивирования мононуклеарных клеток периферической крови больного с дендритными клетками, нагруженными опухолевым антигеном, в присутствии рекомбинантного ИЛ-2 в дозе 50 ЕД/мл, и вводят в ложе удаленной опухоли в комбинации с ИЛ-2 в дозе 250 000 ЕД, в течение 40 72 ч с дозреванием дендритных клеток в присутствии кондиционной среды моноцитов в течение 24 ч и инкубацией дендритных клеток в присутствии антигенного материала опухоли 1 ч при 37°C для их нагрузки опухолевым антигеном, после завершения иммунотерапии ЦТЛ проводят курс вакцинации дендритными клетками, нагруженными опухолевым антигеном, в виде 4-6 подкожных инъекций в дозе 10·10<sup>6</sup>, введение с 45 интервалом 2 недели в сочетании с подкожными инъекциями ИЛ-2 в дозе 250 000 ЕД.
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что полученные дендритные клетки, нагруженные опухолевым антигеном, криоконсервируют в концентрации 20,0·10<sup>6</sup>/мл и хранят при -80°C до последующего использования для генерации ЦТЛ и проведения курса вакцинации.
3. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве антигенного материала для

нагрузки дендритных клеток используют лизат опухолевых клеток в концентрации по белку 0,1 мг/мл.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50