

**ОБЗОРЫ****REVIEWS**

## Теория и практика иммунотерапии, направленной против антигена PRAME

**В.А. Мисюрин**

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478

**РЕФЕРАТ**

Антиген PRAME, представляющий собой значимую мишень для моноклональных антител, является онкоспецифическим маркером, который активен на всех стадиях дифференцировки опухолевых клеток, и вызывает спонтанный Т-клеточный ответ. Поскольку белок PRAME экспрессируется примерно у каждого второго больного с солидными опухолями и онкогематологическими заболеваниями, иммунотерапия против данного антигена имеет значительные перспективы. В настоящем обзоре обсуждается механизм развития спонтанного иммунного ответа против PRAME и роль данного антигена в иммунном надзоре. Рассматривается процесс развития PRAME-специфических Т-клеток. Оцениваются риски применения иммунотерапии против PRAME-экспрессирующей клетки. Обсуждаются достоинства и недостатки различных подходов в иммунотерапии, в т. ч. использование дендритноклеточных вакцин, вакцинирование антигеном PRAME, выведение специфических Т-клеток и разработка специфических моноклональных антител. Объяснены возможные причины неудач некоторых видов иммунотерапии, представлены пути их преодоления. Поиск литературы, на которой основан данный обзор, проводился в базах данных Pubmed, Scopus и eLibrary по ключевому слову «PRAME». Рассмотрены только те публикации, в которых изучались различные аспекты или создавались средства иммунотерапии, направленной против антигена PRAME.

**Ключевые слова:** PRAME, иммунотерапия, дендритноклеточные вакцины, пептидные вакцины, Т-клеточные вакцины, терапевтические антитела.

**Получено:** 19 декабря 2017 г.

**Принято в печать:** 5 февраля 2018 г.

*Для переписки:* Всеволод Андреевич Мисюрин, канд. биол. наук, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478; тел.: +7(985)436-30-19; e-mail: vsevolod.misyurin@gmail.com

*Для цитирования:* Мисюрин В.А. Теория и практика иммунотерапии, направленной против антигена PRAME.

Клиническая онкогематология. 2018;11(2):138–49.

DOI: 10.21320/2500-2139-2018-11-2-138-149

## Theory and Practice of Immunotherapy Directed against the PRAME Antigen

**VA Misyurin**

NN Blokhin National Medical Cancer Research Center, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478

**ABSTRACT**

The preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) is a significant target for monoclonal antibodies and an oncospecific marker known for its activity on all the tumor cell differentiation stages and its eliciting of a spontaneous T-cell response. Since PRAME protein is active in approximately every second patient with solid tumors and oncohematological diseases, anti-PRAME immunotherapy is very promising. In current review the mechanism of spontaneous immune response against PRAME is discussed as well as the role of this antigen in immunosurveillance. The review deals with the PRAME-specific T-cell genesis and risk assessment of immunotherapy directed against PRAME-positive cells. The risks and benefits of various immunotherapy approaches including the use of dendritic cell vaccines, PRAME vaccination, development of specific T-cells, and development of specific monoclonal antibodies were analysed. Possible causes of treatment failure are analysed, and methods of overcoming them are suggested. The literature search in the Pubmed, Scopus, and eLibrary databases, with the use of “PRAME” as a keyword was performed. Only publications related to various aspects of immunotherapy and anti-PRAME-specific agents were included in the review.

**Keywords:** PRAME, immunotherapy, dendritic cell vaccines, peptide vaccines, T-cell vaccines, therapeutic antibodies.

**Received:** December 19, 2017

**Accepted:** February 5, 2018

*For correspondence:* Vsevolod Andreevich Misyurin, PhD in Biology, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478; Tel.: +7(985)4363019; e-mail: vsevolod.misyurin@gmail.com

*For citation:* Misyurin VA. Theory and Practice of Immunotherapy Directed against the PRAME Antigen

Clinical oncohematology. 2018;11(2):138–49.

DOI: 10.21320/2500-2139-2018-11-2-138-149



## ИММУНОГЕННОСТЬ БЕЛКА PRAME

Иммуногенность опухолевых клеток во многом опосредована активностью раково-тестикулярных антигенов. Эти антигены экспрессируются в различных тканях эмбриона, но неактивны у взрослого человека, за исключением клеток гамет. Поскольку гаметы расположены в иммунопривилегированных областях, раково-тестикулярные антигены не могут быть представлены иммунной системе. При спонтанной экспрессии в опухолевой клетке они могут быть захвачены антигенпрезентирующими клетками (АПК) и вызывать противоопухолевый ответ. Белок PRAME, иммуногенным свойствам которого посвящен настоящий обзор, относится к таким антигенам. (С данными о клинической значимости экспрессии PRAME и активности этого антигена при онкологических и онкогематологических заболеваниях можно ознакомиться в предыдущем выпуске журнала «Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика».)

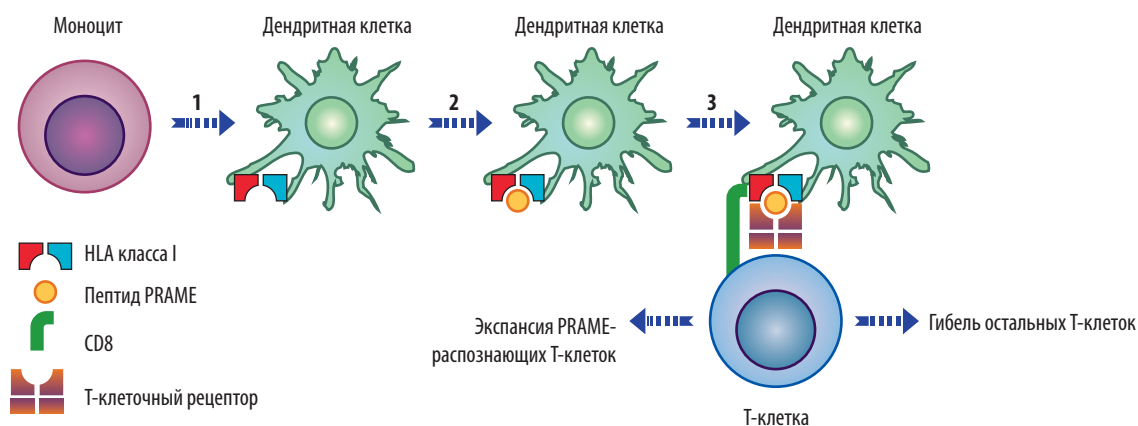
Антиген PRAME был открыт при исследовании иммунных причин спонтанной ремиссии меланомы человека. Опухолевые клетки большого LB33, выведенные в линию, подвергались атаке аутологичных CD8-позитивных клеток. Из популяции этих лимфоцитов был выделен клон, разрушающий клетки меланомы. Был установлен HLA-A2-презентируемый антиген, необходимый для распознавания этими лимфоцитами [1]. Название антигену (PReferentially Antigen of Melanoma Expressed) присвоили после того, как выяснили, что мРНК, ответственная за синтез соответствующего белка, с наибольшей частотой экспрессировалась у больных меланомой [2].

В последующем было установлено, что развитие Т-клеточного ответа против PRAME происходит практически в любом случае, когда данный антиген экспрессируется клетками опухоли. Однако по ряду причин естественный ответ бывает недостаточным для контроля над заболеванием. С другой стороны,

некоторые подходы позволяют увеличить интенсивность иммунного ответа, что было доказано клинически. Таким образом, иммуногенные свойства PRAME могут быть использованы для стимулирования противоопухолевого ответа.

Интенсивность Т-клеточного (опосредованного CD8-позитивными Т-лимфоцитами) ответа против PRAME можно оценить количественно. Для этого многие исследователи использовали АПК, представляющие эпитопы PRAME HLA-совместимым Т-клеткам *in vitro* (рис. 1). После одного или нескольких этапов презентации антигена Т-лимфоцитам можно измерить скорость, с которой полученные Т-клетки осуществляют лизис PRAME-экспрессирующих клеток-мишеней, имеющих необходимые молекулы HLA. Возможно также проведение тетрамерного анализа на проточном цитометре, позволяющего подсчитать долю PRAME-специфических Т-клеток в общей популяции лимфоцитов крови.

Благодаря количественному изменению было установлено, что PRAME-специфические Т-клетки могут встречаться при некоторых онкологических заболеваниях и даже в организме здоровых доноров, хотя и в очень небольшом количестве. По данным К. Rezvani и соавт., например, Т-клетки, связывающие пептид ALYVDSLFFL белка PRAME, могут быть выделены из крови у 3 из 10 больных острым лимфобластным лейкозом [3]. Согласно М. Lutz и соавт., в периферической крови 18 (16 %) из 114 здоровых доноров циркулировали ALYVDSLFFL-распознающие Т-клетки. При этом у доноров-мужчин ответ был более интенсивным и наблюдался чаще, чем у женщин. Это объяснялось экспрессией PRAME в гонадах и, возможно, доступностью фрагментов белка для презентации. Наибольший уровень иммунного ответа против PRAME у женщин наблюдался в период с I по II триместр первой беременности, что могло быть связано с экспрессией PRAME клетками плаценты [4]. Интересно, что Е.С. LaVoу и соавт. смогли выделить PRAME-распознающие Т-клетки из периферической крови у 18 из 19 здоровых доноров.



**Рис. 1.** Принцип экспансии PRAME-специфических CD8-позитивных Т-лимфоцитов с помощью дендритных клеток *in vitro*:

1 — созревание дендритных клеток с помощью цитокинов GM-CSF, IL-4 и TNF- $\alpha$ ; 2 — процессинг антигена PRAME и экспонирование его пептидов молекулами HLA класса I; 3 — презентация антигена Т-клеткам

**Fig. 1.** Strategy of expansion of PRAME-specific CD8-positive T-cells *in vitro* mediated by dendritic cells:

1 — maturation of dendritic cells with GM-CSF, IL-4, and TNF-alpha; 2 — processing of PRAME and exposure of its peptides with HLA-I; 3 — antigen presentation to T-cells

Число выделенных клеток было в 6,2 раза большим, после того как эти доноры быстро пробежали 260 ступенек вверх. Количество клеток с иммунофенотипом памяти CD45RA+CD62L<sup>-</sup> после физических нагрузок также увеличилось [5]. Следует учесть, что PRAME-распознающие Т-клетки, которые можно найти у здоровых доноров и некоторых больных, чаще имеют иммунофенотип наивных Т-клеток [6].

## МЕХАНИЗМ РАЗВИТИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРОТИВ БЕЛКА PRAME

Наличие PRAME-распознающих Т-клеток в организме пациентов с онкологическими заболеваниями и даже у здоровых доноров позволяет предположить следующую модель развития иммунного ответа против PRAME. Еще в костном мозге некоторые наивные Т-клетки приобретают низкоавидный рецептор против PRAME. Поскольку клетки микроокружения костного мозга не экспрессируют PRAME, наивные Т-лимфоциты не подвергаются негативной селекции как аутореактивные. Однако у здорового человека эти клетки не могут быть активированы, т. к. PRAME-экспрессирующих клеток нет или их очень мало, а эпитопы PRAME не презентуются профессиональными АПК. Для активации наивных Т-клеток на поверхности АПК должно быть примерно в 1000 раз больше презентируемых пептидов, чем достаточно для лизиса опухолевой клетки уже активированными Т-лимфоцитами [7]. Возможно, лишь на начальных этапах развития онкологического заболевания PRAME-гиперэкспрессирующие клетки опухоли позволяют сформироваться Т-лимфоцитам с высокоавидным рецептором и после этого они уничтожаются. Таким образом, PRAME-распознающие Т-клетки в крови здоровых доноров могут быть одним из факторов, обеспечивающих иммунный надзор за развитием онкологических заболеваний. Возможно, эти клетки позволяют достичь хорошего ответа у реципиентов после инфузии донорских лимфоцитов.

Что касается развития В-клеточного ответа, то данный тип иммунного ответа против антигена PRAME, вероятнее всего, не развивается. У больных множественной миеломой, которым выполнена трансплантация аутологичных гемопоэтических стволовых клеток, а также у больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ) антитела против PRAME и MAGEA3 не были обнаружены [8, 9]. Столь редкое появление антител связывают с низкой активностью PRAME-специфических Th2-клеток [9].

## ИЗВЕСТНЫЕ ИММУНОГЕННЫЕ ПЕПТИДЫ PRAME

В генотипе европейцев распространены изотипы A2 и B35 молекулы HLA (приблизительно у 50 и 20 % населения соответственно). Молекула HLA класса I закрыта с двух сторон и может ассоциироваться с пептидами длиной 8–11 аминокислотных остатков. Чем сильнее связь пептид–HLA, тем выше иммуногенность белка, имеющего данный эпитоп. Известно,

что в определенных положениях пептида должны располагаться заряженные аминокислотные остатки. Расположение групп этих остатков позволяет при помощи специальных программ находить возможные эпитопы в первичной структуре белка. Белок PRAME состоит из 509 остатков, и в его структуре определено множество потенциальных эпитопов. Наиболее изученным является взаимодействие пептидов PRAME с молекулой HLA-A2, самой распространенной. Из множества предсказанных пептидов 19 продемонстрировали высокую аффинность связывания с молекулой HLA-A2 [10].

Наиболее иммуногенными эпитопами PRAME оказались пептиды VLDGLDVLL (занимает положение 100–108 в белке PRAME или PRA100), SLYSFPEPEA (PRA142), ALYVDSLFFL (PRA300), SLLQHNLGL (PRA425) и NLTHVLYPV (PRA435). Эти эпитопы процессируются и распознаются в комплексе с молекулой HLA-A0201 [3, 11].

С молекулой HLA-B35 могут связываться следующие пептиды PRAME: LPRELFPPL(F) (PRA48), FPPLFMAAF (PRA53), RPRRWKLQV (PRA113), IPVEV-LVDLF (PRA173), LPTLAKFSPY (PRA246), CPNCGDRTFY (PRA488), EPILCPCFM (PRA500) [12].

Установлено также, что с молекулой HLA-B62 связывается пептид GQHLHLETF [13], а с молекулой HLA-A3 — пептид ELFSYLIEK (PRA190) [14].

Большое разнообразие иммуногенных эпитопов PRAME делает этот белок очень привлекательным для использования в терапии. При сопоставлении иммуногенности PRAME и BCR-ABL, характерного для ХМЛ, последний показал очень низкую иммуногенность. Объясняется это тем, что BCR-ABL образован двумя белками, экспрессирующимися в соматических тканях человека и поэтому неиммуногенных. Лишь в месте слияния BCR и ABL находится единственный потенциальный эпитоп, новый для иммунной системы носителя [15]. Однако остальные известные раково-тестикулярные антигены, такие как MAGE-A3, SSXIP2, HAGE и некоторые другие, реже по сравнению с PRAME вызывают Т-клеточный иммунный ответ [16–20].

Интересно, что PRAME может расщепляться не только протеасомами, но и пептидазами nardilysin и TOP. Таким образом, ингибиторы протеасом, такие как бортезомиб, не могут полностью блокировать презентацию эпитопов PRAME при терапии PRAME-экспрессирующих опухолей. Это может быть полезно при планировании противоопухолевой терапии, включающей бортезомиб, сочетанной с иммунотерапией [14].

## ДОСТУПНОСТЬ PRAME-ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ ОПУХОЛЕВОЙ КЛЕТКИ ДЛЯ ИММУНОТЕРАПИИ

Чем больше уровень экспрессии опухолевого антигена, тем больше эпитопов презентуется этой опухолевой клеткой и тем выше вероятность того, что опухолевая клетка будет распознана иммунной системой и уничтожена. Таким образом, больший уровень экспрессии антигена опосредует большую иммуногенность опу-

холевой клетки. Согласно наблюдениям M. Griffioen и соавт., чем больший уровень экспрессии PRAME в них наблюдается, тем интенсивнее происходит лизис. Так, клетки меланомы благодаря высокому уровню экспрессии PRAME погибают гораздо быстрее, чем, например, клетки острого лимфобластного лейкоза, имеющие менее активный ген *PRAME* [21].

Результаты масштабного исследования J. Yao и соавт. показали, что *PRAME* (вместе с *PLAC1*) является одним из самых активных раково-тестикулярных генов в опухолевых тканях человека [22]. *PRAME* не только отличается высокой частотой экспрессии, но и обладает самым высоким уровнем активности. Для других потенциальных мишеней, таких как белок WT1, характерен в десятки раз меньший уровень экспрессии [23].

Медиана уровня экспрессии *PRAME* в бластных клетках больных острыми миелоидными лейкозами (ОМЛ) составляла 700 ед., в то время как в здоровых клетках CD34+ она была всего 1,8 ед. [24]. Активность *PRAME* в клетках различных тканей здоровых доноров может наблюдаться, но всегда на нижней границе чувствительности метода. В частности, в мезенхимных клетках человека *PRAME* оказался наименее активным раково-тестикулярным геном [6]. Благодаря этому иммунотерапия, направленная против антигена PRAME, позволит уничтожить только опухолевые клетки и не затронет нормальные [25, 26].

Известен феномен так называемой лейкозной стволовой клетки, которая менее иммуногенна и может быть причиной рецидива заболевания. Активность PRAME в стволовых клетках солидных опухолей не изучалась. С другой стороны, при ХМЛ экспрессия PRAME характерна для всех популяций лейкозных клеток, в т. ч. CD34-позитивных. Особенно высокий уровень экспрессии PRAME наблюдается при бластном кризе ХМЛ [27]. Следует отметить, что некоторые больные ХМЛ могут быть PRAME-негативными, а следовательно, терапия, направленная против PRAME, в таких случаях будет неэффективной [28].

Таким образом, PRAME-экспрессирующие клетки опухоли доступны для иммунного ответа. Учитывая возможность спонтанного ответа против PRAME, неудивительно, что при различных заболеваниях активность PRAME связана с благоприятным исходом. Так, показано, что экспрессия антигенов WT1, PRAME, PR1 и антигена минорной гистосовместимости HA1 позволяет активировать иммунный ответ после трансплантации аллогенного костного мозга у больных ОМЛ и МДС. При наличии ответа на два и более антигенов у больных сохраняется длительная ремиссия [29]. В. Steger и соавт. также установили, что активность PRAME может быть фактором, улучшающим успех аллогенной трансплантации [29]. В тех случаях, когда у больного уровень экспрессии гена *PRAME* исходно был очень высок, после трансплантации он снижался [26].

Экспрессия PRAME при раке молочной железы является независимым фактором неблагоприятного прогноза ( $p = 0,02$ ). Иммуномодулирующая терапия несколько улучшала исход у больных с PRAME-гиперэкспрессией по сравнению с остальной группой [30]. Вероятная причина улучшения результатов

терапии — развитие PRAME-специфического иммунного ответа после иммуномодулирующей терапии.

Фактором успеха иммунотерапии считаются Т-лимфоциты. Согласно наблюдениям, развитие CD8-ассоциированного ответа против PRAME напрямую зависит от активности этого антигена в опухолевой клетке. Чем более высокий уровень экспрессии PRAME наблюдался в дебюте ОМЛ, тем более выраженным был Т-клеточный ответ против PRAME у больных, достигших ремиссии [3, 16]. У пациентов в развернутых стадиях ОМЛ при относительно высоком уровне активности гена *PRAME* чаще находили Т-клетки с низкоавидным рецептором. В тех случаях, когда Т-клетки больных обладали высокоавидным рецептором, уровень экспрессии PRAME в опухолевых клетках оказывался относительно низким. К. Rezvani и соавт. предположили, что высокоавидные Т-клетки уничтожили пул PRAME-гиперэкспрессирующих клеток, а в оставшихся опухолевых клетках уровень экспрессии PRAME был низким [3].

Однако почему вообще развиваются PRAME-экспрессирующие онкологические заболевания, если наивные Т-клетки, способные распознать PRAME, присутствуют в организме каждого исходно? Наиболее вероятная причина — иммуносупрессия. При саркоме Юинга, например, PRAME-распознающие клетки были найдены только у 2 из 14 обследованных больных. Общее число PD1-экспрессирующих Т-клеток было повышенным, что свидетельствует об иммуносупрессии [31]. Иммуносупрессия является достаточно распространенным явлением и может быть одним из обязательных условий развития опухоли. Интересные результаты получили А. Hughes и соавт., изучавшие развитие иммунного ответа против PRAME в контексте иммуносупрессии у больных ХМЛ [32]. Согласно современным представлениям, в дебюте ХМЛ возрастает число миелоидных супрессоров и регуляторных Т-клеток, а количество активированных НК-клеток (естественных киллеров) уменьшается. При успешном достижении большого молекулярного ответа параметры иммунной системы также приходят в норму. Наблюдается снижение числа миелоидных супрессоров и уровня экспрессии молекулы PD1 на поверхности Т-клеток, а также нормализуется число активированных НК-клеток. В дебюте заболевания пептиды PRAME распознавались Т-клетками только в 10 % случаев. При достижении большого молекулярного ответа распознавание пептидов происходило в 40 % случаев, а при полном молекулярном ответе — в 42 %. BCR-ABL-экспрессирующие CD34-позитивные клетки, представляющие собой стволовые клетки ХМЛ, экспрессируют молекулы HLA классов I и II. Хотя эти клетки в основном не экспрессируют маркеры CD40, CD80, CD83 и CD86, стимулирующие презентацию антигенов, представление эпитопов PRAME молекулами HLA не затруднено. Таким образом, клетки ХМЛ могут подвергаться атаке иммунных клеток [33]. Отсюда следует, что контроль иммунной системы важен для поддержки ремиссии при ХМЛ в случае отмены ингибиторов тирозинкиназ (ИТК). Предполагается, что в дебюте заболевания клон опухолевых клеток численно растет и к нему развивается толерантность. Во время терапии ИТК исчезают не только

клетки ХМЛ, но и клетки-супрессоры, и в результате иммунный ответ против оставшихся лейкозных клеток становится успешным [32].

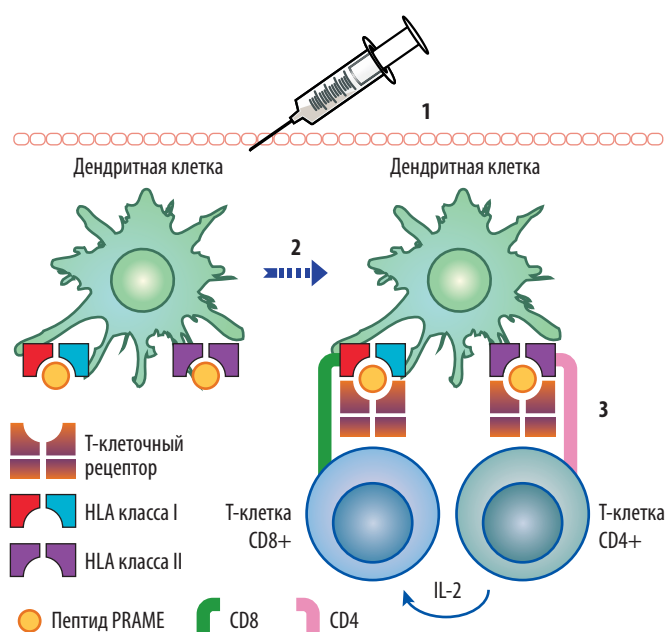
Иммуносупрессия может быть опосредована противоопухолевой терапией. Большинство современных препаратов угнетает функции профессиональных АПК [34]. В результате активация наивных PRAME-распознающих Т-клеток не происходит. По этой причине, вероятно, рост опухоли у больных не контролируется иммунитетом.

Иммунотерапия, направленная против PRAME-экспрессирующих клеток, представляется безопасной, т. к. активность PRAME в соматических клетках определяется на нижней границе чувствительности метода [26]. К настоящему времени испытано множество разных подходов для иммунотерапии PRAME-экспрессирующих заболеваний.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДЕНДРИТНОКЛЕТОЧНЫЕ ВАКЦИНЫ

Одно из направлений иммунотерапии заключается в увеличении эффективности иммунопредставления целевого антигена. Для иммунопредставления можно использовать дендритные клетки (ДК), которые, как известно, являются профессиональными АПК. С помощью ДК можно стимулировать Т-клетки в условиях *in vitro*. ДК достаточно просто получить из мононуклеаров человека, в т. ч. больного. Кроме того, можно «настроить» полученные ДК на презентацию нужного антигена, поместив данный антиген либо кодирующую его РНК прямо в них (рис. 2).

В 2006 г. F. Morandi и соавт. предположили, что нагрузка ДК смесью мРНК имеет преимущества перед нагрузкой единственным антигеном. Это позволяет минимизировать риск потери эпитопа в результате точечной мутации в опухолевой клетке и связанной с этим потерей распознавания опухоли иммунными клетками [35]. В своей работе F. Morandi и соавт. вывели ДК из мононуклеаров 3 больных HLA-A2+ нейробластомой и 7 HLA-A1+ и HLA-A2+ здоровых доноров. Проводили трансфекцию полученных ДК смесью мРНК линий нейробластомы GI-ME-N и IMR-32 (HLA-A1+), а также SKNBЕ и SHSY5Y (HLA-A2+). Трансфекция не повлияла на иммунофенотип ДК. Для сокультивирования с этими ДК обогатили CD8-положительными Т-клетками доноров и больных. Согласно данным иммунофенотипирования, полученные Т-клетки были активированными. Мишенями для этих клеток были линии нейробластомы, инкубированные с интерфероном- $\gamma$  для увеличения уровня экспрессии HLA класса I, и клетки линии T2, нагруженные различными эпитопами, в т. ч. SLLQHLIGL белка PRAME. Т-клетки успешно лизировали клетки-мишени линий нейробластомы. Т-клетки, инкубированные с ДК, полученными от больных, распознавали большее число антигенов по сравнению с клетками, получившими антигены от ДК здоровых доноров. Интересно, что Т-клетки больных еще до стимулирования с помощью ДК обладали способностью распознавать эпитоп PRAME, хотя существенно с меньшей интенсивностью, в то время как исходные Т-клетки здоровых доноров до стимулирования не распознавали пептиды [35].



**Рис. 2.** Механизм развития иммунного ответа против PRAME после введения дендритных клеток:

1 — введение дендритных клеток, нагруженных эпитопами PRAME; 2 — миграция дендритных клеток в периферические лимфоидные органы; 3 — презентация антигена Т-клеткам. CD4-положительные Т-клетки участвуют в активации CD8-положительных Т-клеток

**Fig. 2.** Mechanism of immune response against PRAME after administration of dendritic cells:

1 — injection of PRAME epitope-loaded dendritic cells; 2 — migration of dendritic cells to peripheral lymphoid organs; 3 — antigen presentation to T-cells. CD4-positive T-cells are involved in activation of CD8-positive T-cells

ДК создавались также для иммунотерапии лимфомы Ходжкина (ЛХ). Для этого С. Winkler и соавт. трансфицировали ДК смесью комплементарной ДНК (кДНК) клеточных линий ЛХ. кДНК синтезировалась на матрице мРНК для стабилизации последней. Трансфицированные ДК позволили получить Т-клетки, успешно лизирующие линии ЛХ и клетки линии T2, нагруженные известными иммуногенными пептидами PRAME. При использовании азациитидина для увеличения уровня экспрессии PRAME лизис клеточных мишеней проходил с большей интенсивностью [36].

U. Gerdemann и соавт. разрабатывали ДК, нагруженные не РНК или кДНК, а набором пептидов белков SSX2, MAGEA4, Survivin, NY-ESO-1 и PRAME [37]. Аминокислотные последовательности пептидов взаимно перекрывались между собой. Благодаря этому смесь пептидов имитировала полную последовательность белка. Предполагалось, что это позволит развиваться широкому спектру специфичных Т-клеток [37]. ДК и Т-клетки для экспериментов получали из периферической крови здоровых доноров. В качестве клеток-мишеней использовались опухолевые линии и здоровые клетки, нагруженные целевыми пептидами или трансфицированные векторами для экспрессии данных пептидов. Авторы установили наилучшее сочетание цитокинов для стимулирования Т-клеток с помощью ДК — это IL-7, IL-12, IL-15, с дополнением IL-6 либо IL-27. Данные цитокины позволили получить много поликлональных эффекторных и Th1-

клеток. При этом клетки-эффекторы выводились из состояния анергии, в то время как супрессоры и NK-клетки почти не развивались [37].

Хотя ДК можно получить из моноцитов периферической крови здоровых доноров, для презентации необходимо ввести в эти клетки соответствующий антиген. Кроме того, существует проблема несовпадения ДК донора и больного по HLA. В связи с этим некоторые исследователи оценили возможность получения ДК непосредственно из лейкозных клеток, циркулирующих в крови больных ОМЛ. Поскольку при ОМЛ экспрессия PRAME происходит на высоком уровне, предполагалось, что АПК, полученные из опухолевых клеток, продолжат презентацию эпитопов белка.

Y.S. Mohamed и соавт. создали гибридные АПК из клеток острого промиелоцитарного лейкоза и иммортализованных В-клеток [38]. Данные АПК успешно стимулировали Т-клетки, благодаря чему те проводили лизис PRAME-экспрессирующих линий, представленных в качестве мишеней.

Но самые интересные результаты получила группа L. Li и соавт., создавшая ДК из PRAME-, RHAMM- и WT1-экспрессирующих бластных клеток больных ОМЛ [39]. Для созревания так называемых ОМЛ-ДК использовался «коктейль» цитокинов GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), IL-4 (интерлейкин-4) и TNF- $\alpha$  (фактор некроза опухолей  $\alpha$ ). В полученных ДК уровень активности опухолевых антигенов в целом был выше, чем в исходных бластных клетках. В этих же бластных элементах до превращения их в ДК наблюдался очень низкий уровень экспрессии костимулирующих молекул CD40, CD80, CD83 и относительно высокий — CD86, HLA-ABC, -DR. После превращения клеток в ОМЛ-ДК уровень экспрессии данных маркеров возрос. Однако активность антигенов CD40, CD83 и CD86 в ДК, полученных от здоровых доноров, превосходила уровень, наблюдаемый в ОМЛ-ДК. Таким образом, способность к активации Т-клеток у ОМЛ-ДК, полученных от больных, потенциально меньше по сравнению с ДК от здоровых доноров. Тем не менее ОМЛ-ДК сохранили экспрессию лейкоз-ассоциированных антигенов, благодаря чему не потребовалось прибегать к стрессовым процедурам их трансфекции мРНК или пептидами [39].

L. Li и соавт. получили CD8-позитивные клетки от здоровых доноров и стимулировали их с помощью ОМЛ-ДК. Стимулированные CD8-позитивные клетки распознавали как PRAME-экспрессирующие бластные клетки ОМЛ, так и полученные ОМЛ-ДК. С большей скоростью и более специфично подвергались лизису ОМЛ-ДК, с меньшей — бластные клетки, имеющие меньший уровень экспрессии костимулирующих молекул, и с еще меньшей скоростью — K562, на поверхности которой отсутствуют молекулы HLA класса I [40]. L. Li и соавт. продолжили исследования и оценили эффективность дендритноклеточной вакцины у 5 больных с рецидивами ОМЛ. ДК вводились по 5 млн клеток 4-кратно с интервалом 2 нед. У 2 больных смерть наступила очень быстро, но трое успели пройти полный курс вакцинации, однако тоже умерли. Удалось установить, что Т-клетки вакцини-

рованных больных распознавали пептид ALYVDSLFFL белка PRAME. В основном это были CD4-позитивные Т-клетки [41].

Известны результаты исследования  $\gamma/\delta$  Т-клеток, используемых в качестве АПК. В отличие от ДК  $\gamma/\delta$  Т-лимфоциты могут делиться. Эти  $\gamma/\delta$  Т-клетки выделили из крови здорового донора и нагрузили известными HLA-A2-презентируемыми пептидами белка PRAME. Для сравнения сделали другие АПК — ДК из крови и АПК из K562. Оказалось, что  $\gamma/\delta$  Т-клетки, нагруженные известными HLA-A2-презентируемыми пептидами белка PRAME, позволяли получить столько же активных Т-клеток, сколько и обычные ДК. При этом формировалось меньше регуляторных Т-клеток. Наивные клетки удавалось превратить в эффекторные клетки и клетки памяти. По каким-то причинам полученные Т-клетки не могли поразить PRAME-позитивные клетки опухоли [42].

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ Т-КЛЕТОК

Поскольку ДК можно использовать для стимулирования Т-клеток *in vitro*, было предложено вводить больным крупные (по несколько десятков миллионов) популяции CD8-позитивных Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам PRAME. В ранних исследованиях обсуждалась безопасность таких клеток, но уже в 2001 г. M. Matsushita и соавт. установили, что уровень экспрессии гена *PRAME* в здоровых клетках настолько низкий, что Т-лимфоциты не распознают их как мишень для лизиса. При этом лейкозные клетки демонстрируют активность гена, на порядки большую, чем в здоровых клетках. По этой причине Т-клетки, выделенные из образцов крови больного LB33, атаковали клетки линий K562 [43].

Количество Т-клеток, распознающих PRAME, в крови здоровых добровольцев оценивается как 1–40 на 1 млн клеток CD8+ [21, 44]. Несмотря на немногочисленность клеток, известно много успешных попыток их выделения из крови здоровых доноров [5, 11, 17, 18, 21, 37, 44, 45]. PRAME-распознающие клетки доноров можно стимулировать аутологичными ДК, нагруженными пептидами PRAME, клонировать и размножить их. Эти клетки могут использоваться для терапии PRAME-экспрессирующих заболеваний, т. к. они уничтожают опухолевые линии, подходящие по репертуару HLA [21]. Лизис проходит успешно даже в экспериментах, проводимых на моделях мышей [18, 46].

В организме больных Т-клетки также содержатся, но по упомянутым выше причинам они находятся в состоянии анергии и не могут контролировать рост опухоли. Однако эти клетки можно активировать в условиях *in vitro*, стимулировать их пролиферацию и вернуть в организм больного [21]. Многие исследователи успешно получили PRAME-распознающие Т-клетки из крови больных острыми лейкозами и меланомой [3, 11, 17, 38, 45, 47, 48] и даже из тканей лимфатических узлов, в которые впадали лимфатические сосуды, идущие от опухоли у больных меланомой [46]. Как и в случае со здоровыми донорами, эти Т-клетки часто имели наивный иммунофенотип или

находились в состоянии анергии, но их можно было активировать. Цитокины IL-7, IL-12 и IL-15, например, способны выводить клетки из состояния анергии при их стимулировании ДК *in vitro* [37, 48]. Полученные Т-лимфоциты лизировали клетки-мишени. Свойства клеток, полученных от больных, были в целом сопоставимы со свойствами специфических Т-лимфоцитов, выведенных от здоровых доноров. Наиболее успешный лизис был в условиях, когда клетка-мишень подходила по молекулам HLA и имела очень высокий уровень экспрессии PRAME. Увеличение уровня экспрессии белка PRAME посредством деметилирования последовательности его гена также повышало уязвимость опухолевых клеток цитотоксическими [45, 47].

Важным компонентом Т-клетки является ее рецептор (TCR). A.L. Amig и соавт. были первые, кто выделил и клонировал TCR в новые клетки. Т-клетки с трансфицированным рецептором приобретали способность распознавать тот же спектр клеток-мишеней, что и клетка, которая имела такой рецептор изначально. Перед клонированием в другие Т-клетки эти гены специально модифицировали (codon optimized and cysteine modified) для предотвращения сборки химерных рецепторов [49].

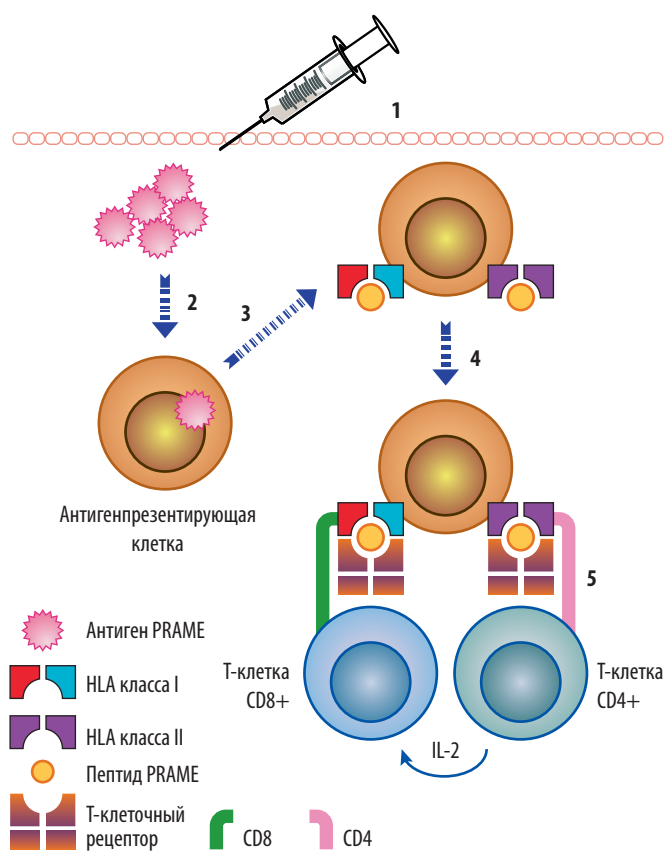
Для предупреждения возможных негативных последствий введения Т-клеток, таких как «цитокиновый шторм» или синдром распада опухоли, было предложено создавать Т-клетки с «суицидальным» геном для возможности их устранения. M.M. van Loenen и соавт. создали вектор с мультицистронной конструкцией, содержащей гены TCR и CD20 [50].

L. Spel и соавт. показали, что при нейробластоме, в большинстве случаев которой наблюдается экспрессия PRAME, NK-клетки больного могут осуществлять лизис опухолевых клеток. В ином случае NK-клетки выделяли интерферон- $\gamma$ , который увеличивал уровень экспрессии HLA класса I. После этого опухолевые клетки интенсивнее подвергались атаке со стороны PRAME-специфических Т-клеток. С одной стороны, можно разрабатывать NK-клеточные вакцины; с другой — более простым решением может быть использование растворимого интерферона- $\gamma$  [51].

## ВАКЦИНИРОВАНИЕ ПЕПТИДАМИ И БЕЛКОМ PRAME

Первыми вакцину, основанную на пептидах белка PRAME, получили здоровые добровольцы. Вакцинирование проходило без значимых побочных эффектов. Количество PRAME-распознающих CD8-позитивных клеток и их литическая активность после этого увеличились (рис. 3) [10].

В единственном клиническом исследовании по применению пептидов PRAME участвовало 26 HLA-A2-, PRAME- и PSA-позитивных больных меланомой, раком почки и раком простаты. Все больные были с распространенными стадиями опухолей, резистентным течением либо прогрессированием. Осуществлялось введение ДНК-векторов для экспрессии фрагментов пептидов 422–509 PRAME, а



**Рис. 3.** Механизм развития иммунного ответа против PRAME после вакцинации белком:

1 — введение вакцины, содержащей антиген PRAME; 2 — захват антигена PRAME антигенпрезентирующей клеткой; 3 — процессинг антигена PRAME и экспонирование его пептидов молекулами HLA классов I и II; 4 — миграция клетки в периферические лимфоидные органы; 5 — презентация антигена Т-клеткам. CD4-позитивные Т-клетки участвуют в активации CD8-позитивных Т-клеток

**Fig. 3.** Mechanism of immune response after vaccination with PRAME:

1 — injection of PRAME-containing vaccine; 2 — capture of PRAME antigen by antigen-presenting cell; 3 — processing of PRAME antigen and exposure of its peptides with HLA-I and HLA-II; 4 — migration of antigen-presenting cell in peripheral lymphoid organs; 5 — antigen presentation to T-cells. CD4-positive T-cells are involved in activation of CD8-positive T-cells

также пептидов 3–45 и 217–297 PSA в аксиллярные лимфатические узлы, а также введение HLA-A0201-презентируемых пептидов 425–433 PRAME и 288–297 PSA. Пациенты получили 4 введения плазмиды (в 1, 4, 15 и 18-й дни) и 2 введения пептида (29-й и 32-й дни). Ремиссия заболевания не была достигнута ни в одном случае. Стабилизация заболевания имела место у 10 из 24 больных. У 7 из этих 10 пациентов период стабилизации продолжался 6 мес. от начала терапии. В эту группу вошло 4 больных раком простаты, 2 — раком почки и 1 — меланомой [52].

Компания GlaxoSmithKline создала и испытала вакцинную композицию, состоящую из модифицированного рекомбинантного белка PRAME человека и иммуномодулирующего агента AS15, действующего как адъювант. При введении этой композиции мышам, кроликам и яванским макакам не отмечалось никаких побочных эффектов, кроме покраснения в месте введения. В отдельных случаях наблюдалось

кратковременное повышение температуры тела. Лимфатические узлы, локализованные в местах введения, были увеличены в опытной группе на 120–130 % за счет паракортекса, что свидетельствует о развитии иммунного ответа. После 4-го введения в крови животных были обнаружены антитела, связывающиеся с рекомбинантным PRAME. Титр антитела оставался стабильным после завершения вакцинирования [53, 54]. Мышам привили клетки опухоли CT26 (мышинный колоректальный рак), экспрессирующие человеческий белок PRAME. Вакцинированные мыши, которым привили клетки опухоли, остались в основном здоровыми в отличие от контроля. Ответ против другой опухоли, CT26-MAGE-A3, после применения PRAME и AS15 был незначительным. При добавлении антител, блокирующих CD4-позитивные клетки, опухоль увеличивалась существенно быстрее, что говорит о значимости Т-хелперов в активировании иммунного ответа против PRAME. У трансгенных мышей, экспрессирующих белки человека HLA-A2 и HLA-DR1, были обнаружены CD8-позитивные Т-клетки, распознающие эпитопы PRAME. У обезьян в основном наблюдался CD4-зависимый Т-клеточный ответ [54].

Эффективность вакцинирования PRAME оценивалась при раке легкого и меланоме. Больные раком легкого с PRAME+ ( $n = 60$ ) получили 12 введений белка PRAME в увеличивающихся дозах 20, 100 или 500 мкг в сочетании с одинаковой концентрацией адъюванта AS15. Чем выше была исходная доза белка, тем чаще наблюдались различные неблагоприятные эффекты, самым частым из которых было раздражение в месте введения препарата. После 4 введений вакцины у всех больных развился гуморальный ответ, величина которого не зависела от дозы белка. Развился Т-клеточный ответ, опосредованный CD4-позитивными клетками, причем с большей частотой у пациентов, получивших 500 мкг PRAME (80 % случаев). CD8-зависимый ответ развился всего у 2 больных, получавших 20 мкг белка. Поскольку CD8-позитивные клетки, распознающие PRAME, развивались редко, авторы предположили, что рекомбинантные белки не являются оптимальным субстратом для иммунорезентации. Для поддержки CD8-позитивных клеток авторы предложили сочетать PD1-блокаду и вакцинирование. II фаза клинического исследования была прервана в связи с тем, что параллельно идущее исследование вакцины против MAGE-A3 не дало результатов, превосходящих плацебо [55].

Вакцину, содержащую модифицированный белок PRAME (в концентрациях 20, 100 или 500 мкг) и адъювант AS15, получило 66 больных меланомой. Побочные эффекты были незначительными и не зависели от дозы. Гуморальный ответ против PRAME развился у всех больных после 4 введений. CD4-зависимый ответ наблюдался в 76, 46 и 57 % случаев в группах 1 (20 мкг), 2 (100 мкг) и 3 (500 мкг). Однако CD8-зависимый ответ против PRAME не развился ни в одном случае. У 8 больных наблюдалось прогрессирование заболевания. Образцы опухоли в период прогрессирования были PRAME-позитивными, как и до терапии. Таким образом, потеря эффективности терапии не связана с потерей антигена-мишени [56].

Можно предположить, что вакцинирование белком PRAME не приводит к развитию иммунного ответа, до-

статочного для контроля над ростом опухоли. Однако стоит рассмотреть вакцину, разработанную GlaxoSmithKline, подробнее. В тексте патента раскрыта структура рекомбинантного белка PRAME [57]. Рекомбинантный PRAME представляет собой химерный белок, образованный из трех аминокислотных остатков, предназначенных для инициации трансляции, 109 остатков поверхностного белка D патогена *Haemophilus influenzae* (гемофильная палочка), полной аминокислотной последовательности белка человека PRAME, а также последовательности из 6 остатков гистидина, предназначенных для удобства очистки. Белок D предназначен для стимулирования иммунного ответа против всей структуры. Согласно первым публикациям, титр антител был определен путем твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), причем в качестве антигена использовался исходный рекомбинантный белок [53]. Разумеется, среди антител в сыворотке вакцинированных животных могли содержаться антитела, распознающие как антигены белка D, так и антигены белка PRAME. Продолжая работу по вакцинированию, авторы создали рекомбинантный белок PRAME, продуцируемый *Pichia pastoris* (дрожжи). Структура белка не была приведена, но можно предположить, что в ней не содержались последовательности других антигенов, за исключением самого PRAME. С помощью этого белка оценивался титр антител у обезьян и больных меланомой и раком легкого, получивших вакцину [54–56]. Примечательно, что в качестве положительного контроля не использовались ни коммерческие антитела, распознающие PRAME, ни сам рекомбинантный белок, созданный независимыми производителями, хотя данные реагенты уже были доступны с самого начала клинических исследований вакцины. Таким образом, способность разработанной вакцины стимулировать гуморальный ответ против PRAME недостаточно доказана.

В работах, проведенных GlaxoSmithKline, показано, что CD8-позитивные Т-клетки, распознающие PRAME, развиваются в единичных случаях. Возможно, порог чувствительности используемой методики был очень высокий, из-за чего не удалось оценить количественные изменения популяции PRAME-распознающих CD8-позитивных клеток. Что касается CD4-экспрессирующих PRAME-распознающих Т-клеток, то, хотя они и были обнаружены, их свойства остались неопределенными. Неизвестен иммунофенотип этих Т-клеток, и нельзя определить, какое воздействие они оказывают на иммунный ответ против антигена PRAME.

---

## РАЗРАБОТКА АНТИТЕЛ ПРОТИВ АНТИГЕНА PRAME

Оценить роль гуморального ответа против PRAME-экспрессирующих клеток можно косвенно, т. к. антитела у больных практически никогда не обнаруживались. В связи с этим разработка терапевтических антител против PRAME остается самым малоразвитым направлением. К настоящему времени (ноябрь 2017 г.) опубликовано всего 3 работы на данную тему. Согласно результатам одной из них, выполненной А.У. Chang и



соавт., можно использовать антигенраспознающий участок TCR и создать на его основе иммуноглобулин. Исходный варибельный домен иммуноглобулина класса G1 человека целиком заменен на данный антигенраспознающий участок, отобранный посредством фагового дисплея. В результате было создано полноценное антитело, обладающее способностью распознавать эпитоп PRA300, презентированный молекулой HLA класса A2. Антитело демонстрировало клеточно-опосредованную цитотоксичность в условиях *in vitro*, а также в ксенографтной модели мыши [58].

Группа D. Pankov и соавт. сделала ставку на то, что белок PRAME локализован на поверхности опухолевой клетки [59]. Авторы создали поликлональные кроличьи антитела против пептида 310–331 PRAME и доказали связывание этих антител с поверхностью различных PRAME-экспрессирующих линий, в т. ч. линий меланомы и лейкозов. Эти антитела, меченные радиоактивной меткой, связывались с опухолями человека, привитыми мышам. В дальнейшем предполагается использовать данные антитела для различных задач, таких как диагностика онкологических заболеваний и таргетная терапия.

Наша научная группа также достигла успехов в разработке моноклональных антител против белка PRAME. Рекомбинантный PRAME, для удобства очистки содержащий последовательность из 6 остатков гистидина, вызывал гуморальный иммунный ответ у иммунизированных мышей [60, 61]. Было замечено, что при добавлении сыворотки иммунизированных мышей в культуру мышинной меланомы, трансфицированной белком PRAME человека, скорость роста клеток снижалась, а процессы гибели усиливались [62]. В культуральной среде отсутствовали клетки-эффекторы и молекулы системы комплемента. Следовательно, сыворотки не могли инициировать клеточно-опосредованную или комплемент-зависимую цитотоксичность против клеток-мишеней. Возможной причиной цитотоксичности могут быть свойства, проявляемые мембрано-

связанной формой белка PRAME. PRAME, связанный антителами из сыворотки, мог работать как рецептор, передающий некий сигнал, результатом которого могло стать замедление процессов роста клеток. Интересно, что разработанные нами моноклональные мышинные антитела, распознающие PRAME, так же как и сыворотка, угнетали рост PRAME-экспрессирующих клеток [63].

## О ПРЕИМУЩЕСТВАХ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ИММУНОТЕРАПИИ, НАПРАВЛЕННОЙ ПРОТИВ PRAME

Несмотря на многообразие уже использованных подходов, проблема иммунотерапии у больных с экспрессией PRAME к настоящему времени не разрешена. Тем не менее накопленный опыт позволяет определить возможные причины неуспешности некоторых подходов и выбрать наиболее перспективные направления для дальнейших исследований. Преимущества и недостатки различных направлений систематизированы в табл. 1.

Дендритноклеточные вакцины и вакцины белковой природы, в т. ч. пептидные, стимулируют иммунный ответ против PRAME **опосредованно**. Эти вакцины не ограничены репертуаром молекул HLA больного, за исключением случаев создания аллогенных дендритноклеточных вакцин. Преимущества подобных вакцин — возможность развития мультиэпитопного ответа против антигена PRAME. Однако практика показала, что подобные подходы лишь в единичных случаях приводят к развитию CD8-зависимого ответа, часто — к развитию CD4-зависимого ответа. В зависимости от своих функций PRAME-специфические CD4-экспрессирующие Т-клетки могут стимулировать разные типы ответа. Возможны стимулирование В-клеточного ответа, CD8-зависимого, неспецифического цитотоксического и даже индукция толерантности.

**Таблица 1.** Сравнение результативности различных подходов к иммунотерапии, направленной против антигена PRAME

Основа иммунотерапии	Преимущества	Недостатки	Результаты применения в ксенографтных моделях	Результаты применения в клинических исследованиях
Дендритные клетки	Возможно развитие CD8-зависимого и Ig-опосредованного ответа против значительного числа эпитопов PRAME	Может привести к развитию толерантности к PRAME	Не применялись	Безуспешны. Стимулировали развитие CD4-зависимого ответа
CD8-позитивные Т-клетки, распознающие PRAME	Гарантированное поражение опухолевых клеток и возможность применения большой массы специфических Т-клеток со встроенным «суицидальным» геном	Узкая специфичность и риск иммуноредактирования	Успешный контроль роста опухоли	Не применялись
Пептидные или рекомбинантные белки	Возможно развитие CD8-зависимого и Ig-опосредованного ответа против значительного числа эпитопов PRAME	Неприменимы при иммунодефицитных состояниях и могут привести к толерантности за счет развития регуляторных клеток	Наблюдался CD8-зависимый ответ против PRAME-экспрессирующих клеток	В лучшем случае наблюдалась стабилизация заболевания. В основном развивался CD4-зависимый ответ, в единичных случаях — CD8-зависимый
Антитела	Высокая эффективность при лейкозах, возможность создавать иммуноконъюгаты, цитостатический эффект	Узкая специфичность и иммуноредактирование, возможно, меньшая эффективность при солидных опухолях	Успешный контроль роста опухоли	Не применялись

К сожалению, в исследованиях эффективности вакцинирования больных не был раскрыт иммунофенотип обнаруженных CD4-позитивных клеток, а их функции можно предположить только на основе анализа достигнутых эффектов. Эти эффекты были следующими: CD8-позитивные клетки не обнаружены, методика определения титра PRAME-специфических антител в сыворотке вызывает вопросы, а потеря клинической эффективности не была связана с потерей целевого антигена. В связи с этим можно предположить, что CD4-позитивные клетки, развившиеся в результате вакцинирования, были регуляторными клетками, ограничившими ответ против антигена PRAME. Хотя развитие Th1-клеток, стимулирующих гуморальный ответ против PRAME, не исключается, вакцинация больных ДК или белком может приводить к толерантности к важному опухолевому антигену.

Следует уточнить, что тип иммунного ответа напрямую связан с функциями ДК. В экспериментах на животных установлено, что ДК, введенные внутривенно, с большей вероятностью стимулируют CD4-позитивные клетки. При подкожном введении увеличивается интенсивность CD8-опосредованного иммунного ответа [64]. Относительно недавно выявили субпопуляцию ДК, в которых функционируют транскрипционные факторы IRF8 и BATF3. Одна из функций данных ДК заключается в активации Т-киллеров и противоопухолевом иммунном ответе [65]. Вакцины, основанные на IRF8/BATF3-зависимых ДК, могут показать значительную эффективность при иммунотерапии против PRAME-экспрессирующих опухолей.

В отличие от ДК и вакцин белковой природы специфические антитела или CD8-позитивные клетки действуют **напрямую** против PRAME-экспрессирующих клеток. Недостаток подобных методов заключается в узкой специфичности и связанным с этим риском потери эпитопа опухолевой клеткой. Но поскольку PRAME является важным «драйвером» канцерогенеза, его потеря в целом снижает жизнеспособность опухолевых клеток, особенно при солидных опухолях [66, 67]. Таким образом, иммуноредактирование не может быть ограничивающим фактором. Еще одно преимущество PRAME-специфических Т-киллеров и моноклональных антител заключается в том, что данные препараты в малой степени зависят от состояния иммунной системы больного. Т-киллеры могут быть модифицированы таким образом, что всегда будут иметь активированный иммунофенотип. Этого можно достичь, встроив в клетки ген для экспрессии IL-2, например. Антитела могут вызывать различные эффекты, прежде всего перфорацию мембраны PRAME-экспрессирующих клеток НК-клетками или белками системы комплемента.

Ограничения использования Т-киллеров — побочные эффекты в виде «цитокинового шторма» — вполне преодолимы уже в настоящее время. Могут возникать затруднения, связанные с несовпадением репертуара HLA у Т-клеток и тканей реципиента, но можно производить клетки из организма самого больного. Применение векторов для экспрессии CAR в этих клетках позволит выиграть время для терапии, а также сделает клетки более управляемыми для снижения побочных эффектов.

Антитела могут быть малоэффективны в случае солидных опухолей, при которых малигнизированные клетки образуют многослойные структуры, где большинство мишеней не имеет физического контакта с препаратом. Однако антитела можно использовать как средство доставки токсинов или радиоактивных агентов. Наконец, цитотоксический эффект антител, распознающих PRAME, может оказаться значимым при терапии.

Когда же лучше всего применять иммунотерапию? В тех случаях, когда масса опухоли велика, действие клеток-эффекторов или антител может привести к синдрому распада опухоли, «цитокиновому шторму» и связанным с этим неблагоприятным явлениям. Применение иммунодепрессантов для смягчения последствий сделает саму терапию неэффективной. Результаты применения ДК или белковых вакцин начнут проявляться не сразу, и может просто не хватить времени для развития противоопухолевого ответа. Наконец, сочетание вакцинирования и химиотерапии может нарушить свойства АПК, тогда результат будет непредсказуемым.

Наиболее подходящим представляется тот момент, когда количество опухолевых клеток минимально. Например, это может быть при хирургическом удалении опухоли или после успешного проведения химиотерапии. Иначе говоря, в ремиссии заболевания и при наиболее благоприятном состоянии иммунной системы, когда число супрессорных клеток минимально. В отсутствие супрессии разовьются клетки-эффекторы и возьмут под контроль остаточные образования. В таком случае можно рассчитывать на предотвращение рецидива или хотя бы смягчение его последствий, т. к. PRAME-экспрессирующие клетки будут уничтожены.

В связи с тем, что PRAME-распознающие CD8-экспрессирующие клетки в небольшом количестве существуют в организме каждого здорового человека, можно проводить превентивное вакцинирование для их активации.

В любом случае PRAME экспрессируется практически у половины пациентов с онкологическими и онкогематологическими заболеваниями. Для улучшения результатов терапии может быть использован и этот маркер опухолевой клетки.

---

## КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликтов интересов.

---

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

---

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Lehmann F, Marchand M, Hainaut P, et al. Differences in the antigens recognized by cytolytic T cells on two successive metastases of a melanoma patient are consistent with immune selection. *Eur J Immunol.* 1995;25(2):340–7. doi: 10.1002/eji.1830250206.
2. Ikeda H, Lethe B, Lehmann F, et al. Characterization of an Antigen That Is Recognized on a Melanoma Showing Partial HLA Loss by CTL Expressing

- an NK Inhibitory Receptor. *Immunity*. 1997;6(2):199–208. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80426-4.
3. Rezvani K, Yong AS, Tawab A, et al. Ex vivo characterization of polyclonal memory CD8 T-cell responses to PRAME-specific peptides in patients with acute lymphoblastic leukemia and acute and chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009;113(10):2245–55. doi: 10.1182/blood-2008-03-144071.
  4. Lutz M, Worschech A, Alb M, et al. Boost and loss of immune responses against tumor-associated antigens in the course of pregnancy as a model for allogeneic immunotherapy. *Blood*. 2015;125(2):261–72. doi: 10.1182/blood-2014-09-601302.
  5. LaVoy EC, Bollard CM, Hanley PJ, et al. A single bout of dynamic exercise enhances the expansion of MAGE-A4 and PRAME-specific cytotoxic T-cells from healthy adults. *Exerc Immunol Rev*. 2015;21:144–53.
  6. Saldanha-Araujo F, Haddad R, Zanette DL, et al. Cancer/Testis Antigen Expression on Mesenchymal Stem Cells Isolated from Different Tissues. *Anticancer Res*. 2010;30(12):5023–7. doi: 10.1007/978-94-007-4798-2\_11.
  7. Kirkin AF, Dzhandzhugazyan K, Zeuthen J. The Immunogenic Properties of Melanoma-Associated Antigens Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes. *Exp Clin Immunogenet*. 1998;15(1):19–32. doi: 10.1159/000019050.
  8. Luetkens T, Schaffhausen P, Uhlich F, et al. Expression, epigenetic regulation, and humoral immunogenicity of cancer-testis antigens in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2010;34(12):1647–55. doi: 10.1016/j.leukres.2010.03.039.
  9. Luetkens T, Kobold S, Cao Y, et al. Functional autoantibodies against SSX-2 and NY-ESO-1 in multiple myeloma patients after allogeneic stem cell transplantation. *Cancer Immunol Immunother*. 2014;63(11):1151–62. doi: 10.1007/s00262-014-1588-x.
  10. Kessler JH, Beekman NJ, Bres-Vloemans SA, et al. Efficient Identification of Novel HLA-A\*0201-presented Cytotoxic T Lymphocyte Epitopes in the Widely Expressed Tumor Antigen PRAME by Proteasome-mediated Digestion Analysis. *J Exp Med*. 2001;193(1):73–88. doi: 10.1084/jem.193.1.73.
  11. Quintarelli C, Dotti G, Hasan ST, et al. High-avidity cytotoxic T lymphocytes specific for a new PRAME-derived peptide can target leukemic and leukemic-precursor cells. *Blood*. 2011;117(12):3353–62. doi: 10.1182/blood-2010-08-300376.
  12. Kessler JH, Mommaas B, Mutis T, et al. Competition-Based Cellular Peptide Binding Assays for 13 Prevalent HLA Class I Alleles Using Fluorescein-Labeled Synthetic Peptides. *Hum Immunol*. 2003;64(2):245–55. doi: 10.1016/S0198-8859(02)00787-5.
  13. Kawahara M, Hori T, Matsubara Y, et al. Identification of HLA class I-restricted tumor-associated antigens in adult T cell leukemia cells by mass spectrometric analysis. *Exp Hematol*. 2006;34(11):1496–504. doi: 10.1016/j.exphem.2006.06.010.
  14. Kessler JH, Khan S, Seifert U, et al. Antigen processing by nardilysin and thimet oligopeptidase generates cytotoxic T cell epitopes. *Nat Immunol*. 2011;12(1):45–53. doi: 10.1038/ni.1974.
  15. Grunebach F, Mirakaj V, Mirakaj V, et al. BCR-ABL Is Not an Immunodominant Antigen in Chronic Myelogenous Leukemia. *Cancer Res*. 2006;66(11):5892–900. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2868.
  16. Greiner J, Schmitt M, Li L, et al. Expression of tumor-associated antigens in acute myeloid leukemia: implications for specific immunotherapeutic approaches. *Blood*. 2006;108(13):4109–17. doi: 10.1182/blood-2006-01-023127.
  17. Weber G, Caruana I, Rouce RH, et al. Generation of tumor antigen-specific T cell lines from pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia – implications for immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2013;19(18):5079–91. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0955.
  18. Schneider V, Zhang L, Rojewski M, et al. Leukemic progenitor cells are susceptible to targeting by stimulated cytotoxic T cells against immunogenic leukemia-associated antigens. *Int J Cancer*. 2015;137(9):2083–92. doi: 10.1002/ijc.29583.
  19. Babiak A, Steinhilber M, Gotz M, et al. Frequent T cell responses against immunogenic targets in lung cancer patients for targeted immunotherapy. *Oncol Rep*. 2014;31(1):384–90. doi: 10.3892/or.2013.2804.
  20. Greiner J, Ringhoffer M, Simikopinko O, et al. Simultaneous expression of different immunogenic antigens in acute myeloid leukemia. *Exp Hematol*. 2000;28(12):1413–22. doi: 10.1016/S0301-472X(00)00550-6.
  21. Griffioen M, Kessler JH, Borghi M, et al. Detection and Functional Analysis of CD8+ T Cells Specific for PRAME: a Target for T-Cell Therapy. *Clin Cancer Res*. 2006;12(10):3130–6. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2578.
  22. Yao J, Caballero OL, Yung WK, et al. Tumor subtype-specific cancer-testis antigens as potential biomarkers and immunotherapeutic targets for cancers. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(4):371–9. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0088.
  23. Qin YZ, Zhu HH, Liu YR, et al. PRAME and WT1 transcripts constitute a good molecular marker combination for monitoring minimal residual disease in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(7):1442–9. doi: 10.3109/10428194.2012.743656.
  24. Gutierrez-Cosio S, de la Rica L, Ballestar E, et al. Epigenetic regulation of PRAME in acute myeloid leukemia is different compared to CD34+ cells from healthy donors: Effect of 5-AZA treatment. *Leuk Res*. 2012;36(7):895–9. doi: 10.1016/j.leukres.2012.02.030.
  25. Greiner J, Ringhoffer M, Taniguchi M, et al. mRNA expression of leukemia-associated antigens in patients with acute myeloid leukemia for the development of specific immunotherapies. *Int J Cancer*. 2004;108(5):704–11. doi: 10.1002/ijc.11623.
  26. Paydas S, Tanriverdi K, Yavuz S, et al. PRAME mRNA Levels in Cases With Acute Leukemia: Clinical Importance and Future Prospects. *Am J Hematol*. 2005;79(4):257–61.
  27. Gerber JM, Qin L, Kowalski J, et al. Characterization of chronic myeloid leukemia stem cells. *Am J Hematol*. 2011;86(1):31–7. doi: 10.1002/ajh.21915.
  28. Yong AS, Keyvanfar K, Eniafe R, et al. Hematopoietic stem cells and progenitors of chronic myeloid leukemia express leukemia-associated antigens: implications for the graft-versus-leukemia effect and peptide vaccine-based immunotherapy. *Leukemia*. 2008;22(9):1721–7. doi: 10.1038/leu.2008.161.
  29. Steger B, Milosevic S, Doessinger G, et al. CD4+ and CD8+ T-cell reactions against leukemia-associated- or minor-histocompatibility-antigens in AML-patients after allogeneic SCT. *Immunobiology*. 2014;219(4):247–60. doi: 10.1016/j.imbio.2013.10.008.
  30. Doolan P, Clynes M, Kennedy S, et al. Prevalence and prognostic and predictive relevance of PRAME in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;109(2):359–65. doi: 10.1007/s10549-007-9643-3.
  31. Altwater B, Kailayangiri S, Theimann N, et al. Common Ewing sarcoma-associated antigens fail to induce natural T cell responses in both patients and healthy individual. *Cancer Immunol Immunother*. 2014;63(10):1047–60. doi: 10.1007/s00262-014-1574-3.
  32. Hughes A, Clarkson J, Tang C, et al. CML patients with deep molecular responses to TKI have restored immune effectors and decreased PD-1 and immune suppressors. *Blood*. 2017;129(9):1166–1176. doi: 10.1182/blood-2016-10-745992.
  33. Schmitt M, Li L, Giannopoulos K, et al. Chronic myeloid leukemia cells express tumor-associated antigens eliciting specific CD8+ T-cell responses and are lacking costimulatory molecules. *Exp Hematol*. 2006;34(12):1709–19. doi: 10.1016/j.exphem.2006.07.009.
  34. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(1):59–73. doi: 10.1038/nri2216.
  35. Morandi F, Chiesa S, Bocca P, et al. Tumor mRNA-Transfected Dendritic Cells Stimulate the Generation of CTL That Recognize Neuroblastoma-Associated Antigens and Kill Tumor Cells: Immunotherapeutic Implications. *Neoplasia*. 2006;8(10):833–42. doi: 10.1593/neo.06415.
  36. Winkler C, Steingrube DS, Altermann W, et al. Hodgkin's lymphoma RNA-transfected dendritic cells induce cancer/testis antigen-specific immune responses. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;61(10):1769–79. doi: 10.1007/s00262-012-1239-z.
  37. Gerdemann U, Katari U, Christin AS, et al. Cytotoxic T Lymphocytes Simultaneously Targeting Multiple Tumor-associated Antigens to Treat EBV Negative Lymphoma. *Mol Ther*. 2011;19(12):2258–68. doi: 10.1038/mt.2011.167.
  38. Mohamed YS, Bashawri LA, Vatte C, et al. The in vitro generation of multi-tumor antigen-specific cytotoxic T cell clones: Candidates for leukemia adoptive immunotherapy following allogeneic stem cell transplantation. *Mol Immunol*. 2016;77:79–88. doi: 10.1016/j.molimm.2016.07.012.
  39. Li L, Schmitt A, Reinhardt P, et al. Reconstitution of CD40 and CD80 in dendritic cells generated from blasts of patients with acute myeloid leukemia. *Cancer Immun*. 2003;3:8.
  40. Li L, Reinhardt P, Schmitt A, et al. Dendritic cells generated from acute myeloid leukemia (AML) blasts maintain the expression of immunogenic leukemia associated antigens. *Cancer Immunol Immunother*. 2005;54(7):685–93. doi: 10.1007/s00262-004-0631-8.
  41. Li L, Giannopoulos K, Reinhardt P, et al. Immunotherapy for patients with acute myeloid leukemia using autologous dendritic cells generated from leukemic blasts. *Int J Oncol*. 2006;28(4):855–61. doi: 10.3892/ijo.28.4.855.
  42. Altwater B, Pscherer S, Landmeier S, et al. Activated human  $\gamma\delta$  T cells induce peptide-specific CD8+ T-cell responses to tumor-associated self-antigens. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;61(3):385–96. doi: 10.1007/s00262-011-1111-6.
  43. Matsushita M, Ikeda H, Kizaki M, et al. Quantitative monitoring of the PRAME gene for the detection of minimal residual disease in leukaemia. *Br J Haematol*. 2001;112(4):916–26. doi: 10.1046/j.1365-2141.2001.02670.x.
  44. van den Ancker W, Ruben JM, Westers TM, et al. Priming of PRAME- and WT1-specific CD8+ T cells in healthy donors but not in AML patients in complete remission. *Oncoimmunology*. 2013;2(4):e23971. doi: 10.4161/onci.23971.
  45. Yao Y, Zhou J, Wang L, et al. Increased PRAME-Specific CTL Killing of Acute Myeloid Leukemia Cells by Either a Novel Histone Deacetylase Inhibitor Chidamide Alone or Combined Treatment with Decitabine. *PLoS One*. 2013;8(8):e70522. doi: 10.1371/journal.pone.0070522.
  46. Zhang M, Graor H, Visioni A, et al. T Cells Derived From Human Melanoma Draining Lymph Nodes Mediate Melanoma-specific Antitumor Responses In Vitro and In Vivo in Human Melanoma Xenograft Model. *J Immunother*. 2015;38(6):229–38. doi: 10.1097/CJI.0000000000000078.
  47. Yan M, Himoudi N, Basu BP, et al. Increased PRAME antigen-specific killing of malignant cell lines by low avidity CTL clones, following treatment with 5-Aza-20-Deoxycytidine. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60(9):1243–55. doi: 10.1007/s00262-011-1024-4.
  48. Quintarelli C, Dotti G, De Angelis B, et al. Cytotoxic T lymphocytes directed to the preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) target chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2008;112(5):1876–85. doi: 10.1182/blood-2008-04-150045.
  49. Amir AL, van der Steen DM, van Loenen MM, et al. PRAME-Specific Allo-HLA-Restricted T Cells with Potent Antitumor Reactivity Useful for Therapeutic T-Cell Receptor Gene Transfer. *Clin Cancer Res*. 2011;17(17):5615–25. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1066.
  50. van Loenen MM, de Boer R, Hagedoorn RS, et al. Multi-cistronic vector encoding optimized safety switch for adoptive therapy with T-cell receptor-modified T cells. *Gene Ther*. 2013;20(8):861–7. doi: 10.1038/gt.2013.4.
  51. Spel L, Boelens JJ, van der Steen DM, et al. Natural killer cells facilitate PRAME-specific T-cell reactivity against neuroblastoma. *Oncotarget*. 2015;6(34):35770–81. doi: 10.18632/oncotarget.5657.
  52. Weber JS, Vogelzang NJ, Ernstoff MS, et al. A Phase 1 Study of a Vaccine Targeting Preferentially Expressed Antigen in Melanoma and Prostate-specific

Membrane Antigen in Patients With Advanced Solid Tumors. *J Immunother*. 2011;34(7):556–67. doi: 10.1097/CJI.0b013e3182280db1.

**53.** Garçon N, Silvano J, Kuper CF, et al. Non-clinical safety evaluation of repeated intramuscular administration of the AS15 immunostimulant combined with various antigens in rabbits and cynomolgus monkeys. *J Appl Toxicol*. 2015;36(2):238–56. doi: 10.1002/jat.3167.

**54.** Gerard C, Baudson N, Ory T, et al. A Comprehensive Preclinical Model Evaluating the Recombinant PRAME Antigen Combined With the AS15 Immunostimulant to Fight Against PRAME-expressing Tumors. *J Immunother*. 2015;38(8):311–20. doi: 10.1097/CJI.0000000000000095.

**55.** Pujol JL, De Pas T, Rittmeyer A, et al. Safety and Immunogenicity of the PRAME Cancer Immunotherapeutic in Patients with Resected Non–Small Cell Lung Cancer: A Phase I Dose Escalation Study. *J Thorac Oncol*. 2016;11(12):2208–17. doi: 10.1016/j.jtho.2016.08.120.

**56.** Gutzmer R, Rivoltini L, Levchenko E, et al. Safety and immunogenicity of the PRAME cancer immunotherapeutic in metastatic melanoma: results of a phase I dose escalation study. *ESMO Open*. 2016;1(4):e000068.

**57.** Blais N, Martin D, Palmantier RM. Vaccin. Patent PCT/EP2008/050290. Available from: <https://patentscope.wipo.int/search/ru/detail.jsf?docId=WO2008087102&redirectedID=true>. (accessed 08.12.2017).

**58.** Chang AY, Dao T, Gejman RS, et al. A therapeutic T cell receptor mimic antibody targets tumor-associated PRAME peptide/HLA-I antigens. *J Clin Invest*. 2017;127(7):2705–18. doi: 10.1172/JCI92335.

**59.** Pankov D, Sjostrom L, Kalidindi T, et al. In vivo immuno-targeting of an extracellular epitope of membrane bound preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME). *Oncotarget*. 2017;8(39):65917–31. doi: 10.18632/oncotarget.19579.

**60.** Финашутина Ю.П., Мисюрин А.В., Ахлынина Т.В. и др. Получение рекомбинантного раково-тестикулярного белка PRAME и моноклональных антител к нему. *Российский биотерапевтический журнал*. 2015;14(3):29–36.

[Finashutina YuP, Misyurin AV, Akhlynina TV, et al. Production of recombinant PRAME cancer testis antigen and its specific monoclonal antibodies. *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal*. 2015;14(3):29–36. (In Russ)]

**61.** Мисюрин А.В., Финашутина Ю.П. Антигенная композиция и ее терапевтическое применение для профилактики и лечения онкологических

заболеваний, рекомбинантная плазмидная ДНК, обеспечивающая синтез гибридного белка, а также способ получения белка. Патент РФ на изобретение № 2590701/13.04.29. Бюл. № 19. Доступно по: <http://www.fips.ru/cdfi/fips.dll/en?ty=29&docid=2590701>. Ссылка активна на 08.12.2017.

[Misyurin AV, Finashutina YuP. Antigennaya kompozitsiya i ee terapevticheskoe primeneniye dlya profilaktiki i lecheniya onkologicheskikh zabolevaniy, rekombinantnaya plazmidnaya DNK, obespechivayushchaya sintez gibridnogo belka, a takzhe sposob polucheniya belka. Patent RUS No. 2590701/13.04.29. Byul. No. 19. Available from: <http://www.fips.ru/cdfi/fips.dll/en?ty=29&docid=2590701>. (accessed 08.12.2017) (In Russ)]

**62.** Лыжко Н.А., Ахлынина Т.В., Мисюрин А.В. и др. Повышение уровня экспрессии гена PRAME в опухолевых клетках сопровождается локализацией белка в клеточном ядре. *Российский биотерапевтический журнал*. 2015;14(4):19–30.

[Lyzhko NA, Ahlynina TV, Misyurin AV, et al. The increased PRAME expression in cancer cells is associated with deposit of the protein in cell nucleus. *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal*. 2015;14(4):19–30. (In Russ)]

**63.** Лыжко Н.А., Мисюрин В.А., Финашутина Ю.П. и др. Проявление цитостатического эффекта моноклональных антител к белку PRAME. *Российский биотерапевтический журнал*. 2016;15(4):53–8. doi: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-53-58.

[Lyzhko NA, Misyurin VA, Finashutina YuP, et al. Development of cytostatic effect of monoclonal antibodies to the protein PRAME. *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal*. 2016;15(4):53–8. doi: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-53-58. (In Russ)]

**64.** Dillman RO. Cancer immunotherapy. *Cancer Biother Radiopharm* 2011;26:1–64. doi: 10.1089/cbr.2010.0902.

**65.** Theisen D, Murphy K. The role of cDC1s in vivo: CD8 T cell priming through cross-presentation. *F1000Res*. 2017;6:98. doi: 10.12688/f1000research.99971.

**66.** Epping MT, Wang L, Edel MJ, et al. The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling. *Cell*. 2005;122(6):835–47. doi: 10.1016/j.cell.2005.07.003.

**67.** De Carvalho DD, Mello BP, Pereira WO, Amarante-Mendes GP. PRAME/EZH2-mediated regulation of TRAIL: a new target for cancer therapy. *Curr Mol Med*. 2013;13(2):296–304. doi: 10.2174/1566524011313020006.

