

Полиоксидоний® активировывает цитотоксический иммунный ответ посредством созревания дендритных клеток: клинические эффекты при раке молочной железы

Catherine Alexia^{1†}, Mailys Cren^{1†}, Pascale Louis-Plence^{1†}, Dang-Nghiem Vo^{1†}, Yasamine El Ahmadi¹, Emilie Dufourcq-Lopez², Zhao-Yang Lu¹, Javier Hernandez¹, Farkhad Shamilov³, Olga Chernysheva³, M. Vasilieva⁴, I. Vorotnikov³, Yana Vishnevskaya³, Nikolay Tupitsyn³, Jean-François Rossi^{5,6} and Martin Villalba^{1,2,7*}

¹Институт регенеративной медицины и биотерапии (IRMB), Университет Монпелье, Национальный институт здравоохранения и медицинских исследований (INSERM), Монпелье, Франция; ²Университетский госпитальный центр Монпелье (CHU Montpellier), Монпелье, Франция; ³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия; ⁴Воронежский областной клинический онкологический диспансер, Воронеж, Россия; ⁵Институт св. Екатерины (Institut Sainte Catherine), Авиньон, Франция; ⁶Университет Монпелье, Медицинское учебное и научно-исследовательское подразделение (UFR Medecine), Монпелье, Франция; ⁷Институт регенеративной медицины и биотерапии (IRMB), Университет Монпелье, Национальный институт здравоохранения и медицинских исследований (INSERM), Национальный научно-исследовательский центр (CNRS), Университетский госпитальный центр Монпелье (CHU Montpellier), Монпелье, Франция

СВОБОДНЫЙ ДОСТУП

Редактор:

Jose A. Garcia-Sanz, Испанский национальный исследовательский совет (CSIC), Испания

Утверждено:

Daniel Scott-Algara, Институт Пастера, Франция
Alan L. Epstein, Медицинская школа Кек при Университете Южной Калифорнии, США

Контактное лицо

для переписки:

Martin Villalba
martin.villalba@inserm.fr

[†]Эти авторы внесли одинаковый вклад в настоящую работу

Специальный раздел:

Настоящая статья была представлена в раздел «Противораковый иммунитет и иммунотерапия» журнала *Frontiers in Immunology*

Получена: 09 июля 2019 г.

Принята: 01 ноября 2019 г.

Опубликована: 28 ноября 2019 г.

Цитируемая работа:

Alexia C, Cren M, Louis-Plence P, Vo D-N, El Ahmadi Y, Dufourcq-Lopez E, Lu Z-Y, Hernandez J, Shamilov F, Chernysheva O, Vasilieva M, Vorotnikov I, Vishnevskaya Y, Tupitsyn N, Rossi J-F and Villalba M M. (2019) Полиоксидоний® активировывает цитотоксический иммунный ответ посредством созревания дендритных клеток: клинические эффекты при раке молочной железы *Front. Immunol.* 10:2693. doi: 10.3389/fimmu.2019.02693

Иммунотерапия, рассматриваемая как основной инструмент лечения рака, в некоторых случаях требует присутствия нескольких лекарственных веществ для максимизации воздействия. Адьюванты способны усиливать эффект других действующих веществ. Однако, несмотря на длительный период применения, в настоящее время зарегистрированы лишь несколько адьювантов, и они редко применяются в лечении рака. Азоксимера бромид (торговое наименование Полиоксидоний® (ПО)) представляет собой сополимер N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксо)-1,4-этиленпиперазиния бромид. Его описывают как иммуоадьювант и иммуномодулятор, применяемый в клинической практике и обладающий превосходной переносимостью. ПО применяется для лечения и профилактики заболеваний, связанных с нарушением функций иммунной системы, и существует интерес к его исследованиям в качестве противоопухолевого препарата. В настоящей работе нами показано, что лечение Полиоксидонием в течение 1 недели привело к положительным морфологическим изменениям у 6 из 20-и пациенток с раком молочной железы (РМЖ), включая полный ответ у пациентки с трижды негативным РМЖ. Это коррелировало с увеличением опухолевой инфильтрации CD4+ Т-лимфоцитами. Эффекты ПО на иммунную систему связаны с активацией миелоидных клеток, а о воздействии ПО на клеточные линии лимфоцитов, таких как естественные клетки-киллеры (НК-клетки) и Т-лимфоциты, известно мало. Мы выяснили, что ПО увеличивает пролиферацию Т-лимфоцитов *in vitro* без негативного воздействия на какой-либо активационный маркер. ПО не влияет на жизнеспособность дендритных клеток (ДК) и увеличивает экспансию незрелых ДК (нДК) и зрелых ДК (зДК) в концентрации 100 мкг/мл; он стимулирует экспрессию нескольких молекул, костимулирующих ДК, включая пролиферацию аллогенных Т-лимфоцитов. И наоборот, ПО снижает жизнеспособность ДК при добавлении на 5-й день после экспансии. ПО нетоксичен в отношении НК-клеток в дозах до 100 мкМ и не влияет на их активацию, созревание и цитотоксичность, но имеет тенденцию к увеличению деградации. Это можно выгодно использовать против клеток-мишеней, демонстрирующих низкую чувствительность к НК-клеткам, например, клеток солидных опухолей. Наконец, мы выявили высокую вариабельность ответа на ПО у разных доноров. В целом, результаты наших исследований *in vitro* показывают, что ПО увеличивает число костимулирующих молекул на ДК, которые участвуют в процессе прайминга Т-лимфоцитов, с более выраженным эффектом в отношении выработки эффекторных Т-лимфоцитов. Это может служить обоснованием будущих клинических исследований ПО в лечении рака.

Ключевые слова: Полиоксидоний, дендритные клетки, цитотоксические лимфоциты, рак молочной железы, алифатические полиамины, естественные клетки-киллеры, Т-лимфоциты

ВВЕДЕНИЕ

Иммунотерапию в настоящее время рассматривают как новый горизонт в лечении рака; в этой сфере был получен ряд впечатляющих успешных результатов (1). В некоторых случаях при иммунотерапии рака требуется нацеленность иммунного ответа на определенные антигены, и при этом обычно отсутствует эффективное стимулирование иммунной системы. В этом смысле адъюванты – активные вещества, модифицирующие эффект других действующих веществ, – усиливают иммунный ответ и в основном применяются в вакцинах (2), позволяя минимизировать необходимую дозу антигена. Несмотря на длительный период применения, в настоящее время зарегистрированы лишь несколько адъювантов для создания адаптивного иммунного ответа на вакцинацию, и они редко применяются в лечении рака (3).

Полиоксидоний (ПО) – физиологически активный препарат из нового класса гетероцепных алифатических полиаминов, привлекающих интерес клиницистов (4). С химической точки зрения ПО представляет собой сополимер N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбок-си)-1,4-этиленпиперазиния бромид, растворимый в воде и биоразлагаемый, с молекулярной массой 60-100 кДа (5). ПО зарегистрирован в России в качестве адъюванта вакцин, который стимулирует выработку антител (<http://retrovax.com/medication/catalog/polyoxydonium/>). Соплимерные цепи расщепляются и легко выводятся из организма (5), что объясняет низкую нефротоксичность данного препарата и благоприятный профиль безопасности, что продемонстрировало крупное пострегистрационное исследование в Словакии (6). Соответственно, ПО входящий наряду с антигенами в состав коммерческой вакцины против гриппа, также продемонстрировал высокую безопасность согласно анализу данных примерно 50 миллионов вакцинированных (5).

ПО связывается с моноцитами и нейтрофилами периферической крови человека и в меньшей степени с лимфоцитами (7). Он применяется в качестве иммуноадъюванта, в частности, в составе вакцин, и в качестве иммуномодулятора для лечения острых и хронических бактериальных, вирусных и грибковых инфекций (4). ПО обладает несколькими иммунологическими свойствами. Во-первых, он стимулирует выработку IL-6 (7). Во-вторых, он повышает бактерицидную активность лейкоцитов (8). В-третьих, ПО индуцирует выработку H₂O₂ и повышает способность нейтрофилов и макрофагов захватывать и перерабатывать различных возбудителей инфекций, включая бактерии, например, стафилококки, примерно на 40-60% (7, 8). Этим можно объяснить способность ПО повышать устойчивость к инфекциям.

Эффект ПО на компартменты лимфоцитов менее изучен, хотя его функции иммуномодулятора могут частично включать в себя улучшение презентации антигенов, результатом чего является эффективная выработка антител (4). Во-первых, ПО был ковалентно конъюгирован с антигенными компонентами противогриппозной вакцины – гемагглютинином и нейраминидазой (5). Данные примерно от 50 миллионов вакцинированных указывали на безопасность и эффективность вакцины (5). Во-вторых, ПО оценивали по сравнению с трехвалентной живой аттенуированной вакциной против кори, свинки и краснухи (9). Здоровым детям не требовался ПО для выработки высокого уровня специфических ан-

тител. И наоборот, у детей с аномальным количеством Т-лимфоцитов применение ПО приносило положительные результаты (9).

Исходя из превосходного профиля безопасности ПО, мы решили попробовать его применение у пациенток с РМЖ до хирургического вмешательства. Мы наблюдали положительный клинический исход у 30% пациенток, что коррелировало с увеличением опухолевой инфильтрации CD4+ Т-лимфоцитами. Эти результаты навели нас на мысль исследовать воздействие ПО *in vitro* для определения клеток-мишеней на трех различных линиях иммунных клеток, играющих важную роль в иммунологическом надзоре за возникновением опухолей, а именно дендритных клеток (ДК), Т-лимфоцитов и NK-клеток (10). Однако, мы выяснили, что некоторые свойства ПО как иммуномодулятора различались у разных доноров. Таким образом, существует реальная потребность в лучшем понимании воздействия ПО на иммунную систему для обоснования новых клинических исследований.

ПАЦИЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лекарственные препараты

ПО был предоставлен НПО «Петровакс» (Москва, Россия). Рекомбинантный человеческий интерлейкин-15 (rhIL-15) был получен от компании Miltenyi, a rhIL-2 – от компании PeproTech. Рекомбинантный человеческий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) и rhIL-4 были получены от компании R&D Systems, a LPS – от компании Sigma. Все другие препараты описаны ниже.

Пациентки с раком молочной железы

ПО зарегистрирован в России и других странах как иммуноадъювант. Пациентки получали лечение в хирургическом отделении Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина в Москве в соответствии с международными утвержденными руководствами по лечению и правилами, используемыми локальным комитетом по этике. Патоморфологи морфологически подтвердили присутствие рака путем окрашивания гематоксилином-эозином до начала лечения Полиоксидонием. Двадцать пациенток с гистологически подтвержденной аденокарциномой молочной железы без метастазов неоадъювантно получали ПО в дозе 12 мг внутримышечно в 1-й, 2-й, 3-й, 5-й и 7-й день. Стадию опухолевого процесса определяли с помощью системы TNM (11). В **таблице 1** указаны стадии опухолевого процесса у пациенток. Согласно данной классификации, T описывает размер исходной (первичной) опухоли и ее проникновение в ближайшие ткани; N описывает ближайшие (регионарные) лимфоузлы, вовлеченные в опухолевый процесс; M описывает отдаленные метастазы. Мы также проанализировали статус Her2/неу, рецепторы эстрогенов и прогестерона и пролиферативный индекс Ki-67. Хирургическое лечение проводилось на 8-й день. Патоморфологические образцы, взятые до и после операции, анализировали в соответствии со шкалой оценки патоморфоза, определяющей патоморфологические изменения, наблюдаемые в образцах, взятых до и после терапии, как описано выше (12, 13). Вкратце, патоморфоз 1 степени соответствует незначительным изменениям; 2 и 3 степени соответствуют незначительному или умеренному уменьшению опухолевого инфильтрата;

4 степень свидетельствует о полном исчезновении опухолевого инфильтрата. Нами также были изучены субпопуляции инфильтрирующих опухоль лейкоцитов; кроме того, мы проанализировали изменения в количестве лимфоцитов в крови и в аспиратах костного мозга в день 0 и на 8-й день у девяти пациенток. Суспензии клеток проанализировали на CD4/CD3/CD25/CD45 и CD8/CD3/CD56/CD45 методом проточной цитометрии с использованием программы FCS3 (Becton Dickinson, Bioline BD Biosciences, С.-Петербург, Россия).

Таблица 1 Клинические характеристики 20 пациенток с раком молочной железы, получавших ПО.	
Кол-во пациентов	20
Медиана возраста (диапазон)	53,5 лет (32-78)
TNM	
T1	1
T2	19
N0	6
N1	7
N2	7
N3	0
M0	20
Гистологический паттерн	
Инфильтративный протоковый рак	14
Инфильтративный дольковый	4
Тубулярный	1
Медуллярный	1

В таблице описаны стадии опухолевого процесса у пациенток; согласно классификации TNM, T описывает размер исходной (первичной) опухоли и ее распространение в прилегающие ткани; N описывает ближайшие (регионарные) лимфоузлы, вовлеченные в опухолевый процесс; M описывает отдаленные метастазы. Также представлены гистологический подтип и патоморфологический ответ.

Образцы крови здоровых доноров

Результаты были получены у трех доноров из французского центра переливания крови (Établissement Français du Sang; EFS). Нами были приготовлены по три биологических образца из каждой лейкоцитарной пленки для каждого из следующих экспериментов: определение концентрации ПО и типа клеток. В настоящей работе была использована пуповинная кровь (ПК) и опыт проф. Джона Де Воса, возглавляющего Коллекцию Центра биологических ресурсов (Biological Resource Center Collection) Университетской больницы Монпелье: <http://www.chu-montpellier.fr/en/platforms> (Идентификационный номер в BIOBANQUES: BB-0033-00031).

Исследование дендритных клеток (ДК) *in vitro*

Экспансия/дифференцировка/ созревание

После очистки раствором фиколла мононуклеарные клетки периферической крови (ПВМС) высевали в культуральной среде RPMI 1640 с добавлением 10% эмбрио-

нальной телячьей сыворотки, 100 Ед/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина и 1% глутамин (RP10), а через 2 часа неприлипшие клетки удалили. Прилипшие клетки использовали в качестве исходной популяции и культивировали в среде RP10 с добавлением rhGM-CSF (100 нг/мл) и rhIL-4 (25 нг/мл) в течение 7 дней.

ПО растворяли в воде и добавляли к клеткам, культивируемым в среде RP10, в нескольких конечных концентрациях (1, 10 или 100 мкг/мл). ПО добавляли со дня 0 до дня 7 (незрелые ДК, нДК D0). Мы добавили 1 мл свежей среды RP10, обогащенной GM-CSF и IL-4, на 2-й день. На 5-й день некоторые нДК (нДК D5) обрабатывали ПО в разных концентрациях (1, 10 и 100 мкг/мл) для изучения его воздействия на созревание нДК. В качестве положительного контроля мы использовали липополисахарид (LPS) (50 нг/мл) для индукции созревания ДК (зДК); нами также было изучено влияние ПО на LPS-индуцированное созревание. Эксперименты были выполнены в трёх независимых опытах; результаты представлены в виде среднего значения ± SEM (стандартная ошибка среднего значения). Экспрессию молекул клеточной поверхности анализировали после 7 дней культивирования. Окрашивание клеток выполняли с использованием флуоресцентных конъюгированных моноклональных антител. Следующие моноклональные антитела: анти-CD1a, конъюгированное с PE-CyTM5 (клон H1149), анти-CD83, конъюгированное с BV421 (клон HB15e), анти-CD80, конъюгированное с BV605 (клон L307.4); анти-CD14, конъюгированное с BV650 (клон M5E2); анти-CD40, конъюгированное с BV711 (клон 5C3); анти-CD86, конъюгированное с PE-CyTM7 (клон 2331); анти-CCR1, конъюгированное с Alexa Fluor[®]647 (клон 53504); и Fc-Block были получены от компании BD Biosciences. Анти-HLA-DR-антитело, конъюгированное с APC-Alexa Fluor^{®R} 750 (клон Immu-357), было закуплено у компании Beckman Coulter. Человеческое антитело, конъюгированное с CCR7 флуоресцеином (клон 150503), было закуплено у компании R&D Systems, a анти-CD1c-антитело, конъюгированное с фикоэритрином (PE) (клон AD5-8E7), было закуплено у компании Miltenyi Biotec. Образцы получали с помощью BD-LSR Fortessa (Becton Dickinson), и все данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Ашленд, шт. Орегон, США). нДК определяли по экспрессии CD1a и CD1c и потере экспрессии CD14, а созревание ДК мониторируют по экспрессии CD40, CD80, CD83 и CD86 в HLA-DR+ -клетках.

Экспансия/активация Т-лимфоцитов *in vitro*

Клетки обрабатывали Полиоксидонием в процессе выполнения всего протокола экспансии/активации. Использовали несколько концентраций ПО: 1, 10, 100 и 500 мкг/мл. После фиколла мы использовали набор EasySep[™] для позитивного отбора CD3 (StemCell Technologies) в соответствии с протоколом производителя. Очищенные CD3+ -клетки ресуспендировали в среде RPMI-Glutamax с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS). Клетки активировали человеческим активатором Т-лимфоцитов CD3/CD28 Dynabeads (Life Technologies) в соответствии с протоколом производителя. На 5-й день мы проанализировали пролиферацию Т-лимфоцитов и различные маркеры Т-лимфоцитов. Некоторые образцы обрабатывали смесью PMA (50 нг/мл)/Иономицин (1

мкг/мл). Внутриклеточное окрашивание выполняли добавлением BD GolgiPlug – ингибитора транспорта белков, содержащего Брефелдин А (BD Biosciences).

Экспрессию молекул клеточной поверхности анализировали после 7 дней культивирования. Окрашивание клеток выполняли с использованием флуоресцентных конъюгированных мышиных моноклональных антител. Следующие моноклональные антитела: анти-CD4, конъюгированное с V500 (клон L200); анти-CD25, конъюгированное с PerCP-Cy5.5 (клон MA251); анти-Foxp3, конъюгированное с V450 (клон 259D/C7); анти-CD127, конъюгированное с PE (клон HIL7RM21); анти-IFN- γ , конъюгированное с PE-Cy7 (клон B27); и анти-IL-17a, конъюгированное с PerCP-Cy5.5, были получены от компании BD Biosciences. Анти-CD4-антитело, конъюгированное с PB (клон 13B8.2), и анти-CD8-антитело, конъюгированное с APC (клон B9.11), были закуплены у компании Beckman Coulter. Окрашенные образцы анализировали с помощью проточного цитометра Gallios (Beckman Coulter) с использованием программного обеспечения Kaluza. Эксперимент выполняли в трех независимых опытах; результаты представлены в виде среднего значения \pm SEM (стандартная ошибка среднего значения).

Экспансия и активация человеческих NK-клеток

Это исследование выполняли, как описано выше (14). Вкратце, из доз донорской крови удаляли Т-лимфоциты с использованием набора EasySep™ для позитивного отбора CD3 (StemCell Technologies). Клетки культивировали в течение 20 дней вместе с γ -облученными PLH-клетками в соотношении 1:1 (NK-клетки: вспомогательные клетки (А-клетки)) в присутствии IL-2 (100 Ед/мл) и IL-15 (5 нг/мл). PLH-клетки добавляли каждые 4 дня, а свежие цитокины – через день. Мы не добавляли PLH в последние 4 дня; в конце процесса степень чистоты NK-клеток (CD56+/CD3-) всегда была выше 90%, и живых PLH-клеток не оставалось.

Для фенотипического анализа клетки окрашивали 7-AAD (Beckman Coulter) для определения жизнеспособных клеток и антител к поверхностным маркерам. Следующие антитела: анти-CD25, конъюгированное с FITC (клон B1.49.9); анти-CD45RO (клон UCHL1); анти-CD69, конъюгированное с PE (клон TP1.55.3); анти-CD62L (клон DREG56); анти-CD19 (клон J3-119); анти-CD3 (клон UCST1); анти-CD19, конъюгированное с ECD (клон J3-119); анти-CD16, конъюгированное с PacificBlue (клон 3G8); анти-CD57 (клон NC1); анти-CD45, конъюгированное с APC-AlexaFluor750 (клон J33); анти-CD45RA (клон 2H4LDH11LDB9); анти-CD45, конъюгированное с KromeOrange (клон J33); и анти-CD16 (клон3G8) были получены от компании Beckman Coulter. Следующие антитела: анти-CD158b, конъюгированное с FITC (клон CH-L); анти-CD158a, конъюгированное с PE (клон HP-3E4); и анти-CD107a, конъюгированное с V450 (клон H4A3), были предоставлены компанией BD Biosciences. Анти-CD56-антитело, конъюгированное с APC (клон REA196); анти-CD3-антитело (клон AC146); и анти-CD158e-антитело, конъюгированное с Vioblue (клон DX9), были закуплены у компании Miltenyi. Анти-CD56-антитело, конъюгированное с PECy7 (клон HCD56), было приобретено у компании BioLegend. Клетки в количестве 1×10^5 – 3×10^5 инкубировали в течение 20-30 мин. при температуре 4°C с различными антителами в фосфатно-солевом буферном

растворе (PBS), содержащем 2,5% фетальной бычьей сыворотки (FBS). Затем клетки промывали и суспендировали в 200-250 мкл той же среды. Окрашенные образцы анализировали с помощью проточного цитометра Gallios (Beckman Coulter) с использованием программного обеспечения Kaluza. Поток жизнеспособных лимфоцитов регулировали с использованием метода FSC/SSC (прямого/бокового рассеяния) и окрашивания 7AAD. В-клетки (CD19+), Т-лимфоциты (CD3+CD56-) и NK-клетки (CD56+CD3-) различали с помощью антител к CD19, CD3 и CD56, соответственно.

Клеточно-опосредованная цитотоксичность (NK-клетки)

Это исследование выполняли, как описано выше (14, 15). NK-клетки поместили 3 мкМ фиолетового красителя CellTracker™ Violet BMOQ Dye (Life Technologies) и инкубировали в течение ночи с клетками-мишенями при различных соотношениях Е:Т (эффektorные клетки : клетки-мишени). После этого перераспределение фосфатидилсерина (PS) и повреждения клеточной мембраны анализировали в популяции клеток-мишеней, в которых фиолетовый краситель не вызывал возбуждения флуоресценции, методом проточной цитометрии с использованием красителей Annexin V-FITC (Immunostep) и 7-AAD (BD Biosciences) или пропидия йодида (PI), как описано выше (16, 17). Мы считаем все клетки, положительно окрашенные Annexin-V и/или PI (или 7-ADD), мертвыми (или умирающими).

Анализ дегрануляции NK-клеток

Это исследование выполняли, как описано выше (15). Вкратце, целевые клетки в количестве 50×10^3 на лунку помещали в среду RPMI с добавлением 10% FBS, IL-2 100 Ед/мл с моненином (BD Biosciences) в 96-луночный планшет с V-образным дном. NK-клетки и клетки-мишени инкубировали в течение ночи при температуре 37°C в 5% CO₂; подсчет живых клеток осуществляли с помощью цитометра Muse (Millipore) с набором реагентов для подсчета клеток и оценки их жизнеспособности (Count and Assay Viability Kit). Для получения контрольных клеток NK-клетки инкубировали без клеток-мишеней. CD107a⁺ NK-клетки анализировали с помощью проточного цитометра Gallios (Beckman Coulter) с использованием красителей 7-AAD, CD45RO-FITC, CD19-PE, CD56-PECy7, CD3-APC, CD45RA-APCAlexaFluor750, CD16-KromeOrange и CD107a-HV500 (BD Biosciences). Результаты анализировали с использованием программного обеспечения Kaluza.

Статистический анализ

Обработку экспериментальных данных и статистический анализ выполняли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (v6.0). Все статистические данные представлены как * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; и **** $p < 0,0001$. Средние значения представлены как среднее значение плюс или минус стандартная ошибка среднего значения (SEM).

Результаты были получены у трех доноров из французского центра переливания крови (Établissement Français du Sang; EFS). Нами были приготовлены по три биологических образца из каждой лейкоцитарной пленки для каждого из следующих экспериментов: определение концентрации ПО и типа клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Воздействие ПО у пациенток с раком молочной железы

Нами была выбрана когорта из 20-и пациенток, средний возраст которых составлял 53,5 года (возрастной диапазон – 32-78 лет). Первая биопсия в день 0 показала, что все пациентки имели разные стадии по классификации TNM, и у большинства из них имел место инфильтративный протоковый рак (Таблица 1). Мы вводили пациенткам ПО внутримышечно в течение 1 недели и провели вторую биопсию на 8-й день. У шести пациенток были выявлены патоморфологические изменения после хирургического вмешательства по сравнению с оценкой до операции (Таблица 2).

Таблица 2 | Клинические характеристики пациенток с патоморфозом после лечения Полиоксидонием (вверху) и рецепторный статус и пролиферативные индексы их опухолей (внизу).

Номер пациентки	Стадия	T	N	Степень патоморфоза
1	IIb	2	1	4
2	IIIa	2	2	1
3	IIIa	2	1	1
4	IIb	2	0	2
5	I	1	0	1
6	IIIa	2	2	2

Номер пациентки	Рецепторы эстрогенов	Рецепторы прогестерона	Her2/neu	Ki-67
1	0	0	0	75
2	7	5	1	28
3	3	5	0	18
4	7	0	3	31
5	7	6	0	26
6	0	0	2	20

В таблице описаны стадии опухолевого процесса; согласно классификации TNM, T описывает размер исходной (первичной) опухоли и ее проникновение в ближайшую ткань; N описывает ближайшие (регионарные) лимфоузлы, вовлеченные в опухолевый процесс. Цифры в столбцах «Рецепторы эстрогенов» и «Рецепторы прогестерона» означают стандартный балльный показатель позитивности рецептора (в баллах). Her2/neu представлен как балльный показатель с количеством баллов от 0 (негативный) до 3 (позитивный). Ki-67 – пролиферативный индекс в процентах от числа положительно окрашенных клеток.

У пациенток, ответивших на лечение, различались показатели по классификации TNM, рецепторам эстрогенов и прогестерона, окрашиванию Her2/neu, а также различались пролиферативные индексы (Таблица 2). У одной пациентки был выявлен особо агрессивный трижды негативный фенотип, т.е. негативный по рецепторам эстрогенов, прогестерона и рецептору человеческого эпидермального фактора роста 2 типа (HER2), и высокий пролиферативный индекс, что было определено по высокому коэффициенту пролиферативной активности на основании результатов окрашивания Ki-67 (Рис. 1). Она получала лечение Полиоксидонием в течение 1 недели, после чего ей была проведена левосторонняя радикальная мастэктомия с сохранением грудных мышц.

Мы наблюдали патоморфоз 4 степени в послеоперационном материале (Рис. 2А, В). Это соответствует полному исчезновению опухолевого инфильтрата, что означает полный патоморфологический ответ. Мы также наблюдали воспалительный инфильтрат в ложе опухоли (Рис. 2С), состоящий из клеток, отвечающих за клеточно-опосредованный и гуморальный иммунитет, при почти эквивалентном соотношении Т-лимфоцитов и В-клеток (Рис. 2С). Макрофаги состояли из отдельных гистиоцитов, кластеризованных в виде гранулем, и демонстрировали появление гигантоклеточной реакции (Рис. 2С). Наконец, около 15-20% клеточного инфильтрата представляли собой гранулоциты, в основном нейтрофилы (данные не представлены). Таким образом, изменения, выявленные у данной пациентки после лечения Полиоксидонием, соответствовали активному хроническому воспалению с образованием гранулем.

Кроме того, незначительные изменения (1 степени) наблюдались у трех пациенток, а уменьшение опухолевого инфильтрата (2 степени) было отмечено у двух пациенток. Мы также получили суспензии клеток и изучили выборки инфильтрирующих опухоль лейкоцитов. Мы выявили значительные различия в популяции CD4⁺ в опухолевом инфильтрате между шестью пациентками с патоморфологическими изменениями и пациентками без патоморфологических изменений, соответственно, $50,91 \pm 2,05\%$ против $40,89 \pm 2,26\%$ ($P = 0,006$). Помимо того, соотношение CD8/CD4 составило $0,79 \pm 0,09$ против $1,17 \pm 0,13$ ($P = 0,03$). Мы также проанализировали попу-

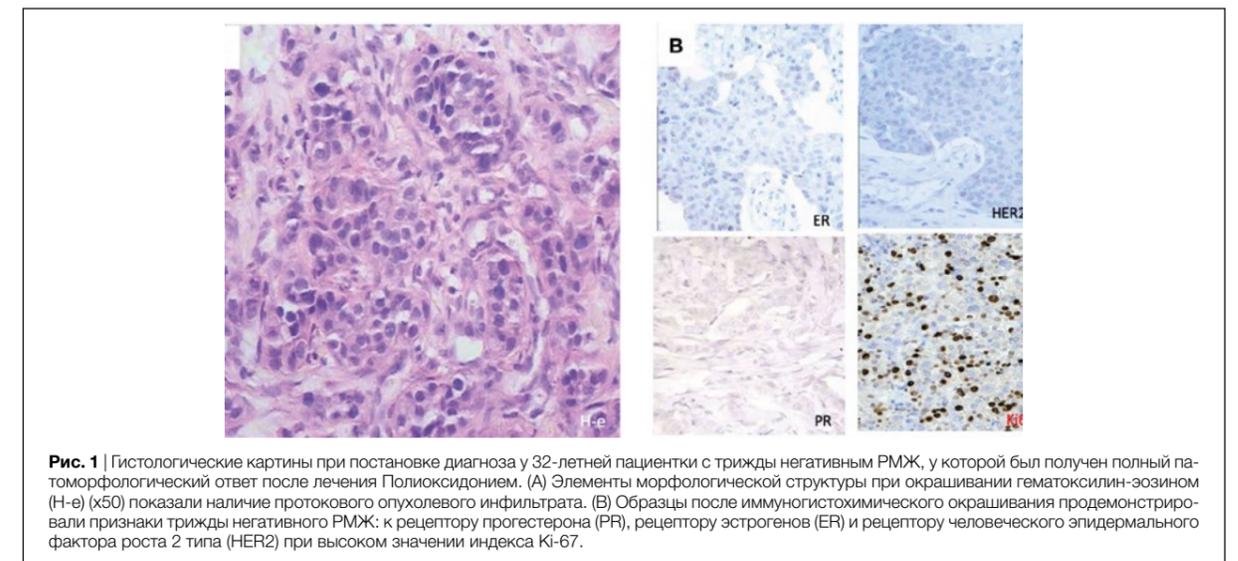


Рис. 1 | Гистологические картины при постановке диагноза у 32-летней пациентки с трижды негативным РМЖ, у которой был получен полный патоморфологический ответ после лечения Полиоксидонием. (А) Элементы морфологической структуры при окрашивании гематоксилин-эозином (H-E) (x50) показали наличие протокового опухолевого инфильтрата. (В) Образцы после иммуногистохимического окрашивания продемонстрировали признаки трижды негативного РМЖ: к рецептору прогестерона (PR), рецептору эстрогенов (ER) и рецептору человеческого эпидермального фактора роста 2 типа (HER2) при высоком значении индекса Ki-67.

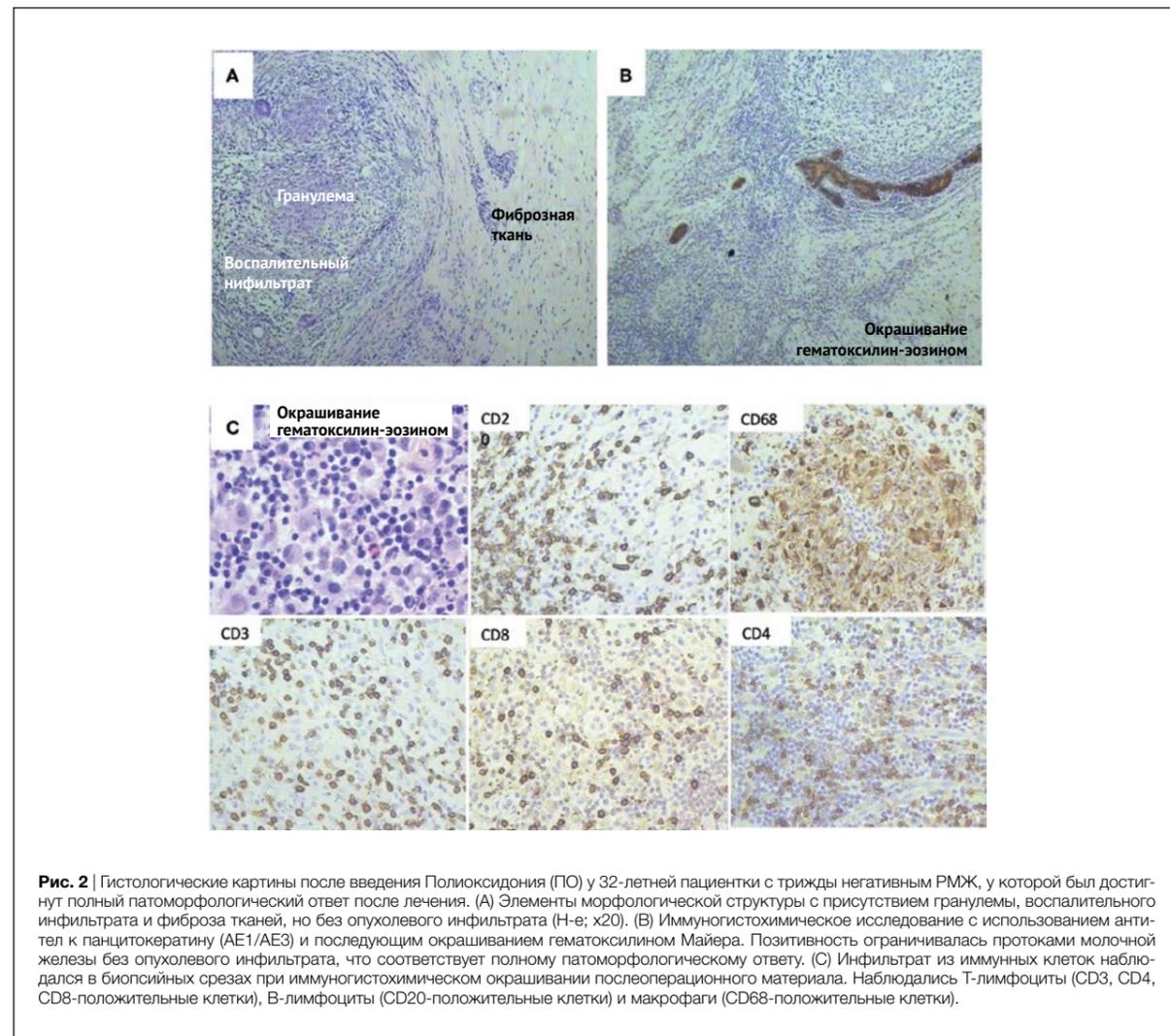


Рис. 2 | Гистологические картины после введения Полиоксидония (ПО) у 32-летней пациентки с трижды негативным РМЖ, у которой был достигнут полный патоморфологический ответ после лечения. (А) Элементы морфологической структуры с присутствием гранулемы, воспалительного инфильтрата и фиброза тканей, но без опухолевого инфильтрата (H-e; x20). (В) Иммуногистохимическое исследование с использованием анти-тел к панцитокератину (АЕ1/АЕ3) и последующим окрашиванием гематоксилином Майера. Позитивность ограничивалась протоками молочной железы без опухолевого инфильтрата, что соответствует полному патоморфологическому ответу. (С) Инфильтрат из иммунных клеток наблюдался в биопсийных срезах при иммуногистохимическом окрашивании послеоперационного материала. Наблюдались Т-лимфоциты (CD3, CD4, CD8-положительные клетки), В-лимфоциты (CD20-положительные клетки) и макрофаги (CD68-положительные клетки).

ляции CD4 и CD8 в крови и в аспиратах костного мозга у девяти наших пациенток в день 0 и день 8 после лечения Полиоксидонием и не нашли каких-либо существенных различий (данные не представлены).

Воздействие ПО на Т-лимфоциты

Предыдущие результаты касательно рекрутирования Т-лимфоцитов навели нас на мысль об исследовании прямого воздействия ПО на Т-лимфоциты. Мы провели стимуляцию очищенных Т-лимфоцитов, полученных от трех здоровых доноров (ЗД), анти-CD3/CD28 антителами. Этот протокол индуцировал эффективную активацию, определяемую по снижению количества CD127 и увеличению количества CD25 (Дополнительный рис. 1А) и снижению количества CD45RA (данные не представлены). Для частичной имитации относительно длительного применения Полиоксидония у пациенток с РМЖ мы провели стимуляцию Т-лимфоцитов и обработали их различными концентрациями ПО.

Количество Т-лимфоцитов статистически возросло к 5-му дню при концентрациях ПО 100 и 500 мкг/мл (Рис. 3). И наоборот, ПО не изменил ни процентное содержание CD4+ клеток, экспрессирующих CD127, CD25 и CD45, ни уровень их экспрессии (Дополнительный рис. 2). Подобным образом, ПО не оказывал влияния на активацию CD8+, за исключением того, что более вы-

сокие дозы ПО индуцировали снижение уровней CD25 (Дополнительный Рис. 3). Повторное стимулирование Т-лимфоцитов РМА/иономицином на 5-й день индуцировало выработку IFN γ в обоих компартментах Т-лимфоцитов. ПО не влияло на этот ответ (Дополнительный Рис. 3). Если резюмировать, то в экспериментах *in vitro* длительное лечение Полиоксидонием не оказывало токсического действия и, по сути, повышало пролиферацию Т-лимфоцитов без негативного воздействия на какой-либо из исследуемых маркеров активации.

Воздействие ПО на дендритные клетки (ДК)

ДК являются ключевыми регуляторами иммунного ответа, способными запускать процесс прайминга (активации) необученных дремлющих Т-лимфоцитов и инициировать первичный Т-клеточный иммунный ответ. Таким образом, воздействие ПО на Т-лимфоциты у пациенток с РМЖ может быть опосредовано модуляцией ДК. Мы обрабатывали прилипшие мононуклеары периферической крови (РВМС) гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (GM-CSF) и интерлейкином-4 (IL-4) в течение 5 дней для образования незрелых ДК (нДК) и стимулирования их созревания (зДК) дополнительной двухдневной инкубацией с липополисахаридом (LPS). Мы проанализировали воздействие ПО

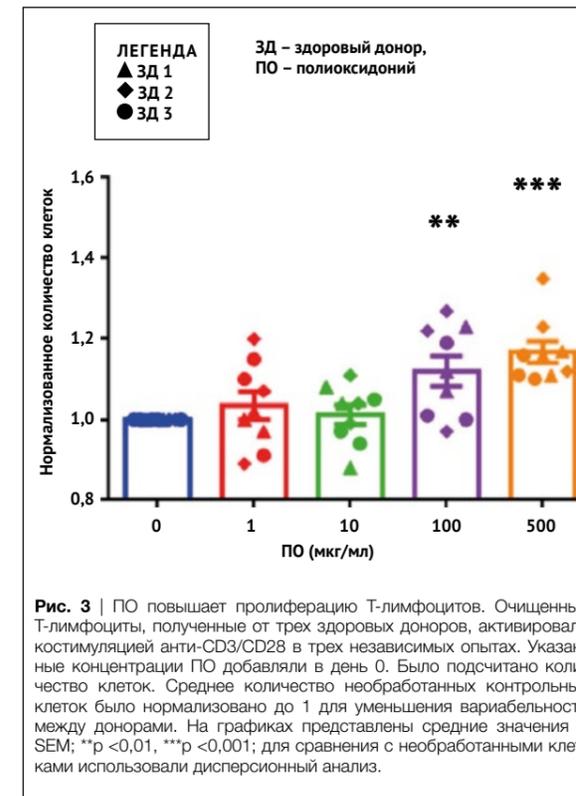


Рис. 3 | ПО повышает пролиферацию Т-лимфоцитов. Очищенные Т-лимфоциты, полученные от трех здоровых доноров, активировали стимуляцией анти-CD3/CD28 в трех независимых опытах. Указанные концентрации ПО добавляли в день 0. Было подсчитано количество клеток. Среднее количество необработанных контрольных клеток было нормализовано до 1 для уменьшения вариабельности между донорами. На графиках представлены средние значения \pm SEM; ** p < 0,01, *** p < 0,001; для сравнения с необработанными клетками использовали дисперсионный анализ.

на образование и созревание ДК по трем протоколам. Во-первых, мы добавляли ПО в нескольких концентрациях со дня 0 по день 7. Это свидетельствует о способности ПО влиять на образование/экспансию нДК. Во-вторых, мы обработали нДК Полиоксидонием на 5-й день (D5). Это позволило нам мониторировать способность ПО индуцировать созревание нДК *per se*, что в свою очередь указывало на способность ПО способствовать формированию гуморального и/или клеточно-опосредованного иммунного ответа. В-третьих, мы стимулировали созревание нДК инкубацией с LPS при этом обрабатывая клетки ПО в нескольких концентрациях. Это позволило изучить способность ПО влиять на LPS-индуцированное созревание ДК. нДК определяли по экспрессии CD1a и CD1c и потере экспрессии CD14. Созревание ДК мониторировали по экспрессии костимулирующих молекул CD40, CD80, CD83 и CD86 на HLA-DR+ клетках. Доля нДК, экспрессирующих костимулирующие молекулы CD80, CD86, CD40 и CD83, была относительно низкой и существенно возрастала в LPS-индуцированных зДК (Дополнительный Рис. 4).

ПО не влияло на жизнеспособность нДК и зДК и увеличивало образование нДК и зДК при добавлении в концентрации 100 мкг/мл в день 0 (Рис. 4). И наоборот, при добавлении на 5-й день в концентрациях 1 и 10 мкг/мл ПО незначительно снижал жизнеспособность ДК (у здорового добровольца 3) и, следовательно, их конечное число (Рис. 4). Мы наблюдали вариабельность у разных доноров, но ПО устойчиво демонстрировал хорошую переносимость с точки зрения жизнеспособности и экспансии ДК (Дополнительный Рис. 5). В совокупности эти результаты позволили предположить, что ПО может увеличивать экспансию зДК. Таким образом, в очагах воспаления, где происходит созревание ДК, ПО может содействовать выработке зДК.

Затем на 7-й день мы провели фенотипический анализ для оценки уровня экспрессии генов гистосовместимости человека (HLA) II класса и костимулирующих молекул CD40, CD80, CD83 и CD86 (Дополнительный рис. 4). Экспрессия этих поверхностных маркеров возрастает в процессе созревания ДК и может быть информативной в отношении иммуногенных свойств ПО. ПО не влияло на экспрессию какого-либо из этих маркеров в процессе образования нДК с точки зрения процента положительных клеток (Рис. 5А) или уровней экспрессии (Рис. 5В). Добавление 10 мкг/мл ПО на 5-й день увеличило долю нДК, экспрессирующих некоторые костимулирующие молекулы, у двух доноров из трех (Рис. 5А). Более того, эта же концентрация ПО привела к повышению уровней экспрессии некоторых костимулирующих молекул у этих пациенток (Рис. 5В). Это показывает, что ПО обладает иммуногенными свойствами. ПО не изменял LPS-индуцированную экспрессию костимулирующих молекул (Дополнительные Рис. 4, 6). На самом деле, LPS-индуцированное повышение уровней экспрессии уже было очень значительным, что дает основания предположить, что ПО не способен повысить их еще больше.

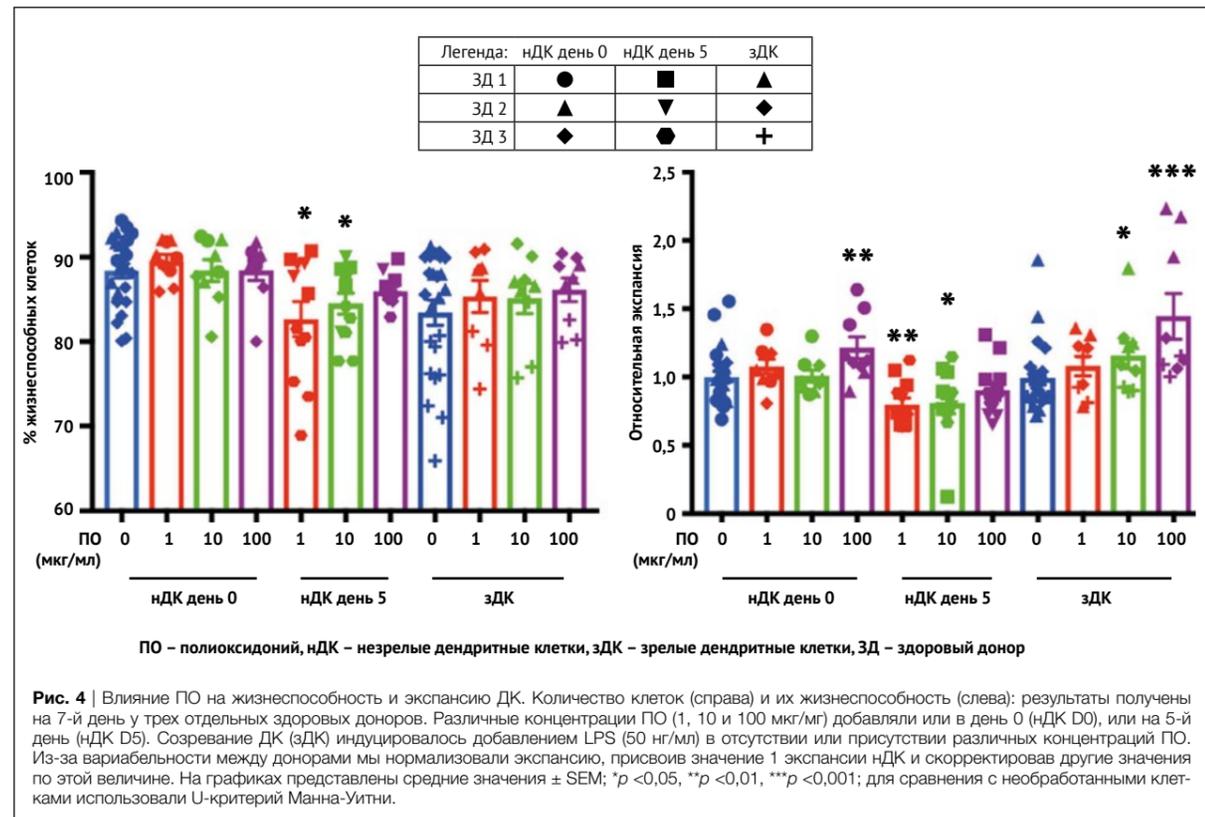
Наконец, для подтверждения индуцированного Полиоксидонием созревания ДК обработанные Полиоксидонием дендритные клетки сокультивировали с CFSE-меченными Т-лимфоцитами для оценки их способности индуцировать пролиферацию аллогенных CD4 и CD8 Т-лимфоцитов. В качестве контролей мы использовали незрелые и зрелые ДК. Прежде всего, важно отметить, что пролиферация как CD4, так и CD8 Т-лимфоцитов индуцировалась при всех условиях, исследованных в трех независимых биологических экспериментах для двух отдельных доноров.

Большие количества пролиферирующих Т-лимфоцитов наблюдались после инкубации с зДК у обоих доноров. Инкубация с нДК, обработанными Полиоксидонием, увеличивало пролиферацию аллогенных CD4 и CD8 Т-лимфоцитов по сравнению с контрольными нДК (Рис. 6). Несмотря на то, что эти результаты различались у разных доноров, они продемонстрировали высокую иммуногенность обработанных Полиоксидонием ДК и их потенциал в индуцировании пролиферации CD4 и CD8 Т-лимфоцитов.

Отметим в заключение, что ПО не влияет на дифференцировку ДК, но может способствовать их созреванию и экспрессии костимулирующих молекул, что приводит к высокой иммуногенности ДК, которая выражается в пролиферации Т-лимфоцитов. Однако, имеет место вариабельность, что позволяет предположить, что воздействие ПО может зависеть от иммунного статуса пациента/донора.

Воздействие ПО на НК-клетки

НК-клетки являются частью врожденной иммунной системы и обладают естественной цитотоксичностью. НК-клетки преимущественно атакуют клетки, у которых отсутствует МНС-I, включая трансформированные или инфицированные вирусом клетки со сниженной экспрессией МНС-I (главного комплекса генов гистосовместимости), чтобы не быть распознанными цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTL). Поэтому гипотеза «потери своего» предполагает, что НК-клетки отличаются от других здоровых «своих» клеток на основании экспрессии МНС-I. Однако, теперь ясно,



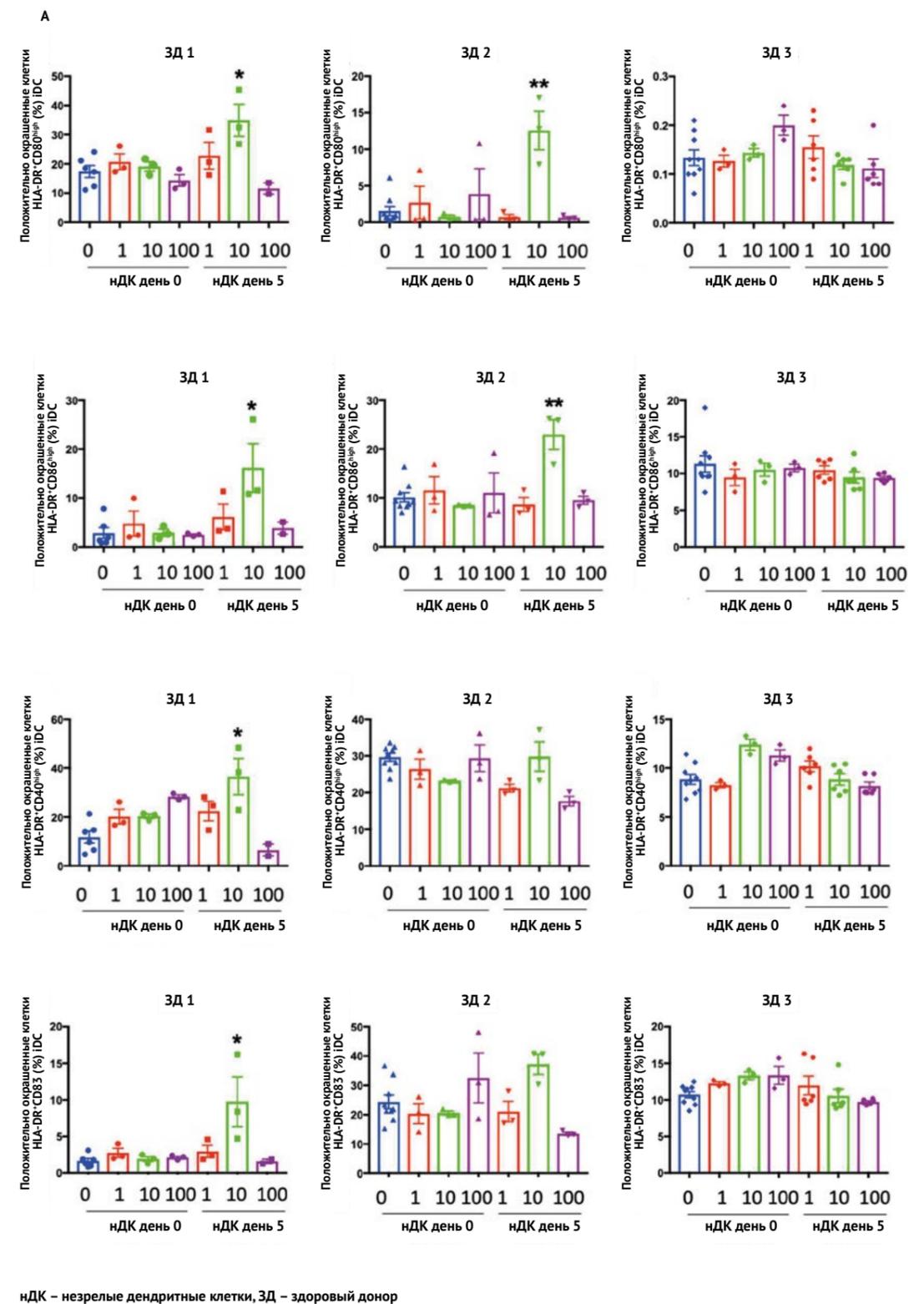
что активация NK-клеток зависит от сложного сигнального процесса, опосредованного активирующими и ингибирующими рецепторами. Исход зависит от силы различных активирующих и ингибирующих сигналов. Ингибирующие рецепторы в основном распознают молекулы MHC-I (HLA у человека), а активирующие рецепторы могут распознавать стрессовые лиганды в клетках-мишенях. Поэтому NK-клетки также уничтожают клетки, подвергшиеся стрессу, даже если они экспрессируют нормальные уровни MHC-I.

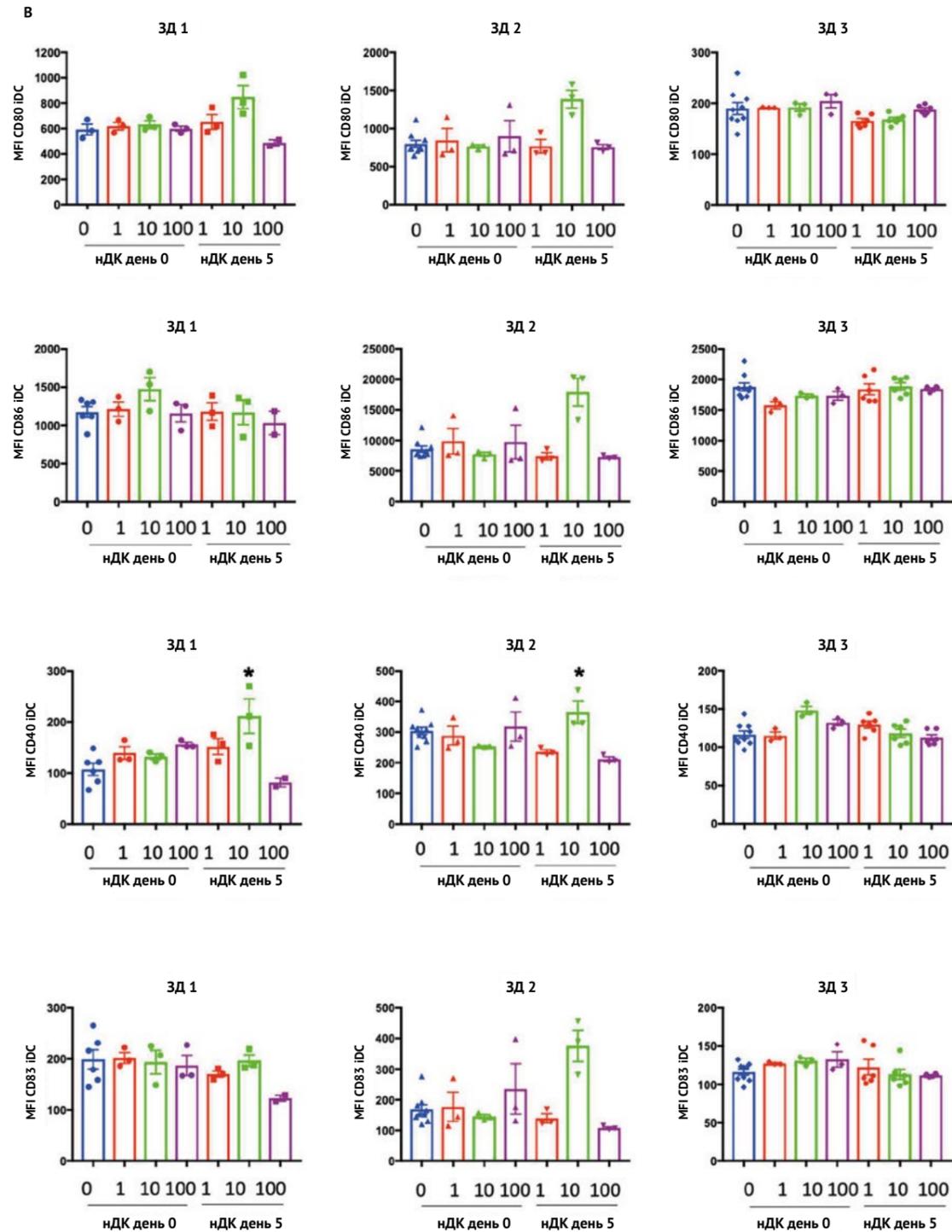
Поскольку NK-клетки обеспечивают защиту от рака (18, 19), мы проанализировали воздействие ПО на активацию и экспансию NK-клеток. РВМС-клетки со сниженным CD3⁺ инкубировали с различными концентрациями ПО, и количество клеток анализировали на 7-й, 14-й и 21-й дни. Мы наблюдали уменьшение количества клеток только при концентрациях 500 мкг/мл, но статистических различий эффекта при любых концентрациях выявлено не было (Дополнительный Рис. 7). На самом деле, исходные данные были весьма разнородными из-за различий в начальных количествах NK-клеток в пакетах крови и ответа на протокол активации/экспансии. Это было ожидаемо с учетом различий процентного содержания NK-клеток у здоровых людей (примерно 5-20%) и в ответах NK-клеток на различные стимулы (14). Для того чтобы обойти данную проблему, мы рассчитали среднее количество клеток для каждого донора и получили нормализованное значение. Мы использовали его для нормализации значений в обработанных Полиоксидонием клетках. Это показало, что ПО в концентрации 500 мкг/мл снижал пролиферацию NK-клеток (Рис. 7). И наоборот, более низкие концентрации не оказывали никакого воздействия. Таким образом, ПО не влияет на жизнеспособность и пролиферацию NK-клеток в концентрациях ниже 100 мкг/мл и вплоть до 21 дня стимуляции,

что дает основания предположить, что эти концентрации не должны негативно влиять на жизнеспособность и пролиферацию NK-клеток у пациентов. В данном контексте следует отметить, что NK-клетки периферической крови имеют короткий срок жизни, в среднем – 1 неделю (20), поэтому маловероятно, что большинство NK-клеток будут находиться в контакте с Полиоксидонием в течение более длительных периодов.

Далее мы исследовали воздействие ПО на три хорошо известных маркера активации NK-клеток – CD69, CD25 и рецептор трансферрина CD71 – на 21-й день после активации (Дополнительный Рис. 8А). Количество CD71 возрастает в клетках с быстрым метаболизмом. CD25 является высокоаффинным рецептором IL-2. CD69 представляет собой маркер ранней активации NK-клеток. Экспрессия всех этих маркеров увеличивалась после активации NK-клеток, и уровень их экспрессии был выше в NK-клетках с высокой противоопухолевой активностью (21, 22). Никакая концентрация ПО не влияла на процент NK-клеток, экспрессирующих CD69 и CD71, или уровни их экспрессии, определенные по интенсивности MFI. Мы наблюдали тенденцию к увеличению процента CD25-положительных клеток и более высоким уровням CD25 при концентрации ПО 10 мкг/мл. Однако в целом ПО не изменял экспрессию данных маркеров активации.

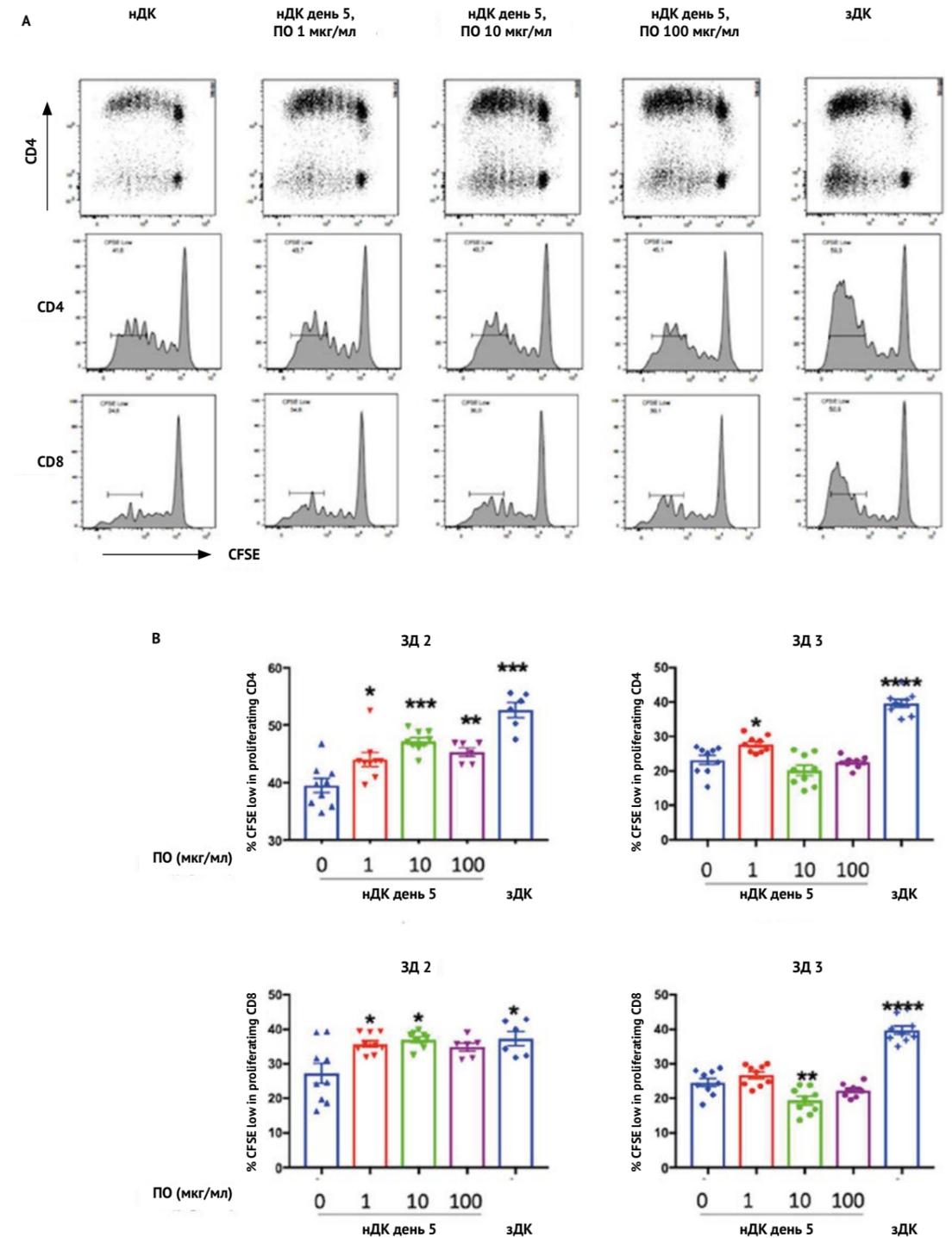
В процессе созревания NK-клеток клетки CD56^{bright} становятся клетками CD56^{dim}CD62L⁺CD57⁺, которые вырабатывают перфорин, поддерживая при этом высокий уровень выработки IFN- γ в ответ на цитокины (23, 24). Клетки CD56^{dim}CD62L⁺CD57⁺ тогда демонстрируют низкий уровень ответа на цитокины и более высокую цитотоксическую способность и считаются полностью зрелыми NK-клетками (23, 25). *In vitro* стимуляторы, действующие в течение периода до 20 дней, не индуцируют





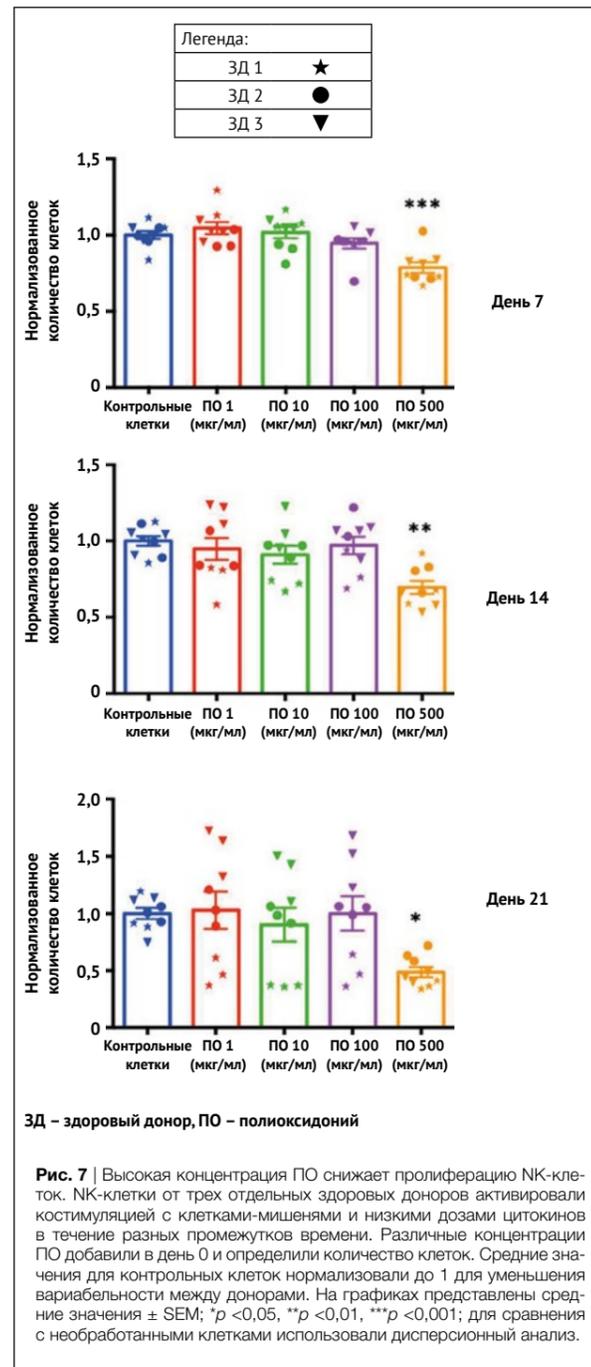
ндк – незрелые дендритные клетки, ЗД – здоровый донор

Рис. 5 | Влияние ПО на процент ДК, экспрессирующих маркеры созревания ДК. нДК были индуцированы, как описано в подписи под Рис. 4. (А) Процент ДК, экспрессирующих различные маркеры. (В) Были проанализированы уровни экспрессии (MFI) маркеров созревания ДК. На графиках представлены средние значения ± SEM для каждого отдельного здорового донора; биологические эксперименты были выполнены в трех независимых опытах. **p* < 0,05, ***p* < 0,01; для сравнения с необработанными клетками использовали U-критерий Манна-Уитни.



ндк – незрелые дендритные клетки, ЗД – здоровый донор, ПО – полиоксидоний

Рис. 6 | ПО повышал потенциал нДК к стимуляции реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR). нДК, обработанные на 5-й день различными концентрациями ПО (0, 1, 10, 100 мкг/мл), или ЗДК, как описано в подписи под Рис. 4, использовали для стимуляции CFSE-меченных аллогенных Т-лимфоцитов в соотношении ДК:Т-клетка 1:40. (А) Пролиферацию Т-лимфоцитов анализировали на 5-й день. Все условия тестировали, по крайней мере, в трех независимых опытах. На рисунке представлены репрезентативные точечные диаграммы (вверху) и гистограммы, изображающие пролиферацию CFSE-меченных аллогенных CD4⁺ (в середине) и CFSE-меченных CD8⁺ клеток (внизу). (В) Процент высокопролиферативных CD4 (вверху) и CD8-клеток (внизу). **p* < 0,05, ***p* < 0,01, ****p* < 0,001, *****p* < 0,0005; для сравнения с необработанными клетками использовали U-критерий Манна-Уитни.



CD57 (14). ПО в концентрациях 10-100 мкг/мл показал тенденцию к уменьшению экспрессии обоих маркеров (Дополнительный Рис. 8B). Наконец, полностью зрелые цитотоксические NK-клетки экспрессируют ингибирующие иммуноглобулин-подобные рецепторы киллерных клеток (KIR) и CD16 (26). На дополнительном Рис. 8B показан тренд к увеличению экспрессии KIR и отсутствие изменений CD16 в обработанных Полиоксидонием клетках (до 100 мкМ).

Цитотоксическая функция NK-клеток опосредована активирующими рецепторами, например, NKG2D, который распознает стрессовые лиганды в клетках-мишенях. Их активация индуцирует естественную цитотоксичность. Кроме того, NK-клетки распознают Fc-домены в опсонизированных моноклональными антителами мишенях с помощью FcγRIIIa (CD16a). Эта активация

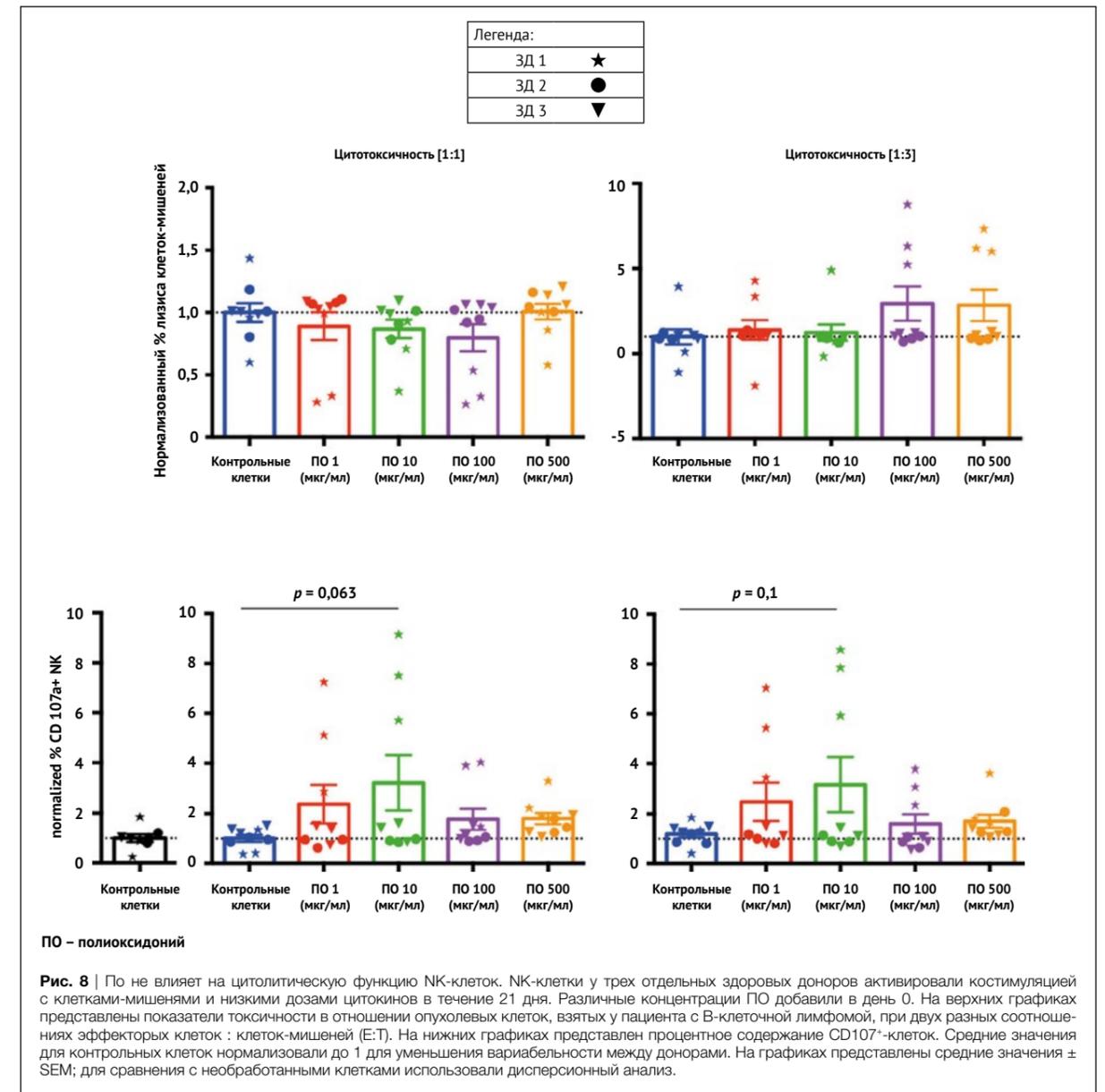
индуцирует антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗЦК). ПО в дозах ниже 500 мкМ не влиял на экспрессию этих эссенциальных рецепторов (Дополнительный Рис. 8B).

CD45 – это белок тирозинфосфатаза, экспрессируемый главным образом в лейкоцитах (27). Наибольшая изоформа, CD45RA, экспрессируется на необученных Т-лимфоцитах. Активированные Т-лимфоциты и Т-лимфоциты памяти экспрессируют наиболее короткую изоформу белка CD45, CD45RO, в которой отсутствуют экзоны RA, RB и RC. Эта наиболее короткая изоформа способствует активации Т-лимфоцитов. Экспрессия изоформ CD45 обеспечивает различные функциональные свойства NK-клеток (22). NK-клетки, коэкспрессирующие длинную изоформу (CD45RA) наряду с короткой (CD45RO), демонстрируют более высокую противоопухолевую активность у пациентов с гемобластомом (21). После стимуляции *in vitro* CD45RA+ представляют собой дремлющие клетки, CD45RO+ – активированные клетки, CD45RARO демонстрируют более высокую цитотоксичность, а CD45RA^{dim} представляют собой клетки в процессе активации. ПО существенным образом не изменял эти популяции, полученные *in vitro* (Дополнительный рис. 9), хотя наблюдалась тенденция к усилению экспрессии CD45RA и увеличению CD45RO, что может свидетельствовать о возросшей цитолитической активности (22).

Далее мы проанализировали воздействие ПО на NK-клеточно-опосредованную цитотоксическую функцию, исследовав естественную цитотоксичность и дегрануляцию. Мы использовали два соотношения эффекторных клеток – клеток-мишеней (E:T): 1:1 и 1:3. Поскольку более 50% NK-клеток экспрессируют KIR, мы использовали в качестве мишеней первичные клетки, экспрессирующие молекулы MHC-I, способные ингибировать KIR-экспрессирующие NK-клетки. Анализ исходных данных не выявил изменений какого-либо из этих параметров (Дополнительный Рис. 10). Фактически, имела место существенная разнородность данных, полученных у разных доноров. Таким образом, мы использовали такой же подход, как на Рис. 7, измерив среднюю цитотоксичность контрольных клеток для каждого донора и получив соответствующие нормализованные значения. Мы использовали их при расчете нормализованных значений для обработанных Полиоксидонием клеток. Мы не выявили каких-либо существенных изменений цитотоксичности (Рис. 8). После проведения анализа дегрануляции мы наблюдали тенденцию к усилению ответа при концентрации ПО 10 мкМ при обоих соотношениях E:T. Отметим в заключение, что ПО не влиял на цитотоксичность, хотя мог способствовать дегрануляции NK-клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ

Стимуляция противоопухолевой активности иммунной системы становится важным подходом к лечению. Прогресс в области онкологии, достигнутый в последнее время, дает основания предположить, что применение терапевтических молекул, стимулирующих иммунную систему для борьбы с инфекционными заболеваниями различной этиологии, является альтернативой традиционной химиотерапии (1, 4). Посторонние природные полиэлектролиты (белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты) и их структурные аналоги (полипептиды, по-



линуклеотиды) обладают свойствами антигенов и могут служить стимуляторами иммунной системы (5).

Преимущество синтетических полиэлектролитов (СПЭ) заключается в отсутствии иммуногенности, а N-оксидные группы ПО снижают естественную токсичность полиаминов. Это было проанализировано в разных клинических условиях (5, 6). Таким образом, ПО является явным кандидатом для исследования в терапии рака. Это было нашей первой целью, и результаты обнадеживают: 6 из 20-и пациенток ответили на лечение, в основном, путем рекрутирования CD4⁺-клеток к месту локализации опухоли. Однако, важно понимать механизм действия новых препаратов, а механизм действия ПО на лимфоциты практически неизвестен. Мы провели поисковое исследование, пытаясь определить молекулярную основу его клинического эффекта.

Хотя ПО преимущественно связывается с миелоидными клетками, он также связывается с лимфоцитами, хотя и с меньшей аффинностью (7). Поэтому мы изучили воздействие ПО *in vitro* на трех разновидностях им-

мунных клеток, участвующих в противоопухолевом иммунном ответе (10). Поскольку фармакология ПО была в основном неизвестна, мы использовали множество концентраций. Более того, поскольку мы не знали, в каких функциях ПО может участвовать, мы исследовали разные аспекты его действия, т.е. воздействие на процессы активации, созревания и пролиферации, для каждого типа анализируемых клеток, т.е. NK, Т-клеток и ДК.

Хотя мы проанализировали только трех ЗД, мы выяснили, что ПО обладает иммуногенностью, а также мы наблюдали значительную вариабельность: у одного ЗД наблюдался относительно сильный ответ, у второго – умеренный ответ, а третий в целом не ответил на лечение. Это имело сходство с нашими наблюдениями у пациенток с РМЖ, из которых около 30% ответили на лечение. Таким образом, хотя целью данного исследования не было определение доли пациенток, ответивших на лечение Полиоксидонием, по нашему мнению, полученные результаты показывают, что воздействие ПО зависит от конкретного пациента/донора. Такой относи-

тельно низкий процент отвечающих пациентов наблюдается при применении большинства иммунотерапевтических препаратов (28) и не препятствует использованию ПО с учетом его низкой токсичности. Новые препараты обычно терпят неудачу в клинических исследованиях из-за слабого эффекта и/или высокой токсичности (29). Доля пациентов, ответивших на лечение, варьируется в широком диапазоне. Это более заметно в иммунотерапии, поскольку клетки-мишени могут модулировать другие клетки или модулироваться другими клетками или окружением (28). Например, антитела, блокирующие взаимодействие PD-1/PD-L1, считаются одним из крупнейших достижений в лечении рака за последние 20 лет. Однако, данная терапия улучшает прогноз только у 50% пациентов, опухоли которых наилучшим образом отвечают на лечение. Для опухолей с низким уровнем ответа доля ответивших на лечение составляет менее 5%, даже если эти опухоли экспрессируют PD-L1 (28). Примечательно, что несмотря на механизм действия и прямой эффект ПО на лимфоциты, данный препарат едва ли токсичен для этих клеток в концентрациях до 100 мкг/мл или даже в концентрации 500 мкг/мл для Т-лимфоцитов. Это наблюдалось, даже если лимфоциты обрабатывались препаратом в течение нескольких недель. Более того, он не влияет на активацию лимфоцитов *in vitro*. Таким образом, полученные нами результаты *in vitro* и *in vivo* дают основание полагать, что ПО является безопасным препаратом.

Полученные нами результаты дают основание полагать, что ПО не оказывает «сильного» воздействия на исследованные нами типы клеток и механизмы. Это обычно наблюдается, когда адьюванты применяются сами по себе (30), и хотя эффекты ПО сильно не выражены, они непротиворечивы. Например, мы наблюдали эффективную активацию нескольких активационных маркеров ДК при определенных концентрациях ПО (Рис. 5), что коррелировало с оптимальной активацией аллогенных Т-лимфоцитов (Рис. 6). Таким образом, ДК явным образом активируются наиболее иммуногенными концентрациями ПО. Во-вторых, мы наблюдали, что ПО значительно усиливал экспансию Т-лимфоцитов *in vitro* при использовании двух наиболее высоких концентраций, тогда как экспансия другой клеточной линии лимфоцитов, т.е. НК-клеток, не изменялась или не уменьшалась. Примечательно, что это коррелировало с рекрутированием CD4+ Т-лимфоцитов к местам локализации опухолей у пациенток с РМЖ.

Воздействие ПО не зависело от дозы. Это заставило нас использовать множество концентраций препарата при разных условиях для выявления тех условий, при которых препарат демонстрирует иммуногенность. На самом деле, отсутствие дозозависимого эффекта не является необычным для иммунной системы, избыточно сильная активация которой может привести к ингибированию клеток. У лимфоцитов двухфазовый иммунный ответ зависит от фосфатазы CD45, дефосфорилирующей ингибирующие остатки Src-киназы, и приводит к экспансии и активации лимфоцитов. Однако, мощная активация CD45 ведет к дефосфорилированию Src-киназных активирующих остатков, что ингибирует активацию Т-лимфоцитов (31). Таким образом, избыточно сильные активационные сигналы могут приводить к нарушению активации лимфоцитов. Кроме того, необученные и активированные лимфоциты экспрессируют различ-

ные изоформы CD45, обладающие разной активностью (22, 32). Таким образом, необученные и активированные лимфоциты не одинаково отвечают на одни и те же стимулы.

Итак, выявленные нами в настоящей работе клетки-мишени ПО могут объяснить варибельность ответа на данный полиамин. Таким образом, хотя ПО продемонстрировал клинически значимый благоприятный эффект в нескольких ситуациях, в будущих работах необходимо четко определить, какие онкологические пациенты могут получить наибольшую пользу от применения Полиоксидония, чтобы повысить эффективность его применения в клинической практике.

Данная работа представляет собой первое исследование, демонстрирующее как клиническую, так и биологическую активность ПО в иммунотерапии рака. В контексте рассматриваемого материала весьма интересно то, что две пациентки, лучше всех ответившие на лечение ПО (был получен полный патоморфологический ответ и частичный ответ), страдали от трижды негативного рака молочной железы. Данный тип рака имеет плохой прогноз (33), и применение ПО может его улучшить.

ЗАЯВЛЕНИЕ О ДОСТУПНОСТИ ДАННЫХ

Все наборы данных, сгенерированных для настоящего исследования, включены в эту статью/Дополнительный материал.

ЗАЯВЛЕНИЕ ОБ ЭТИЧЕСКИХ ПРИНЦИПАХ

Исследования с участием людей были рассмотрены и одобрены Национальным медицинским исследовательским центром онкологии им. Н.Н. Блохина в Москве. Пациенты/участники представили письменное информированное согласие на участие в данном исследовании.

ВКЛАД АВТОРОВ

КА, МК, ПЛ-Р, Д-НВ, ЯЭ, ЭД-Л и Ж-ЯЛ выполняли эксперименты *in vitro*. ПЛ-Р, ХЭ, Ж-ФР и МВи определили дизайн экспериментов *in vitro* и подготовили рукопись. ФШ, ОЧ, МВа, ИВ, ЯВ и НТ выполнили клиническую часть, включая сбор образцов и анализ *ex vivo* образцов, взятых у пациенток с раком молочной железы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Финансовая поддержка проводимой работы частично осуществлялась на основании контракта между НПО «Петровакс» (Москва, Россия) и госучреждением «Национальный институт здравоохранения и медицинских исследований» (INSERM), Франция. НПО «Петровакс» не участвовало в разработке дизайна исследования, сборе анализе, интерпретации данных, написании настоящей статьи или принятии решения о ее представлении к публикации. Поддержка настоящей работы была также оказана в рамках программ PRT-K program 2018 (MVi; 2018-021) и Canceropole GSO Emergence (MVi; 2018/2019).

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МАТЕРИАЛ

Дополнительный материал к настоящей статье можно найти онлайн: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02693/full#supplementary-material>

ЛИТЕРАТУРА

- Kruger S, Ilmer M, Kobold S, Cadilha BL, Endres S, Ormanns S, et al. Advances in cancer immunotherapy 2019 – latest trends. *J Exp Clin Cancer Res.* (2019) 38:268. doi: 10.1186/s13046-019-1266-0
- De Gregorio E, Caproni E, Ulmer JB. Vaccine adjuvants: mode of action. *Front Immunol.* (2013) 4:214. doi: 10.3389/fimmu.2013.00214
- Bowen WS, Srivastava AK, Batra L, Barsoumian H, Shirwan H. Current challenges for cancer vaccine adjuvant development. *Exp Rev Vaccines.* (2018) 17:207-15. doi: 10.1080/14760584.2018.1434000
- Powell BS, Andrianov AK, Fusco PC. Polyionic vaccine adjuvants: another look at aluminum salts and polyelectrolytes. *Clin Exp Vaccine Res.* (2015) 4:23-45. doi: 10.7774/cevr.2015.4.1.23
- Kabanov VA. From synthetic polyelectrolytes to polymer-subunit vaccines. *Pure Appl Chem.* (2004) 76:1659-77. doi: 10.1351/pac200476091659
- Pruzinec P, Chirun N, Sveikata A. The safety profile of Polyoxidonium in daily practice: results from postauthorization safety study in Slovakia. *Immunotherapy.* (2018) 10:131-7. doi: 10.2217/imt-2017-0116
- Dyakonova VA, Dambaeva SV, Pinegin BV, Khaitov RM. Study of interaction between the polyoxidonium immunomodulator and the human immune system cells. *Int Immunopharmacol.* (2004) 4:1615-23. doi: 10.1016/j.intimp.2004.07.015
- Dambaeva SV, Mazurov DV, Golubeva NM, D'yakonova VA, Pinegin BV, Khaitov RM. Effect of polyoxidonium on the phagocytic activity of human peripheral blood leukocytes. *Russ J Immunol.* (2003) 8:53-60
- Toptygina A, Semikina E, Alioshkin V. Influence of an immunopotentiator Polyoxidonium on cytokine profile and antibody production in children vaccinated with Priorix. *Arch Physiol Biochem.* (2012) 118:197-203. doi: 10.3109/13813455.2012.659669
- Fessenden TB, Duong E, Spranger S. A team effort: natural killer cells on the first leg of the tumor immunity relay race. *J Immunother Cancer.* (2018) 6:67. doi: 10.1186/s40425-018-0380-4
- Webber C, Gospodarowicz M, Sobin LH, Wittekind C, Greene FL, Mason MD, et al. Improving the TNM classification: findings from a 10-year continuous literature review. *Int J Cancer.* (2014) 135:371-8. doi: 10.1002/ijc.28683
- Ermilova VD, Kuposova TL, Murav'eva NI, Kuz'mina ZV. [Degree of manifestation of therapeutic pathomorphosis and the nature of the change in the estrogen and progesterone receptors after the radiation and chemotherapy of breast cancer]. *Vopr Onkol.* (1985) 31:69-73
- Semenova NA, Dydikina IY, Dederer LY, Tikhomirov AG, Gorbunova VA, Laktionova KP, et al. The use of 1H-NMR spectroscopy for predicting the efficiency of neoadjuvant chemotherapy of breast cancer. *Bull Exp Biol Med.* (2000) 130:701-4. doi: 10.1007/BF02682110
- Sanchez-Martinez D, Allende-Vega N, Orecchioni S, Talarico G, Cornillon A, Vo DN, et al. Expansion of allogeneic NK cells with efficient antibody-dependent cell cytotoxicity against multiple tumor cells. *Theranostic.* (2018) 8:3856-69. doi: 10.7150/thno.25149
- Vo DN, Alexia C, Allende-Vega N, Morschhauser F, Houot R, Menard C, et al. NK cell activation and recovery of NK cell subsets in lymphoma patients after obinutuzumab and lenalidomide treatment. *Oncoimmunology.* (2018) 7:e1409322. doi: 10.1080/2162402X.2017.1409322
- Aguilo JI, Garaude J, Pardo J, Villalba M, Anel A. Protein kinase C- theta is required for NK cell activation and in vivo control of tumor progression. *J Immunol.* (2009) 182:1972-81. doi: 10.4049/jimmunol.08.01820
- Sanchez-Martinez D, Azaceta G, Muntasell A, Aguilo N, Nunez D, Galvez EM, et al. Human NK cells activated by EBV lymphoblastoid cells overcome anti-apoptotic mechanisms of drug resistance in haematological cancer cells. *Oncoimmunology.* (2015) 4:e991613. doi: 10.4161/2162402X.2014.9.91613
- Villalba M, Rathore MG, Lopez-Royuela N, Krzywinska E, Garaude J, Allende-Vega N. From tumor cell metabolism to tumor immune escape. *Int J Biochem Cell Biol.* (2013) 45:106-13. doi: 10.1016/j.biocel.2012.04.024
- Anel A, Aguilo JI, Catalan E, Garaude J, Rathore MG, Pardo J, et al. Protein kinase C-theta (PKC-theta) in natural killer cell function and anti-tumor immunity. *Front Immunol.* (2012) 3:187. doi: 10.3389/fimmu.2012.00187
- Strauss-Albee DM, Blish CA. Human NK cell diversity in viral infection: ramifications of ramification. *Front Immunol.* (2016) 7:66. doi: 10.3389/fimmu.2016.00066
- Krzywinska E, Allende-Vega N, Cornillon A, Vo DN, Cayrefourcq L, Panabieres C, et al. Identification of anti tumor cells carrying natural killer (NK) cell antigens in patients with hematological cancers. *EBioMedicine.* (2015) 2:1364-76. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.08.021
- Krzywinska E, Cornillon A, Allende-Vega N, Vo DN, Rene C, Lu ZY, et al. CD45 isoform profile identifies natural killer (NK) subsets with differential activity. *PLoS ONE.* (2016) 11:e0150434. doi: 10.1371/journal.pone.0150434
- Bryceson YT, Chiang SC, Darmanin S, Fauriat C, Schlums H, Theorell J, et al. Molecular mechanisms of natural killer cell activation. *J Innate Immun.* (2011) 3:216-26. doi: 10.1159/000325265
- Juelke K, Killig M, Luetke-Eversloh M, Parente E, Gruen J, Morandi B, et al. CD62L expression identifies a unique subset of polyfunctional CD56dim NK cells. *Blood.* (2010) 116:1299-307. doi: 10.1182/blood-2009-11-253286
- Lopez-Verges S, Milush JM, Pandey S, York VA, Arakawa-Hoyt J, Pircher H, et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood.* (2010) 116:3865-74. doi: 10.1182/blood-2010-04-282301
- Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural killer cells: development, maturation, and clinical utilization. *Front Immunol.* (2018) 9:1869. doi: 10.3389/fimmu.2018.01869
- Kaplan R, Morse B, Huebner K, Croce C, Howk R, Ravera M, et al. Cloning of three human tyrosine phosphatases reveals a multigene family of receptor-linked protein-tyrosine-phosphatases expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1990) 87:7000-4. doi: 10.1073/pnas.87.18.7000
- Chen Q, Li T, Yue W. Drug response to PD-1/PD-L1 blockade: based on biomarkers. *OncoTargets Ther.* (2018) 11:4673-83. doi: 10.2147/OTT.S168313
- Fogel DB. Factors associated with clinical trials that fail and opportunities for improving the likelihood of success: a review. *Contemp Clin Trials Commun.* (2018) 11:156-64. doi: 10.1016/j.conctc.2018.08.001
- Carter D, Reed SG. Role of adjuvants in modeling the immune response. *Curr Opin HIV AIDS.* (2010) 5:409-13. doi: 10.1097/COH.0b013e32833d2cd8
- Rhee I, Veillette A. Protein tyrosine phosphatases in lymphocyte activation and autoimmunity. *Nat Immunol.* (2012) 13:439-47. doi: 10.1038/ni.2246
- Mustelin T, Vang T, Bottini N. Protein tyrosine phosphatases and the immune response. *Nat Rev Immunol.* (2005) 5:43-57. doi: 10.1038/nri1530
- Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* (2008) 26:1275-81. doi: 10.1200/JCO.2007.14.4147

Конфликт интересов: Авторы заявляют, что исследование проводилось в отсутствие каких-либо коммерческих или финансовых отношений, которые могли бы подразумевать потенциальный конфликт интересов.

Copyright © 2019 Alexia, Cren, Louis-Pence, Vo, El Ahmadi, Dufourcq-Lopez, Lu, Hernandez, Shamilov, Chernysheva, Vasilieva, Vorotnikov, Vishnevskay, Tupitsyn, Rossi and Villalba. Это – общедоступная статья, распространяемая в соответствии с условиями лицензии Creative Commons «С указанием авторства» (Creative Commons Attribution License (CC BY)). Использование, распространение или воспроизводство на других форумах разрешено со ссылкой на первого(ых) автора(ов) и владельца/ владельцев авторских прав и при упоминании оригинальной публикации в данном журнале в соответствии с принятой научной практикой. Использование, распространение или воспроизводство без соблюдения данных условий запрещено.

