

НЕХАЕВА

Татьяна Леонидовна

**ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ПОЛУЧЕНИЯ
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ АУТОЛОГИЧНЫХ ДЕНДРИТНЫХ
КЛЕТОК**

**специальность – 14.01.12 – онкология
– 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология**

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

**Санкт-Петербург
2014 г.**

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении
«Научно-исследовательском институте онкологии им. Н.Н. Петрова» Министерства
здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела терапевтической онкологии
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России

Балдуева Ирина Александровна

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник отделения биотерапии опухолей ФГБУ
«Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН

Михайлова Ирина Николаевна

Доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией общей иммунологии отдела
иммунологии ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины»
Северо-западного отделения РАМН

Назаров Петр Григорьевич

Ведущая организация: ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения
Российской Федерации

Защита состоится « 24 » _____ июня _____ 2014 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного
совета Д 208.052.01 при ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России по адресу:
197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68; тел.: (812) 4399554

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ онкологии
им. Н.Н.Петрова» Минздрава России по адресу: 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул.
Ленинградская, 68 и на сайте <http://www.niioncologii.ru/sites/default/files/files/20142104221008.pdf>
Автореферат разослан « ____ » _____ 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета:
доктор медицинских наук

Бахидзе Елена Вилльевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Поиск новых возможностей лечения больных с распространенным опухолевым процессом является актуальной задачей современной онкологии. Высокий уровень смертности, недостаточная эффективность лекарственного лечения, прорыв в понимании молекулярно-генетических и иммунобиологических механизмов развития рака, становятся основополагающими факторами развития фундаментальной и клинической онкологии (Давыдов М.И., Аксель Е.М., 2009).

На современном этапе развития науки не представляет сомнений факт участия дендритных клеток (ДК) в «высокопрофессиональной» презентации низкоиммуногенных опухолеассоциированных антигенов (ОАА) (Михайлова И.Н. и соавт., 2007; Murphy J.F., 2010; Morel P.A., Turner M.S., 2010). ДК являются объектом широкого круга исследований, основная цель которых – создание клеточных вакцин, способных корректировать иммунный ответ у больных со злокачественными новообразованиями (Барышников А.Ю. и соавт., 2009; Кадагидзе З.Г. и соавт., 2011; Ridgway D., 2003; Mackiewicz J., Mackiewicz A., 2009; Palucka K. et al., 2010; Castiello L. et al., 2011; Tuyaeerts S., 2011). Разработка отечественных инновационных вакцин на основе аутологичных ДК (ДК-вакцина), обладающих эффективностью, безопасностью и надлежащим уровнем качества, отвечают задачам стратегической импортзамещающей программы Правительства РФ. Получение вакцинных ДК из миелоидных предшественников *in vitro* с использованием различных питательных сред, ростовых факторов и факторов дифференцировки различной активности, выбор которых для каждой лекарственной формы ДК (зрелые, незрелые) основан на оценке иммунобиологических и технологических характеристик, изучении их влияния на эффективность, безопасность и стабильность лекарственной формы, в ряде случаев препятствует получению стандартного клеточного продукта (Балдуева И.А., 2008; Toh H.C. et al., 2009; Koido S. et al., 2011; Ning J. et al., 2011).

Обеспечение качества отечественных аутологичных ДК-вакцин предполагает стандартизацию и контроль на основе использования рекомендованных методик, а также испытаний, отвечающих требованиям гармонизации и унификации. Сочетание новых мощных инструментов иммуномониторирования с усовершенствованием протоколов ДК вакцинации и рационально выстроенные фундаментальные научные исследования обеспечат больше доверия к противоопухолевой вакцинотерапии и откроют новые возможности лечения онкологических больных (Демидов Л.В., Харкевич Г.Ю., 2003).

Цель исследования - внедрение в клиническую практику стандартизированных методов получения вакцин на основе аутологичных костномозговых и периферических ДК для лечения больных меланомой кожи.

Задачи исследования

1. Апробировать и оптимизировать получение миелоидных предшественников ДК из лейкоферезного материала и периферической крови.
2. Стандартизировать условия дифференцировки, нагрузки и активации аутологичных ДК на основе изучения иммунофенотипа незрелых и зрелых ДК и уровня экспрессии раково-тестикулярных антигенов (РТА) на опухолевых клеточных линиях, используемых для специфического созревания ДК.
3. Оценить стабильность иммунобиологических характеристик стандартизированных ДК-вакцин на основе незрелых костномозговых и зрелых периферических ДК в процессе криоконсервации и хранения.
4. Изучить иммунологическую и клиническую эффективность стандартизированных ДК-вакцин.

Научная новизна. В диссертационной работе впервые:

- стандартизованы методы получения ДК-вакцин на основе аутологичных костномозговых и периферических предшественников;
- проведена оценка поствакцинального клеточного и гуморального иммунного ответа у больных диссеминированной меланомой кожи;
- разработана оригинальная методика активной специфической иммунотерапии «Способ иммунотерапии костномозговыми предшественниками дендритных клеток, сенсibilизированных фотомодифицированными опухолевыми клетками *in vivo*, больных диссеминированными солидными опухолями» (**Патент на изобретение №237603**, приоритет изобретения 17.04.2008 г., дата выдачи патента — 20.12.2009 г.).

Научно-практическая значимость

- Обоснована целесообразность использования стандартизированных ДК-вакцин для лечения больных меланомой кожи.
- Снижена себестоимость получения ДК-вакцин в 5 раз за счет оптимизированного использования ростовых факторов GM-CSF и IL-4 как импортного, так и отечественного производства.
- Адаптированы, оптимизированы и внедрены в клиничко-лабораторную практику ELISpot-анализ и клеточный ИФА.
- Описаны стандартные операционные процедуры (СОП) для всех этапов получения ДК-вакцин.
- Внедрены в клиническую практику стандартизированные методы получения вакцин на основе аутологичных ДК (**Медицинская технология ФС№2010/390 26.10.2010**

«Иммунотерапия костномозговыми предшественниками дендритных клеток, сенсibilизированных фотомодифицированными опухолевыми клетками *in vivo*, больных с диссеминированными солидными опухолями»).

Основные положения, выносимые на защиту

1. В результате оптимизации процесса дифференцировки ДК *in vitro* установлено: применение ростового фактора GM-CSF (72 нг/мл) отечественного производства (Фармсинтез, Россия) и GM-CSF (72 нг/мл) импортного производства (CellGenix, Германия) обеспечивает получение сопоставимых результатов и приводит к снижению стоимости ДК-вакцин в 5 раз.
2. Оптимальная концентрация IL-4 для дифференцировки ДК находится в пределах от 5 до 20 нг/мл, что снижает стоимость производства ДК-вакцин в 3-5 раз.
3. Для получения стандартизированных ДК-вакцин рекомендуется использовать оптимизированную панель моноклональных антител: CD14, CD1a, CD83, CD86, CD80, CCR7, HLA DR, метод проточной цитометрии или иммуноцитохимическое окрашивание, что позволит корректно определить степень зрелости ДК.
4. Критерием контроля качества вакцинных ДК является: жизнеспособность, иммунофенотип незрелых и зрелых опухолеспецифических ДК, высокая функциональная активность, отсутствие в вакцине ксеногенной сыворотки и инфекционных агентов на всех этапах дифференцировки, криоконсервации, размораживания и готовой лекарственной формы аутологичной ДК-вакцины.

Апробация материалов диссертации. Основные результаты работы обсуждены на научной конференции отделения химиотерапии и инновационных технологий ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России совместно с кафедрой клинической лабораторной диагностики Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова (2010). Результаты работы были представлены на конкурсе молодых ученых «У.М.Н.И.К.» (Санкт-Петербург, 2010), X Всероссийской научной конференции с международным участием (Москва, 2011), IV Всероссийском научном Форуме с международным участием им. акад. В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2011), научном обществе онкологов Санкт-Петербурга и Ленинградской области (2012), конференции «Петровские чтения» (Санкт-Петербург, 2012), конференции «Дендритные клетки и их роль в норме и патологии» в рамках Объединенного иммунологического форума (Нижний Новгород, 2013), VIII Всероссийском съезде онкологов (Санкт-Петербург, 2013), 8 Съезде по меланоме (Гамбург, Германия, 2013), ASCO (Чикаго, США, 2012, 2013), ежегодном собрании Французского общества иммунологов (Париж, Франция, 2013).

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, обзора литературы, 6 глав собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, списка литературы и 7

приложений. Текст изложен на 173 страницах машинописного текста, содержит 28 таблиц и 37 рисунков. Список литературы включает 21 источник отечественных и 164 источника зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Работа выполнена в ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Исследование проводилось в период с 2008 по 2013 г. В соответствии с задачами исследования работа была разделена на 2 части: лабораторная и клиническая.

В исследование включено 42 больных меланомой кожи (9 больных меланомой кожи III стадии и 33 больных – IV стадии). Объектами исследования согласно этапам получения ДК-вакцин (рис. 1) были образцы биологического материала: 1) мононуклеары (МНК) периферической крови (146 образцов); 2) МНК лейкоферезного материала (18 образцов); 3) незрелые костномозговые ДК (134 образца); 4) незрелые ДК периферической крови (125 образцов); 5) образцы аутологичной опухоли; 6) аллогенные клеточные линии меланомы кожи человека, Mel 226, Mel 515, Mel 519, Mel 520, полученные в лаборатории клеточных технологий НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова, депонированные во Всероссийской Коллекции клеточных культур позвоночных (НИИ цитологии РАН); 6) зрелые вакцинные ДК (226 образцов); 7) сыворотка и плазма периферической крови (96 образцов). Образцы МНК периферической крови доноров - контрольная группа (36 образцов).

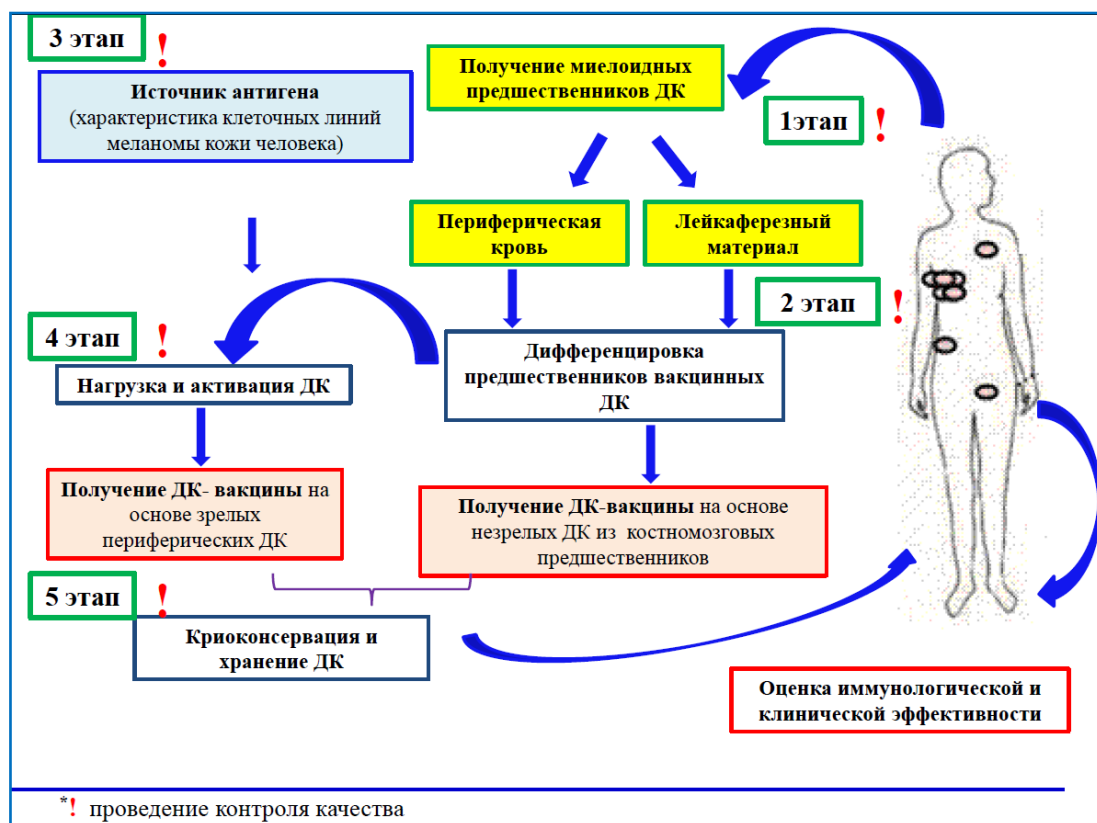


Рис. 1. Схема получения вакцин на основе дендритных клеток.

Работу с ДК человека проводили в условиях стерильного модуля («Air Lock», США) с жестким режимом, использованием потолочных воздушных фильтров HEPA/ULPA (ультравысокая очистка), обладающих эффективностью 99,9995% по частицам размером 0,12 микрон. Рабочее место оснащено ламинарно-поточным шкафом с вертикальным потоком воздуха, для создания в рабочей зоне стерильной среды (II класс биологической защиты).

Технология получения ДК-вакцин состоит из 5 основных этапов:

- 1) получение костномозговых или периферических предшественников ДК;
- 2) дифференцировка ДК из миелоидных предшественников *in vitro*;
- 3) приготовление РТА⁺ содержащего опухолевого лизата;
- 4) нагрузка и активация незрелых ДК лизатом РТА⁺;
- 5) криоконсервация и хранение вакцинных ДК.

Получение костномозговых и периферических предшественников ДК заключалось в использовании двух способов:

- 1) лейкоферез костномозговых предшественников периферической крови с помощью аппарата CobeSpectra (гемопоэтические стволовые клетки, ранние предшественники миеломоноцитопоэза, дендропоэза, моноциты);
- 2) венопункция венозной крови.

Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли стандартным методом (Woum A., 1968) с использованием «Ficoll-Paque Premium» «GE Healthcare» (Великобритания).

Дифференцировку МНК в незрелые ДК проводили в бессывороточной среде «CellGro DC», питательных средах RPMI-1640 с добавлением ксеногенной или АВ сыворотки человека, ростовых факторов и факторов дифференцировки GM-CSF импортного и отечественного производства (72 нг/мл), при различных концентрациях IL-4 (от 0 до 45 нг/мл).

Методика приготовления стандартизированной вакцины на основе незрелых костномозговых предшественников ДК

Дифференцировку МНК в незрелые ДК проводили в сбалансированной бессывороточной среде «CellGro DC», произведенной в условиях GMP и рекомендованной для культивирования ДК человека. Ростовые факторы и факторы дифференцировки – GM-CSF (72 нг/мл) и IL-4 (20 нг/мл) вносили на 1-й и 3-й день культивирования. На 5-й день культивирования ДК собирали пастеровской пипеткой, незначительную часть прикрепившихся клеток снимали скрепером, отмывали двукратным центрифугированием в 10 мл 0,9% изотонического раствора NaCl, содержащего альбумин человека (конечная концентрация 2%), при 1000 об/мин в течение 10 мин. Производили подсчет, оценку жизнеспособности, определяли иммунофенотип, уровень дифференцировки.

Методика приготовления стандартизированной вакцины на основе аутологичных ДК, нагруженных PTA⁺ опухолевым лизатом

Дифференцировку ДК из адгезионной моноцитарной фракции (CD14⁺) периферической крови больных злокачественными новообразованиями проводили в сбалансированной бессывороточной среде «Cell-Gro DC». Ростовые факторы и факторы дифференцировки – GM-CSF (72 нг/мл) и IL-4 (20 нг/мл) (CellGenix, Германия) вносили на 1-й, 3-й и 5-й дни культивирования.

Нагрузка и активация незрелых ДК лизатом PTA⁺. На 7-й день вносили коктейль лизированных охарактеризованных аутологичных и/или аллогенных опухолевых клеток (клеточные линии Mel 226, Mel 515, Mel 519, Mel 520), экспрессирующих иммуногенные PTA⁺ (NY-ESO-1⁺, MAGE⁺, HAGE⁺, GAGE⁺) в соотношении 1 ДК и 3 лизированные опухолевые клетки, ростовые факторы: GM-SCF (72 нг/мл), IL-4 (20 нг/мл) и TNF-α (20 нг/мл) в ранее изученных концентрациях. Через 48 ч ДК собирали, осаждали центрифугированием, отмывали в 10 мл 0,9% раствора хлорида натрия, содержащего 10% альбумина человека, производили подсчет, оценку жизнеспособности, определяли иммунофенотип, уровень дифференцировки и функциональную активность.

Приготовление опухолевого лизата, содержащего PTA. Клеточные линии Mel 226, Mel 515, Mel 519, Mel 520, экспрессирующие PTA, смешивали в равных пропорциях и проводили 6 последовательных циклов моментального замораживания/оттаивания в фосфатно-солевом буфере (качество лизиса клеток контролировали с помощью 0,1% трипанового синего и светового микроскопа), центрифугировали и фильтровали надосадочную фракцию через фильтр 0,2 мкм (Millipore, США). PTA⁺, содержащий опухолевый лизат, помещали в криопробирки и хранили при -20°C до использования (Балдуева И.А., 2008).

Криоконсервацию миелоидных предшественников и вакцинных ДК проводили с помощью программного замораживателя «Computer Freezer «Ice-Cube 14S» (Австрия). Для этого клетки помещали в бессывороточную криосреду (Биолот, Россия) и индивидуально маркированные криопробирки. Далее клетки переносили в индивидуальные контейнеры с жидким азотом (-196°C) и хранили в криобанке до использования.

Размораживание миелоидных предшественников и вакцинных ДК. Криопробирку с ДК помещали на 3 мин в водяную баню +42°C, далее ex tempore переносили в стерильную 15-мл пробирку и разбавляли не менее чем десятикратным избытком 0,9% изотонического раствора NaCl, содержащего альбумин человека (конечная концентрация 2%). Отмывали ДК двукратным центрифугированием (1000 об/мин в течение 10 мин) в 10 мл 0,9% изотонического раствора NaCl, производили подсчет и оценку жизнеспособности.

Имунофенотипирование костномозговых и периферических незрелых и зрелых ДК проводили двумя методами:

- 1) иммуноцитохимического окрашивания по Oliver C., Jamur M.C. (2010).
- 2) проточной цитометрии BD FACSCalibur (BD Bioscience).

Использовали немеченные моноклональные антитела к дифференцировочным и линейно-специфическим антигенам: моноциты (CD14), незрелые ДК (CD1a), зрелые ДК (CD83), маркеры активации (CD80 и CD86), хемокиновый рецептор (CCR7), белки антигенов гистосовместимости II класса (HLA DR) и моноклональные антитела, меченные флуорохромами: CD83-PE-Cy5, CD1a-PE, CD80-FITC, CD86-FITC, CD14-FITC, CCR7-FITC, CD209-FITC, HLA-DR PerCP-Cy5.5; изотипический контроль (BD Biosciences, США) и программное обеспечение CellQuest Pro (tm).

Клиническую и иммунологическую оценку эффективности и безопасности двух видов ДК-вакцин (ДКВ* и ФДК) провели у 42 больных с гистологически верифицированным диагнозом меланомы кожи после подписания ими информированного согласия. ДКВ получили 28 больных (13 мужчин и 15 женщин в возрасте от 24 до 74 лет), ФДК – 14 пациентов (11 мужчин и 3 женщины в возрасте от 25 до 64 лет).**

Для отбора больных использовали общепринятые в клинической практике критерии включения и исключения. Точкой отсчета наблюдения за больными принималась дата хирургического лечения. Объективную оценку клинического эффекта (стандартные клинические, лабораторные, рентгенологические и ультразвуковые) исследования проводили после каждого четного цикла вакцинотерапии. Больные получили от 2 до 12 циклов лечения. Пациенты были включены произвольным образом в когорты, получавшие один из изучаемых методов терапии. Для оценки клинической эффективности вакцинотерапии использовали критерии RECIST v1.1. Оценка нежелательных явлений (НЯ) проводилась по шкале токсичности СТС АЕ v.3.

Мониторинг специфического поствакцинального иммунного ответа изучали двумя методами:

- 1) ELISpot анализ;
- 2) клеточный иммуоферментный анализ (клеточный ИФА).

ELISpot анализ – исследование функциональной активности антиген-специфических клонов цитотоксических Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN- γ (интерферон-гамма) и гранзим Б. Использовали стандартные IFN- γ ELISpot тест-системы BD Biosciences (США), R&D Systems (Великобритания) и Millipore Corporation (США). Визуализацию результатов проводили с помощью автоматизированной системы ELISpot компании Carl Zeiss (Балдуева И.А., 2010; Нехаева Т.Л., 2010).

*ДКВ - вакцина на основе зрелых периферических ДК.
**ФДК - вакцина на основе незрелых костномозговых ДК с фотодинамической терапией.

Клеточный ИФА – определение титра опухолеспецифических иммуноглобулинов класса G (IgG). В качестве антигена использовали аллогенные клеточные линии меланомы кожи Mel 226, Mel 519, Mel 520, Mel 515 и аутологичные опухолевые клетки. Регистрацию реакции антиген-антитело проводили при длине волны 450 нм на фотометре «Multiskan EX» (Thermo Electron Corporation, США).

Полученные данные обрабатывали методами описательной статистики, корреляционного и регрессионного анализа. Для определения достоверности различий использовали критерии Стьюдента, Фишера и Вилкоксона, показатели выживаемости больных оценивали по методу Каплан-Мейера. Обработку результатов проводили с помощью прикладных статистических программ Statgraphics Plus и SPSS for Windows.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Стандартизация методов получения и криоконсервации миелоидных предшественников ДК из лейкофerezного материала и периферической крови

Для получения ДК из моноцитов необходимо их предварительное прикрепление к твердому субстрату. Международные протоколы получения ДК из миелоидных предшественников методом адгезии на пластике не учитывают потерю неадгезированных моноцитов, что свидетельствует о недостаточно полном знании различий в субпопуляциях миелоидных предшественников, дифференцированных в вакцинные ДК *in vitro*.

В связи с этим нами изучено выделение концентрированного количества МНК в градиенте плотности Ficoll-Paque Premium и адгезия на пластике. В исследование включено 18 образцов лейкофerezного материала и 17 образцов МНК периферической крови больных меланомой кожи, и 9 образцов периферической крови здоровых лиц (доноры). Оценку качества материала проводили на гематологическом анализаторе крови «SysmexXT-2000i» (Sysmex, Япония), с помощью светового микроскопа «AxioImager.M1» (CarlZeiss, Германия) и проточного цитофлюориметра «FACSCalibur» с использованием специфических МкАт к CD45, CD14, CD34, CD33, CD13, HLA-DR, CD3, CD19 и изотипического контроля с учетом количества МНК в каждой пробе.

Анализ иммунофенотипа миелоидных предшественников ДК по уровню экспрессии CD34, CD33, CD14, CD11c, HLA-DR антигенов у больных меланомой кожи выявил различия в адгезионных свойствах и изменение субпопуляционного состава предшественников на фоне криоконсервации и криоконцентрации на градиенте плотности Ficoll-Paque ($p < 0,05$).

Потеря неадгезионной фракции миелоидных предшественников ДК (%) составила $46,82 \pm 13,52$ в образцах онкологических больных по сравнению с $29,78 \pm 9,24$ в группе здоровых лиц (доноры), $p = 0,36$, что свидетельствует о возможности использования периферической крови онкологических больных для дифференцировки ДК *in vitro*.

При сравнительном анализе экспрессии дифференцировочных антигенов на CD14⁺ моноцитах после криоконсервации и криоконцентрации статистически значимые изменения не были обнаружены ($p>0,05$), что демонстрирует нецелесообразность концентрации моноцитов для повышения качества клеточного субпродукта после криоконцентрации.

2. Оптимизация и стандартизация условий дифференцировки вакцинных ДК

Многочисленные экспериментальные исследования свидетельствуют, что незрелые CD1a⁺CD83⁻ ДК периферической крови человека слабоиммуногенные и могут вызывать толерантность к антигенному стимулу (Kadowaki N. et al., 2000; Jin Y., et al., 2007).

В противоположность этому, зрелые CD1a⁻CD83⁺ ДК вызывают образование опухолеспецифических Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN- γ (Shevach E.M., 2004; Aerts-Toegaert C. et al., 2007). Таким образом, степень зрелости становится ключевой характеристикой ДК при получении ДК-вакцин. В этой связи важным является определение факторов, способствующих созреванию различных субпопуляций ДК.

В настоящей работе был проведен сравнительный анализ экспрессии иммунофенотипических маркеров зрелых ДК, дифференцированных в присутствии фиксированной концентрации ростового фактора GM-CSF¹ импортного производства (контроль) и GM-CSF² отечественного производства (опыт) в концентрации 72 нг/мл в сочетании с IL-4 (45 нг/мл).

Таблица 1. Иммунофенотип зрелых ДК, дифференцированных в присутствии GM-CSF импортного (контроль) и отечественного (опыт) производства

Дифференцировочные/ линейноспецифические антигены	GM-CSF ¹ (контроль) (%) M \pm m, δ (n=16)	GM-CSF ² (опыт) (%) M \pm m, δ (n=20)	Критерий Фишера (F) уровень значимости (p) достоверность различий
CD14 ⁺	6,12 \pm 2,34; 5,17	2,02 \pm 0,91; 3,18	F=3,91 p=0,07 (>0,05)
CD1a ⁺	20,08 \pm 9,13; 23,01	24,03 \pm 9,11; 26,22	F=0,07 p=0,79 (>0,05)
CD83 ⁺	66,14 \pm 4,21; 10,12	82,15 \pm 6,07; 18,34	F=3,85 p=0,07 (>0,05)
CD1a ⁺ CD83 ⁻	13,23 \pm 6,16; 15,32	13,11 \pm 5,01; 15,12	F=0,001 p=0,97 (>0,05)
CD1a ⁺ CD83 ⁺	8,12 \pm 4,21; 11,15	10,12 \pm 4,06; 13,10	F=0,08 p=0,78 (>0,05)
CD1a ⁻ CD83 ⁺	59,41 \pm 7,26; 17,16	72,22 \pm 9,12; 27,15	F=1,10 p=0,31 (>0,05)
CD83 ⁺ CD86 ⁺	51,24 \pm 6,12; 15,16	47,05 \pm 7,11; 21,14	F=0,11 p=0,74 (>0,05)
CD83 ⁺ CD80 ⁺	65,25 \pm 4,12; 9,06	78,23 \pm 5,07; 15,10	F=3,63 p=0,08 (>0,05)
CCR7 ⁺	82,56 \pm 11,31; 28,31	83,23 \pm 8,02; 24,14	F=0,01 p=0,94 (>0,05)

CCR7 ⁺ CD83 ⁺	64,14±7,16; 13,05	76,16±9,13; 23,43	F=0,74 p=0,41 (>0,05)
HLA DR ⁺	91,31±5,33; 12,14	93,03±2,11; 6,23	F=0,17 p=0,68 (>0,05)

Примечание: М – среднее значение экспрессии антигенов, m – ошибка среднего значения, δ – стандартное отклонение; концентрация GM-CSF (72 нг/мл), ИЛ-4 (45 нг/мл).

Результаты этого анализа, представленные в табл. 1, демонстрируют отсутствие статистически значимых различий ($p > 0,05$), что свидетельствует о сопоставимой активности ростовых факторов GM-CSF импортного и отечественного производства.

С целью снижения стоимости ДК вакцин и рационального использования ИЛ-4, произведенного в условиях GMP (CellGenix, Германия), было изучено его влияние на экспрессию CD1a⁺, CD209⁺, CD40⁺, HLA-DR⁺, CD86⁺, CD80⁺ антигенов на незрелых и зрелых ДК. Эффективность ИЛ-4 оценивали в диапазоне концентраций от 0 (контрольный образец) до 45 нг/мл.

Для анализа экспрессии изучаемых маркеров на незрелых ДК были получены полиномиальные модели 2-го порядка на основе однофакторного регрессионного анализа, которые позволили установить, что для дифференцировки ДК *in vitro* оптимальная концентрация ИЛ-4 находится в интервале от 5 до 20 нг/мл (рис. 2 А и Б). Дальнейшее увеличение концентрации не приводило к значимому повышению уровня экспрессии данных маркеров. Полученные данные позволили уменьшить расход ИЛ-4 импортного производства от 3 до 5 раз.

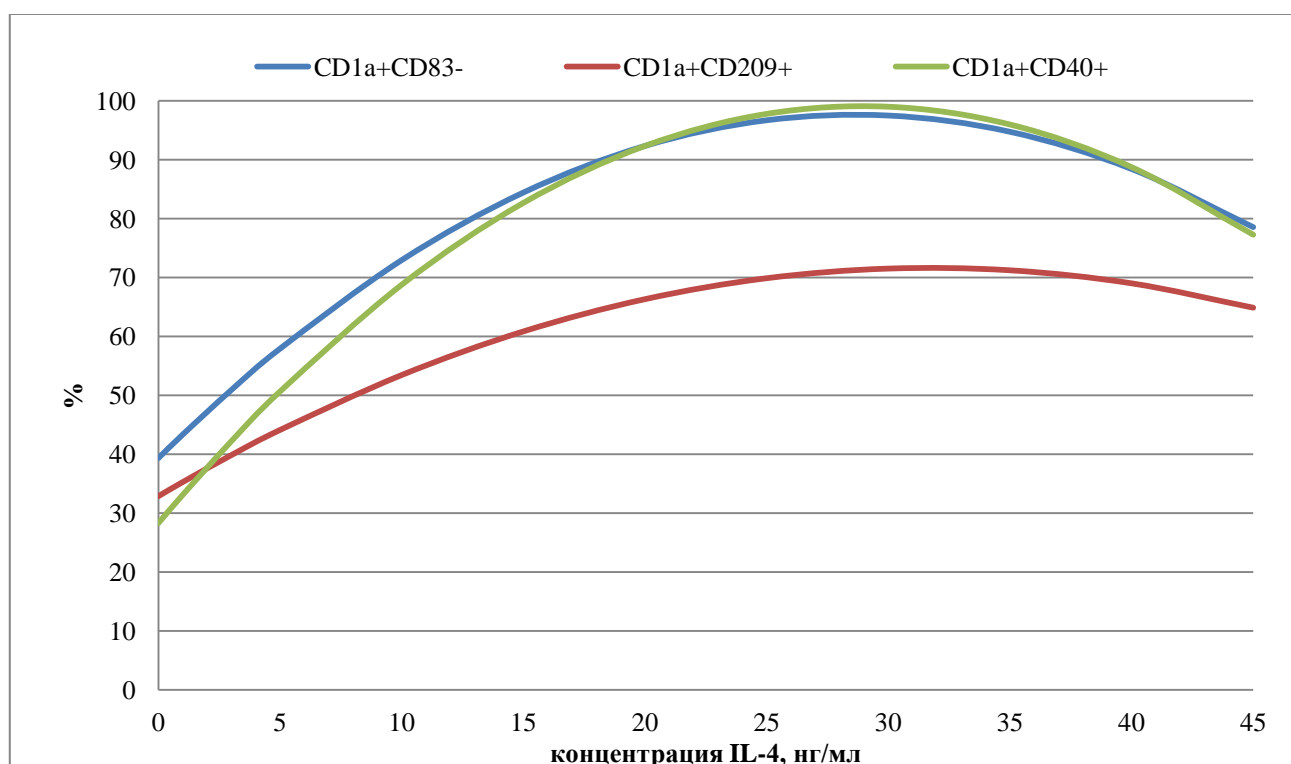


Рис. 2 А. Экспрессия CD1a, CD83, CD209 и CD40 антигенов на незрелых ДК в диапазоне концентрации ИЛ-4 от 0 до 45 нг/мл.

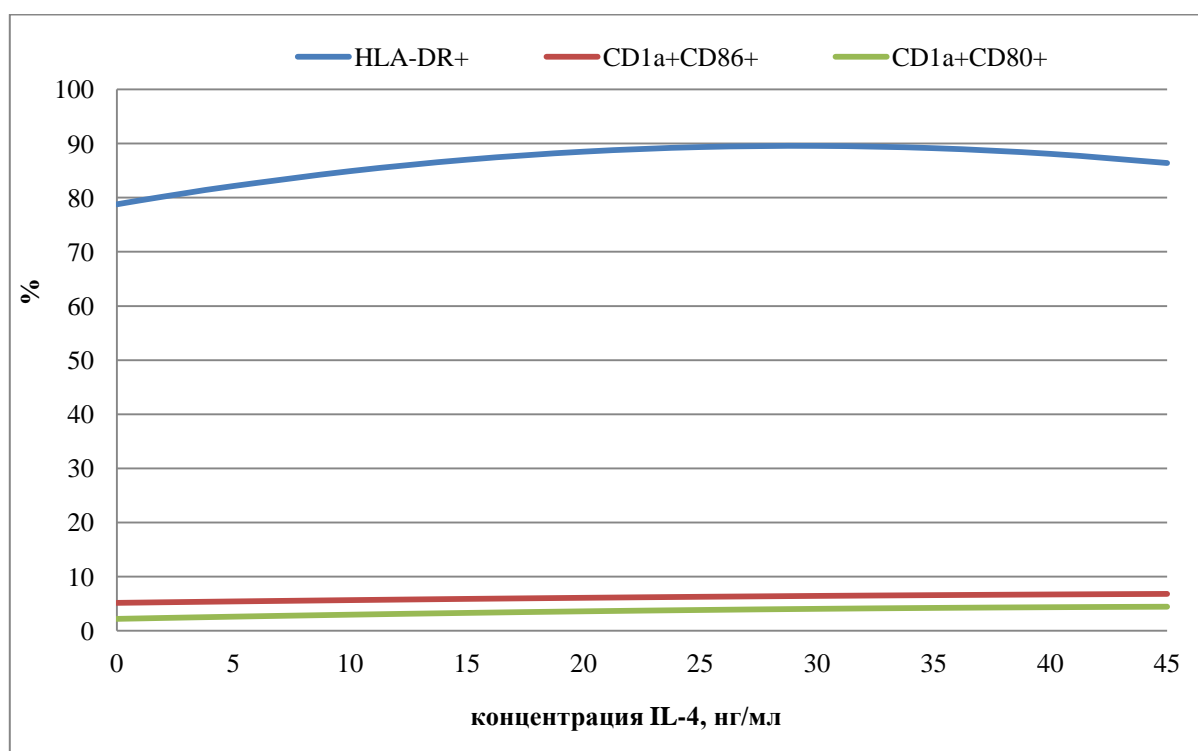


Рис. 2 Б. Экспрессия CD1a, HLA-DR, CD80 и CD86 антигенов на незрелых ДК в диапазоне концентрации IL-4 от 0 до 45 нг/мл.

С целью повышения эффективности бюджетных расходов на лечение больных меланомой кожи и снижения стоимости ДК-вакцин нами было проведено сравнительное исследование (табл. 2) влияния на созревание ДК интерферона-альфа (INF- α), который в последнее время рассматривается как фактор, способствующий ускоренному созреванию ДК в сочетании с GM-CSF (Korthals M. et al., 2007).

При сравнительном анализе результатов иммунофенотипирования популяций незрелых ДК, дифференцированных из миелоидных предшественников, ДК1 (GM-CSF + IL-4) и ДК2 (GM-CSF + IFN- α) на 7-й день культивирования было установлено, что популяция ДК2 содержала клетки с экспрессией моноцитарного компонента CD14 по сравнению с отсутствием подобных клеток в популяции ДК1, дифференцированных в присутствии IL-4 (табл.2).

Таблица 2. Иммунофенотип незрелых ДК, дифференцированных в присутствии GM-CSF + IL-4 (ДК1) и GM-CSF + IFN- α (ДК2)

Дифференцировочные/ линейноспецифические антигены	ДК1 M \pm m; δ (n=18)	ДК2 M \pm m; δ (n=20)	Критерий Фишера (F); уровень значимости (p)	Критерий Стьюдента (T), уровень значимости (p)
CD11c ⁺	94,88 \pm 2,95; 8,85	96,42 \pm 1,28; 3,4	F = 0,18 p = 0,67 (>0,05)	T=0,47 p=0,64 (>0,05)

CD14 ⁺	0	23,28±2,94; 7,78	-	-
HLA-DR ⁺	94,55±0,94; 2,83	91,14±4,78; 12,66	F = 0,62 p = 0,44 (>0,05)	T=0,69 p=0,59 (>0,05)
CD1a ⁺	76,78±4,15; 12,47	52,28±6,67; 16,65	F = 10,62 p = 0,006 (<0,05)	T=3,11 p=0,01 (<0,05)
CD83 ⁺	2,67±1,61; 4,82	25,14±4,95; 13,10	F = 22,88 p = 0,0002 (<0,05)	T=4,31 p=0,003(<0,05)
CD1a ⁺ CD83 ⁻	75,55±4,43; 13,31	37±4,68; 12,39	F = 35,04 p = 0,000 (<0,05)	T=5,97 p=0,000 (<0,05)
CD1a ⁺ CD83 ⁺	1,22±0,76; 2,28	17,71±4,03; 10,67	F = 20,68 p = 0,0004 (<0,05)	T=4,02 p=0,006 (<0,05)
CD1a ⁻ CD83 ⁺	1,44±0,85; 2,55	7,42±1,46; 3,86	F = 13,91 p = 0,002 (<0,05)	T=3,53 p=0,005 (<0,05)
CD1a ⁺ CD86 ⁺	17,33±5,43; 16,3	18,42±4,6; 12,17	F = 0,02 p = 0,88 (>0,05)	T=0,15 p=0,43 (>0,05)
CD1a ⁺ CD80 ⁺	2,44±0,86; 2,6	11,28±2,15; 5,7	F = 17,26 p = 0,0009 (<0,05)	T=3,81 p=0,005 (<0,05)
CD1a ⁺ CD209 ⁺	64,66±6,69; 23,09	17,57±5,33; 14,11	F = 22,38 p = 0,0003 (<0,05)	T=5,02 p=0,0002 (<0,05)

Кроме того, в популяции ДК2 наблюдалось статистически значимое снижение количества незрелых CD1a⁺ ДК по сравнению с ДК1 и увеличение зрелых CD83⁺ ДК. При этом имело место значимое различие в числе клеток с костимулирующим сигналом CD80⁺ и миграционной способностью (CD1a⁺CD209⁺ ДК). Это подтверждает факт ускоренного созревания ДК под воздействием IFN- α в изучаемый период наблюдения и является некорректным при изготовлении противоопухолевых дендритноклеточных вакцин, так как иммунофенотип незрелых ДК должен приближаться к значениям CD14⁻CD1a⁺CD83⁻, что в большей степени соответствует характеристике ДК, дифференцированных в присутствии IL-4 (ДК1).

3. Стандартизация условий криоконсервации и хранения вакцинных ДК в соответствии с иммунофенотипом, требованиями надлежащей лабораторной и клинической практики

Наиболее критичными процессами, влияющими на жизнеспособность клеток, является криоконсервация и размораживание. Наряду с температурным фактором большое значение имеют специальные консервирующие среды, которые также обеспечивают оптимальные условия хранения клеток. В настоящее время становится возможным использование криосред, специально разработанных для криоконсервации клеток человека, культивируемых в обогащенной бессывороточной среде. Это безбелковые среды, не содержащие в своем составе ксеногенных (животных) компонентов и компонентов сыворотки человека.

Для оценки жизнеспособности ДК были использованы две среды для криоконсервации и хранения (табл. 3 и 4):

- 1) бессывороточная криосреда с ДМСО (Биолот, Россия);
- 2) 90% сыворотка АВ человека (Sigma, США) с добавлением 10% ДМСО.

Результаты исследования показали, что статистически значимых различий в жизнеспособности ДК до криоконсервации и после оттаивания в среде содержащей сыворотку и в бессывороточной криосреде не обнаружено ($p > 0,05$), что свидетельствует о возможности и преимуществе использования бессывороточной среды.

Таблица 3. Жизнеспособность ДК до и после криоконсервации в среде, содержащей сыворотку АВ человека, на 7-й день хранения (n=18)

Обозначение статистических характеристик	Жизнеспособность ДК до криоконсервации (%)	Жизнеспособность ДК после криоконсервации (%)
$M \pm m; \delta^*$	$94,4 \pm 0,93; 2,07$	$93,0 \pm 1,0; 2,24$
Дисперсия, D	4,3	5,0
Т-критерий, уровень значимости, p	1,51 0,21 ($>0,05$)	

Таблица 4. Жизнеспособность ДК до и после криоконсервации в бессывороточной среде на 7-й день хранения (n=20)

Обозначение статистических характеристик	Жизнеспособность ДК до криоконсервации (%)	Жизнеспособность ДК после криоконсервации (%)
$M \pm m; \delta^*$	$96,0 \pm 0,84; 1,87$	$94,6 \pm 0,81; 1,82$
Дисперсия, D	3,5	3,3
Т-критерий, уровень значимости, p	1,09 0,34 ($>0,05$)	

* $M \pm m$ - среднее значение и его ошибка; δ - стандартное отклонение

Другой важной характеристикой вакцинных ДК (до и после криоконсервации) является их функциональная активность, которая была изучена по изменению числа IFN- γ -секретирующих клеток в ответ на стимуляцию ДК опухолевыми антигенами с помощью ELISpot-анализа.

Исследование выявило статистически значимые различия при активации вакцинными ДК аутологичных лимфоцитов периферической крови по сравнению с отрицательным контролем (спонтанная активация). Однако различия в количестве IFN- γ -секретирующих иммунокомпетентных Т-клеток при активации ДК до и после их криоконсервации были статистически незначимыми ($95,5 \pm 11,02$ и $94,4 \pm 11,48$; $p = 0,94$; $F = 0,005$, соответственно), что свидетельствует об оптимально подобранных условиях криоконсервации.

4. Скрининг вакцинного препарата ДК на наличие инфекционных агентов: контроль качества

Контроль стерильности вакцинного препарата производили в соответствии с Приказом МЗ СССР №720 от 31.07.1978 «Об улучшении медицинской помощи больным с гнойными

хирургическими заболеваниями и усилению мероприятий по борьбе с внутрибольничной инфекцией». Для этого образцы культуры ДК отбирали на бактериологический анализ на 7-й (ДК незрелые) и 9-й (ДК зрелые) дни культивирования. На первом этапе бактериологического анализа осуществляли посев забранного материала на питательные среды, инкубировали 10 дней, при температуре 37°C и/или в течение 5 дней в гематологическом бактериологическом анализаторе.

На втором этапе бактериологического анализа производили высеивание на плотные дифференциально-диагностические среды (мясо-пептонный агар 5%, желточно-солевой агар, среда Эндо, агар Сабуро) с последующей инкубацией при 37°C, в течение 24 ч. Идентификацию микроорганизмов осуществляли на автоматическом бактериологическом анализаторе (врач-бактериолог Т.Ю. Галунова, лаборатория бактериологии НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова).

Весь период наблюдения (48 мес) вакцинные ДК были без признаков микробного загрязнения.

5. Клиническая и иммунологическая оценка эффективности и безопасности двух видов лечебных ДК-вакцин (ДКВ и ФДК) и адьювантного режима ДКВ у больных меланомой кожи

За время проведения исследования у 42 пациентов было выполнено 218 циклов вакцинотерапии. ДКВ получили 28 больных, было проведено 181 введение вакцины (от 2 до 20 у каждого пациента). ФДК получили 14 больных - 172 введения незрелых ДК в 37 циклах вакцинотерапии (от 1 до 6 у каждого пациента). Медиана продолжительности времени наблюдения за больными составила 356 дней, средняя длительность наблюдения - 442 дня.

Установлено, что ДКВ и ФДК вакцинотерапия безопасна и не сопровождалась серьезными нежелательными явлениями (НЯ 4 ст.).

Оценку эффективности лечения проводили с использованием показателей частоты объективных ответов (при наличии опухолевых очагов до начала терапии), времени до прогрессирования заболевания (ВДП) и общей выживаемости больных (табл. 5).

Как видно из представленных данных, использование ДКВ и ФДК вакцин приводит к получению объективных ответов на лечение - 5% (95% ДИ 0-15%) у больных, получавших ДКВ и 15% (95% ДИ 2-39%) у больных, получавших ФДК.

В нашем исследовании время до прогрессирования заболевания составляет 75 (95% ДИ 45-98) дней у больных, получавших ДКВ, 108 (95% ДИ 68-147) дней у больных, получавших ФДК и 402 (95% ДИ 2-802) дня у больных, получавших адьювантное лечение. Медиана общей выживаемости (ОВ) составила при ДКВ 420 (95% ДИ 282-557) дней, ФДК 334 (95% ДИ 43-624) дня. Эти результаты сопоставимы с результатами применения других иммунотерапевтических средств у идентичных категорий больных. Так, в регистрационном

исследовании III фазы по изучению терапии пептидной вакцины и ипилимумабом в качестве 2-й линии терапии больных с диссеминированной меланомой кожи медиана ВДП составила 2,8 мес, ОВ - 10,1 мес (O'Day S. et al., 2010). При этом данный препарат статистически значимо увеличивал продолжительность жизни больных и на основании полученных результатов был зарегистрирован для клинического применения.

Таблица 5. Эффективность вакцинотерапии с использованием ДКВ и ФДК у больных меланомой кожи

Показатель		Вакцинотерапия		
		ДКВ адьювантная n=9	ДКВ лечебная n=19	ФДК лечебная n=14
1	2	3	4	5
ЧР	абсолютные значения	-	1	2
	(%)	-	5	15
	95% ДИ	-	0-15	2-39
СЗ	абсолютные значения	-	6	5
	(%)	-	32	39
	95% ДИ	-	11-52	12-65
КЭ	абсолютные значения	-	7	7
	(%)	-	37	54
	95% ДИ	-	15-59	21-78
ПЗ	абсолютные значения	-	12	6
	(%)	-	63	46
	95% ДИ	-	41-83	19-73
ВДП	дни	402	72	108
	95% ДИ	2-802	45- 98	68-147
1-летнее ВДП	%	56	15	8
	95% ДИ	23-88	3-33	0-30
ОВ	дни	Не достигнута	420	334
	95% ДИ		282-557	43-624
1-летняя ОВ	%	100	40	33
	95% ДИ	0	19-61	7-60

Примечание: ЧР - частичный регресс, ПЗ - прогрессирование заболевания, СЗ - стабилизация заболевания; ВДП – время до прогрессирования заболевания; ОВ – общая выживаемость; КЭ – клинический эффект 95% ДИ – 95% доверительный интервал.

Для анализа иммунологических параметров нами был введен показатель *достаточности* и *недостаточности* клинического эффекта. Под достаточным клиническим эффектом понимали развитие объективного ответа или стабилизации заболевания длительностью более 6 мес у больных, получавших лечебную вакцинотерапию, и более 1 года у больных, получавших адъювантное лечение. Все другие варианты клинического ответа на терапию расценивались как недостаточные. Было выявлено статистически значимое увеличение продукции INF- γ опухолев-специфическими Т-лимфоцитами от начала лечения ($15,44 \pm 5,79$ спот/ 10^5 МНК) в процессе ДКВ ($73 \pm 31,01$ спот/ 10^5 МНК после 4-й вакцинации) в группе пациентов с достаточным клиническим эффектом (коэффициент корреляции 0,593; $p=0,005$). Специфическое влияние ФДК-вакцинотерапии в лабораторных тестах *in vitro* выявлено у 54% больных. Это может выражаться в увеличении содержания меланомаспецифических IgG ($p<0,014$) в периферической крови и/или продукции гранзима Б периферическими поствакцинальными Т-лимфоцитами ($p<0,01$).

Мониторинг поствакцинального иммунного ответа в процессе вакцинотерапии аутологичными ДК больных меланомой кожи может быть использован для создания алгоритма оценки эффективности вакцинотерапии на основе ДК.

Выводы:

1. Выявлены и стандартизированы оптимальные условия получения, криоконсервации и хранения аутологичных дендритноклеточных вакцин, нагруженных иммуногенными РТА⁺ антигенами.
2. Анализ иммунофенотипа миелоидных предшественников ДК по уровню экспрессии CD34, CD33, CD14, CD11c, HLA-DR антигенов у больных меланомой кожи выявил различия в адгезионных свойствах и изменение субпопуляционного состава предшественников на фоне криоконсервации и криоконцентрации на градиенте плотности Ficoll-Paque ($p<0,05$).
3. В результате сравнения влияния GM-CSF (72 нг/мл) импортного и отечественного производства на экспрессию дифференцировочных антигенов ДК (CD14, CD1a, CD83, CD80, CD86, CCR7, HLA-DR) было установлено, что изучаемые цитокины обладают сходными фармакологическими характеристиками ($p>0,05$). Для снижения затрат на производство аутологичных дендритноклеточных вакцин целесообразно использовать GM-CSF отечественного производства.
4. Исходно высокая концентрация IL-4 (45 нг/мл), часто используемая для дифференцировки ДК *in vitro*, представляется фармакологически и экономически необоснованной; оптимальной становится концентрация IL-4 от 20 до 5 нг/мл ($p<0,05$) в сочетании с GM-CSF (72 нг/мл) и ростовой бессывороточной средой «Cell Gro DC», что не отразилось на качестве ДК-вакцин, но привело к снижению затрат на производство.

5. В результате сравнения влияния IL-4 (20 нг/мл) и его предполагаемого аналога IFN- α (90 нг/мл) на дифференцировку ДК (CD1a⁺CD83⁺ и CD1a⁻CD83⁺) в изучаемый период наблюдения (4-й и 7-й день культивирования), были получены данные, свидетельствующие о преимуществе использования IL-4 по сравнению с IFN- α ($p < 0,05$).
6. Анализ жизнеспособности и функциональной активности ДК (ELISpot-анализ), криоконсервированных в среде, содержащей сыворотку, и бессывороточной среде с 10% ДМСО не выявил статистически значимых различий ($p > 0,05$).
7. Скрининг вакцинного препарата ДК на наличие инфекционных агентов за весь период наблюдения (48 мес) не выявил признаков микробного загрязнения.
8. Использование стандартизированных аутологичных ДК-вакцин в лечебном и адъювантном режиме показало их **безопасность** (единичные случаи НЯ 3 ст., отсутствие НЯ 4 ст.); **клиническую эффективность ДКВ** - частота объективного ответа на лечение у 5% (95% ДИ 0-15%) больных, СЗ у 32 % больных, медиана ВДП 72 (95% ДИ 45-98) дня; **ФДК вакцинотерапии** - частота объективного ответа на лечение у 15% (95% ДИ 2-39%) больных, СЗ у 39 % больных, медиана ВДП 108 (95% ДИ 68-147) дней; медиана ВДП при адъювантной ДКВ составляет 402 (95% ДИ 2-802) дня. Связь иммунологических изменений с развитием лечебного эффекта ($p < 0,05$) свидетельствует о необходимости проведения специфического иммунологического мониторинга (ELISpot-анализ, клеточный ИФА).

Практические рекомендации

1. Разработана лабораторная методика оценки качества вакцинных ДК, в основу которой заложен контроль получения миелоидных периферических предшественников, дифференцировки ДК in vitro, нагрузки и активации незрелых CD1a⁺CD83⁻ ДК, жизнеспособности ДК, иммунофенотипических характеристик незрелых CD1a⁺CD83⁻ и зрелых CD1a⁺CD83⁻ опухолеспецифических вакцинных ДК, долговременной криоконсервации и скрининга вакцинных ДК на наличие инфекционных агентов.
2. Адаптированы и внедрены в клиническую практику методы лабораторного мониторинга специфического поствакцинального иммунного ответа ELISpot-анализ и клеточный ИФА.
3. Для всех этапов приготовления вакцинных ДК описаны стандартные операционные процедуры.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

1. Балдуева И.А., Моисеенко В.М., Данилова А.Б., Данилов А.О., Нехаева Т.Л., Георгиев Г.П., Гнучев Н.В., Ларин С.С., Киселёв С.Л. Клеточные технологии в терапии злокачественных опухолей // Российский иммунологический журнал. — 2008. — Т. 2 (11). — № 2—3. — С. 303—304.
2. Моисеенко В.М., Балдуева И.А., Данилова А.Б., Орлова Р.В., Семёнова А.И., Тюкавина Н.В., Фахрутдинова О.Л., Нехаева Т.Л., Новик А.В., Георгиев Г.П., Гнучев Н.В., Ларин С.С., Киселёв С.Л. Опыт и перспективы вакцинотерапии злокачественных опухолей // Российский иммунологический журнал. — 2008. — Т.2 (11). — № 2—3. — С. 311.
3. Moiseyenko V.M., Baldueva I.A., Gelfond M.L., Fahrutdinova O.L., Novik A.V., Nehayeva T.L., Danilova A.B., Danilov A.O., Imyanitov E.N. Combination of dendritic cells (DC) vaccine and photodynamic therapy (PDT) shows promising results in patients with disseminated melanoma // The Melanoma XII Congress, 2008, Hague, Netherlands.
4. Одинак М.М., Чирский В.С., Бисага Г.Н., Балдуева И.А., Моисеенко В.М., Нехаева Т.Л., Калинина Н.М., Давыдова Н.И., Бычкова Н.В., Чумаш К. Аутогенные IL-10-модифицированные дендритные клетки в иммунотерапии рассеянного склероза: первый клинический опыт // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2008. — №4. — С. 60—65.
5. Моисеенко В.М., Новик А.В., Балдуева И.А., Проценко С.А., Данилова А.Б., Нехаева Т.Л., Овсянников А.И. Опыт применения плазмафереза для лечения больных диссеминированной меланомой кожи // Сборник материалов VII съезда онкологов России. — 2009. — Т. 2. — С. 179.
6. Моисеенко В.М., Гельфонд М.Л., Балдуева И.А., Нехаева Т.Л., Новик А.В., Фахрутдинова О.Л., Данилов А.О., Данилова А.Б. Лечение диссеминированной меланомы вакциной на основе дендритных клеток, активированных опухолевыми клетками в состоянии фотоиндуцированного фотодитазином апоптоза // Материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты» 21-22 апреля 2009 / Рос. Биотер. журнал. — 2009. — Т. 8. — № 2. — С. 37—38.
7. Чирский В.С., Одинак М.М., Бисага Г.Н., Балдуева И.А., Моисеенко В.М., Нехаева Т.Л., Калинина Н.М., Давыдова Н.И. К вопросу о механизмах иммунотерапии аутологичными IL-10-модифицированными дендритными клетками больных с рассеянным склерозом // Материалы научной конференции, посвященной 150-летию кафедры патологической анатомии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова. — СПб, 2009. — С. 148—150.
8. Odinak M., Bisaga G., Chirsky V., Baldueva I., Moiseyenko V., Neckhaeva T., Kalinina N., Davidova N., Paschenkov M., Ciumas C. First clinical experience of autogenic IL-10 modified dendritic cells in multiple sclerosis // Multiple Sclerosis. — 2009. — Vol. 15, Suppl. 2. — P. 143.
9. Moiseyenko V.M., Baldueva I.A., Gelfond M.L., Nehayeva T.L., Novik A.V., Fahrutdinova O.L., Danilov A.O., Danilova A.B. The combination of dendritic cells (DC) vaccine and photodynamic therapy (PDT) shows promising results in patients with disseminated melanoma // Proc. II International symposium Topical problems of biophotonics. — 2009. — P. 344—345.
10. Балдуева И.А., Нехаева Т.Л., Новик А.В., Зуева Е.В., Данилова А.Б., Данилов А.О., Моисеенко В.М. IL-7 в сочетании с IL-12 увеличивает чувствительность ELISPOT-теста поствакцинального Т-клеточного иммунного ответа у больных с диссеминированной меланомой кожи (МК) // Материалы 19-Международной конференции «СПИД, рак и общественное здоровье» 24 - 26 мая 2010 / Русский журнал. — 2010. — Т. 14. — № 1 (29). — С. 15—16.
11. Одинак М.М., Чирский В.С., Бисага Г.Н., Пашенков М.В., Балдуева И.А., Моисеенко В.М., Нехаева Т.Л., Калинина Н.М., Давыдова Н.И., Бычкова Н.В., Поздняков А.В. Аутогенные IL-10-модифицированные дендритные клетки в иммунотерапии рассеянного склероза: анализ первых результатов клинических исследований // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2010. — Т. 5, № 3. — С. 90—95.
12. Одинак М.М., Чирский В.С., Бисага Г.Н., Балдуева И.А., Моисеенко В.М., Нехаева Т.Л., Калинина Н.М., Давыдова Н.И. О возможности иммунотерапии рассеянного склероза аутогенными IL-10-модифицированными дендритными клетками. ВМА им. С.М. Кирова, ФГУ НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова, Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова, Санкт-Петербург, Россия. 21-22 апреля 2010, Санкт-Петербург IV Всероссийский симпозиум «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии».
13. Новик А.В., Балдуева И.А., Фахрутдинова О.Л., Нехаева Т.Л., Моисеенко В.М. Изучение сочетанного использования плазмафереза и вакцинотерапии на основе аутологичных дендритных клеток у больных

- диссеминированной меланомой кожи: I-II фаза клинических исследований // Материалы X Юбилейной конференции «Частные проблемы экспериментальной и клинической онкологии». — 2010. — С. 111—112.
14. Балдуева И.А., Нехаева Т.Л., Новик А.В., Фахрутдинова О.Л., Данилова А.Б., Данилов А.О., Зуева Е.Е., Моисеенко В.М. Исследование поствакцинального иммунного ответа в ELISPOT тесте у больных с диссеминированной меланомой кожи (МК) // Материалы IX Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты» 18-19 мая 2010 / Рос. Биотер. журнал. — 2010. — Т. 9. — № 2. — С. 40.
 15. Данилова А.Б., Данилов А.О., Фахрутдинова О.Л., Нехаева Т.Л., Зуева Е.В., Балдуева И.А., Моисеенко В.М. Определение иммуносупрессирующих факторов в различных биологических жидкостях при создании и применении противоопухолевых вакцин // VI съезд онкологов и радиологов стран СНГ: материалы съезда, Душанбе, 2010. — С. 66—66.
 16. Нехаева Т.Л., Новик А.В., Фахрутдинова О.Л. Мониторинг поствакцинального специфического иммунного ответа у больных с диссеминированными солидными опухолями // Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины: сборник тезисов X Юбилейной научно-практической конференции молодых ученых. — 2010. — С. 132—133.
 17. Новик А.В., Фахрутдинова О.Л., Нехаева Т.Л., Изучение сочетанного использования плазмафереза и вакцинотерапии на основе аутологичных дендритных клеток у больных диссеминированной меланомой кожи: I-II фаза клинических исследований // Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины: сборник тезисов X Юбилейной научно-практической конференции молодых ученых, 2010. — С. 125—126.
 18. Новик А.В., Балдуева И.А., Фахрутдинова О.Л., Нехаева Т.Л., Моисеенко В.М. Изучение сочетанного использования плазмафереза и вакцинотерапии на основе аутологичных дендритных клеток у больных диссеминированной меланомой кожи: I-II фаза клинических исследований // Тезисы X Юбилейной научной конференции молодых онкологов с участием международных специалистов "Современные проблемы экспериментальной и клинической онкологии". — 2010. — С.111—112.
 19. Новик А.В., Балдуева И.А., Фахрутдинова О.Л., Нехаева Т.Л., Моисеенко В.М. Изучение сочетанного использования плазмафереза и вакцинотерапии на основе аутологичных дендритных клеток у больных диссеминированной меланомой кожи: I-II фаза клинических исследований (тезисы) // VI съезд онкологов и радиологов стран СНГ: материалы съезда. — 2010. — С. 222.
 20. Одинак М.М., Чирский В.С., Бисага Г.Н., Пашенков М.В., Балдуева И.А., Моисеенко В.М., Нехаева Т.Л., Калинина Н.М., Давыдова Н.И. К вопросу об эффективности применения аутологичных IL-10-модифицированных дендритных клеток для лечения больных с рассеянным склерозом // Нейроиммунология. — 2011. — Т. 9, № 3-4. — С. 122—123.
 21. Балдуева И.А., Данилова А.Б., Данилов А.О., Новик А.В., Нехаева Т.Л., Проценко С.А. Разработка обоснование и оценка современной биотерапии у больных солидными опухолями // Вopr.онкол. — 2011. — № 6. — С. 789—796.
 22. Данилова А.Б., Данилов А.О., Новик А.В., Фахрутдинова О.Л., Нехаева Т.Л., Зуева Е.В., Балдуева И.А., Моисеенко В.М. Клинико-лабораторная оценка иммуносупрессирующих факторов в контексте создания и применения противоопухолевых вакцин. Протокол заседания общества онкологов № 476 // Вopr.онкол. — 2011. — Т. 57. — № 3. — С. 398—399.
 23. Балдуева И.А., Моисеенко В.М., Гельфонд М.Л., Новик А.В., Нехаева Т.Л., Фахрутдинова О.Л., Данилова А.Б., Данилов А.О., Проценко С.А. Разработка вакцины на основе костномозговых предшественников дендритных клеток (ДК), сенсibilизированных фотомодифицированной опухолью для лечения больных с диссеминированной меланомой кожи // Мед. иммунол. — 2011. — Т. 13. — С. 447.
 24. Балдуева И.А., Нехаева Т.Л., Данилова А.Б., Новик А.В., Данилов А.О., Моисеенко В.М., Имянитов Е.Н. Разработка диагностической панели раково-тестикулярных антигенов для оценки поствакцинального иммунного ответа у больных злокачественными новообразованиями // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Организационные вопросы реализации Национальной онкологической Программы в Российской Федерации», Казань, 2011 // Поволжский онкол. вестник. — 2011. — № 1. — С. 16—17.
 25. Балдуева И.А., Нехаева Т.Л., Данилова А.Б., Новик А.В., Данилов А.О., Моисеенко В.М., Имянитов Е.Н. Разработка диагностической панели раково-тестикулярных антигенов для оценки поствакцинального иммунного ответа у больных злокачественными новообразованиями // Рос. биотер. журнал. — 2011. — Т. 1. — С.67.

26. Балдуева И.А., Моисеенко В.М., Гельфонд М.Л., Новик А.В., Нехаева Т.Л., Фахрутдинова О.Л., Данилова А.Б., Данилов А.О., Проценко С.А. Клинические исследования вакцинотерапии костномозговыми дендритными клетками (ДК) в сочетании с фотодинамической терапией (ФДТ) у больных с диссеминированной меланомой кожи // *Материалы X Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты»*, Москва, 2011 // *Рос. биотер. журнал.* — 2011. — Т. 1. — С. 6—7.
27. Петрова Т.Ю., Нехаева Т.Л., Новик А.В., Комаров Ю.И. Разработка диагностикума на основе раково-тестикулярных антигенов для оценки специфичности поствакцинального иммунного ответа у больных злокачественными новообразованиями // *Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины: сборник тезисов научно-практической конференции молодых ученых.* — 2011. — С. 42.
28. Новик А.В., Балдуева И.А., Нехаева Т.Л., Данилова А.Б., Данилов А.О., Петрова Т.Ю., Имянитов Е.Н., Проценко С.А. Применение аутологичной раково-тестикулярной дендритно-клеточной вакцины (ДКВ) у больных диссеминированной меланомой кожи: Пфаза клинических исследований // *Петровские чтения 2012 : сборник тезисов 8 конференции по фундаментальной онкологии.* — 2012. — С. 105—106.
29. Нехаева Т.Л., Балдуева И.А., Новик А.В., Данилова А.Б., Данилов А.О., Петрова Т.Ю., Имянитов Е.Н., Проценко С.А. Активация противоопухолевого иммунитета в ответ на введение аутологичной раково-тестикулярной дендритно-клеточной вакцины (ДКВ) у больных диссеминированной меланомой кожи // *Петровские чтения 2012: сборник тезисов 8 конференции по фундаментальной онкологии* — 2012. — С. 102-104.
30. Балдуева И.А., Новик А.В., Моисеенко В.М., Нехаева Т.Л., Данилова А.Б., Данилов А.О., Проценко С.А., Петрова Т.Ю., Улейская Г.И., Щёкина Л.А., Семёнова А.И., Михайличенко Т.Д., Телетаева Г.М., Комаров Ю.И., Гафтон Г.И., Кочнев В.А., Барчук А.С., Анисимов В.В., Семилетова Ю.В., Мацко Д.Е., Имянитов Е.Н., Щербаков А.М., Беляев А.М. Клиническое исследование (II фаза) вакцины на основе аутологичных дендритных клеток с иммунологическим адьювантом у больных меланомой кожи // *Вопр. онкол.* — 2012. — Т. 58. — № 2. — С. 212—221.
31. Балдуева И.А., Моисеенко В.М., Новик А.В., Данилова А.Б., Данилов А.О., Нехаева Т.Л., Проценко С.А., Семёнова А.И., Телетаева Г.М., Барчук А.С., Гафтон Г.И., Анисимов В.В., Семилетова Ю.В., Комаров Ю.И., Имянитов Е.Н., Иванцов А.О. Клинические исследования терапевтических противоопухолевых вакцин (ТПВ) // *Материалы VII съезда онкологов и радиологов стран СНГ.* — 2012. — С. 512—513.
32. Балдуева И.А., Новик А.В., Моисеенко В.М., Гельфонд М.Л., Нехаева Т.Л., А.Б. Данилова, Данилов А.О., Проценко С.А., Семёнова А.И., Телетаева Г.М., Вааль А.И. Вакцинотерапия костномозговыми дендритными клетками (ДК) в сочетании с фотодинамической терапией больных диссеминированными опухолями // *Злокачественные опухоли.* — 2012. — С. 161.
33. Гельфонд М.Л., Арсеньев А.И., Левченко Е.В., Гельфонд В.М., Мамонтов О.Ю., Моисеенко В.М., Балдуева И.А., Новик А.В., Нехаева Т.Л., Данилова А.Б., Данилов А.О., Сенчик К.Ю., Трунов В.А., Кульвелис Ю.В., Суханова Т.Е. Фотодинамическая терапия в комбинированном лечении злокачественных новообразований: настоящее и будущее // *Лазерная медицина.* — 2012. — Т. 16. — С. 25-30.
34. Moiseyenko V.M., Baldueva I.A., Novik A.V., Nehaeva T.L., Danilova A.B., Danilov A.O., Petrova T.Y., Protsenko S.A., Michailichenko T.D., Semenova A.I., Teletaeva G.M. Autologous Dendritic Cell Vaccine (ADCV) in combination with plasmapheresis (PP) and Cyclophosphamide (Cy) in Patients with Disseminated Melanoma: a Phase II study // *J. Clin. Oncol.* — 2012. — ASCO 2012 abstr. — e. 13059.
35. Нехаева Т.Л. Оптимизация аутологичных дендритно-клеточных вакцин для лечения больных злокачественными новообразованиями // *Сибирский онкологический журнал.* — 2013. — № 3 (57). — С. 52—56.
36. Гафтон Г.И., Семилетова Ю.В., Анисимов В.В., Гельфонд М.Л., Мяснянкин М.Ю., Новик А.В., Нехаева Т.Л., Балдуева И.А., Гафтон И.Г. Фотодинамическая терапия в хирургическом лечении больных меланомой кожи // *Сибирский онкологический журнал.* — 2013. — № 4 (58). — С. 23—27.
37. Балдуева И.А., Нехаева Т.Л., Новик А.В., Данилова А.Б., Комаров Ю.И., Данилов А.О., Воробейчиков Е.В., Вааль А.И. Клиническая и иммунологическая эффективность вакцинотерапии на основе незрелых костномозговых дендритных клеток (ДК) в сочетании с фотодинамической терапией (ФДТ) и циклофосфамидом (ЦФ) // *Российский иммунологический журнал.* — 2013. — Т. 7 (16). — № 2—3. — С. 342.

38. Нехаева Т.Л., Балдуева И.А., Новик А.В., Данилова А.Б., Данилов А.О., Комаров Ю.И., Воробейчиков Е.В., Пономаренко В.М., Вааль А.И. Оптимизация технологии и стандартизация получения противоопухолевых вакцин на основе аутологичных дендритных клеток (ДК) // Российский иммунологический журнал. — 2013. — Т. 7 (16). — № 2—3. — С. 345.
39. Нехаева Т.Л., Данилова А.Б., Балдуева И.А., Новик А.В., Данилов А.О., Воробейчиков Е.В., Комаров Ю.И. Лабораторный мониторинг иммунологической эффективности вакцин на основе аутологичных дендритных клеток (ДК) у больных меланомой кожи // Российский иммунологический журнал. — 2013. — Т. 7 (16). — № 2—3. — С. 345.
40. Гафтон Г.И., Анисимов В.В., Балдуева И.А., Гельфонд М.Л., Семилетова Ю.В., Новик А.В., Мяснянкин М.Ю., Лемехов В.Г., Гафтон И.Г., Нехаева Т.Л. Неoadъювантная фотодинамическая терапия в хирургическом лечении больных меланомой кожи // Вопросы онкологии. — 2013. — Т. 59. — Приложение к № 3. — С. 1157—1158.
41. Данилова А.Б., Данилов А.О., Балдуева И.А., Нехаева Т.Л., Новик А.В., Комаров Ю.И. Препредиктивное значение изменения экспрессии опухолеассоциированных антигенов (ОАА) и продукции иммуносупрессирующих факторов (ИФ) опухолевыми клетками в процессе культивирования и создания противоопухолевых вакцин // Вопросы онкологии. — 2013. — Т. 59. — Приложение к № 3. — С. 1160—1161.
42. Комаров Ю.И., Балдуева И.А., Новик А.В., Нехаева Т.Л., Проценко С.А., Гафтон Г.И., Семёнова А.И., Телетаева Г.М., Латипова Д.Х., Данилова А.Б., Данилов А.О., Воробейчиков Е.В., Вааль А.И., Масафанова О.А. Влияние хирургического и лекарственного лечения на содержание основных субпопуляций иммунокомпетентных клеток периферической крови у больных с мягкоткаными саркомами // Вопросы онкологии. — 2013. — Т. 59. — Приложение к №3. — С. 1169—1170.
43. Комаров Ю.И., Нехаева Т.Л., Балдуева И.А., Новик А.В., Семенова А.И., Проценко С.А., Латипова Д.Х., Телетаева Г.М., Гафтон Г.И., Данилова А.Б., Данилов А.О., Воробейчиков Е.В., Вааль А.И. Влияние различных типов лечения на содержание основных субпопуляций иммунокомпетентных клеток у больных мягкоткаными саркомами // Сибирский онкологический журнал. — 2013. — Приложение № 1. — С. 55—56.
44. Нехаева Т.Л., Балдуева И.А., Новик А.В., Данилова А.Б., Данилов А.О., Комаров Ю.И., Воробейчиков Е.В., Пономаренко В.М., Вааль А.И. Разработка, оптимизация и стандартизация противоопухолевых вакцин на основе периферических дендритных клеток (ДК) // Вопросы онкологии. — 2013. — Т. 59. — Приложение к № 3. — С. 1182-1183.
45. Нехаева Т.Л., Балдуева И.А., Новик А.В., Данилова А.Б., Комаров Ю.И., Данилов А.О., Воробейчиков Е.В., Вааль А.И. Иммунологическое исследование вакцинотерапии на основе костномозговых незрелых дендритных клеток (ДК) в сочетании с фотодинамической терапией (ФДТ) и циклофосфамидом (ЦФ): оптимизация метода // Вопросы онкологии. — 2013. — Т. 59. — Приложение к № 3. — С. 1181-1182.
46. Нехаева Т.Л., Данилова А.Б., Новик А.В., Балдуева И.А., Данилов А.О., Воробейчиков Е.В., Комаров Ю.И. Иммунологические исследования вакцинотерапии на основе аутологичных дендритных клеток (ДК) у больных меланомой кожи (поствакцинальный иммунитет и иммуносупрессирующие факторы) // Вопросы онкологии. — 2013. — Т. 59. — Приложение к № 3. — С. 1180—1181.
47. Новик А.В., Балдуева И.А., Нехаева Т.Л., Гельфонд М.Л., Данилова А.Б., Комаров Ю.И., Данилов А.О., Воробейчиков Е.В., Вааль А.И., Проценко С.А., Семёнова, Г.М. Телетаева А.И., Латипова Д.Х. Вакцинотерапия на основе костномозговых дендритных клеток (ДК) в сочетании с фотодинамической терапией (ФДТ) и циклофосфамидом (ЦФ) у больных диссеминированной меланомой кожи: II фаза клинических исследований // Вопросы онкологии. — 2013. — Т. 59. — Приложение к № 3. — С. 1183—1184.
48. Новик А.В., Балдуева И.А., Нехаева Т.Л., Проценко С.А., Гафтон Г.И., Анисимов В.В., Семилетова Ю.В., Данилова А.Б., Данилов А.О., Воробейчиков Е.В., Вааль А.И., Комаров Ю.И. Клинические исследования вакцинотерапии на основе аутологичных дендритных клеток у больных меланомой кожи в (II фаза) // Вопросы онкологии. — 2013. — Т. 59. — Приложение к № 3. — С. 1184—1185.
49. Danilova A.B Danilov A.O., Baldueva I.A., Nechaeva T.L., Novik A.V., Komarov J.I. Tumor associated antigens expression and immunosuppressive factors production by tumor cells during cultivation as predictive factors for vaccinotherapy in melanoma.// JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft. — 2013. — V. 11. — I. Supplement s 7. — P. 70—71.

50. Nechaeva T.L., Danilova A.B., Novik A.V., Baldueva I.A., Danilov A.O., Vorobeychikov E.V., Komarov J.I. Specific antitumor immune response in melanoma patients receiving autologous dendritic cell vaccine // JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft. — 2013. — V. 11. — I. Supplement s 7. — P. 70.
51. Novik A.V., Baldueva I.A., Gelfond M.L., Protsenko S.A., Nehaeva T.L., Vaal A.I., Vorobeychikov E.V., Danilova A.B., Danilov A.O., Semenova A.I., Teletaeva G.M., Moiseyenko V.M. A phase II study of intratumoral administration of the autologous immature dendritic cell (DC) vaccine used after lesion photodynamic therapy (PhDT) and immunomodulation with cyclophosphamide (Cy) in pretreated patients with disseminated malignant melanoma // J. Clin. Oncol. — 2013. — abstr 3088.
52. Novik A.V., Baldueva I.A., Michailova I.N., Nechaeva T.L., Protsenko S.A., Gafton G.I., Anisimov V.V., Semiletova J.V., Danilova A.B., Danilov A.O., Vaal A.I., Komarov J.I. Adjuvant autologous dendritic cell vaccine in patients with stage IIIB-IIIC melanoma: a phase II study // JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft. — 2013. — V. 11. — I. Supplement s 7. — P. 68.
53. Novik A.V., Baldueva I.A., Gelfond M.L., Protsenko S.A., Nehaeva T.L., Vaal A.I., Vorobeychikov E.V., Danilova A.B., Danilov A.O., Semenova A.I., Teletaeva G.M., Moiseyenko V.M. A phase II study of intratumoral administration of the autologous immature dendritic cell (DC) vaccine used after lesion photodynamic therapy (PhDT) and immunomodulation with cyclophosphamide (Cy) in pretreated patients with disseminated malignant melanoma // ASCO 2013 abstr. — e.3088.
54. Danilova A.B., Danilov A.O., Baldueva I.A., Nehaeva T.L., Novik A.V., Komarov J.I. Tumor associated antigens expression and immunosuppressive factors production by tumor cells during cultivation as predictive factors for vaccinotherapy in melanoma // 8th world melanoma congress, 2013.
55. Nechaeva T.L., Danilova A.B., Novik A.V., Baldueva I.A., Danilov A.O., Vorobeychikov E.V., Komarov J.I. Specific antitumor immune response in melanoma patients receiving autologous dendritic cell vaccine // 8th world melanoma congress, 2013.
56. Novik A.V., Baldueva I.A., Michailova I.N., Nechaeva T.L., Protsenko S.A., Gafton G.I., Anisimov V.V., Semiletova J.V., Danilova A.B., Danilov A.O., Vaal A.I., Komarov J.I. Adjuvant autologous dendritic cell vaccine in patients with stage IIIB-IIIC melanoma: a phase II study // 8th world melanoma congress, 2013.
57. Danilova A., Baldueva I., Nehaeva T., Novik A., Vaal A. Tumor associated antigens expression and immunosuppressive factors production by tumor cells of the solid tumors during cultivation as predictive factors for vaccinotherapy of patients with malignant neoplasms // Annual Meeting of the French Society for Immunology, 4-7 NOV 2013, Paris, France in print.
58. Гельфонд М.Л., Левченко Е.В., Мамонтов О.Ю., Балдуева И.А., Нехаева Т.Л., Новик А.В., Анисимов В.В., Семилетова Ю.В., Маснянкин М.Ю. Неoadъвантная и интраоперационная фотодинамическая терапия в комбинированном лечении злокачественных новообразований // II Всероссийской конференция «Актуальные вопросы фотодинамической терапии и фотодиагностики», Москва, 2013 // Журнал «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика» — 2013. — Т. 3. — С. 54.
59. Балдуева И.А., Нехаева Т.Л., Новик А.В., Данилова А.Б. Клеточные технологии в онкологии // Материалы II Межрегиональной научно-практической конференции «Клеточные технологии – практическому здравоохранению» — Екатеринбург, 2013. — С. 7—9.
60. **Гафтон Г.И., Семилетова Ю.В., Анисимов В.В., Гельфонд М.Л., Мяснянкин М.Ю., Новик А.В., Нехаева Т.Л., Балдуева И.А., Гафтон И.Г. Фотодинамическая терапия в хирургическом лечении больных меланомой кожи // Сибирский онкологический журнал. — 2013. — № 4 (58). — С. 23—27.**

Патент, медицинская технология

Патент на изобретение №2376033 «Способ иммунотерапии костно-мозговыми предшественниками дендритных клеток, сенсibilизированных фотомодифицированными опухолевыми клетками *in vivo*, больных диссеминированными солидными опухолями» // Моисеенко В.М., Балдуева И.А., Гельфонд М.Л., Фахрутдинова О.Л., Нехаева Т.Л., Данилов А.О., Данилова А.Б., приоритет изобретения 17.04.2008 г., дата выдачи патента — 20.12.2009 г.

Медицинская технология «Иммунотерапия костномозговыми предшественниками дендритных клеток, сенсibilизированных фотомодифицированными опухолевыми клетками *in vivo*, больных диссеминированными солидными опухолями» // Моисеенко В.М., Балдуева И.А., Гельфонд М.Л., Проценко С.А., Новик А.В., Нехаева Т.Л., Фахрутдинова О.Л., Данилова А.Б., Данилов А.О., Зуева Е.В. — СПб, 2011. — 23 с.