



Современные подходы к оценке качества, проведению доклинических и клинических исследований дендритно-клеточных вакцин в онкологии

Т.Л. Нехаева^{1,✉}, А.А. Камалетдинова², М.Ф. Лутфуллин², Т.В. Табанская³

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Ленинградская, д. 68, пос. Песочный, Санкт-Петербург, 197758, Российская Федерация

² Министерство здравоохранения Российской Федерации, Рахмановский пер., д. 3/25, стр. 1–4, Москва, ГСП-4, 127994, Российская Федерация

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ Нехаева Татьяна Леонидовна; nehaevat151274@mail.ru

Резюме

На сегодняшний день применение персонализированных методов клеточной иммунотерапии злокачественных новообразований рассматривается как перспективный подход к лечению опухолей, а эффективность этих методов оценивается в контексте клинико-биологических характеристик опухоли и состояния иммунной системы конкретного пациента. Одним из вариантов иммунотерапии является разработка аутологичных противоопухолевых вакцин на основе дендритных клеток.

Цель работы — анализ современных методологических подходов к оценке качества, эффективности и безопасности противоопухолевых вакцин на основе дендритных клеток. В обзоре приведено описание функциональной роли дендритных клеток в регуляции иммунного ответа, а также проведен анализ данных литературы, посвященных современным подходам получения дендритно-клеточных вакцин с заданными характеристиками, оценке качества, изучению противоопухолевой эффективности клеточного препарата, а также опыту проведения доклинических и клинических исследований. Освещены специфические аспекты международного опыта регистрации и клинического применения клеточных препаратов. В обзоре обсуждены методологические подходы к проведению доклинических исследований дендритно-клеточных вакцин, которые должны быть нацелены на получение сведений для выбора дозы, обоснования пути введения, режима применения клеточных препаратов, а также идентификации иммунологических маркеров, коррелирующих с клинической эффективностью. Рассмотрен международный опыт проведения клинических исследований дендритно-клеточных вакцин при различных злокачественных новообразованиях. Предложен перечень показателей качества клеточных препаратов на основе соматических клеток человека для их дальнейшего использования в клинической практике.

Ключевые слова: дендритно-клеточная вакцина; доклинические исследования; клинические исследования; оценка качества; модели *in vitro*; модели *in vivo*

Для цитирования: Нехаева Т.Л., Камалетдинова А.А., Лутфуллин М.Ф., Табанская Т.В. Современные подходы к оценке качества, проведению доклинических и клинических исследований дендритно-клеточных вакцин в онкологии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(2):148–161. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-2-148-161>

© Т.Л. Нехаева, А.А. Камалетдинова, М.Ф. Лутфуллин, Т.В. Табанская, 2023

Current approaches to quality assessment, non-clinical and clinical studies of dendritic cell vaccines in oncology

T.L. Nekhaeva¹✉, A.A. Kamaletdinova², M.F. Lutfullin², T.V. Tabanskaya³

¹ N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, 68 Leningradskaya St., Pesochny, St Petersburg 197758, Russian Federation

² Ministry of Health of the Russian Federation, 3/25 Rakhmanovsky Ln., bld. 1–4, Moscow 127994, Russian Federation

³ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ Tatiana L. Nekhaeva; nehaevat151274@mail.ru

Abstract

At present, personalised cellular immunotherapy is considered a promising approach to the treatment of malignant neoplasms. The effectiveness of these cellular immunotherapy methods is evaluated in the context of clinical and biological tumour characteristics and the state of the immune system of a particular patient. One of the immunotherapy options for cancer is the development of autologous dendritic cell vaccines.

The aim of this study was to analyse current methodological approaches to the evaluation of the quality, efficacy, and safety of dendritic cell cancer vaccines.

This review describes the functional role of dendritic cells in immune response regulation. The paper presents the results of literature analysis covering current approaches to obtaining dendritic cell vaccines with specific characteristics, quality assessment, studies of the anti-tumour efficacy of cell therapy products, and the experience of conducting non-clinical and clinical studies. The review highlights specific aspects of international experience in the registration and clinical use of cell therapy products. The authors discuss methodological approaches to non-clinical studies of dendritic cell vaccines, which should aim to obtain information to select the dose, route, and mode of administration and to identify immunological markers correlating to the clinical efficacy of cell therapy products. The paper covers international experience in conducting clinical trials of dendritic cell vaccines for various malignant neoplasms. The authors propose a list of quality attributes of human somatic cell-based medicinal products for further clinical use.

Key words:

dendritic cell vaccine; non-clinical studies; clinical trials; quality assessment; *in vitro* models; *in vivo* models

For citation:

Nekhaeva T.L., Kamaletdinova A.A., Lutfullin M.F., Tabanskaya T.V. Current approaches to quality assessment, non-clinical and clinical studies of dendritic cell vaccines in oncology. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(2):148–161. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-2-148-161>

Введение

Одним из современных иммунотерапевтических подходов, вызывающих повышенное внимание исследователей, является использование противоопухолевых вакцин. Механизм действия этих препаратов заключается в иммунизации пациента опухоль-ассоциированными антигенами (ОАА), что приводит к активации адаптивного иммунного ответа, нацеленного на опухолевые клетки [1]. В настоящее время разрабатываются различные виды противоопухолевых вакцин – на основе пептидов,

опухолевых клеток, экзосом. Однако наиболее перспективной представляется разработка дендритно-клеточных вакцин (ДКВ), в основе которых лежит способность дендритных клеток (ДК) представлять антиген Т-лимфоцитам, вызывать их активацию и инициировать противоопухолевый иммунный ответ [1–3].

Впервые идея о возможности использования ДК для лечения злокачественных опухолей была высказана в 1990-х годах, когда в эксперименте на лабораторных животных была показана возможность выделения этих клеток,

их активации опухолевыми антигенами *ex vivo* и формирования противоопухолевого ответа на модели мышей с инокулированными опухолевыми клетками [4]. В других ранних работах по ДК описано их применение для нагрузки пептидами папилломавируса человека или синтетическими пептидами, что вызывало развитие противоопухолевого ответа, главным образом опосредованного Т-лимфоцитами [5]. В дальнейших исследованиях было показано, что формирующийся Т-клеточный иммунный ответ специфичен к антигену, используемому для нагрузки. Результаты первых пилотных клинических исследований (КИ) применения ДКВ, проведенные с включением пациентов с фолликулярной В-клеточной лимфомой, множественной миеломой, меланомой и различными злокачественными новообразованиями (ЗНО) с экспрессией раково-тестикулярных антигенов, показали, что данный подход безопасен и вызывает опухолеспецифический иммунный ответ [6].

Для формирования противоопухолевого иммунного ответа ДКВ необходимо обеспечить способность ДК к миграции и индукции трех сигналов, необходимых для активации Т-лимфоцитов: перекрестной презентации антигена, взаимодействию с костимулирующими молекулами и поляризации Т-лимфоцитов путем продукции цитокинов [1, 7]. Различные типы ДК могут быть пригодны для клинического применения: выделенные из периферической крови; выращенные *ex vivo* из их CD34⁺ костномозговых предшественников; полученные из моноцитов периферической крови; зрелые и незрелые [8].

В настоящее время существует множество стратегий создания противоопухолевых ДКВ с заданными характеристиками, однако есть несколько общих основных шагов в разработке этих клеточных препаратов. Как правило, первым этапом получения ДК является выделение предшественников этих клеток (например, моноцитов из периферической крови или CD34⁺ клеток из костного мозга), затем проводят их дифференцировку *in vitro* путем инкубации с цитокинами – гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) и интерлейкином-4 (IL-4) или Flt3 лигандом [1]. Далее ДК нагружают одним или несколькими опухолевыми антигенами, для чего клетки инкубируют с лизатом или внеклеточными экзосомами опухолевых клеток, белками или пептидами, подобранными для определенных молекул главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, MHC) [1, 3]. Другим подходом являет-

ся электропорация ДК с использованием мРНК, кодирующей различные опухолевые антигены. Разные методы нагрузки ДК имеют свои преимущества и недостатки. Однако наиболее перспективными являются вакцины, полученные с использованием нагрузки лизатом инактивированных опухолевых клеток, подверженных иммуногенной клеточной гибели [3, 9]. На заключительном этапе обеспечивают созревание ДК *in vitro*, чтобы получить антигенпрезентирующие клетки (АПК), способные активировать Т-лимфоциты. Для этого ДК инкубируют с различными комбинациями провоспалительных цитокинов (например, TNF- α , IL-1 β и IL-6), часто с добавлением простагландина E2, липополисахарида, CD40L, интерферонов (IFN), агонистов Толл-подобных рецепторов (toll-like receptor, TLR), например poly-ICLC [10]. В результате этих воздействий полученные ДК обладают высоким уровнем экспрессии молекул для активации лимфоцитов (MHC класса I и II, CD80, CD86), рецепторов, необходимых для миграции в лимфатические узлы (например, CCR7), и секретируют цитокины для поляризации лимфоцитов (например, IL-12) [1]. Однако есть протоколы получения ДКВ и их использования в КИ в виде незрелых ДК, например вакциноterapia костномозговыми предшественниками ДК, сенсibilizированными фотомодифицированными опухолевыми клетками [11].

Внедрение в клиническую практику клеточного препарата возможно только при условии подробного изучения специфической активности и безопасности на этапе экспериментальных исследований. Соответственно, получение ДКВ с заданными характеристиками, способных индуцировать противоопухолевый иммунный ответ, требует контроля этих характеристик, изучения противоопухолевой эффективности полученного клеточного препарата, а также идентификации и оценки рисков при планировании доклинического и клинического исследования.

Цель работы – анализ современных методологических подходов к оценке качества, эффективности и безопасности противоопухолевых вакцин на основе дендритных клеток.

Функциональная роль дендритных клеток в регуляции иммунного ответа

В зависимости от происхождения ДК разделяют на следующие типы.

1. Классические, или «конвенциональные», ДК (classical/conventional dendritic cell, cDC): происходят от общего предшественника ДК в костном мозге, экспрессируют CD11c. Их можно разделить на субпопуляции.

- Классические ДК 1 типа (сDC1): развиваются под контролем транскрипционных факторов IRF8, ID2 и BATF3; характеризуются экспрессией CD141 [12]. Основная функция этих клеток при ЗНО – презентация антигенов CD8⁺ Т-лимфоцитам и их активация, но также они могут активировать и CD4⁺ Т-клетки. Под действием IFN I типа или IFN-γ классические ДК 1 типа могут секретировать хемокины CXCL9 или CXCL1, которые привлекают CXCR3⁺ эффекторы (например, NK-клетки) [12].
- Классические ДК 2 типа (сDC2): развиваются под контролем транскрипционных факторов IRF4, ID2, ZEB2 и Notch2/KLF4; характеризуются экспрессией CD1c; при ЗНО презентуют антигены CD4⁺ Т-лимфоцитам [12].

2. Плазмоцитоподобные ДК (plasmacytoid dendritic cell, pDC): происходят как от общего предшественника ДК, так и от лимфоидных предшественников [13]. Эти клетки экспрессируют CD123, CD303 (BDCA2), CD304 (BDCA4) и иммуноглобулин-подобный транскрипт (ILT7); демонстрируют выраженную экспрессию IFN I типа; помимо адаптивного иммунного ответа способны индуцировать миграцию и активацию NK-клеток, созревание макрофагов и ДК [13]. Однако также есть данные о проопухолевой активности pDC.

3. Воспалительные, или моноцитарные, ДК (monocyte-derived dendritic cell, moDC): появляются только при воспалении, когда экспрессия CCR2 в тканях способствует привлечению моноцитов и их дифференцировке в ДК.

Одной из важных характеристик ДК как профессиональных АПК является их способность представлять захваченные экзогенные антигены в контексте молекул как МНС II класса, так и МНС I класса, которые в случае других ядродержащих клеток образуют комплексы с эндогенными антигенами [12, 14]. Эта особенность ДК, называемая кросс-презентацией, или перекрестной презентацией, необходима для формирования иммунитета к вирусам, внутриклеточным бактериям и злокачественным клеткам [12]. Опухолевые антигены, связанные с молекулами МНС I класса и представленные на поверхности ДК, распознаются наивными антиген-специфическими CD8⁺ Т-лимфоцитами, что приводит к их пролиферации и индукции цитотоксической активности с последующей элиминацией злокачественных клеток, несущих данные антигены. С другой стороны, антигены в комплексе с молекулами МНС II класса распознаются наивными антиген-специфическими

CD4⁺ Т-хелперами, которые в случае секреции ДК необходимых цитокинов приобретают фенотип Т-хелперов 1 типа (Th1) и способствуют индукции противоопухолевых цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) [14].

После взаимодействия Т-клеточного рецептора (T-cell receptor, TCR) и МНС в Т-лимфоцитах инициируется процесс активации и дифференцировки, известный как праймирование Т-клеток, после чего они мигрируют в опухоль, где ЦТЛ оказывают цитотоксическое противоопухолевое действие при поддержке Т-хелперов [12]. Однако для активации эффективного антигенспецифического противоопухолевого ответа, опосредованного ЦТЛ, необходима секреция ДК цитокинов, основным среди которых является IL-12 [1]. Продукция ДК цитокина IL-12 зависит от двух сигналов – один индуцируется CD40 или TLR, другой связан с IFN-γ. Под действием IL-12 происходит праймирование CD8⁺ Т-лимфоцитов и превращение их в цитотоксические эффекторы, а также поляризация наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов в сторону Т-хелперов 1 типа [1, 12, 15]. Секреция IL-12 является третьим сигналом, который наряду с кросс-презентацией антигена и экспрессией костимулирующих молекул индуцирует адаптивный клеточный ответ при ЗНО [1]. Кроме того, секреция IL-12 ДК способствует активации NK-клеток, участвующих в неспецифической элиминации опухолевых клеток [16].

Тогда как поляризация Т-хелперов в сторону Th1 происходит под действием IL-12, поляризации в направлении Th2 способствует секреция IL-4. В норме она осуществляется, главным образом, с участием классических ДК 2 типа и необходима для формирования иммунного ответа на внеклеточные патогены, паразитарные антигены и аллергены. Однако преобладание Th2 в опухолевом микроокружении приводит к недостаточной эффективности цитотоксического клеточного иммунного ответа, элиминирующего злокачественные клетки [14].

Методологические подходы к изучению дендритно-клеточных вакцин *in vitro* и *in vivo*

Доклинические исследования являются необходимым этапом разработки клеточных препаратов, в том числе ДКВ, и включают оценку эффективности, безопасности и биораспределения изучаемого клеточного препарата [17, 18]. В настоящее время наблюдается разрыв между фундаментальными исследованиями и клиническим применением полученных результатов. Несмотря на многочисленные попытки решения

этой проблемы, существенными препятствиями к внедрению новых терапевтических подходов остаются низкая воспроизводимость и применимость доклинических результатов в клинической практике. Одним из подходов для преодоления этих препятствий является создание релевантных моделей [17, 19, 20].

Модели *in vitro* (2D-модели, 3D-модели)

Для оценки способности ДКВ активировать антигенспецифические Т-лимфоциты и вызывать их пролиферацию используются подходы *in vitro*. Долгое время «золотым стандартом» определения функциональной активности ДКВ считался метод смешанной культуры лимфоцитов, однако он не отражал всех аспектов взаимодействия ДК и Т-клеток [21]. В настоящее время широко используется метод анализа молекул костимуляции («COSTIM bioassay») с применением анти-CD3 антител для субоптимальной стимуляции Т-лимфоцитов [21], который был валидирован для оценки эффективности ДКВ и может использоваться в КИ. Основой этих методов является количественная оценка пролиферации Т-лимфоцитов, которую ранее определяли с помощью радиоактивного ³H-тимидина. Сейчас существует более простой метод окрашивания клеток красителем сукцинимидиловым эфиром карбоксифлуоресцеин-диацетата (carboxyfluorescein succinimidyl ester, CFSE), содержание которого измеряется с помощью проточной цитофлуориметрии. Другим подходом к оценке специфического противоопухолевого иммунного ответа является определение цитотоксической активности CD8⁺ Т-лимфоцитов, для чего оценивают уровень разрушения (лизиса) опухолевых клеток ЦТЛ или секрецию ими цитотоксических медиаторов (IL-2, IFN- γ , TNF- α) [22]. Эффекторные CD8⁺ Т-лимфоциты реализуют свою функцию с помощью цитолитических белков, содержащихся в литических гранулах (гранзимы, перфорины) [23].

Для оценки противоопухолевой эффективности ДКВ в ходе доклинических исследований необходима разработка моделей ЗНО *in vitro* с использованием опухолевых клеточных линий [20, 24]. Долгое время они считались «золотым стандартом» благодаря их доступности и простоте использования, неограниченной способности к пролиферации, а также отсутствию этических ограничений [24]. Однако показано, что свойства клеточных линий часто не соответствуют характеристикам опухоли *in vivo* [25]. Клеточные линии демонстрируют низкую гетерогенность и фенотип, отличный от исходного фенотипа клеток ЗНО, а при дли-

тельном культивировании могут накапливать генетические аберрации [24]. В связи с этим активно развиваются методы получения первичных опухолевых культур и клеточных линий пациентов, которые сохраняют исходный уникальный фенотип и могут использоваться в доклинических исследованиях и персонализированной медицине [24, 25].

Первичные культуры получают из фрагмента опухоли пациента, извлеченного при биопсии или хирургическом вмешательстве, который подвергают ферментативной или механической диссоциации до отдельных клеток, а затем культивируют *in vitro* и используют для оценки различных терапевтических подходов. В некоторых случаях из первичной культуры удается получить стабильную клеточную линию [24, 25]. Тем не менее для некоторых опухолей клеточные линии отсутствуют, что может быть связано со сложностью выделения и/или длительного поддержания культуры *in vitro*, а также с изменением фенотипа в культуре, связанным с генетической нестабильностью [26]. В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России создан Банк клеточных линий солидных опухолей однотипно пролеченных пациентов (из фрагментов опухолей 917 пациентов). Доля жизнеспособных клеточных линий на пятом пассаже составляла 60,9%, а после 40–45 пассажа доля клеточных линий со стабильными пролиферативными характеристиками и секреторным фенотипом была равна лишь 21,5%. В работе А.Б. Даниловой с соавт. [27] отмечена важность строгой воспроизводимости условий культивирования и постоянный контроль функциональных параметров опухолевых клеток.

Для оценки противоопухолевого эффекта ДКВ *in vitro* разрабатываются многокомпонентные (гетеротипические) модели, включающие помимо опухолевых клеток эффекторные Т-лимфоциты. В работе P.V. Pham с соавт. [28] зрелые ДК, нагруженные лизатом стволовых клеток рака молочной железы (РМЖ), инкубировали с Т-клетками, а затем добавляли эту клеточную суспензию к монослою опухолевых клеток. Для оценки цитотоксического эффекта праймированных лимфоцитов использовали анализатор клеток в реальном времени xCELLigence (Agilent Technologies, США), измеряя снижение пролиферации клеток РМЖ [28].

Одной из причин неприменимости результатов доклинических исследований в клинике является использование в качестве моделей достаточно простых биологических объектов, не учитывающих комплексные взаимодействия в организме [19]. Хотя двумерные *in vitro*

модели являются относительно недорогими и простыми в использовании, они не способны имитировать процесс роста солидных опухолей *in vivo*, их структуру и гетерогенность, сложные пространственные взаимодействия между злокачественными клетками и микроокружением (включая внеклеточный матрикс), градиент питательных веществ, экспрессию генов и белков [25, 26]. В связи с этим исследования, проведенные с использованием 2D-моделей, часто приводят к противоречивым результатам [26], поэтому на сегодняшний день разработано несколько подходов к получению 3D-моделей опухоли.

Одним из таких подходов является создание сфероидов из отдельных опухолевых клеток – агрегатов сферической формы, способных к самоорганизации и самообновлению [25, 26, 29]. Эти трехмерные модели опухоли широко используются для определения эффективности различных методов противоопухолевой терапии, включая химиотерапию, фотодинамическую терапию и иммунотерапию. Процесс формирования сфероида соответствует фазам роста опухоли *in vivo*, наличие гипоксического ядра имитирует состояние участков опухоли, не получающих достаточного кровоснабжения, с характерными особенностями метаболизма и секрецией соответствующих факторов, а накопление компонентов внеклеточного матрикса в сфероиде приводит к его уплотнению и снижению проницаемости, позволяя моделировать взаимодействия клеток опухоли с матриксом [25, 29].

Помимо злокачественных клеток в состав сфероидов могут быть включены эндотелиоциты, клетки стромы и иммунной системы, что позволяет изучать роль различных компонентов микроокружения в развитии и прогрессировании опухоли [26, 29]. Поскольку гетеротипическая 3D-модель имитирует комплексные взаимодействия опухоли и иммунной системы, она может использоваться для оценки эффективности иммунотерапевтических подходов. В работе T. Courau с соавт. [30] на модели, включавшей клетки колоректального рака и мононуклеарные клетки периферической крови, была изучена инфильтрация сфероида Т-лимфоцитами и НК-клетками и показано его иммуноопосредованное разрушение. В исследовании E. Gottfried с соавт. [31] было оценено влияние типа опухоли на фенотип ДК в 3D-модели и показана роль лактата в дифференцировке этих клеток. N. Etminan с соавт. [32] использовали сфероиды клеток глиомы для изучения созревания и миграции ДК.

Применение опухолевых сфероидов имеет ограничения, связанные с неспособностью некоторых опухолевых клеток формировать трехмерные структуры *in vitro*, а также сложностями поддержания одинакового размера и соотношения различных клеток в составе сфероида. Кроме того, сфероиды, искусственно созданные *in vitro*, не вполне точно повторяют структуру опухолевой ткани. Применение органоидов, являющихся фрагментами первичной опухолевой ткани, сохраняющих структуру, морфологию, состав стромы и гетерогенность исходной опухоли, позволяет персонализировать поиск терапевтических подходов *in vitro* [26, 29]. Показана возможность трансплантации органоидов мышам с формированием гистологически аналогичной опухоли [26].

Для оценки эффективности различных онкоиммунологических подходов для противоопухолевой терапии может использоваться сокультивирование органоидов с опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами или клетками периферической крови [33]. На этом основана персонифицированная опухолевая *ex vivo* модель CANscript (MitraBiotech, США), позволяющая изучать опухоль с сохранением ее морфологии в контексте индивидуального опухолевого микроокружения пациента, для чего фрагменты опухолевой ткани пациента культивируют в аутологичной плазме с аутологичными мононуклеарными клетками периферической крови.

Перспективным подходом к созданию 3D-моделей опухоли считается метод трехмерной биопечати, при котором используют автоматизированное послойное нанесение опухолевых клеток и других компонентов микроокружения [34]. Хотя метод позволяет получить любую заданную архитектуру ткани, включая сосудистую сеть, остаются технические сложности, связанные с функционированием модели. Решением этой проблемы может быть использование микрофлюидных систем – устройств с микроскопическими камерами и каналами, позволяющими длительно культивировать клетки в условиях непрерывной подачи питательной среды. Кроме того, разрабатываются более сложные биотехнологические системы – «органы-на-чипе», состоящие из жестких и эластичных материалов, скаффолдов (матриц для культивирования), микрофлюидных систем и живых клеток различных типов [25]. С помощью этого метода созданы васкуляризированные модели меланомы кожи, рака легкого, почечно-клеточного рака, РМЖ, опухоли головного мозга и ряда других ЗНО, модели лимфоидной ткани, а также смодели-

лировано взаимодействие опухоли и иммунной системы [35].

Несмотря на сложность и высокую стоимость, микрофлюидные системы и «органы-на-чипе» активно внедряют в лабораторную практику для проведения доклинических исследований в онкоиммунологии [35]. Этот подход был использован для оценки эффективности генно-инженерных Т-лимфоцитов на 3D-модели рака печени, рака легкого и рака яичника [36]. В работе С. Frick с соавт. [37] использовали микрофлюидную 3D-модель для оценки миграции ДК в условиях строго контролируемых градиентов хемокинов в режиме реального времени. В исследовании S. Parlato с соавт. [38] с применением данной технологии была изучена не только миграция ДК, но и их взаимодействие с опухолевыми клетками и фагоцитоз.

Таким образом, современные биотехнологические подходы расширяют возможности использования *in vitro* моделей для проведения доклинических исследований иммунотерапевтических подходов в онкологии. Актуальной задачей остается разработка 3D-систем, позволяющих оценить противоопухолевую эффективность ДКВ в условиях, приближенных к условиям в организме человека. Однако, несмотря на успехи моделирования взаимодействий опухоли и иммунной системы *in vitro*, некоторые их аспекты могут быть воспроизведены только *in vivo* с использованием лабораторных животных.

Модели *in vivo*

Большая часть исследований противоопухолевых терапевтических подходов *in vivo* проводится на моделях с использованием мышей, среди которых выделяют автохтонные (спонтанные), канцероген-индуцированные и перевиваемые [39, 40]. Спонтанные опухолевые модели наиболее близко отражают процесс возникновения и развития опухоли у человека [41]. Существуют линии мышей, которые характеризуются высокой частотой спонтанного появления ЗНО, кроме того, в качестве автохтонных опухолевых моделей используются мыши с генетическими изменениями [39]. Однако работа с такими моделями затруднена в связи с длительным латентным периодом и вариабельной скоростью роста опухоли. Применение канцероген-индуцированных опухолевых моделей широко распространено и хорошо описано в литературе. Использование этой модели дает возможность подобрать метод индукции для ЗНО определенного типа и локализации, но не позволяет изучать мета-

стазирование опухоли и требует длительного наблюдения [42].

В доклинической разработке методов иммунотерапии ЗНО широко применяются сингенные перевиваемые мышинные модели благодаря иммуносовместимости трансплантируемых клеток с организмом реципиента. Существенным ограничением их применения являются отличия мышинных опухолевых клеточных линий от опухолевых клеток человека. Так, важной проблемой является статус экспрессии молекул МНС I класса, который необходимо учитывать при разработке иммунотерапевтических подходов. Кроме того, клетки мышинных опухолевых линий не экспрессируют гены опухолей человека и лишены гетерогенности [43]. Таким образом, хотя сингенная модель полезна для проведения доклинических исследований, она часто не отражает характеристики человеческих опухолей *in situ* и не может являться индикатором эффективности терапии у людей [41].

Использование ксенотрансплантации опухолевых клеток человека иммунодефицитным мышам позволяет избежать этих ограничений. Кроме того, в такой гуманизированной модели возможна трансплантация опухолевой ткани, полученной от пациента, с сохранением ее гетерогенности и биологических характеристик [43]. Современные биотехнологические методы позволяют создавать гуманизированные мышинные модели путем ксенотрансплантации как опухолевого, так и иммунного компонента и моделировать взаимодействие ЗНО и иммунной системы человека. Однако такой подход не учитывает комплексного взаимодействия опухоли с иммунной системой и неприменим для изучения ряда иммунотерапевтических методов лечения. Несмотря на указанные недостатки, возможность трансплантации опухолевой ткани пациента с индивидуальным мутационным ландшафтом в частично воспроизведенный компартмент человеческой иммунной системы открывает новые перспективы в изучении факторов, влияющих на эффективность иммунотерапии [41].

Исходя из особенностей клеточных препаратов, к которым относятся ДКВ, и их отличий от классических лекарственных препаратов, релевантными моделями *in vivo* можно считать гуманизированные модели или стратегию «гомологичный препарат», подразумевающую создание лекарственного препарата животного происхождения, аналогичного предназначенному для использования у человека [17, 18].

В работе J. Sprooten с соавт. [44] описано использование различных моделей *in vivo*

для оценки эффективности ДКВ в доклинических исследованиях. Часто для этой цели применялись сингенные модели с получением мышинных ДК и изучением их эффективности против мышинных опухолей. В исследовании S.K. Wculek с соавт. [45] выделяли классические ДК 1 типа из селезенки мышей, нагружали их лизатом опухолевых клеток, оценивали их способность индуцировать CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеточный ответ *in vivo* у мышей с перевиваемыми опухолями и обнаружили инфильтрацию опухолевых очагов Т-лимфоцитами и снижение скорости их прогрессирования. В работе S. Pellegatta с соавт. [46] на сингенной модели глиомы также было показано, что введение ДК, нагруженных лизатом клеток глиомы, вызывает измеримый противоопухолевый ответ. Применение сингенной модели глиомы 9L у крыс породы Вистар позволило продемонстрировать, что терапия ДК, нагруженными опухолевым антигеном, приводит к усилению инфильтрации опухоли CD4⁺/CD8⁺ Т-лимфоцитами и к увеличению выживаемости.

В работе Y. Kametani с соавт. [47] обобщены современные данные об использовании гуманизированных моделей для оценки эффективности различных иммунотерапевтических подходов. В работе P.V. Pham с соавт. [28] использовали линию мышей с иммунодефицитом (NOD/SCID) для получения гуманизированной модели путем трансплантации человеческих гемопоэтических стволовых клеток и последующего введения мышам опухолевых стволовых клеток РМЖ. Вакцина на основе моноклеарных ДК, нагруженных лизатом опухолевых клеток, введенная мышам с последующей оценкой размера опухоли и выживаемости, продемонстрировала противоопухолевую эффективность [28]. В другом исследовании [48] на гуманизированной модели NOD/SCID IL-2Rg^{null} (NSG) мышей, которым трансплантировали человеческие моноклеарные клетки периферической крови, был показан Т-клеточный ответ после введения ДКВ, нагруженной антигеном меланомы MART-1, с использованием метода оценки уровня лизиса опухолевых клеток лимфоцитами *ex vivo*.

Отдельного внимания заслуживает разработка методов визуализации эффекта ДКВ *in vivo*. В работе B. Wang с соавт. [49] рассмотрены подходы к отслеживанию миграции ДКВ в реальном времени на мышинных моделях карциномы с использованием неинвазивных методов, включая ПЭТ и МРТ. Имеются данные о клиническом применении методов визуализации при использовании ДКВ у пациентов с меланомой [50].

Модели *in silico*

Одним из перспективных подходов к разработке противоопухолевой иммунотерапии, включая ДКВ, является моделирование *in silico* с использованием компьютерных технологий [51]. Для оценки эффектов введения ДКВ на мышах была создана математическая модель, которая согласуется с моделью меланомы мыши *in vivo*. На разработанной модели показано значение миграции ДК в лимфатические узлы для реализации противоопухолевого иммунного ответа. L.R. Dickman с соавт. [52] изучили роль временных показателей иммунного ответа на эффективность вакцинации ДК; созданная модель была валидирована *in vivo* на мышах с индуцированной меланомой. В исследовании F. Rappalardo с соавт. [53] была разработана вычислительная модель формирования иммунного ответа на введение ДКВ с учетом роли активированных ЦТЛ и Т-клеток памяти. Выбор молекулярных мишеней для оптимизации вакцинотерапии на основе ДК был проведен X. Lai с соавт. с использованием многоуровневого вычислительного моделирования [54]. Однако следует отметить, что для мишеней, определенных этим методом, требуется дополнительная проверка в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Доклинические исследования являются необходимым этапом разработки лекарственных препаратов на основе соматических клеток, включая иммунотерапевтические клеточные препараты, за которым следует клиническая оценка безопасности и эффективности.

Клинические исследования дендритноклеточных вакцин

К настоящему времени уже накоплен опыт клинического применения ДКВ при различных ЗНО, среди которых меланома, глиомы, саркомы, рак яичников, мочевого пузыря, почки, поджелудочной железы, гепатоцеллюлярная карцинома, рак предстательной железы (РПЖ), РМЖ, немелкоклеточный рак легкого, колоректальный рак, острый миелоидный лейкоз, лимфомы и др. [44, 55, 56]. Для большинства опухолей ДКВ изучаются в КИ I–II фазы; при РПЖ на настоящий момент завершены исследования III фазы. В нескольких КИ III фазы продолжается изучение ДКВ при глиобластоме, увеальной меланоме и меланоме кожи и раке почки [44, 56]. В метаанализе была показана эффективность ДКВ при глиобластоме, однако при впервые диагностированном данном ЗНО эффекта выявлено не было [57]. Согласно результатам метаанализа, проведенного на пациентах с гепатоцеллюлярной карциномой, получивших ДКВ, показано увеличение общей

выживаемости и выживаемости без прогрессирования [58]. По данным метаанализа, включавшего результаты 6 нерандомизированных КИ вакцинотерапии РПЖ, терапевтический эффект ДКВ не выявлен [59]. В большинстве исследований продемонстрирована безопасность вакцинотерапии у онкологических пациентов, а в ряде случаев было показано развитие иммунного ответа после введения ДКВ [58, 59].

Первой ДКВ, одобренной Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA, США), является Sipuleucel-T (Provenge®, Dendreon, США). Вакцина представляет собой аутологичные мононуклеарные клетки, включающие АПК (в том числе ДК), нагруженные таргетным антигеном PAP (prostatic acid phosphatase), который считается опухолеспецифическим для опухолевых клеток РПЖ [60]. Были проведены КИ I, II и III фаз, подтверждающие безопасность и эффективность препарата Sipuleucel-T при РПЖ. Применение этой вакцины позволило увеличить общую выживаемость на 4,1 месяца и улучшить трехлетнюю выживаемость на 8,7% у пациентов с кастрационно-резистентным метастатическим РПЖ [61]. Примерами других ДКВ, официально используемых в клинической практике, являются препарат APCEDEN® (APAC Biotech, Индия) для лечения РПЖ, рака яичников, немелкоклеточного рака легких и колоректального рака [62] и препарат CreaVax-RCC (JW CreaGene, Республика Корея) для лечения метастатической карциномы почек. Препарат DCVax®-L (Northwest Biotherapeutics, США) проходит КИ III фазы у пациентов после хирургического удаления глиобластомы в сочетании с лучевой и химиотерапией [63].

Хотя многочисленные КИ продемонстрировали безопасность и иммуногенность ДКВ, их противоопухолевая эффективность была недостаточно высокой [1, 9]. Это может быть связано с недостаточной функциональной активностью ДК, полученных *ex vivo* и входящих в состав вакцин. Поскольку стадии созревания ДК и их нагрузки антигеном *in vivo* не в полной мере воспроизводимы при производстве ДКВ, возможно нарушение функциональных свойств ДК, таких как миграция, презентация антигена и продукция цитокинов [1]. Решением проблемы может быть разработка оптимальных протоколов получения зрелых ДК *ex vivo* и их нагрузки опухолевыми антигенами, обеспечивающих максимальное соответствие ДКВ характеристикам, необходимым для индукции выраженного опухолеспецифического иммунного ответа.

Клинические и доклинические исследования показали, что менее 5% введенных ДК достигают лимфатического узла [1]. Поскольку известно, что миграция ДК в лимфоузлы обусловлена наличием рецептора CCR7, возможным подходом к увеличению эффективности ДКВ является повышение экспрессии этого рецептора путем инкубации с растворимыми факторами или с помощью генно-инженерных конструкций, а также непосредственное воздействие на сигнальные пути, связанные с CCR7 [64]. Другим возможным подходом является введение ДК непосредственно в дренирующий лимфатический узел, так как показано, что при внутривенном введении ДК оседают в легочной ткани, печени, селезенке и не определяются в опухоли и лимфатических узлах [3]. Для повышения эффективности ДКВ обязательным фактором является оптимизация условий созревания клеток, нацеленная на усиление кросс-презентации антигена, увеличение экспрессии костимулирующих молекул и повышение секреции цитокинов для активации Т-лимфоцитов. Возможные стратегии заключаются в подборе растворимых факторов с учетом сигнальных путей, задействованных в созревании ДК, и создании генно-модифицированных ДК с заданными характеристиками [65].

Способность к презентации антигена, миграции и секреции цитокинов различается в зависимости от типа ДК. В связи с этим выбор типа клеток является решающим параметром при разработке ДКВ [1]. Хотя наилучшим кандидатом для иммунотерапии являются классические ДК 1 типа, в настоящее время в большинстве вакцин используются моноцитарные ДК [15]. Результаты исследований показали, что эти клетки обладают ограниченной способностью к кросс-презентации антигенов и миграции в лимфатические узлы. Кроме того, даже если *ex vivo* ДК моноцитарного происхождения приобрели свойства, характерные для классических ДК 2 типа, в иммуносупрессивном микроокружении эти свойства могут быть утрачены [16]. Следует отметить, что для использования в производстве ДКВ классических ДК 1 типа есть существенные ограничения: их содержание в крови составляет менее 1%, при этом данный тип клеток трудно получить методами *ex vivo* таким образом, чтобы сохранился их функциональный фенотип [12].

В исследовании E. Hlavackova с соавт. [66] было показано, что предшествующее применение некоторых комбинаций противоопухолевых препаратов (темозоломид + иринотекан, пазопаниб + топотекан + циклофосфамид) у пациентов перед отбором клеток негативно влияет

на созревание ДК и снижает их иммуностимулирующие свойства. Помимо изменения характеристик самих ДК, снижение эффективности ДКВ может также объясняться различными паттернами экспрессии антигенов, связанными с гетерогенностью опухоли, недостаточной инфильтрацией опухоли лимфоцитами и формированием различных иммуносупрессивных механизмов [10, 12, 66]. Это свидетельствует о необходимости тщательного подбора пациентов, которым показана иммунотерапия ДКВ, на основании клинических и молекулярных характеристик опухоли, состояния иммунной системы, а также с учетом уже проведенной терапии [3]. Более того, новые данные свидетельствуют о том, что сочетание применения ДКВ с другими методами противоопухолевой терапии может полностью раскрыть потенциал этого направления иммунотерапии и улучшить показатель выживаемости пациентов [44].

Для разработки и повышения эффективности инновационных терапевтических подходов к лечению ЗНО, включая иммунотерапию, необходимо изучение компонентов опухолевого микроокружения и их взаимодействия с малигнизированными клетками. Уникальные клиничко-биологические характеристики каждого ЗНО связаны с особенностями состава и функционирования микроокружения опухоли, что влияет на эффективность противоопухолевого иммунного ответа, ключевую роль в котором играют ДК. Накопленные знания о функциях и механизме действия ДК позволили разработать персонализированные противоопухолевые ДКВ, применение которых в настоящее время активно изучается у пациентов с различными ЗНО.

Нерешенной задачей иммунологических протоколов остается идентификация иммунологических маркеров, которые коррелируют с клинической эффективностью. Тщательный скрининг пациентов и более точная характеристика популяции, участвующей в КИ, необходимы для повышения эффективности исследуемых иммунотерапевтических подходов [19]. Для оценки противоопухолевого иммунитета традиционно используется определение количественного содержания и субпопуляционного состава клеток иммунной системы у онкологических пациентов. Присутствие эффекторных клеток в опухолевом очаге, их локализация и отсутствие иммуносупрессивных клеток связаны с успешной реализацией иммунного ответа [67]. Для обнаружения этих клеточных компонентов в опухоли используют гистологическое окрашивание и иммуногистохимические методы, позволяющие опреде-

лить субпопуляции клеток на основе экспрессии поверхностных маркеров.

Оценка специфического противоопухолевого иммунного ответа предполагает определение поляризации иммунного ответа в составе микроокружения в направлении противоопухолевого фенотипа, что связано с определенным профилем секреции цитокинов. В связи с этим для оценки взаимодействия опухоли и иммунной системы, а также для определения прогноза онкологического заболевания целесообразно определение цитокинового профиля пациентов с использованием проточной цитофлуориметрии (в том числе с применением внутриклеточного окрашивания), ИФА и его модификации ELISPOT (enzyme-linked immunospot assay), количественной ПЦР, а также мультиплексных иммунологических методов [22, 68]. Определение цитокинового профиля используют для оценки эффективности адаптивной Т-клеточной иммунотерапии, при этом важна роль баланса между IFN- γ и TGF- β [68]. Продукция цитокинов (IFN- γ , Gr- β , IL-4, TNF- α) опухолеспецифическими Т-лимфоцитами в ELISPOT-тесте, визуализация активированных Т-лимфоцитов при помощи проточного цитофлуориметрического анализа с использованием меченого комплекса пептид-МНС, который специфично связывается с Т-клеточным рецептором лимфоцита, и размеры реакции гиперчувствительности замедленного типа далеко не всегда связаны с регрессом опухоли. Отсутствие такой корреляции между иммунологической и клинической эффективностью ДКВ является одной из нерешенных проблем иммунотерапии злокачественных опухолей.

В настоящее время не существует универсальных подходов к тестированию клеточных препаратов на основе аутологичных ДК для обеспечения безопасности и эффективности их применения у онкологических пациентов. Основную сложность с точки зрения разработки клеточного препарата представляет собой обеспечение контроля качества ввиду малого размера серии продукта, а также отсутствия согласованного представления о номенклатуре и допустимых значениях показателей качества. Например, в КИ могут использоваться клеточные препараты, содержащие в одной дозе от $0,3 \times 10^6$ до 200×10^6 клеток [69]. Разработка индивидуального лекарственного препарата на основе соматических клеток потребует подбора эффективной дозы и соответствующего контроля качества данного продукта.

Более того, в Российской Федерации отсутствует нормативный документ, определяющий требования к показателям и методикам оценки

качества лекарственного препарата на основе соматических клеток. Для оценки качества могут быть использованы некоторые общие фармакопейные статьи Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд.¹ и других стран Европейского союза (ЕС)², Японии³, США⁴ и Республики Беларусь⁵ [70]. В рамках Федерального закона Российской Федерации № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах»⁶ необходимо обеспечить качество биомедицинского клеточного продукта, разработать нормативную документацию (спецификацию на ДКВ). Требования к качеству на этапе разработки ДКВ будут определяться предполагаемыми клиническими эффектами и показаниями к применению клеточного продукта [10].

Существует перечень показателей качества, которые характерны для всех видов клеточных продуктов. Например, для аутологичной ДКВ на основе раково-тестикулярных антигенов CaTeVac производства ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России основными показателями качества являются следующие: «Идентичность (подлинность)», «Специфическая активность», «Жизнеспособность клеток», «pH», «Стерильность» и др. Показатель «Идентичность (подлинность)» определяется методом проточной цитофлуориметрии по уровню экспрессии костимулирующих молекул (CD14/CD83⁺/CD80⁺/CD86⁺/HLA-DR⁺); по данному показателю ДК должны быть фенотипически зрелыми. Определение показателя «Специфическая активность» проводится по оценке специфичности пролиферации Т-лимфоцитов в присутствии вакцинных ДК. Показатель «Жизнеспособность клеток» определяется методом проточной цитометрии; в препарате должно быть более 70% живых клеток. Определение показателя «pH» проводится потенциометрическим методом; значение должно быть от 5 до 8. По показателю «Стерильность» клеточный препарат должен быть стерильным. Испытания проводят методом прямого посева с использованием только тиогликолевой среды при двух температурных режимах инкубирования 32,5±2,5 °С и 22,5±2,5 °С. Возможно определение бионагрузки с использованием VacT/Alert 3D. Показатель «Микоплазмы» определяют молекулярно-генетическим методом (ПЦР); в препарате микоплазмы должны

отсутствовать. Определение показателя «Бактериальные эндотоксины» проводится с использованием гель-тромб теста (метод А); значение показателя должно быть не более 30 ЕЭ/мл. Все методы оценки качества готового клеточного препарата должны быть научно обоснованы, валидированы и обеспечивать получение достоверных результатов.

Заключение

Проведен анализ современных подходов получения дендритно-клеточных вакцин с заданными характеристиками, оценки качества вакцин, изучения противоопухолевой эффективности клеточного препарата, а также опыта проведения доклинических и клинических исследований.

Показано, что степень зрелости дендритных клеток является ключевой характеристикой противоопухолевой специфической эффективности дендритно-клеточной вакцины, в связи с чем перечень показателей качества готового лекарственного препарата должен содержать в том числе подтверждение данной характеристики.

Среди релевантных моделей изучения противоопухолевой специфической эффективности дендритно-клеточных вакцин *in vitro* широко используются классические 2D-модели, а также существует устойчивый интерес к разработке 3D-моделей, приближенных к условиям организма. При этом модели *in vivo* остаются необходимыми для проверки концепции и установления фармакологической безопасности и изучения биораспределения клеточных препаратов. На этапе проведения клинических исследований актуальной задачей является поиск и валидация иммунологических маркеров, коррелирующих с клинической эффективностью.

В целом изучение мирового опыта проведения доклинических и клинических исследований дендритно-клеточных вакцин в онкологии может быть полезным для обоснования индивидуальных методологических подходов, что будет способствовать повышению качества получаемых в ходе исследований результатов и увеличит вероятность признания результатов научным сообществом и регуляторными органами.

¹ Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

² European Pharmacopoeia 10th ed.; 2020.

³ Japanese Pharmacopoeia 17th ed.; 2016.

⁴ USP 42-NF 37; 2019.

⁵ Государственная фармакопея Республики Беларусь. II изд.; 2013.

⁶ Федеральный закон Российской Федерации от 23.06.2016 № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах».

Литература/References

- Swartz AM, Hotchkiss KM, Nair SK, Sampson JH, Batich KA. Generation of tumor targeted dendritic cell vaccines with improved immunogenic and migratory phenotype. In: Thomas S, ed. *Vaccine Design. Methods in Molecular Biology*. Vol. 2410. New York: Humana; 2022. P. 609–27. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1884-4_33
- Нехаева ТЛ, Данилова АБ, Балдуева ИА. Изучение особенностей миграции дендритных клеток в экспериментальной аналитической системе CELL-IQ. *Сибирский онкологический журнал*. 2018;17(4):14–23. Nekhaeva TL, Danilova AB, Baldueva IA. Study of dendritic cell migration using CELL-IQ analysis system. *Siberian Journal of Oncology*. 2018;17(4):14–23 (In Russ.). <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2018-17-4-14-23>
- Harari A, Graciotti M, Bassani-Sternberg M, Kandalaf LE. Antitumor dendritic cell vaccination in a priming and boosting approach. *Nat Rev Drug Discov*. 2020;19(9):635–52. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0074-8>
- Flamand V, Sornasse T, Thielemans K, Demanet C, Bakkus M, Bazin H, et al. Murine dendritic cells pulsed *in vitro* with tumor antigen induce tumor resistance *in vivo*. *Eur J Immunol*. 1994;24(3):605–10. <https://doi.org/10.1002/eji.1830240317>
- Ossevoort MA, Feltkamp MC, van Veen KJ, Melief CJ, Kast WM. Dendritic cells as carriers for a cytotoxic T-lymphocyte epitope-based peptide vaccine in protection against a human papillomavirus type 16-induced tumor. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol*. 1995;18(2):86–94. <https://doi.org/10.1097/00002371-199508000-00002>
- Celluzzi CM, Mayordomo JI, Storkus WJ, Lotze MT, Falo LD Jr. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J Exp Med*. 1996;183(1):283–7. <https://doi.org/10.1084/jem.183.1.283>
- Нехаева ТЛ, Карпов АЕ, Пипиа НП. Поиск иммунотерапевтических мишеней в онкологии при формировании иммунного синапса. *Вопросы онкологии*. 2021;67(3):344–9. Nekhaeva TL, Karpov AE, Pipia NP. Searching for immunotherapeutic targets in oncology during immune synapse formation. *Problems in Oncology*. 2021;67(3):344–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2021-67-3-344-349>
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YI, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767–811. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.767>
- Vedunova M, Turubanova V, Vershinina O, Savyuk M, Efimova I, Mishchenko T, et al. DC vaccines loaded with glioma cells killed by photodynamic therapy induce Th17 anti-tumor immunity and provide a four-gene signature for glioma prognosis. *Cell Death Dis*. 2022;13:1062. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05514-0>
- Chiang CL, Balint K, Coukos G, Kandalaf LE. Potential approaches for more successful dendritic cell-based immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther*. 2015;15(4):569–82. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1000298>
- Моисеенко ВМ, Балдуева ИА, Гельфонд МЛ, Орлова РВ, Фахрутдинова ОЛ, Данилова АБ и др. Способ иммунотерапии костно-мозговыми предшественниками дендритных клеток, сенсibilизированных фотомодифицированными опухолевыми клетками *in vivo*, больных диссеминированными солидными опухолями. Патент Российской Федерации № 2376033; 2009. Moiseenko VM, Baldueva IA, Gelfond ML, Orlova RM, Fahrutdinova OL, Danilova AB, et al. Method of immunotherapy with bone-marrow precursors of dendrite cells, sensibilised with photomodified tumor cells *in vivo*, for patients disseminated with solid tumors. Patent of the Russian Federation No. 2376033; 2009 (In Russ.).
- Godoy-Tena G, Ballestar E. Epigenetics of dendritic cells in tumor immunology. *Cancers (Basel)*. 2022;14(5):1179. <https://doi.org/10.3390/cancers14051179>
- Fu C, Zhou L, Mi QS, Jiang A. Plasmacytoid dendritic cells and cancer immunotherapy. *Cells*. 2022;11(2):222. <https://doi.org/10.3390/cells11020222>
- Murphy TL, Murphy KM. Dendritic cells in cancer immunology. *Cell Mol Immunol*. 2022;19(1):3–13. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00741-5>
- Gardner A, de Mingo Pulido A, Ruffell B. Dendritic cells and their role in immunotherapy. *Front Immunol*. 2020;11:924. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00924>
- Noubade R, Majri-Morrison S, Tarbell KV. Beyond cDC1: Emerging roles of DC crosstalk in cancer immunity. *Front Immunol*. 2019;10:1014. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01014>
- Мельникова ЕВ, Меркулова ОВ, Чапленко АА, Меркулов ВА. Дизайн доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов: особенности, ключевые принципы и требования. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017;17(3):133–44. Melnikova EV, Merkulova OV, Chaplenko AA, Merkulov VA. Design of preclinical studies of biomedical cell products: characteristics, key principles and requirements. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2017;17(3):133–44 (In Russ.).
- Тихомирова АВ, Горячев ДВ, Меркулов ВА, Лысикова ИВ, Губенко АИ, Зебрев АИ и др. Доклинические и клинические аспекты разработки биомедицинских клеточных продуктов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2018;8(1):23–35. Tikhomirova AV, Goryachev DV, Merkulov VA, Lysikova IV, Gubenko AI, Zebrev AI, et al. Preclinical and clinical aspects of the development of biomedical cell products. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2018;8(1):23–35 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-1-23-35>
- Seyhan AA. Lost in translation: the valley of death across preclinical and clinical divide – identification of problems and overcoming obstacles. *Transl Med Commun*. 2019;4(1):18. <https://doi.org/10.1186/s41231-019-0050-7>
- Avdonkina NA, Danilova AB, Misyurin VA, Prosekina EA, Girdyuk DV, Emelyanova NV, et al. Biological features of tissue and bone sarcomas investigated using an *in vitro* model of clonal selection. *Pathol Res Pract*. 2021;217:153214. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2020.153214>
- Shankar G, Bader R, Lodge PA. The COSTIM bioassay: a novel potency test for dendritic cells. *J Immunol Methods*. 2004;285(2):293–9. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2003.12.008>
- Lamano JB, Ampie L, Choy W, Kesavabhotla K, DiDomenico JD, Oyon DE, et al. Immunomonitoring in glioma immunotherapy: current status and future perspectives. *J Neurooncol*. 2016;127(1):1–13. <https://doi.org/10.1007/s11060-015-2018-4>
- Cassiole C, Baldari CT. The expanding arsenal of cytotoxic T cells. *Front Immunol*. 2022;13:883010. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.883010>
- Richter M, Piwocka O, Musielak M, Piotrowski I, Suchorska WM, Trzeciak T. From donor to the lab: a fascinating journey of primary cell lines. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:711381. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.711381>
- Miserocchi G, Mercatali L, Liverani C, De Vita A, Spadazzi C, Pieri F, et al. Management and potentialities of primary cancer cultures in preclinical and translational studies. *J Transl Med*. 2017;15(1):229. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1328-z>
- Colella G, Fazioli F, Gallo M, De Chiara A, Apice G, Ruosi C, et al. Sarcoma spheroids and organoids – promising tools in the era of personalized medicine. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2):615. <https://doi.org/10.3390/ijms19020615>
- Данилова АБ, Нехаева ТЛ, Авдонкина НА, Просекина ЕА, Блохина МЛ, Емельянова НВ и др. Банк клеточных линий солидных опухолей однотипно пролеченных пациентов как основа клеточного моделирования в онкологии. *Материалы VI Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2020»*. СПб: Вопросы онкологии; 2020. С. 136. Danilova AB, Nekhaeva TL, Avdonkina NA, Prosekina EA, Blokhina ML, Emelyanova NV, et al. The bank of cell lines of solid tumors of similarly treated patients as the basis of cell modeling in oncology. *Materials of the VI St. Petersburg International Oncology Forum "White Nights 2020"*. St. Petersburg: Issues of Oncology; 2020. P. 136 (In Russ.).

28. Pham PV, Le HT, Vu BT, Pham VQ, Le PM, Phan NL, et al. Targeting breast cancer stem cells by dendritic cell vaccination in humanized mice with breast tumor: preliminary results. *Onco Targets Ther.* 2016;9:4441–51. <https://doi.org/10.2147/ott.s105239>
29. Paradiso F, Serpelloni S, Francis LW, Taraballi F. Mechanical studies of the third dimension in cancer: From 2D to 3D model. *Int J Mol Sci.* 2021;22(18):10098. <https://doi.org/10.3390/ijms221810098>
30. Courau T, Bonnereau J, Chicoteau J, Bottois H, Remark R, Assante Miranda L, et al. Cocultures of human colorectal tumor spheroids with immune cells reveal the therapeutic potential of MICA/B and NKG2A targeting for cancer treatment. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):74. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0553-9>
31. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Ebner S, Mueller-Klieser W, Hoves S, Andreesen R, et al. Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood.* 2006;107(5):2013–21. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-05-1795>
32. Etmann N, Peters C, Lakbir D, Bünemann E, Börger V, Sabel MC, et al. Heat-shock protein 70-dependent dendritic cell activation by 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic treatment of human glioblastoma spheroids *in vitro*. *Br J Cancer.* 2011;105(7):961–9. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.327>
33. Dijkstra KK, Cattaneo CM, Weeber F, Chalabi M, van de Haar J, Fanchi LF, et al. Generation of tumor-reactive T Cells by co-culture of peripheral blood lymphocytes and tumor organoids. *Cell.* 2018;174(6):1586–98.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.009>
34. Zhuang P, Chiang YH, Fernanda MS, He M. Using spheroids as building blocks towards 3D bioprinting of tumor microenvironment. *Int J Bioprint.* 2021;7(4):444. <https://doi.org/10.18063/ijbv.v7i4.444>
35. Maharjan S, Cecen B, Zhang YS. 3D immunocompetent organ-on-a-chip models. *Small Methods.* 2020;4(9):2000235. <https://doi.org/10.1002/smt.202000235>
36. Ando Y, Siegler EL, Ta HP, Cinay GE, Zhou H, Gorrell KA, et al. Evaluating CAR-T cell therapy in a hypoxic 3D tumor model. *Adv Healthc Mater.* 2019;8(5):e1900001. <https://doi.org/10.1002/adhm.201900001>
37. Frick C, Dettinger P, Renkawitz J, Jauch A, Berger CT, Recher M, et al. Nano-scale microfluidics to study 3D chemotaxis at the single cell level. *PLoS One.* 2018;13(6):e0198330. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198330>
38. Parlato S, De Ninno A, Molfetta R, Toschi E, Salerno D, Mencattini A, et al. 3D microfluidic model for evaluating immunotherapy efficacy by tracking dendritic cell behaviour toward tumor cells. *Sci Rep.* 2017;7(1):1093. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01013-x>
39. Нехаева ТЛ, Чернов АН, Торопова ЯГ, Галагудза ММ, Балдуева ИА. Разнообразие опухолевых моделей для тестирования противоопухолевой активности веществ у мышей. *Вопросы онкологии.* 2020;66(4):353–63. Nekhaeva TL, Chernov AN, Toropova YaG, Galagudza MM, Baldueva IA. Variety of tumor models for testing antitumor treatment activity of substances in mice. *Problems in Oncology.* 2020;66(4):353–63 (In Russ.).
40. Hardee S, Prasad ML, Hui P, Dinauer CA, Morotti RA. Pathologic characteristics, natural history, and prognostic implications of BRAF^{V600E} mutation in pediatric papillary thyroid carcinoma. *Pediatr Dev Pathol.* 2017;20(3):206–12. <https://doi.org/10.1177/1093526616689628>
41. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med.* 2018;24(5):541–50. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0014-x>
42. Kemp CJ. Animal models of chemical carcinogenesis: driving breakthroughs in cancer research for 100 years. *Cold Spring Harb Protoc.* 2015;2015(10):865–74. <https://doi.org/10.1101/pdb.top069906>
43. Saito R, Kobayashi T, Kashima S, Matsumoto K, Ogawa O. Faithful preclinical mouse models for better translation to bedside in the field of immuno-oncology. *Int J Clin Oncol.* 2020;25(5):831–41. <https://doi.org/10.1007/s10147-019-01520-z>
44. Sprooten J, Ceusters J, Coosemans A, Agostinis P, De Vleeschouwer S, Zitvogel L, et al. Trial watch: dendritic cell vaccination for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2019;8(11):e1638212. <https://doi.org/10.1080/2162402x.2019.1638212>
45. Wculek SK, Amores-Iniesta J, Conde-Garrosa R, Khouili SC, Melero I, Sancho D. Effective cancer immunotherapy by natural mouse conventional type-1 dendritic cells bearing dead tumor antigen. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):100. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0565-5>
46. Pellegatta S, Poliani PL, Corno D, Menghi F, Ghielmetti F, Suarez-Merino B, et al. Neurospheres enriched in cancer stem-like cells are highly effective in eliciting a dendritic cell-mediated immune response against malignant gliomas. *Cancer Res.* 2006;66(21):10247–52. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-06-2048>
47. Kametani Y, Ohno Y, Ohshima S, Tsuda B, Yasuda A, Seki T, et al. Humanized mice as an effective evaluation system for peptide vaccines and immune checkpoint inhibitors. *Int J Mol Sci.* 2019;20(24):6337. <https://doi.org/10.3390/ijms20246337>
48. Spranger S, Frankenberger B, Schendel DJ. NOD/scid IL-2Rg(null) mice: a preclinical model system to evaluate human dendritic cell-based vaccine strategies *in vivo*. *J Transl Med.* 2012;10:30. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-30>
49. Wang B, Sun C, Wang S, Shang N, Fignini M, Ma Q, et al. Image-guided dendritic cell-based vaccine immunotherapy in murine carcinoma models. *Am J Transl Res.* 2017;9(10):4564–73. PMID: 29118918
50. Mayer AT, Gambhir SS. The immunomaging toolbox. *J Nucl Med.* 2018;59(8):1174–82. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.185967>
51. Новик АВ, Гирдюк ДВ, Нехаева ТЛ, Емельянова НВ, Ефремова НА, Латипова ДХ и др. Модель прогнозирования прогрессирования солидной опухоли на фоне лекарственной терапии с применением методов искусственного интеллекта. *Эффективная фармакотерапия.* 2022;18(21):6–13. Novik AV, Girdyuk DV, Nekhaeva TL, Emelyanova NV, Efremova NA, Latipova DKh, et al. Progression prediction model of a solid tumor against the background of drug therapy using artificial intelligence methods. *Effective Pharmacotherapy.* 2022;18(21):6–13 (In Russ.).
52. Dickman LR, Kuang Y. Analysis of tumor-immune dynamics in a delayed dendritic cell therapy model. *Chaos.* 2020;30(11):113108. <https://doi.org/10.1063/5.0006567>
53. Pappalardo F, Pennisi M, Ricupito A, Topputo F, Bellone M. Induction of T-cell memory by a dendritic cell vaccine: a computational model. *Bioinformatics.* 2014;30(13):1884–91. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu059>
54. Lai X, Keller C, Santos G, Schaft N, Dörrie J, Vera J. Multi-level computational modeling of anti-cancer dendritic cell vaccination utilized to select molecular targets for therapy optimization. *Front Cell Dev Biol.* 2022;9:746359. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.746359>
55. Meng X, Sun X, Liu Z, He Y. A novel era of cancer/testis antigen in cancer immunotherapy. *Int Immunopharmacol.* 2021;98:107889. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107889>
56. Yu J, Sun H, Cao W, Song Y, Jiang Z. Research progress on dendritic cell vaccines in cancer immunotherapy. *Exp Hematol Oncol.* 2022;11(1):3. <https://doi.org/10.1186/s40164-022-00257-2>
57. Liu Z, Gao C, Tian J, Ma T, Cao X, Li A. The efficacy of dendritic cell vaccine for newly diagnosed glioblastoma: a meta-analysis of randomized controlled studies. *Neurochirurgie.* 2021;67(5):433–8. <https://doi.org/10.1016/j.neuchi.2021.04.011>
58. Chen C, Ma YH, Zhang YT, Zhang F, Zhou N, Wang X, et al. Effect of dendritic cell-based immunotherapy on hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Cytotherapy.* 2018;20(8):975–89. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2018.06.002>
59. Mohammadzadeh M, Shirmohammadi M, Ghojzadeh M, Nikniaz L, Raeisi M, Aghdas SAM. Dendritic cells pulsed with prostate-specific membrane antigen in metastatic

- castration-resistant prostate cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Prostate Int.* 2018;6(4):119–25. <https://doi.org/10.1016/j.pnrl.2018.04.001>
60. Handy CE, Antonarakis ES. Sipuleucel-T for the treatment of prostate cancer: novel insights and future directions. *Future Oncol.* 2018;14(10):907–17. <https://doi.org/10.2217/fon-2017-0531>
 61. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penzance DF, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med.* 2010;363(5):411–22. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1001294>
 62. Kumar C, Kohli S, Chiliveru S, Bapsy PP, Jain M, Suresh Atti VS, et al. A retrospective analysis comparing APCEDEN® dendritic cell immunotherapy with best supportive care in refractory cancer. *Immunotherapy.* 2017;9(11):889–97. <https://doi.org/10.2217/imt-2017-0064>
 63. Liau LM, Ashkan K, Tran DD, Campian JL, Trusheim JE, Cobbs CS, et al. First results on survival from a large Phase 3 clinical trial of an autologous dendritic cell vaccine in newly diagnosed glioblastoma. *J Transl Med.* 2018;16(1):142. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1507-6>
 64. Hong W, Yang B, He Q, Wang J, Weng Q. New insights of CCR7 signaling in dendritic cell migration and inflammatory diseases. *Front Pharmacol.* 2022;13:841687. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.841687>
 65. Perez CR, De Palma M. Engineering dendritic cell vaccines to improve cancer immunotherapy. *Nat Commun.* 2019;10(1):5408. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13368-y>
 66. Hlavackova E, Pilatova K, Cerna D, Selingerova I, Mudry P, Mazanek P, et al. Dendritic cell-based immunotherapy in advanced sarcoma and neuroblastoma pediatric patients: anti-cancer treatment preceding monocyte harvest impairs the immunostimulatory and antigen-presenting behavior of DCs and manufacturing process outcome. *Front Oncol.* 2019;9:1034. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01034>
 67. Fridman WH, Zitvogel L, Sautès-Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(12):717–34. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.101>
 68. Ramesh P, Shivde R, Jaishankar D, Saleiro D, Le Poole IC. A palette of cytokines to measure anti-tumor efficacy of T cell-based therapeutics. *Cancers (Basel).* 2021;13(4):821. <https://doi.org/10.3390/cancers13040821>
 69. Sabado RL, Balan S, Bhardwaj N. Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell Res.* 2017;27(1):74–95. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.157>
 70. Водякова МА, Сайфутдинова АР, Мельникова ЕВ, Олфир ЮВ. Сравнение требований фармакопей мира к качеству клеточных линий. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(3):159–73. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-159-173>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Т.Л. Нехаева** – идея, концепция, анализ и обобщение результатов мирового опыта по проведению доклинических и клинических исследований дендритно-клеточных вакцин в онкологии; **А.А. Камалетдинова** – критический анализ работы и редактирование текста рукописи; **М.Ф. Лутфуллин** – поиск литературных источников, анализ литературных данных, написание текста рукописи; **Т.В. Табанская** – обзор литературы, отбор публикаций, написание текста рукописи.

Благодарности. Работа выполнена в рамках научного проекта РНФ № 22-25-00723 по проведению фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **T.L. Nekhaeva** elaborated the study idea and concept, analysed and summarised international experience of non-clinical and clinical studies of dendritic cell vaccines in oncology. **A.A. Kamaletdinova** critically analysed the work and edited the manuscript. **M.F. Lutfullin** searched and analysed literature, drafted the manuscript. **T.V. Tabanskaya** reviewed literature, selected publications for the study, and drafted the manuscript.

Acknowledgements. The study was carried out as part of research project No. 22-25-00723 of the Russian Science Foundation (RSF) aimed at basic scientific research and exploratory scientific research.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Об авторах / Authors

Нехаева Татьяна Леонидовна, канд. мед. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7826-4861>
nehaevat151274@mail.ru

Камалетдинова Айсылу Абраровна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0807-6953>
KamaletdinovaAA@minzdrav.gov.ru

Лутфуллин Марсель Фанисович
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1484-6587>
LutfullinMF@minzdrav.gov.ru

Табанская Татьяна Валерьевна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7965-6050>
TabanskayaTV@minzdrav.gov.ru

Поступила 18.11.2022

После доработки 24.04.2023

Принята к публикации 07.06.2023

Tatiana L. Nekhaeva, Cand. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7826-4861>
nehaevat151274@mail.ru

Aisylu A. Kamaletdinova
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0807-6953>
KamaletdinovaAA@minzdrav.gov.ru

Marsel F. Lutfullin
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1484-6587>
LutfullinMF@minzdrav.gov.ru

Tatiana V. Tabanskaya
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7965-6050>
TabanskayaTV@minzdrav.gov.ru

Received 18 November 2022

Revised 24 April 2023

Accepted 7 June 2023