

# АДЬЮВАНТЫ В ВАКЦИНОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

М.А. Барышникова, В.С. Косоруков

ФБГУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Мария Анатольевна Барышникова [ma\\_b@mail.ru](mailto:ma_b@mail.ru)

Адьюванты — важные составляющие противоопухолевых вакцин, поскольку они усиливают иммунные ответы на вакцинацию. Однако разрешенные к применению адьюванты, например соли алюминия, недостаточно эффективно стимулируют иммунный ответ. Поиск и изучение свойств новых адьювантов, часто сочетающих в себе функции стимуляторов иммунитета с доставкой антигена к иммунным клеткам, на сегодняшний день являются актуальными задачами иммунотерапии. Клинические испытания иммуностимулирующих веществ, в частности лигандов Толл-лайк рецепторов (TLR), выявили их терапевтический потенциал не только как противоопухолевых агентов, но и как адьювантов к вакцинам.

**Ключевые слова:** вакцинация, неоантигены, адьюванты, лиганды TLR

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-36-44

## CANCER VACCINE ADJUVANTS

M.A. Baryshnikova, V.S. Kosorukov

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Adjuvants are important components of cancer vaccines because they enhance immune responses to vaccination. However, adjuvants licensed for clinical use, e. g. aluminum salts, fail to stimulate an effective immune response. Research and development of new adjuvants with combined functions, including immune stimulation and antigen delivery, are a vital task for antitumor immunotherapy. Clinical trials of immune stimulating compounds, in particular Toll-like receptor (TLR) ligands, reveal their therapeutic potential as both antitumor agents and vaccine adjuvants.

**Key words:** cancer vaccine therapy, neoantigens, adjuvants, TLR ligands

### Введение

Несмотря на интенсивные исследования рака и развитие новых эффективных методов терапии, онкологические заболевания остаются одной из главных проблем здравоохранения, поражая миллионы людей во всем мире, что подтверждает необходимость разработки новых подходов к противоопухолевой терапии. Среди развивающихся терапевтических стратегий передовым подходом к лечению является иммунотерапия рака, которая использует собственные иммунные клетки организма для борьбы с опухолью.

Одним из ключевых признаков рака является его способность ускользать от иммунной системы [1], и главная цель иммунотерапии рака — преодоление иммуносупрессии в опухолевом микроокружении, чтобы иммунные клетки могли эффективно удалять опухоль, не вызывая при этом непереносимых побочных эффектов.

Первые успешные попытки иммунотерапии опухолей были сделаны врачом Вильямом Коли, который в 1891 г. установил взаимосвязь между перенесенной инфекцией (скарлатина, рожа) и регрессией

опухоли у пациентов и начал вводить в неоперабельные саркомы инактивированные бактерии (*Streptococcus pyogenes* и *Serratia marcescens*), так называемый токсин Коли [2]. Через многие годы обнаружили, что противоопухолевый эффект токсина Коли обеспечивался стимуляцией паттернраспознающих рецепторов (PRPs), к которым относятся и TLR (toll-like receptors) [3].

Сегодня для иммунотерапии опухолей используют различные средства, включая цитокины (например, ГМ-КСФ и интерлейкин 2), онколитические вирусы, адоптивный клеточный перенос (например, адоптивная Т-клеточная терапия), ингибиторы контрольных точек иммунной системы (например, CTLA-4, PD-1), и терапевтические противоопухолевые вакцины (дендритноклеточные, ДНК- или РНК-вакцины, пептидные вакцины) [4].

Генетически нестабильные опухоли с большим числом мутаций содержат опухолеспецифичные неоантигены, способные индуцировать противоопухолевый иммунный ответ. Вакцины, усиливающие иммунное распознавание опухолевых неоантигенов, сегодня представляются многообещающим альтернативным

подходом к лечению злокачественных новообразований и могут стать важной частью комбинированной терапии, включающей также лучевую терапию, химиотерапию и хирургию [5]. Ряд таких противоопухолевых вакцин проходят клинические испытания [6–8].

Исследования последних десятилетий показали, что большинство противоопухолевых вакцин сами по себе слабо иммуногенны и требуют применения адъювантов, повышающих эффективность антигенспецифических иммунных ответов [9]. Анализ результатов исследований противоопухолевой вакцинотерапии с использованием разных типов вакцин, выполненный в 2004 г. S.A. Rosenberg и соавт. [10], показал, что клиническая эффективность вакцинотерапии была чрезвычайно низкой, это могло быть связано с выбором неиммуногенных антигенов или отсутствием сильных адъювантов, способных преодолеть иммуносупрессию у больных раком. Таким образом, мощные адъюванты являются ключевым компонентом противоопухолевых вакцин, так как преодолевают иммунотолерантность опухолевого микроокружения, приводя к генерации выраженных противоопухолевых иммунных ответов.

Адъюванты – вещества, которые усиливают иммунную реакцию на чужеродные антигены или собственные опухолеассоциированные антигены [11]. Термин адъювант происходит от латинского слова «*adjuvare*», означающего «помогающий» или «способствующий». Классическими считаются адъюванты бактериального происхождения – бациллы Кальметта–Герена (БЦЖ) и *Corynebacterium parvum*, компоненты клеточной стенки микроорганизмов (липид А, эндотоксин, мурамил-дипептид, димеколат трегалозы), иммуногенные белки (гемоцианин лимфы улитки), химически синтезированные соединения (DETOX), цитокины (интерлейкины 1, 2, фактор некроза опухоли, интерферон (ИФН), колониестимулирующий фактор) и некоторые другие. Эти вещества в качестве адъювантов стимулируют активную неспецифическую иммунную реакцию, как гуморальную, так и клеточную, и таким образом помогают вакцинам улучшать антигенспецифические иммунные ответы [11]. Помимо этого, к адъювантам относят и вещества, образующие в месте введения вакцины депо с медленно высвобождающимся антигеном, и системы доставки, которые могут эффективно доставлять антиген к антигенпрезентирующим клеткам и тем самым обеспечивать развитие антигенспецифических иммунных ответов.

Поиск и изучение свойств новых адъювантов, часто сочетающих в себе функции стимуляторов иммунитета с доставкой антигена к иммунным клеткам, на сегодняшний день являются актуальными задачами в области иммунотерапии. Требования

к перспективным адъювантам включают безопасность, эффективность и экономическую целесообразность [12].

#### Адъюванты как системы доставки антигена

К традиционным адъювантам, функционирующим в качестве системы доставки антигенов, относят масляные эмульсии, минеральные соли, липосомы. В ряде исследований показано, что некоторые системы доставки обладают также иммуногенными свойствами.

Алюминий и его производные используются в качестве адъювантов уже более 80 лет. Среди ограниченного количества традиционных адъювантов, разрешенных к применению, они применяются наиболее часто, в частности в противомикробных вакцинах от дифтерии, коклюша и столбняка, от папилломавируса человека, гриппа типа В и вируса гепатита А. Известно, что производные алюминия очень эффективны в обеспечении гуморальных иммунных ответов, но не индуцируют клеточно-опосредованный иммунитет, который является ключевым в удалении опухоли [13]. Несмотря на это, продолжают исследования производных алюминия в качестве адъювантов противоопухолевых вакцин. Например, в работе S. Alfonso и соавт. описаны результаты клинического испытания противоопухолевой терапевтической вакцины с алюминием, направленной на опухолеассоциированный ганглиозид NeuGcGM3, у больных немелкоклеточным раком легкого [14]. Традиционно предполагалось, что адъювантные свойства солей алюминия реализуются за счет формирования депо в месте инъекции, из которого постепенно высвобождается антиген, что обеспечивает пролонгированное взаимодействие антигена с клетками иммунной системы. Однако S. Hutchison и соавт. показали, что это не так, алюминий не влиял на величину и последовательность иммунных ответов на антиген [15]. T. Marichal и соавт. обнаружили, что в результате клеточной гибели, индуцированной алюминием или его солями, высвобождается ДНК, которая выступает в качестве DAMP (молекулярного паттерна, ассоциированного с повреждением/опасностью) и запускает врожденные иммунные ответы [16].

В последние годы значительно возрос интерес к липосомосодержащим вакцинам. Липосомы – синтетические фосфолипидные везикулы и их производные наночастицы, такие как археосомы и вирусомы, активно используются в вакцинотерапии в качестве систем доставки [17].

Способность липосом индуцировать иммунные ответы к включенным в них антигенам была впервые описана G. Gregoriadis и A. Allison в 1970-е годы [18, 19]. К достоинствам липосом относятся их универсальность,

биосовместимость и биоразлагаемость [20]. Ключевым преимуществом липосомальных систем доставки вакцин является их разнообразие и пластичность. Состав и способы приготовления липосом можно варьировать в зависимости от желаемых свойств, которые зависят от выбора липида, заряда, размера, распределения размера, загрузки и расположения антигенов или дополнительных адъювантов [17]. Водорастворимые антигены (белки, пептиды, нуклеиновые кислоты, углеводы, гаптены) можно включать во внутреннее гидрофильное пространство липосом, тогда как липофильные компоненты (липопептиды, антигены, адъюванты, линкерные молекулы) интеркалируют в липидный бислой; также антигены или адъюванты могут быть присоединены к поверхности липосом [21, 22].

К липосомальным системам, проходящим доклинические и клинические испытания или одобренным для использования в качестве адъювантов в ряде противомикробных вакцин, относятся виросомы, содержащие фосфолипиды и белки оболочки вируса гриппа; липосомы, содержащие натуральные и синтетические нейтральные или анионные фосфолипиды, холестерол, натуральный или синтетический монофосфорил липид А и QS21 сапотин; нефосфолипидные катионные липосомы, комбинации и смеси липосом с иммуностимулирующими комплексами [23].

В исследованиях на животных показана более высокая противоопухолевая эффективность липосомальных вакцин по сравнению с нелипосомальными. Например, на мышинной модели нейробластомы липосомальная доставка CpG ODNs (цитозин-гуанин динуклеотид олигодеоксинуклеотидов) в опухоль привела к выраженному противоопухолевому эффекту [24]. Липосомальные вакцины, содержащие основной фактор роста фибробластов и монофосфорил липид А, индуцировали противоопухолевый иммунитет, вызывали продукцию опухолеспецифичных антител и иммунные ответы Th1-типа у мышей с карциномой легкого Льюиса [25]. Липосомальная доставка липидного антигена  $\alpha$ -галактозилцерамида обеспечивала противоопухолевые иммунные ответы, предотвращающие метастазы в легкие у 65 % мышей с меланомой B16F10 [26]. Клинические исследования, в которых липосомы использовали для доставки опухоли-специфичного антигена, показали, что липосомальные вакцины потенциально безопасны и способны индуцировать длительные антиген-специфичные CD4+ и CD8+ Т-клеточные ответы у пациентов с фолликулярной лимфомой [27].

Ряд публикаций посвящен исследованию в качестве адъювантов противоопухолевых вакцин виросом, сферических вирусных частиц без генетического материала вируса и нуклеокапсида, неспособных

к репликации и инфицированию, но сохраняющих способность родительского вирусного штамма к проникновению в клетки [28, 29]. Впервые виросомы были созданы в 1975 г. J.D. Almeida и соавт. из липосом и частиц вируса гриппа [30]. Помимо того, что виросомы способствуют адресной доставке антигена, они могут стимулировать иммунную систему, в частности, вакцинация комплексом из ДНК плазмиды и катионных виросом индуцировала активацию цитотоксических Т-лимфоцитов [31]. В настоящее время виросомы на основе ряда вирусов (вируса гриппа, гепатита В, иммунодефицита, болезни Ньюкасла и вируса Сендай) изучают в качестве векторов для доставки лекарств, в том числе различных терапевтических молекул, таких как ДНК, РНК и пептиды [29].

На основе липидов созданы и другие адъюванты. Например, в работе X. Yang и соавт. описан новый иммунный адъювант мицеллы M-COSA, созданный для направленной доставки в цитозоль дендритных клеток (ДК) антигена овалбумина и плазмиды ДНК, кодирующей CCR7, (CCR7 DNA), обеспечивая миграцию ДК в лимфатические узлы для усиления презентации антигена МНС-I. M-COSA показали более высокую эффективность в сравнении с немиецеллярной формой. M-COSA увеличил экспрессию костимуляторных молекул и секрецию цитокинов, приводя к активации и созреванию ДК. Антигены и плазмидная ДНК, инкапсулированные в мицеллы, выходили из эндосом в цитоплазму и улучшали МНС-I презентацию антигена и увеличивали экспрессию CCR7. В результате вакцинации подавлялся рост опухоли и возрастало число CD8+ Т-клеток, которые положительно коррелировали с уменьшением опухоли [32].

F. Qiu и соавт. описали стратегию простой и быстрой упаковки пептидных антигенов в рН-чувствительные наночастицы с возможностью эндосомального высвобождения их содержимого для улучшения иммунного ответа на противоопухолевые персонализированные вакцины, направленные на индивидуальные опухолевые неоантигены [33]. Неоантигенные пептиды обычно вызывают слабые CD8+Т-клеточные ответы и нуждаются в адъювантах для увеличения иммуногенности. Вакцины, направленные на неоантигены, создаются с использованием химически синтезированных пептидных антигенов, присущих индивидуально каждому пациенту. F. Qiu и соавт. изучили электростатически стабильные полиплексные наночастицы (наноплексы), которые получали при смешивании декализинмодифицированных антигенных пептидов и полипропилакриловой кислоты (рРАА), полианиона с рН-зависимой мембрано-дестабилизирующей активностью. Эти наноплексы увеличивали и пролонгировали захват антигена и его презентацию МНС-I молекулами, экспрессируемыми

ДК, приводя к увеличению активации CD8<sup>+</sup> Т-клеток. При интраназальном пути иммунизации наноплексные вакцины ингибировали формирование метастазов в легкие на модели мышинной меланомы B16. Кроме того, наноплексные вакцины синергичны с адьювантом  $\alpha$ -галактозилкерамидом ( $\alpha$ -GalCer) в стимуляции выраженных CD8<sup>+</sup> Т-клеточных ответов, они значительно увеличивали время выживаемости мышей с развившейся меланомой [33]. Таким образом, пептид/pPAA наноплексы могут быть перспективны при разработке неоантигенных противоопухолевых вакцин.

Еще один вид адьювантов на основе липидов – иммуностимулирующие комплексы, состоящие из сапонинов растения *Quillaja saponaria*, холестерина и фосфолипида, которые имеют клеткоподобную структуру диаметром около 40 нм. Из-за удобной структуры они могут обеспечивать эффективную доставку антигена в клетки, приводя к индукции антигенспецифичного клеточного и длительного гуморального иммунного ответов [34]. Механизм действия иммуностимулирующих комплексов включает прямое взаимодействие с ДК для обеспечения кросс-презентации антигена, вызывая индукцию сильных антигенспецифичных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеточных ответов. Иммуностимулирующие комплексы ISCOMATRIX использовали как адьюванты в клинических испытаниях противоопухолевых вакцин у пациентов с NY-ESO<sup>+</sup>-опухолями [35, 36]. В 2015 г. A. Silva и соавт. показали, что вакцины с иммуностимулирующим комплексом ISCOMATRIX в комбинации с агонистами TLR3 и TLR9 могут быть перспективной иммунотерапевтической противоопухолевой стратегией, поскольку такая комбинация приводила к снижению роста опухолей на мышинных моделях меланомы, карциномы поджелудочной железы и предстательной железы, причем для терапевтического эффекта было важно наличие в качестве адьюванта именно ISCOMATRIX [37].

#### Адьюванты-стимуляторы врожденного иммунитета

Исследования последних лет выявили необходимость активации врожденного иммунитета для развития противоопухолевого иммунного ответа [38]. Распознавание чужеродных антигенов, а также опухолеассоциированных антигенов, врожденной иммунной системой обеспечивается группой паттернраспознающих рецепторов (PRRs), экспрессирующихся в ДК и макрофагах. PRRs распознают чужеродные молекулы, такие как патогенассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs), и молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением/опасностью (DAMPs), высвобождающиеся при смерти клеток или клеточном стрессе. Это приводит к индукции воспалительного ответа с продукцией про-

воспалительных цитокинов, которая вызывает генерацию выраженного врожденного и приобретенного иммунных ответов против опухоли. Механизмы, с помощью которых сигнальные пути PRRs могут разрушить иммунотолерантность антигенпрезентирующих клеток к опухолеассоциированным антигенам, включают увеличение количества костимуляторных молекул, таких как CD80, CD86, CD40, и индукцию ИФН 1-го типа [39].

PRRs разделяют на семейства согласно их структурной гомологии: TLRs (toll-like receptors), RLRs (retinoic acid-inducible gene I (RIG-1) – like receptors), NLRs (nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) – like receptors) и CLRс (C-type lectin receptors). Семейство TLR – одно из самых больших и хорошо изученных с точки зрения известных лигандов, сигнальных путей и функциональной значимости [3]. Лиганды TLR приобрели большое значение в иммунотерапии опухолей как адьюванты вакцинотерапии и как самостоятельные лекарственные препараты.

В связи с тем, что PAMPs и DAMPs имеют высокую способность стимулировать клеточно-опосредованный иммунитет, они широко исследуются в качестве адьювантов для противоопухолевых вакцин. Например, агонист TLR4 – монофосфорил липид А, модифицированное производное липополисахарида, обеспечивает усиление иммунного ответа и является компонентом разрешенной к применению вакцины против рака шейки матки [40, 41].

Проведено много исследований агонистов TLR7/TLR8 в качестве адьювантов противоопухолевых вакцин. TLR7 распознает вирусную одноцепочечную РНК и производные имидазоквинолина, к которым относятся препараты ресиквимод и имиквимод.

Имиквимод разрешен к применению для антивирусной терапии генитальной кандиломы, а также для лечения предраковых повреждений кожи (актинического кератоза) [42]. Жидкая лекарственная форма на основе имиквинода – ТМХ-101 (Vesimune) – проходила в 2015 г. II фазу клинических испытаний для лечения неинвазивного рака мочевого пузыря [43]. Механизм действия имиквинода не до конца изучен, известно, что он вызывает индукцию ИФН 1-го типа через активацию TLR7-MyD88-IRF7 сигнальных путей. При изучении комбинированного эффекта агониста TLR7 имиквинода и дендритноклеточной вакцины против мышинной меланомы S. Ren и соавт. обнаружили, что нанесение имиквинода в виде крема на кожу вызывает воспаление и увеличение поступления ДК в дренирующие лимфатические узлы. Имиквимод усиливал эффективность дендритноклеточной вакцины против B16-OVA меланомы. Сочетанное использование имиквинода и дендритноклеточной вакцины усиливало цитотоксичность лимфоцитов селезенки в отношении

опухолевых клеток и ингибировало продукцию CD4+FOXP+Трег-клеток. Экспрессия мРНК TLR7 была подтверждена в MC/9 тучных клетках и в ДК. Клетки MC/9, обработанные растворимой формой имиквимода R837, увеличивали экспрессию на ДК CD80, CD86, МНС-II и CCR7. Также R837 ингибировал рост клеток B16-OVA *in vitro*. Полученные в результате этой работы данные подтвердили, что имиквимод может быть использован как потенциальный адъювант для противоопухолевых дендритноклеточных вакцин [44]. D. Paßlick и соавт. выявили, что комбинация производного имидазоквинолина ресиквимода (R848) и мурамилдипептида (MDP) обладает дополняющим друг друга иммуностимулирующим эффектом [45]. Этой группой ученых были созданы нанокапсулы на основе сперминмодифицированных декстрановых наночастиц, содержащие антиген с комбинацией адъювантов. Данная нановакцина вызывала стимуляцию ДК и антигенспецифическую пролиферацию CD4+ и CD8+ Т-клеток.

В исследовании [46] показали, что агонист TLR7/8 ресиквимод (R848) значительно снижал рост клеток остроуго миелоидного лейкоза человека у иммунодефицитных мышей, вызывая активацию TLR8, которая приводила к дифференцировке и ингибированию роста клеток по сигнальному пути TLR8/MyD88/p38.

К. Chen и соавт. исследовали индукцию специфических Т-клеток у больных гепатоцеллюлярной карциномой при использовании нановакцины LPMan-GPC3/CL097 на основе маннозилированных липосом с глипиканом-3 (GPC3), одним из ключевых тканевых маркеров, который помогает отличать злокачественные и доброкачественные изменения печени у больных циррозом. В качестве адъюванта использовали агонист TLR7/8 CL097 [47]. Иммунизация LPMan-GPC3/CL097 вызывала образование GPC3-специфичных CD4+ ИФН $\gamma$ - и CD8+ ИФН $\gamma$ -продуцирующих Т-клеток в селезенке и печени, которые удаляли GPC3-экспрессирующие опухолевые клетки.

TLR9 – эндосомальный TLR, распознающий внутриклеточные молекулы ДНК микробного происхождения по наличию неметилированных повторов CpG. CpG ODN (олигодинуклеотид, содержащий неметилированные CpG повторы) – синтетический лиганд TLR9, способный активировать сигнальный путь TLR9-MyD88-IRF7, приводящий к индукции ИФН 1-го типа, и через активацию сигнального пути TLR9-MyD88-NF $\kappa$ B индуцирующий продукцию провоспалительных цитокинов иммунными клетками [48].

Клинические испытания CpG ODN в качестве иммунотерапевтического агента у онкологических больных при меланоме или мелкоклеточном раке легкого подтвердили, что комбинация с химиотера-

пией или монотерапия CpG ODN может индуцировать противоопухолевые иммунные ответы, которые коррелируют с клиническим исходом [49]. В. Temizoz и соавт. изучили возможность применения в качестве адъюванта противоопухолевых вакцин комбинацию CpG ODN и стимулятора гена ИФН STING, и показали синергизм их действия; в комбинации адъюванты индуцировали иммунный ответ и уменьшали рост опухоли у мышей [50]. Однако раскрытие потенциала CpG ODN в качестве адъюванта для противоопухолевых вакцин или противоопухолевого агента требует дальнейших исследований [49].

Большой интерес как адъюванты противоопухолевых вакцин представляют агонисты TLR3: в ряде работ как в доклинических исследованиях на животных моделях, так и в клинических испытаниях показано, что они повышают вакциноиндуцированные противоопухолевые иммунные ответы и обеспечивают удаление опухоли [51].

Лиганды TLR3 – полирибоинозиновая-полирибоцитидиловая кислота (*Polyriboinosinic – polyribocytidylic acid*, poly(I:C) и ее производное poly-ICLC (Хилтонол, Hiltonol™), представляющий собой poly(I:C), стабилизированную поли-L-лизинном и карбоксиметилцеллюлозой, – синтетические имитаторы полимеров вирусной двуцепочечной РНК со схожим механизмом действия. Они включены в перечень иммунотерапевтических агентов Национального института рака (National Cancer Institute, США) как агенты с высоким потенциалом к усилению эффекта противоопухолевой иммунотерапии [52]. В настоящее время проходят испытания различные стратегии, включающие poly(I:C)/poly-ICLC в вакцинотерапию рака, цель которых максимально стимулировать противоопухолевый иммунный ответ.

Исследования *in vitro* показали, что poly(I:C) эффективно способствует созреванию и активации ДК, стимулирует Т-клетки, обеспечивает цитотоксичность NK-клеток, повышает кросс-презентацию ДК и стимулирует ДК-NK-взаимодействие. Кроме того, poly(I:C) индуцирует секрецию провоспалительных цитокинов как опухолевыми клетками, так и различными иммунными клетками [51]. В экспериментах на мышах было показано, что из всех агонистов TLR poly(I:C) является наиболее эффективным индуктором ИФН 1-го типа [53].

Кроме того, оказалось, что некоторые опухолевые клетки имеют рецепторы TLR3, RIG-I и MDA5, на которые может воздействовать poly(I:C) и вызывать ингибирование опухолевого роста и индукцию апоптоза [54]. Однако в работе [55] показано, что *in vitro* гибель опухолевых клеток была вызвана poly(I:C) – опосредованным воздействием цитокинов и активацией моноцитов. При внутриопухолевом введении poly(I:C) мышам наблюдали гибель опухолевых клеток

и снижение роста опухоли, независимо от активации TLR-сигнальных путей в опухолевых клетках.

Многочисленные доклинические исследования показали, что использование poly(I:C)/poly-ICLC как отдельного адъюванта в различных антигенсодержащих вакцинах приводило к усилению индукции Т-клеток, специфичных к опухолеассоциированным антигенам. Poly(I:C)/poly-ICLC-содержащие вакцины снижали опухолевый рост во всех исследованиях, независимо от пути введения. Также эффект poly(I:C)/poly-ICLC изучали в комбинации с другими адъювантами. В. Вауурти соавт. разработали липосомальную систему доставки белкового антигена, в которую включили poly(I:C) и агонист TLR9 CpG ODN, экспрессирующий неметилованные CpG повторы) [56]. Исследование противоопухолевого потенциала вакцины показало, что она значительно увеличивает продукцию цитокинов в клетках селезенки мышей, вызывает активацию и созревание ДК; иммунизация мышей обеспечивала длительный противоопухолевый постинъекционный иммунитет и снижение прогрессии опухоли [56].

В работе Н.Т.Т. Duong и соавт. описана система доставки ДНК вакцин, в которой наноинженерная ДНК-вакцина с адъювантом poly(I:C) загружена в микроиглы из двуслойных ультра-рН-чувствительных компонентов [57]. В испытаниях на мышах показали, что вакцина с новой системой доставки более эффективна по сравнению со свободной формой, она вызывала отторжение опухолей у мышей и активировала гуморальный и клеточный иммунитет.

Первые клинические исследования poly(I:C) в качестве препарата для лечения рака проводили в 1970 годы, но они показали отсутствие положительного эффекта на исход заболеваний, возможно, из-за короткого времени полувыведения [51]. Стабилизированная форма – poly-ICLC – обеспечивала 5- или 10-кратную устойчивость к гидролизу в сыворотке приматов и индуцировала значимые уровни сывороточного ИФН [58]. Однако увеличение стабильности привело к усилению токсичности, которая проявлялась лихорадкой, гипотензией, синдромом артралгии-миалгии, снижением количества клеток крови, гриппоподобными симптомами, почечной недостаточностью, болью в костях, изменениями в печени, костном мозге и центральной нервной системе. Токсические эффекты poly-ICLC были облегчены снижением внутривенных дозировок или внутримышечным введением. Пилотное исследование, проведенное А.М. Salazar и соавт., показало безопасность и эффективность низких доз poly-ICLC при внутримышечном введении пациентам со злокачественной глиомой [59].

Созданы модификации poly(I:C) с более оптимизированной доставкой и минимизированными побочными эффектами [60]. Амплиген, poli-I:C –

Poly(I:C12C), нетоксичный аналог poly(I:C) с замененными однонуклеотидными основаниями (G и U), что повысило его устойчивость к гидролизу и снизило токсичность [61].

В противоположность применению poly(I:C) и его модификаций в качестве лекарственных препаратов, клиническая оценка их как адъювантов противоопухолевых вакцин была начата только около 10 лет назад. В ряде исследований poly-ICLC использовали в качестве адъюванта в дендритноклеточных вакцинах для лечения больных глиомой [62, 63]. В работах 2017 г. приводятся многообещающие результаты клинических испытаний неоантигенных персонализированных пептидных или РНК-вакцин для лечения меланомы, в которых в качестве адъюванта использовали лиганд TLR3 poly-ICLC (Хилтонол) [6, 7].

В ряде исследований poly-ICLC сочетали с другими стимуляторами иммунитета, например ГМ-КСФ или агонистом TLR7/8 ресиквимодом [64, 65], монтанидом ISA-51 [66]. Результаты клинических испытаний poly-ICLC в вакцинотерапии опухолей показывают, что этот адъювант безопасен и хорошо переносим [51].

### Заключение

Адъюванты – ключевые компоненты противоопухолевых вакцин, так как они усиливают иммунные ответы на вакцинацию. Помимо использования в качестве вспомогательных компонентов вакцин, некоторые адъюванты, например лиганды TLR3 или TLR7/8, могут быть использованы в качестве противоопухолевых агентов для иммунотерапии рака. Несмотря на многообещающие результаты клинических испытаний новых противоопухолевых вакцин, на данный момент существует только несколько адъювантов, разрешенных к использованию.

Механизмы, с помощью которых адъюванты обеспечивают противоопухолевый иммунный ответ, основываются на стимуляции врожденного иммунитета через паттернраспознающие рецепторы, через которые реализуется развитие приобретенных иммунных ответов против опухоли. При этом некоторые адъюванты могут обеспечивать развитие противоопухолевого иммунного ответа путем эффективной доставки антигена и/или адъюванта в опухоль или в антигенпрезентирующие клетки. Сегодня существует 2 направления развития адъювантов для противоопухолевых вакцин: 1-е – поиск новых соединений с адъювантной активностью, 2-е – оптимизация известных сегодня адъювантов и исследование различных комбинаций адъювантов. Исследования на животных, а также клинические испытания подтвердили, что комбинации адъювантов, способных активировать множественные PRRs, гораздо более эффективны, чем их одиночное применение.

## Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646–74. PMID: 21376230. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- McCarthy E.F. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J* 2006;26:154–8. PMID: 16789469.
- Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Nat Immunol* 2010;11(5):373–84. PMID: 20404851. DOI: 10.1038/ni.1863.
- Zhou J. Advances and prospects in cancer immunotherapy. *New J Sci* 2014; Article ID 745808. DOI: 10.1155/2014/745808.
- Барышникова М.А., Кособокова Е.Н., Косоруков В.С. Неоантигены в иммунотерапии опухолей. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(2):6–14. [Baryshnikova M.A., Kosobokova E.N., Kosorukov V.S. Neoantigens in tumor immunotherapy. *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(2):6–14. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-6-14.
- Ott P.A., Hu Z., Keskin D.B. et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature* 2017;547:217–21. PMID: 28678778. DOI: 10.1038/nature22991.
- Sahin U., Derhovanessian E., Miller M. et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature* 2017;547:222–6. PMID: 28678784. DOI: 10.1038/nature23003.
- Sonntag K., Hashimoto H., Eylich M. et al. Immune monitoring and TCR sequencing of CD4 T cells in a long term responsive patient with metastasized pancreatic ductal carcinoma treated with individualized, neoepitope-derived multipeptide vaccines: a case report. *J Transl Med* 2018;16(1):23. PMID: 29409514. DOI: 10.1186/s12967-018-1382-1.
- Temizoz B., Kuroda E., Ishii K.J. Vaccine adjuvants as potential cancer immunotherapeutics. *Int Immunol* 2016;28(7):329–38. PMID: 27006304. DOI: 10.1093/intimm/dxw015.
- Rosenberg S.A., Yang J.C., Restifo N.P. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004;10(9):909–15. PMID: 15340416. DOI: 10.1038/nm1100.
- Барышников А.Ю. Принципы и практика вакцинотерапии рака. *Бюллетень СО РАМН* 2004;112(2):59–63. [Baryshnikov A.Yu. Principles and practice of cancer vaccinotherapy. *Byulleten SO RAMN = Bulletin of the Siberian Division of Russian Medical Sciences Academy* 2004;112(2):59–63. (In Russ.)].
- Banday A.H., Jeelani S., Hruby V.J. Cancer vaccine adjuvants – recent clinical progress and future perspectives. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2015;37(1):1–11. PMID: 25318595. DOI: 10.3109/08923973.2014.971963.
- Brewer J.M. (How) do aluminium adjuvants work? *Immunol Lett* 2006;102(1):10–5. PMID: 16188325. DOI: 10.1016/j.imlet.2005.08.002.
- Alfonso S., Valdes-Zayas A., Santiesteban E.R. et al. A randomized, multicenter, placebo-controlled clinical trial of racotumomab-alum vaccine as switch maintenance therapy in advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2014;20(14):3660–71. PMID: 24788102. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1674.
- Hutchison S., Benson R.A., Gibson V.B. et al. Antigen depot is not required for alum adjuvanticity. *Fed Am Soc Exp Biol* 2012;26:1272. PMID: 22106367. DOI: 10.1096/fj.11-184556.
- Marichal T., Ohata K., Bedoret D. et al. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat Med* 2011;17:996. PMID: 21765404. DOI: 10.1038/nm.2403.
- Schwendener R.A. Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. *Ther Adv Vaccines* 2014;2(6):159–82. PMID: 25364509. DOI: 10.1177/2051013614541440.
- Allison A., Gregoriadis G. Liposomes as immunological adjuvants. *Nature* 1974;252(5480):252. PMID: 4424229.
- Allison A., Gregoriadis G. Liposomes as immunological adjuvants. *Recent Results Cancer Res* 1976;(56):58–64. PMID: 188085.
- Райков А.О., Хашем А., Барышникова М.А. Липосомы для направленной доставки противоопухолевых препаратов. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(2):90–6. [Raikov A.O., Hashem A., Baryshnikova M.A. Liposomes as target delivery of antitumor drugs. *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2016;15(2):90–6. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-90-96.
- Барышникова М.А., Барышников А.Ю. Иммунолипосомы и мишени их действия. *Российский химический журнал* 2012;LVI(3–4):60–6. [Baryshnikova M.A., Baryshnikov A.Yu. Immunoliposomes and their targets. *Rossiyskiy Khimicheskiy Zhurnal = Russian Journal of General Chemistry* 2012; LVI(3–4):60–6. (In Russ.)].
- Афанасьева Д.А., Барышникова М.А., Щербаков А.И. и др. Разработка модели противоопухолевой липосомальной вакцины. *Иммунология* 2014;35(6):317–21. [Afanasyeva D.A., Baryshnikova M.A., Scherbakov A.I. et al. The development of anticancer liposomal vaccine model. *Immunologiya = Immunology* 2014;35(6):317–21. (In Russ.)].
- Alving C.R., Beck Z., Matyas G.R., Rao M. Liposomal adjuvants for human vaccines. *Expert Opin Drug Deliv* 2016;13(6):807–16. PMID: 26866300. DOI: 10.1517/17425247.2016.1151871.
- Brignole C., Marimpietri D., Di Paolo D. et al. Therapeutic targeting of TLR9 inhibits cell growth and induces apoptosis in neuroblastoma. *Cancer Res* 2010;70(23):9816–26. PMID: 20935225. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1251.
- Zhong Z., Wei X., Qi B. et al. A novel liposomal vaccine improves humoral immunity and prevents tumor pulmonary metastasis in mice. *Int J Pharm* 2010;399(1–2):156–62. PMID: 20692327. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.07.053.
- Nakamura T., Yamazaki D., Yamauchi J., Harashima H. The nanoparticulation by octaarginine-modified liposome improves  $\alpha$ -galactosylceramide-mediated antitumor therapy via systemic administration. *J Control Release* 2013;171(2):216–24. PMID: 23860186. DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.07.004.
- Neelapu S.S., Baskar S., Gause B.L. et al. Human autologous tumor-specific T-cell responses induced by liposomal delivery of a lymphoma antigen. *Clin Cancer Res* 2004;10(24):8309–17. PMID: 15623607. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1071.
- Saga K., Kaneda Y. Virosome presents multimodal cancer therapy without viral replication. *Biomed Res Int* 2013;2013:764706. PMID: 24369016. DOI: 10.1155/2013/764706.
- Trovato M., De Berardinis P. Novel antigen delivery systems. *World J Virol* 2015;4(3):156–68. PMID: 26279977. DOI: 10.5501/wjv.v4.i3.156.
- Almeida J.D., Edwards D.C., Brand C.M., Heath T.D. Formation

- of virosomes from influenza subunits and liposomes. *Lancet* 1975;2:899–901. PMID: 53375. DOI:10.1016/s0140-6736(75)92130-3.
31. Jamali A., Holtrup M., de Haan A. et al. Cationic influenza virosomes as an adjuvanted delivery system for CTL induction by DNA vaccination. *Immunol Lett* 2012;148(1):77–82. PMID: 22981929. DOI: 10.1016/j.imlet.2012.08.006.
  32. Yang X., Lian K., Meng T. et al. Immune adjuvant targeting micelles allow efficient dendritic cell migration to lymph nodes for enhanced cellular immunity. *ACS Appl Mater Interfaces* 2018;10(39):33532–44. PMID: 30192498. DOI: 10.1021/acsami.8b10081.
  33. Qiu F., Becker K.W., Knight F.C. et al. Poly(propylacrylic acid) – peptide nanoplexes as a platform for enhancing the immunogenicity of neoantigen cancer vaccines. *Biomaterials* 2018;182:82–91. PMID: 30107272. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.07.052.
  34. Wilson N.S., Duester P., Yang B. et al. Inflammasome-dependent and -independent IL-18 production mediates immunity to the ISCOMATRIX adjuvant. *J Immunol* 2014;192(7):3259–68. PMID: 24610009. DOI: 10.4049/jimmunol.1302011.
  35. Davis I.D., Chen W., Jackson H. et al. Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4(+) and CD8(+) T cell responses in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(29):10697–702. PMID: 15252201. DOI: 10.1073/pnas.0403572101.
  36. Davis I.D., Quirk J., Morris L. et al. A pilot study of peripheral blood BDCA-1(CD1c) positive dendritic cells pulsed with NY-ESO-1 ISCOMATRIX™ adjuvant. *Immunotherapy* 2017;9(3):249–59. PMID: 28183192. DOI: 10.2217/imt-2016-0132.
  37. Silva A., Mount A., Krstevska K. et al. The combination of ISCOMATRIX adjuvant and TLR agonists induces regression of established solid tumors in vivo. *J Immunol* 2015;194(5):2199–207. PMID: 25646304. DOI: 10.4049/jimmunol.1402228.
  38. Goldberg J.L., Sondel P.M. Enhancing Cancer Immunotherapy Via Activation of Innate Immunity. *Semin Oncol* 2015;42(4):562–72. PMID: 26320061. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2015.05.012.
  39. Gosu V., Basith Sh., Kwon O.P., Choi S. Therapeutic applications of nucleic acids and their analogues in toll-like receptor signaling. *Molecules* 2012;17:13503–29. PMID: 23151919. DOI: 10.3390/molecules171113503.
  40. Schwarz T.F. Clinical update of the AS04-adjuvanted human papillomavirus-16/18 cervical cancer vaccine. *Cervarix Adv Ther* 2009;26(11):983–98. PMID: 20024678. DOI: 10.1007/s12325-009-0079-5.
  41. Ferreira Costa A.P., Gonçalves A.K., Machado P.R. L. et al. Immune response to human papillomavirus one year after prophylactic vaccination with AS04-adjuvanted HPV-16/18 vaccine: HPV-specific IgG and IgA antibodies in the circulation and the cervix. *Asian Pac J Cancer Prev* 2018;19(8):2313–7. PMID: 30141308. DOI: 10.22034/APJCP.2018.19.8.2313.
  42. Huen A.O., Rook A.H. Toll receptor agonist therapy of skin cancer and cutaneous T-cell lymphoma. *Curr Opin Oncol* 2014;26(2):237–44. PMID: 24441505. DOI: 10.1097/CCO.0000000000000048.
  43. Junt T., Barchet W. Translating nucleic acid-sensing pathways into therapies. *Nat Rev Immunol* 2015;15(9):529–44. PMID: 26292638. DOI: 10.1038/nri3875.
  44. Ren S., Wang Q., Zhang Y. et al. Imiquimod enhances the potency of an exogenous BM–DC based vaccine against mouse melanoma. *Int Immunopharmacol* 2018;64:69–77. PMID: 30149266. DOI: 10.1016/j.intimp.2018.08.026.
  45. Paßlick D., Piradashvili K., Bamberger D. et al. Delivering all in one: Antigen-nanocapsule loaded with dual adjuvant yields superadditive effects by DC-directed T cell stimulation. *J Control Release* 2018;289:23–34. PMID: 30219277. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.09.008.
  46. Ignatz-Hoover J.J., Wang H., Moreton S.A. et al. The role of TLR8 signaling in Acute Myeloid Leukemia Differentiation. *Leukemia* 2015;29(4):918–26. PMID: 25283842. DOI: 10.1038/leu.2014.293.
  47. Chen K., Wu Z., Zang M. et al. Immunization with glypican-3 nanovaccine containing TLR7 agonist prevents the development of carcinogen-induced precancerous hepatic lesions to cancer in a murine model. *Am J Transl Res* 2018;10(6):1736–49. PMID: 30018715.
  48. Krieg A.M. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5(6):471–84. PMID: 16763660. DOI: 10.1038/nrd2059.
  49. Temizoz B., Kuroda E., Ishii K.J. Combination and inducible adjuvants targeting nucleic acid sensors. *Curr Opin Pharmacol* 2018;41:104–13. PMID: 29870915. DOI: 10.1016/j.coph.2018.05.003.
  50. Temizoz B., Kuroda E., Ohata K. et al. TLR9 and STING agonists synergistically induce innate and adaptive type-II IFN. *Eur J Immunol* 2015;45(4):1159–69. PMID: 25529558. DOI: 10.1002/eji.201445132.
  51. Ammi R., De Waele J., Willems Y. et al. Poly(I: C) as cancer vaccine adjuvant: knocking on the door of medical breakthroughs. *Pharmacol Ther* 2015;146:120–31. PMID: 25281915. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.09.010.
  52. Cheever M.A. Twelve immunotherapy drugs that could cure cancers. *Immunol Rev* 2008;222:357–68. PMID: 18364014. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00604.x.
  53. Longhi M.P., Trumpfheller C., Idoyaga J. et al. Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4+ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. *J Exp Med* 2009;206(7):1589–602. PMID: 19564349. DOI: 10.1084/jem.20090247.
  54. Cheng Y.S., Xu F. Anticancer function of polyinosinic-polycytidylic acid. *Cancer Biol Ther* 2010;10(12):1219–23. PMID: 20930504.
  55. Klein J.C., Wild C.A., Lang S., Brandau S. Differential immunomodulatory activity of tumor cell death induced by cancer therapeutic toll-like receptor ligands. *Cancer Immunol Immunother* 2016;65(6):689–700. PMID: 27034235. DOI: 10.1007/s00262-016-1828-3.
  56. Bayyurt B., Tincer G., Almacioglu K. et al. Encapsulation of two different TLR ligands into liposomes confer protective immunity and prevent tumor development. *J Control Release* 2017;247:134–44. PMID: 28069554. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.01.004.
  57. Duong H.T. T., Yin Y., Thambi T. et al. Smart vaccine delivery based on microneedle arrays decorated with ultra-pH-responsive copolymers for cancer immunotherapy. *Biomaterials* 2018;185:13–24. PMID: 30216806. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.09.008.
  58. Levy H.B., Baer G., Baron S. et al. A modified polyriboinosinic-polyribocytidylic acid complex that induces interferon in primates. *J Infect Dis* 1975;132(4):434–9. PMID: 810520.
  59. Salazar A.M., Levy H.B. et al. Long-term treatment of malignant gliomas with intramuscularly administered polyinosinic-polycytidylic acid stabilized with polylysine and carboxymethylcellulose: an open pilot study. *Neurosurgery* 1996;38(6):1096–103; discussion 1103–4. PMID: 8727138.
  60. Hafner A.M., Cortésy B., Merkle H.P. Particulate formulations for the delivery of poly (I: C) as vaccine adjuvant. *Adv*

- Drug Deliv Rev 2013;65(10):1386–99. PMID: 23751781. DOI: 10.1016/j.addr.2013.05.013.
61. Jasani B., Navabi H., Adams M. Ampligen: a potential toll-like 3 receptor adjuvant for immunotherapy of cancer. *Vaccine* 2009;27:3401. PMID: 19200817. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.01.071.
62. Okada H., Kalinski P., Ueda R. et al. Induction of CD8+ T-cell responses against novel glioma-associated antigen peptides and clinical activity by vaccinations with  $\alpha$ -type 1 polarized dendritic cells and polyinosinic – polycytidylic acid stabilized by lysine and carboxymethyl-cellulose in patients with recurrent malignant glioma. *J Clin Oncol* 2011;29(3):330–6. PMID: 21149657. DOI: 10.1200/JCO.2010.30.7744.
63. Prins R.M., Soto H., Konkankit V. et al. Gene expression profile correlates with T-cell infiltration and relative survival in glioblastoma patients vaccinated with dendritic cell immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2011;17(6):1603–15. PMID: 21135147. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2563.
64. Morse M.A., Chapman R., Powderly J. et al. Phase I study utilizing a novel antigen-presenting cell-targeted vaccine with Toll-like receptor stimulation to induce immunity to self-antigens in cancer patients. *Clin Cancer Res* 2011;17(14):4844–53. PMID: 2163285. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0891.
65. Dhodapkar M.V., Sznol M., Zhao B. et al. Induction of antigen-specific immunity with a vaccine targeting NY-ESO-1 to the dendritic cell receptor DEC-205. *Sci Transl Med* 2014;6(232):232–51. PMID: 24739759. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008068.
66. Sabbatini P., Tsuji T., Ferran L. et al. Phase I trial of overlapping long peptides from a tumor self-antigen and poly-ICLC shows rapid induction of integrated immune response in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2012;18(23):6497–508. PMID: 23032745. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2189.

**ORCID авторов/ORCID of authors**

М.А. Барышникова/M.A. Baryshnikova: <https://orcid.org/0000-0002-6688-8423>

В.С. Косоруков/V.S. Kosorukov: <https://orcid.org/0000-0002-8462-2178>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.