

<https://doi.org/10.21682/2311-1267-2023-10-4-11-34-43>

Пилотное клиническое исследование ДНК-вакцинации против нейробластомы: дизайн исследования и промежуточные результаты

И.В. Пролесковская¹, А.Н. Мелешко¹, Е.П. Вашкевич¹, Н.Е. Конопля²

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» Министерства здравоохранения Республики Беларусь; Республика Беларусь, 223053, Минская область, Минский район, Боровлянский с/с, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43;

²ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова» Министерства здравоохранения Республики Беларусь; Республика Беларусь, 223040, Минский район, аг. Лесной

Контактные данные: Александр Николаевич Мелешко meleshko@tut.by

Введение. Мы сообщаем промежуточные результаты пилотного клинического испытания терапевтической ДНК-вакцинации пациентов с нейробластомой (НБ) (NCT04049864).

Цель исследования – проверить безопасность и иммуногенность ДНК-вакцинации против НБ.

Материалы и методы. В статье приведены данные о 6 больных, закончивших вакцинацию. Определены критерии включения и исключения пациентов. Клинический протокол включает форму и дозы вакцины, временную схему вакцинации и сопроводительную терапию. Для всех пациентов проводился анализ минимальной остаточной болезни методом количественной полимеразной цепной реакции, измерение Т-клеточного иммунного ответа методом ELISpot и антительного ответа методом иммуноферментного анализа.

Результаты. Вакцина хорошо переносилась пациентами с минимальными побочными симптомами. Т-клеточный иммунный ответ оценивался через 2 нед после каждого курса вакцинации и был положительным у 5 из 6 больных. Антительный иммунный ответ был выявлен у 1 пациента. Пять из 6 больных живы и находятся в клинической ремиссии на 01.11.2022. Бессобытийная выживаемость вакцинированных пациентов составила $82 \pm 18\%$ против $29 \pm 11\%$ в контрольной группе ($p = 0,03$).

Ключевые слова: нейробластома, ДНК-вакцина, противоопухолевый иммунный ответ

Для цитирования: Пролесковская И.В., Мелешко А.Н., Вашкевич Е.П., Конопля Н.Е. Пилотное клиническое исследование ДНК-вакцинации против нейробластомы: дизайн исследования и промежуточные результаты. Российский журнал детской гематологии и онкологии. 2023;10(4):34–43.

Информация об авторах

И.В. Пролесковская: к.м.н., доцент, заместитель директора по клинической работе РНПЦ ДОГИ, главный внештатный детский онкогематолог Министерства здравоохранения Республики Беларусь, e-mail: proleskai@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1145-7263>

А.Н. Мелешко: к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий РНПЦ ДОГИ, e-mail: meleshko@tut.by; <https://orcid.org/0000-0001-6964-3635>

Е.П. Вашкевич: заведующий лабораторией иммунологических исследований РНПЦ ДОГИ, e-mail: katsiaryna.vashkevich@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-5105-3757>

Н.Е. Конопля: д.м.н., профессор, главный научный сотрудник группы химиотерапии лаборатории фотодинамической терапии и гипертермии РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова, e-mail: n.konoplya@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0592-7182>

Вклад авторов

И.В. Пролесковская: автор клинического протокола и куратор исследования, сбор данных о пациентах, подготовка текста статьи

А.Н. Мелешко: разработчик ДНК-вакцины, написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи

Е.П. Вашкевич: выполнение иммунологических анализов

Н.Е. Конопля: научный руководитель исследования, редактирование статьи

Pilot clinical trial of DNA vaccination against neuroblastoma: study design and preliminary results

I.V. Proleskovskaya¹, A.N. Meleshko¹, E.P. Vashkevich¹, N.E. Konoplya²

¹Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Ministry of Health of the Republic of Belarus; 43 Frunzenskaya St., Borovlyany village, Minsk district, Minsk region, 223053, Republic of Belarus;

²Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical Radiology named after N.N. Aleksandrov, Ministry of Health of the Republic of Belarus; ag. Lesnoy, Minsk region, 223040, Republic of Belarus

Introduction. We report preliminary results of a pilot clinical trial of therapeutic DNA vaccination of patients with neuroblastoma (NCT04049864).

The aim of the study – is to test the safety and immunogenicity of DNA vaccination against neuroblastoma.

Materials and methods. The results of 6 patients who completed vaccination are summarized in the article. Inclusion and exclusion criteria for patients are defined. The clinical protocol included vaccine form and doses, timed vaccination regimen, and concomitant therapy. Minimal residual disease was analyzed for all patients by quantitative polymerase chain reaction, measurement of T-cell immune response by ELISpot and antisense response by ELISA.

Results. The vaccine was well tolerated by patients with minimal adverse symptoms. T-cell immune response was evaluated two weeks after each course of vaccination and was positive in 5 of 6 patients. An antisense immune response was detected in 1 patient. 5 out of 6 patients are alive and in clinical remission as of 11/01/2022. Event-free survival of vaccinated patients was $82 \pm 18\%$ vs $29 \pm 11\%$ of controls ($p = 0.03$).

Key words: neuroblastoma, DNA vaccine, antitumor immune response

For citation: Proleskovskaya I.V., Meleshko A.N., Vashkevich E.P., Konoplya N.E. Pilot clinical trial of DNA vaccination against neuroblastoma: study design and preliminary results. Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology. 2023;10(4):34–43.

Information about the authors

I.V. Proleskovskaya: Cand. of Sci. (Med.), Docent, Deputy Director of Clinical Work of the Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Ministry of Health of the Republic of Belarus, Chief Supernumerary Pediatric Oncohematologist of the Ministry of Health of the Republic of Belarus, e-mail: proleskai@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1145-7263>

A.N. Meleshko: Cand. of Sci. (Biol.), Leading Researcher of the Laboratory of Genetic Biotechnologies of the Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Ministry of Health of the Republic of Belarus, e-mail: meleshko@tut.by; <https://orcid.org/0000-0001-6964-3635>

E.P. Vashkevich: Head of the Laboratory of Immunological Research of the Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Ministry of Health of the Republic of Belarus, e-mail: katsiaryna.vashkevich@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5105-3757>

N.E. Konoplya: Dr. of Sci. (Med.), Professor, Chief Researcher of the Chemotherapy Group of the Laboratory of Photodynamic Therapy and Hyperthermia of the Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical Radiology named after N.N. Aleksandrov, Ministry of Health of the Republic of Belarus, e-mail: n.konoplya@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0592-7182>

Authors' contributions

I.V. Proleskovskaya: author of the clinical protocol and coordinator of the protocol, collection of patient data, preparation of the text of the article

A.N. Meleshko: DNA vaccine developer, writing the text of the article, review of publications on the topic of the article

E.P. Vashkevich: performance of immunologic analyses

N.E. Konoplya: scientific supervisor of the study, edition of the article

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. / **Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки. / **Funding.** The study was performed without external funding.

Введение

Нейробластома (НБ) — наиболее часто встречающаяся экстракраниальная солидная опухоль в детском возрасте. Эффективное лечение пациентов с НБ группы высокого риска остается серьезной проблемой детской онкологии, поскольку прогноз остается неблагоприятным даже после высокодозной химиотерапии (ХТ) и аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК). Только развитие новых альтернативных стратегий лечения, в том числе иммунотерапии (ИТ), является возможным путем улучшения прогноза этого заболевания.

В настоящее время классические подходы лечения онкологических заболеваний — ХТ, лучевая терапия, хирургия — приближаются к пределу своей эффективности. Все большее значение в лечении этих тяжелых заболеваний приобретают новые биологические, биотехнологические, биомедицинские подходы, расширяющие терапевтические возможности современной медицины. К ним можно отнести следующие направления: клеточные технологии, включающие культуры *in vitro* и *ex vivo* клеток и тканей, в том числе стволовых или дифференцированных, а также применение генетически-модифицированных клеток, проведение ауто-ТГСК и аллогенной ТГСК, использование эмбриональных стволовых клеток, иммунобиотехнологий, генотерапии, тканевой инженерии и их комбинаций.

Новое направление ИТ — противоопухолевые вакцины — появилось 2 десятилетия назад в связи с открытием нескольких опухоль-специфичных антигенов, которые способны вызывать протективный иммунитет и подавлять развитие опухоли главным образом за счет включения ветви иммунного ответа, связанного с появлением специфичных цитотоксических CD8-лимфоцитов, устраняющих опухолевые клетки [1]. Поскольку опухоль является аутологичной тканью организма, экспрессия опухолевыми

клетками специфических белков, которые могли бы распознаваться иммунной системой, довольно редкое событие. В связи с этим противоопухолевый иммунитет обычно слабый, а поиск этих антигенов очень затруднителен. В настоящее время, несмотря на активный поиск новых опухоль-ассоциированных антигенов (ОАА), известны лишь несколько из них с доказанной активацией иммунитета. К таким антигенам относятся: простат-специфические антигены (PSA и PSMA), тирозиназа при меланоме, идиотип опухолевого иммуноглобулина при В-клеточных лимфомах, тирозин-гидроксилаза (ТН) при НБ, а также «герминальные раковые гены» *MAGE-A1*, *MAGE-A3*, *NY-ESO-1* в ряде солидных опухолей, включая карциномы, меланому и саркомы.

Существуют различные формы противоопухолевых вакцин, включающие синтезированные пептиды, рекомбинантные белки, лизаты опухолевых клеток, стимулированные дендритные клетки или модифицированные опухолевые клетки. ДНК-вакцины состоят из кольцевых конструкций ДНК, кодирующих антиген и другие костимулирующие последовательности, созданные на основе бактериальных плазмид [2, 3]. Отдельную группу ДНК-вакцин образуют вакцины, доставляемые с помощью вирусных векторов (ретровирусных, лентивирусных, аденовирусных и аденоассоциированных вирусов) [4]. Плазмидные ДНК-вакцины (иногда называемые «голыми» (naked DNA-vaccines)) вводятся обычно в виде раствора внутримышечно [5], хотя эффективность иммунизации невысока. Для увеличения иммуногенности ДНК-вакцин используют разный набор генов-костимуляторов, включенных в конструкцию вакцины, а также разные способы доставки. Наилучшим вариантом доставки ДНК-вакцины является электропорация в месте инъекции. Применение электропорации ограничено необходимостью в дорогостоящем оборудовании и болезненной процедурой введения. Вторым по

распространенности вариантом является включение ДНК в комплексы (наночастицы) с синтетическим или натуральным носителем, в качестве которого используют катионные полимеры (полиэтиленимин (ПЭИ), полилизин, хитозан) либо липиды (фосфотидилхолин, фосфотидилэтанолламин и аналоги) [6]. Наиболее изученным и экспериментально успешным является использование частиц ДНК с ПЭИ [7]. ПЭИ является сильным трансфецирующим реагентом (переносит ДНК через клеточные мембраны), а также обладает выраженными адьювантными свойствами [8].

Следующим способом вакцинации являются аттенуированные (ослабленные) штаммы бактерий и дрожжей, в которые вводится ДНК-вакцина, после чего суспензия микроорганизмов принимается перорально [9]. Наибольшее применение получили пероральные вакцины, основанные на штаммах *Salmonella* и *Listeria*. В настоящее время проводится ряд клинических испытаний ДНК-вакцины, доставляемой в бактериях штамма *Salmonella typhi* Ty21a (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01486329) (2011–2015) [10] и бактериях *Listeria monocytogenes* [11] против рака поджелудочной железы. Совокупность результатов завершённых клинических испытаний ДНК-вакцин показывает улучшение безрецидивной и общей выживаемости вакцинированных пациентов.

Началу собственных пилотных клинических испытаний предшествовал длительный период доклинических исследований *in vitro* и *in vivo* на животной модели. В частности, отработан метод трансфекции клеток с помощью различных изомеров ПЭИ, охарактеризованы размер и заряд наночастиц ДНК-ПЭИ, проверена безопасность применения ДНК-ПЭИ на мышцах с определением максимальной безопасной дозы (полулетальная концентрация при внутримышечной инъекции оказалась недостижима). За основу бактериальной вакцины был взят штамм SL7207 *Salmonella enterica* (agoA аттенуированный мутант), описанный ранее [9]. Методом транспозонного мутагенеза нами проведена дополнительная аттенуация штамма SL7207 с внесением мутации в гене *guaAB*; полученный штамм *Salmonella enterica* (agoA *guaAB*) получил название SS2017 [12]. Проведено детальное исследование безопасности максимальной переносимой дозы бактерий на животных (более 10^{11} КОЕ, полулетальная доза не достигнута). По результатам доклинического испытания эффективности вакцинации доказана иммуногенность ДНК-вакцины против НБ при введении как в составе наночастиц ДНК-ПЭИ, так и в бактериальной форме, и при совместном (бустерном) применении. Иммунизация животных ДНК-вакциной имела терапевтический эффект, выраженный в замедлении роста опухоли или ее исчезновении у части мышей [12, 13]. Наконец, к моменту подготовки настоящего протокола в течение 3 лет проводится клиническое исследование идиотипической ДНК-вакцинации взрослых пациентов с лимфомами с использованием ДНК-ПЭИ и бактериальной формы вакцины. Выпол-

нено около 50 инъекций вакцины с ДНК-ПЭИ и более 20 приемов бактериальной вакцины. Ни в одном случае вакцинация не сопровождалась токсичностью выше Grade 2 (СТСАЕ v3.0). Иммуногенность ДНК-вакцины у взрослых пациентов была зафиксирована после бустерной вакцинации (ДНК-ПЭИ + бактерии) и сопровождалась регрессией опухоли и достижением молекулярной ремиссии [14]. Указанные результаты позволяют авторам обосновать целесообразность проведения пилотного клинического исследования ДНК-вакцины против НБ. Применение вакцины не сопровождается дополнительными рисками.

Материалы и методы

Пациенты

В исследование включены 8 пациентов с НБ, 7 из них с рецидивами заболевания и 1 после завершения лечения 1-й линии. В статье приведены результаты 6 больных, закончивших вакцинацию. Во 2-й линии лечения 4 пациента получали применяемый в то время в Республике Беларусь противорецидивный протокол, включающий в себя 2 блока полихимиотерапии (ПХТ) N8, 2 блока ICE, терапию с метайодбензилгуанидином (^{123}I -MIBG), 3 из них – повторную ауто-ТГСК. Одному больному (M5) не удалось провести ТГСК вследствие невозможности выполнить забор стволовых клеток периферической крови (ПСК). Один пациент (B2) получал RIST-протокол (по настоянию родителей) и в последующем гаплоидентичную ТГСК от отца. Пациенту S6 выполнена химиоиммунотерапия накситамабом в Испании. Два больных перед ДНК-вакцинацией имели полный ответ (ПО) на лечение, 4 – частичный (ЧО).

Критерии включения в протокол

1. Диагноз рецидива НБ с обязательным морфологическим/цитологическим подтверждением.
2. Наличие опухолевой ткани для биопсии.
3. Достижение с помощью стандартных методов терапии ответа опухоли на лечение – ЧО и более.
4. Физический статус по шкале ECOG – 0–2.
5. Ожидаемая продолжительность жизни не менее 12 мес.
6. Возраст – от 1 до 20 лет.
7. Показатели клеточного иммунитета крови: лимфоциты – не менее $1 \times 10^9/\text{л}$.
8. Наличие письменного информированного согласия пациента и его родителей (законных представителей) на участие в данном протоколе.
9. Комплаентность родителей (законных представителей) и самого пациента при участии в протоколе исследования.

Критерии исключения из исследования

A – основанные на данных анамнеза:

1. Наличие любого первичного иммунодефицита.
2. Наличие первично-множественной злокачественной опухоли.
3. Наличие аутоиммунных заболеваний в анамнезе (кроме тиреоидита).
4. Поливалентная аллергия.

5. Тяжелые заболевания, в том числе протекающие с выраженными симптомами, не леченные воспалительные и инфекционные процессы, из-за которых пациент не может получать лечение в соответствии с протоколом исследования.

6. Социально-экономические или географические обстоятельства, которые не могут гарантировать должное соблюдение требований протокола лечения и дальнейшего наблюдения.

Б – основанные на данных лабораторного обследования непосредственно перед вакцинацией:

1. Отсутствие экспрессии в ткани опухоли 2 антигенов и более, используемых в протоколе.

2. Уровень лейкоцитов периферической крови $< 1,5 \times 10^9/\text{л}$, тромбоцитов $< 50,0 \times 10^9/\text{л}$, гемоглобин $< 80 \text{ г/л}$.

3. Положительные тесты на вирус иммунодефицита человека, гепатит В или С.

4. Выраженное нарушение функции печени – уровни АСТ/SGOT или АЛТ/SCPT превышают верхнюю границу нормы в 5 раз и более.

Клинический протокол

Испытание представляло пилотное, нерандомизированное, открытое исследование ДНК-вакцинации. Протокол был утвержден ученым советом РНПЦ ДОГИ и одобрен этическим комитетом 9 января 2019 г., после чего инструкция по применению метода утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь (№ 060-0621). Информированное согласие было подписано родителями всех пациентов перед началом вакцинации. Ей предшествовал период времени на иммунное восстановление в течение 2–3 мес от проведения последней ауто-ТГСК. В период, предшествующий вакцинации, пациенты могут получать метрономную терапию по протоколу лечения НБ, которую следует остановить за неделю до начала вакцинации. Перед и во время вакцинации проводят сопроводительную иммуно- и антиангиогенную терапию, включающую циклофосфамид, пропранолол, целекоксиб и леналидомид. Циклофосфамид назначается за 3 дня до начала 1-го курса вакцинации в разовой дозе 300 мг/м^2 . Леналидомид назначается в дозе $25 \text{ мг/м}^2/\text{день}$ курсом из 3 нед, начиная за 7 дней до первой вакцинации и завершая в день последней вакцинации каждого блока. Пропранолол в дозе 2 мг/кг и целекоксиб 400 мг/м^2 применяются в режиме метрономной терапии на протяжении 3 курсов вакцинации. Вакцинация проводится повторно с интервалом в 1 нед (± 3 рабочих дня). Каждая вакцинация включает инъекцию и прием капсулы с дозой бактерий. Один блок включает 3 введения вакцин против одного антигена. Каждый последующий блок включает новый (дополнительный) антиген и/или повторение вакцины с прежним антигеном при недостаточно выраженном иммунном ответе (рис. 1). Стандартный курс вакцинации включает 3 блока с интервалом в 2 нед. В течение 10 дней до начала вакцинации и в течение

10 дней после завершения курса проводится пункция костного мозга (КМ) для анализа минимальной остаточной болезни (МОБ). При каждой вакцинации пациент получал внутримышечную инъекцию 500 мкг ДНК и капсулу, содержащую 10^9 КОЕ аттенуированного штамма *Salmonella* с той же плазмидой.

Получение вакцины

Выбор антигена

Материал удаленной опухоли или биопсии был подвергнут иммуногистохимическому (ИГХ) исследованию и количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) для измерения экспрессии OAA TN, Phox2B, MAGEA1, MAGEA3, Survivin, PRAME. Выбор антигенов для вакцинации каждого пациента обусловлен частотой их встречаемости и лабораторным подтверждением экспрессии. TN и Phox2B присутствуют во всех случаях типичной НБ и нуждаются в подтверждении только в случае очень низкоспецифичной НБ с атипичной цитологией. Остальные антигены требуют подтверждения методами ИГХ и ПЦР. Вакцинация включает один из гистоспецифичных антигенов TN или Phox2B и 1–2 опухолевых антигена, как минимум один из которых из семейства cancer-testis antigen.

Инъекционная вакцина

Водный раствор плазмидной ДНК обладает крайне низкой иммуногенностью по причине быстрого разрушения нуклеазами и очень низкой вероятности проникновения в ядро клетки (трансфекции). Для вакцинации используют разные способы доставки вакцин в клетку [15], среди которых конъюгаты с катионными или липидными полимерами (наночастицы) и электропорация. В качестве полимерного носителя мы используем линейный ПЭИ с молекулярной массой 20 кДа как оптимальный для вакцинации *in vivo* по результатам наших доклинических испытаний.

Конструкция рекомбинантного белка включает в себя лидерный пептид (t-PA), кДНК антигена, соединенный через AAAGPGP линкер с белком PVXCP, и клонирована в вектор pING. Плазмиды проходят проверку методом полного секвенирования. Плазмидную ДНК выделяли набором MaxiPrep Kit (Life Technologies), растворяли в стерильном буфере DPBS.

Линейный ПЭИ (20 кДа) (Sigma) использовали для приготовления комплекса с плазмидной ДНК в соотношении 1:1,5 (ДНК:ПЭИ), как описано ранее [13, 20]. Плазмидную ДНК (500 мкг) и ПЭИ (75 мкл исходного раствора 10 мг/мл) разбавляли 5 % глюкозой до 4 мл . Образование комплексов проводилось путем добавления раствора ДНК к ПЭИ по каплям перед инъекцией.

Пероральная вакцина

Бактериальная вакцина была получена на основе нового аттенуированного штамма (aroA, guaAB) *Salmonella enterica serovar typhimurium* – SS2017, куда путем электропорации вводили ДНК-вакцину. Бактерии, содержащие плазмиду с ДНК-вакциной, для

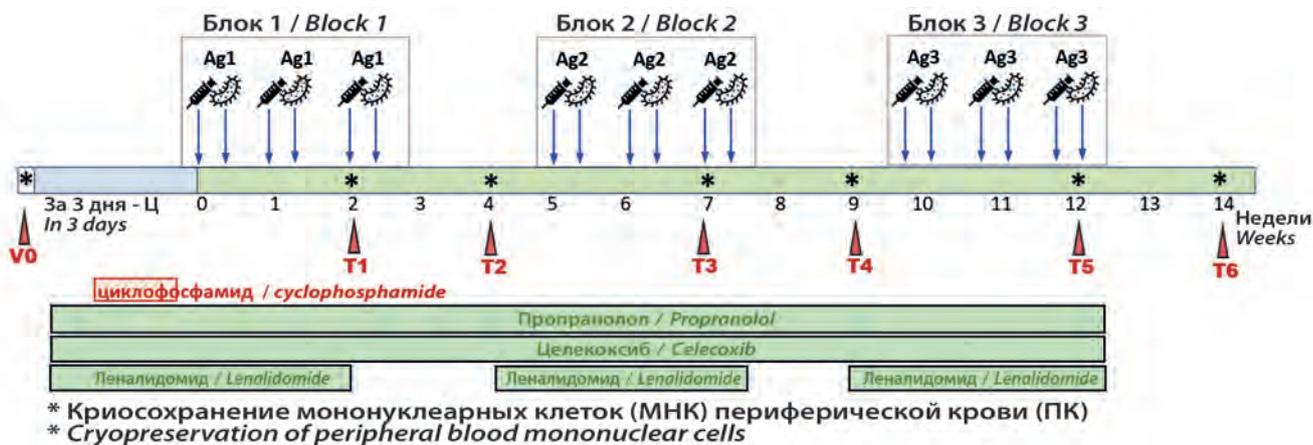


Рис. 1. Детальная схема вакцинации и точки забора периферической крови для иммунологических тестов

Fig. 1. Detailed vaccination scheme and peripheral blood collection points for immunologic tests

каждого антигена отбирали на среде с канамицином и хранили до применения. В ходе приготовления вакцины культуру вакцинального штамма размораживали, наращивали в присутствии канамицина в среде Terrific broth 18 ч при 37 °C с перемешиванием, после чего бактериальную суспензию отмывали физраствором, концентрировали в 200 мкл, смешивали с равным объемом глицерола и помещали в желатиновую капсулу с охлаждением. Доза 10⁹ КОЕ измерялась для каждого пациента методом серийных разведений и подсчета колоний.

Анализ минимальной остаточной болезни

Материалом для исследования является аспират КМ. Лейкоциты выделяют методом лизиса эритроцитов в RCLB буфере. РНК выделяли с помощью TRIzol (Invitrogen, США) согласно инструкции. Один микрограмм РНК отжигали с 200 нг рэндом-праймеров (Invitrogen, США) нагревом до 65 °C и охлаждением до 4 °C. Синтез кДНК проводили в 20 мкл реакционной смеси с 0,5 мМ dNTP Mix, 1 мкл RNAsin (Promega) и 1 мкл SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific). Мишенями для мониторинга остаточной (диссеминированной) болезни были гены *Phox2B* и *TH*. Количественную ПЦР в реальном времени выполняли в 20 мкл смеси с TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, США) с добавлением 5 мкл кДНК, 500 нг каждого праймера и 150 нг ТМ-пробы. Измерения и контроли ставили в триплетах на приборе CFX96 (Bio-Rad, США). Расчет МОБ проводили по методу ΔCt относительно контрольного гена *GUS*. Положительным оценивался результат измерения с любым уровнем *Phox2B* и *TH* > 0,0002.

Иммунологическое исследование

Т-клеточный ответ измеряли по продукции интерферона гамма лимфоцитами при стимуляции пептидной библиотекой антигена методом ELISpot. Криосохраненные МНК ПК до и после вакцинации размораживали, помещали в культуру, стимулировали фитогемагглютинином (ФГА) (2 мкг/мл) в течение 3 дней, после чего инкубировали в среде RPMI-1640

(Gibco) с 10 % эмбриональной телячьей сывороткой (Gibco) в присутствии 300 U/mL recombinant IL-2 (Ронколейкин, «НПК «БИОТЕХ», Россия) при 37 °C, 5 % CO₂ в течение недели. ELISpot выполняли с использованием набора ELISpot Plus: Human IFN-γ (ALP) 237 (Mabtech). В 96-луночную планшетку, покрытую связывающими антителами, вносили 250 тыс. клеток и стимулировали 40 ч с пептидной библиотекой антигенов, белком PVXCP. ФГА или пептидную библиотеку цитомегаловируса (Mabtech) использовали для положительного контроля, среду антигена – для отрицательного. На 2-е сутки планшетку отмывали, обрабатывали детектирующими антителами и конъюгатом ALP и субстратом BCIP/NBT для визуализации спотов. Подсчет спотов выполняли на аппарате AID iSpot Spectrum (AID GmbH) и обрабатывали программой EliSpot Software Version 7.x. Трехкратный прирост количества спотов (интерферон гамма-продуцирующих Т-клеток) в поствакцинальном образце клеток по сравнению с превакцинальным расценивался как положительный ответ.

Антителный ответ измеряли методом иммуноферментного анализа против белка PVXCP. Покрытые антигеном планшетку инкубировали с разведенной сывороткой пациентов и после отмывки окрашивали HRP-мечеными античеловеческими антителами (Thermo Fisher Scientific, Литва). После 1 ч инкубации планшетку отмывали и обрабатывали раствором субстрата ТМВ. Абсорбция 450 нм фиксировалась на аппарате Clariostar (BMG, Германия). Трехкратное повышение титра антител в поствакцинальном образце клеток по сравнению с превакцинальным расценивалось как положительный ответ.

Результаты

Характеристика пациентов

Шесть больных были включены в исследование с 2019 по 2022 г. и получили как минимум 3 полных курса вакцинации, двое из них – дополнительно 3 курса вакцинации. Клиническая характеристика пациентов, получивших вакцинацию, представлена в табл. 1.

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов, получивших вакцинацию

Table 1. Clinical characteristics of patients who received vaccination

Пациент <i>Patient</i> <i>TH/ PHOX2B</i>	Стадия <i>Stage</i>	Возраст <i>Age</i>	Цитогенетика опухоли <i>Tumor cytogenetics</i>	Вид рецидива <i>Type of relapse</i>	Лечение 2-й линии до вак- цинации <i>2nd line treatment before vaccination</i>	Ответ на терапию перед вакцинацией <i>Response to therapy before vaccination</i>	МОБ до вак- цинации <i>TH/ PHOX2B</i> <i>TH/PHOX2B</i> <i>MRD before vaccination</i>	МОБ через 1 мес после вакцина- ции <i>TH/PHOX2B</i> <i>TH/PHOX2B</i> <i>MRD 1 month after vaccination</i>	Антигены для вакци- нации <i>Antigens for vaccination</i>
B1*	4-я	10 лет 1 месяц <i>10 years 1 month</i>	Без специ- фических аббераций <i>Without specific aberrations</i>	Генерали- зованный <i>Generalized</i>	2 N8 + 2 ICE + MIBG + ауто-ТГСК	ЧО <i>Partial response</i>	0	0	Phox2B, TH, PRAME
B2	4-я	6 лет 3 месяца <i>6 years 3 months</i>	del 11q, <i>Myc-N</i>	Мяг- котканый <i>Soft fabric</i>	RIST + MIBG + гапло-ТГСК	ПО <i>Complete response</i>	0	0	TH, PRAME, MAGEA3
K3	4-я	9 лет 7 месяцев <i>9 years 7 months</i>	<i>Myc-N</i> , del 1p	Мяг- котканый <i>Soft fabric</i>	2 N8 + 2 ICE + ауто-ТГСК	ПО <i>Complete response</i>	0	0	Phox2B, TH, Survivin
M4*	4-я	5 лет 6 месяцев <i>5 years 6 months</i>	del 1p, del 11q, 17 gain	Генерали- зованный <i>Generalized</i>	2 N8 + 2 ICE + ауто-ТГСК	ЧО <i>Partial response</i>	0	0	Phox2B, TH, PRAME, Survivin
M5	4-я	9 лет 4 месяца <i>9 years 4 months</i>	del 11q, 17gain	Мяг- котканый <i>Soft fabric</i>	1 N8 + 1 ICE + MIBG	ЧО <i>Partial response</i>	0	0	Phox2B, TH, Survivin
S6	4-я	9 лет 11 месяцев <i>9 years 11 months</i>	<i>Myc-N</i> , del 11q	Генерали- зованный <i>Generalized</i>	RIST + 2 ICE + naxitamab (5)	ЧО <i>Partial response</i>	0	0	Phox2B, TH, PRAME

Примечание. * – курсы вакцинации проведены дважды; N8, ICE – блоки ПХТ; RIST – противорецидивный протокол; MIBG – доза 12 мЗв; naxitamab – моноклональные анти-GD2-антитела; МОБ PHOX2B – МОБ, определяемая в КМ по экспрессии PHOX2B.

Note. * – vaccination courses were carried out twice; N8, ICE – polychemotherapy blocks; RIST – anti-relapse protocol; MIBG – dose 12 mSv; naxitamab – monoclonal anti-GD2 antibodies.

Безопасность и побочные эффекты

Побочные симптомы оценивали согласно Международной шкале токсичности CTCAE v5.0. Комбинированная вакцина была безопасна и хорошо переносилась пациентами. Локальная боль в месте инъекции в течение суток наблюдалась у половины больных. У пациента В1 наблюдалось повышение температуры до 37,5 °С после 2 введений. Побочных симптомов со стороны желудочно-кишечного тракта не было ни у одного из пациентов. Бактериологический анализ кала не выявил персистенции вакцинального штамма сальмонелл.

Иммунный ответ

Сыворотку и моноклеарную фракцию клеток крови собирали у каждого пациента до, во время и после вакцинации в контрольных точках. Анализ продукции интерферона гамма при стимуляции лимфоцитов пептидной библиотекой антигена в тесте ELISpot выявил положительный иммунный ответ у 5/6 (83,3 %) пациентов как минимум в одной точке после вакцинации. У 1 больного (К3) увеличение количества реактивных лимфоцитов (спотов) не достигло 3-кратного критерия позитивности. Положительного ответа на все входящие в состав вакцин ОАА достигли 3/6 (50%) пациента (рис. 2).

Иммунный ответ в тесте ELISpot, выраженный в количестве спотов/млн лимфоцитов, составил 8–242 (медиана – 40). Кратный прирост в тесте ELISpot до/после вакцинации варьировал в пределах 1,4–16,3 (медиана – 4,4).

Попарное сравнение числа спотов до и после вакцинации для каждого антигена показало примерно одинаковую частоту и интенсивность ответа, достоверно для TH и Phox2B (рис. 3). Динамика иммунного ответа во времени показала сохранение положительного прежде ответа через месяц после последней вакцины для 5/8 (62 %) курсов вакцинации и снижение для 2/8 (25 %) курсов (табл. 2). Антительный иммунный ответ был выявлен у 1 пациента S6 (рис. 4).

Клинический ответ

Для анализа результатов лечения мы сравнили данную группу пациентов с ретроспективной группой пациентов с НБ, имевших рецидив/прогрессию болезни и получивших во 2-й линии терапии ПХТ, MIBG, ауто-ТГСК, но не получавших пациент-специфической ДНК-вакцинации. Клиническая характеристика групп представлена в табл. 3.

Как представлено в табл. 3, достоверных различий между группами по полу, возрасту, стадии заболевания, N-MYC-статусу, типу терапии в 1-й линии отмечено не было.

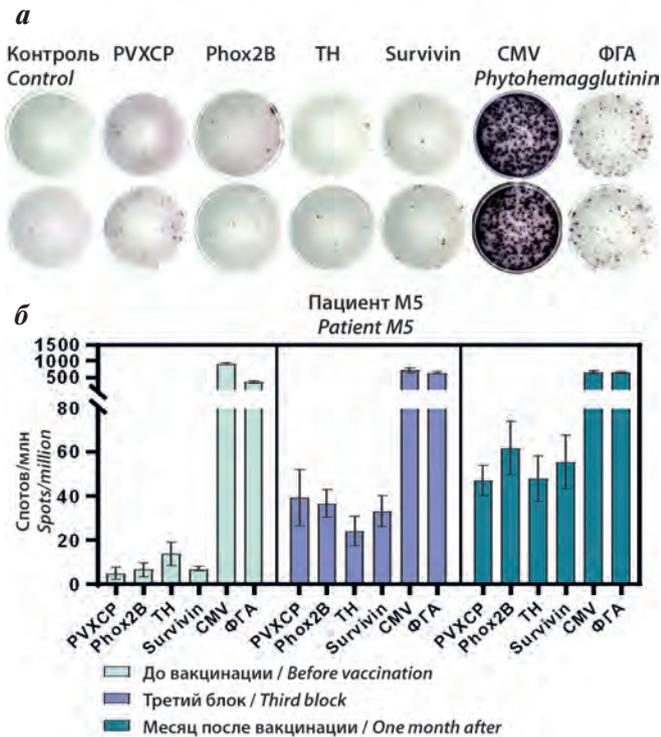


Рис. 2. Иммунный ответ пациента M5: а – пример анализа ELISpot иммунного ответа после 3-го блока (представлены дубликаты); б – динамика иммунного ответа в 3 точках на все антигены (среднее, SD). * – достоверные различия ($p < 0,05$) между пре- и поствакцинальным образцом (Mann–Whiney U-test)

Fig. 2. Immune response of patient M5: а – example of ELISpot analysis of the immune response after 3 blocks (duplicates are presented); б – dynamics of immune response at three points to all antigens (mean, SD). * – significant differences ($p < 0.05$) between pre- and post-vaccine sample (Mann–Whiney U-test)

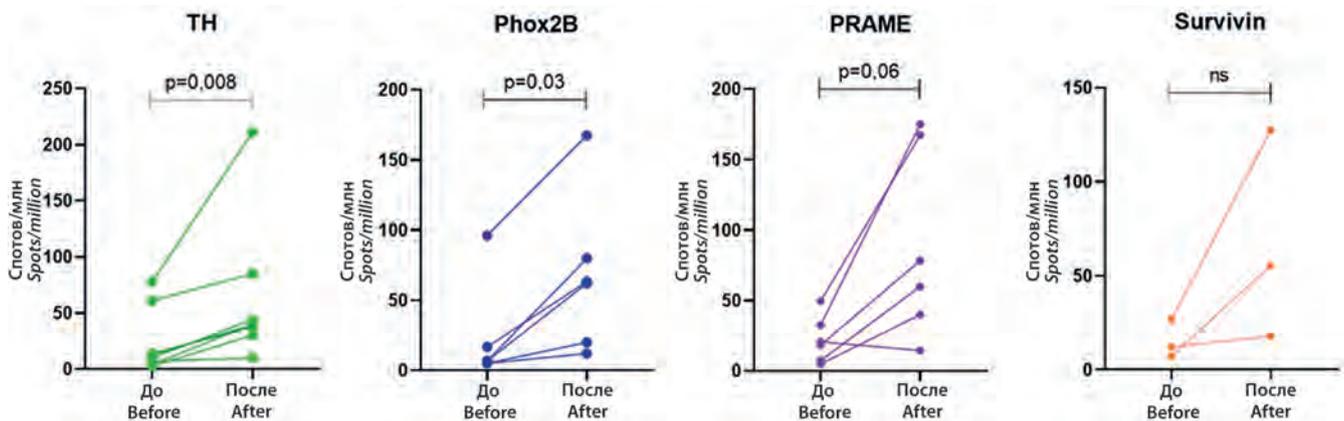


Рис. 3. Динамика Т-клеточного иммунного ответа у всех пациентов. Данные представлены для наибольшего ответа на каждый из антигенов до и после соответствующего блока. * – достоверные различия ($p < 0,05$) между пре- и поствакцинальным образцом (Wilcoxon test)

Fig. 3. Dynamics of T-cell immune response in all patients. Data are presented for the highest response to each antigen before and after the respective block. * – significant differences ($p < 0.05$) between the pre- and post-vaccine sample (Wilcoxon test)

При сравнении бессобытийной выживаемости (БСВ) в данных 2 группах пациентов и кумулятивной частоты развития рецидивов (КЧР) на 01.09.2022 были получены следующие данные: $n = 6$, БСВ – $80 \pm 18 \%$ против $n = 17$, БСВ – $29 \pm 11 \%$ ($p = 0,03$), КЧР $n = 6$, 0 рецидивов $0 \pm 10 \%$ против $n = 17$, 11 рецидивов $64,7 \pm 13 \%$ ($p = 0,013$) (рис. 5).

Полученные результаты являются предварительными, группы сравнения не велики. Однако данные результаты говорят о том, что обсуждаемая терапевтическая опция хорошо переносима, не токсична и может быть использована как элемент ИТ при лечении пациентов с НБ группы высокого риска как в рецидиве заболевания, так и в 1-й линии лечения.

Обсуждение

Данное клиническое испытание является продолжением предшествующего исследования комбинированной формы ДНК-вакцины для лечения лимфом [14]. Выбранная форма вакцинации включает комбинацию внутримышечного введения конъюгата плазмидной ДНК с ПЭИ, которое сопровождалось бустом пероральной бактериальной вакцины. Плазмидные ДНК-вакцины обладают высокой безопасностью применения, но слабой иммуногенностью и сомнительной эффективностью. ПЭИ является известным трансфецирующим реагентом, который обеспечивает высокую эффективность трансфекции *in vitro* некоторых линий клеток. Конъюгат ДНК с ПЭИ позволяет улучшить проникновение ДНК в клетку, увеличить экспрессию антигена и, как следствие, иммуногенность ДНК-вакцин [7, 16–18].

Таблица 2. Сравнительная интенсивность максимального иммунного ответа, выраженная в среднем количестве спотов/млн клеток
Table 2. Comparative intensity of maximal immune response expressed as mean number of spots/million cells

Пациент Patient	Курс Course	До вакцинации Before vaccination	1-й блок 1 st block	2-й блок 2 nd block	3-й блок 3 rd block	Спустя месяц A month later	
B1	1-й 1 st	12,50	40,00	47,50	30,00	30,00	1–10
B1	2-й 2 nd	31,67	40,00	51,67	80,00	21,70	10–20
B2		20,81	39,46	52,59	25,38	17,38	20–30
K3		8,00	10,00	12,50	15,00	17,38	30–40
M4	1-й 1 st	96,04	242,36	224,3	167,45	155,5	40–50
M4	2-й 2 nd	60,83	74,00	85,00	175	130	50–60
M5		14,11	8,26	37,34	39,88	62,04	60–100
S6		16,73	40,25	60,00	63,33	60,00	> 100

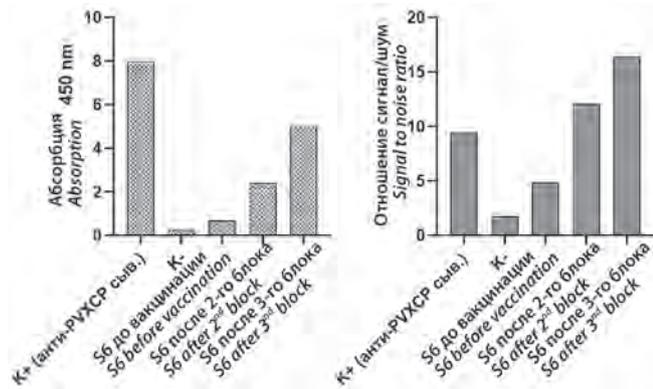
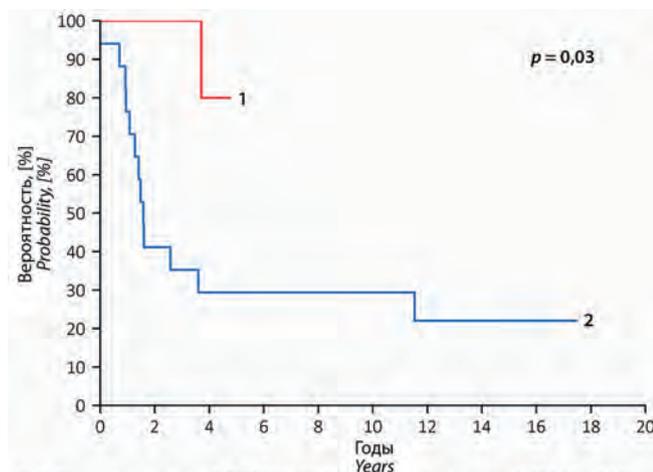


Рис. 4. Антительный ответ у пациента S6 против общего вакцинального белка иммуностимулятора PVXCP

Fig. 4. Antibody response in patient S6 against the common vaccine immunostimulatory protein PVXCP



1. ДНК-вакцинация: n = 6, БСВ 82 ± 18 % / DNA vaccination: n = 6, EFS 82 ± 18 %
2. Контрольная группа: n = 17, БСВ 29 ± 11 % / Control group: n = 17, EFS 29 ± 11 %

Рис. 5. Кривые Каплана–Майера для БСВ пациентов группы вакцинации и контрольной группы

Fig. 5. Kaplan–Meier curves for event-free survival of patients in the vaccination group and control group

Ряд исследований показал способность аттенуированных бактерий, содержащих плазмидную ДНК-вакцину, ингибировать рост опухоли в мышечных моделях [9, 19, 20]. Отдельные клинические испытания показали безопасность и иммуногенность бактериальных вакцин, как, например, применение anti-VEGFR-2 вакцины VXM01 у пациентов с раком поджелудочной железы [10, 21], однако недостаточную клиническую эффективность такой вакцины [22]. Наши доклинические исследования на мышечной модели НБ показали, что ДНК-ПЭИ конъюгат способен замедлять рост опухоли, а бактериальная и комбинированная вакцина – усиливать иммуногенность [12, 13]. На этом основании мы и применяли такой формат вакцинации, несмотря на недостаток клинических данных по использованию ДНК и бактериальных вакцин для НБ.

Для развития противоопухолевого клеточного иммунного ответа достаточно одного ОАА. При разработке испытания мы стремились таргетировать несколько антигенов на следующих основаниях. Опухоль бывает гетерогенна по экспрессии даже ключевых генов (белков), могут быть субпопуляции опухолевых клеток сильно или слабо экспрессирующих каждый из них. Иммуноселекция и клональная эволюция опухоли может приводить к снижению экспрессии антигена, к которому есть иммунный ответ, что влечет иммунологическое избегание опухоли. Два антигена и более затрудняют избегание иммунного ответа. К некоторым антигенам возможна более выраженная центральная толерантность. Разные белки представляют собой большой набор возможных эпитопов МНС-I и МНС-II классов. Наконец, некоторые опухолевые антигены имеют ограниченную частоту встречаемости или мозаичную экспрессию. Также описана экспрессия известных опухолевых антигенов из семейства cancer-testis antigens в стволовых опухолевых клетках, присутствующих в минорном количестве.

Таблица 3. Клиническая характеристика групп сравнения

Table 3. Clinical characteristics of the comparison groups

Показатель Parameter	Контрольная группа Control group		ДНК-вакцинация DNA vaccination		p
	n	%	n	%	
Всего Total	17	100,0	6	100,0	
Пол Gender					
мальчики boys	11	64,7	3	50,0	0,5257
девочки girls	6	35,3	3	50,0	
Возраст Age					
минимум min	0,05		2,78		0,6523*
медиана median	4,25		3,62		
максимум max	7,71		5,45		
Стадия Stage					
2В	1	5,9	0	0,0	0,5435
3-я	4	23,5	0	0,0	0,1911
4-я	12	70,6	6	100,0	0,1331
Группа риска Risk group					
промежуточная intermediate	2	11,8	0	0,0	0,3792
высокая high	15	88,2	6	100,0	
N-MYC-статус N-MYC status					
N-MYC+	6	35,3	3	50,0	0,5257
N-MYC-	11	64,7	3	50,0	
Протокол лечения в 1-й линии 1 st line treatment protocol					
NB2004	11	64,7	6	100,0	0,0905
nb 199902	4	23,5	0	0,0	0,1911
орес/ojes	2	11,8	0	0,0	0,3792
ауто-ТГСК в 1-й линии auto-HSCT in the 1 st line	15	88,2	6	100,0	0,3792

Результаты вакцинации 6 пациентов показали хорошую переносимость и безопасность вакцинации даже у детей младшего возраста, ослабленных длительным лечением. Наиболее распространенным осложнением была боль в месте инъекции в течение 1–3 дней. В отдельных случаях после вакцинации наблюдались небольшое повышение температуры, недомогание или сонливость, которые проходили без лечения. Системных реакций более тяжелого уровня не было, как и осложнений со стороны желудочно-кишечного тракта.

Применяемая схема вакцинации позволила достичь измеримой иммуногенности для большинства пациентов и всех антигенов. Т-клеточный иммунный ответ, определяемый в тесте ELISpot, оказался преобладающим над антительным ответом, выявленным только у 1 пациента. Подобная закономерность уже описана для ДНК-вакцин [14] и не является существенным ограничением, так как все используемые ОАА являются внутриклеточными и не распознаются антителами; однако такие результаты указывают на слабую экспрессию растворимого белка антигена трансфицированными в ходе вакцинации клетками.

Т-клеточный ответ можно количественно оценить в сравнении с положительными контролями теста ELISpot. ФГА является сильным митогеном и неспецифическим поликлональным активатором Т-клеток и может служить только в качестве технического контроля функциональной активности лимфоцитов и работоспособности самого теста. Более показательным является положительный контроль с пептидной библиотекой цитомегаловируса, к которому заведомо есть стабильный высокий иммунитет. Ответ на вирусные антигены требует презентации антигена Т-клеткам и отражает реальную интенсивность Т-клеточного иммунитета. По нашим результатам, Т-клеточный иммунитет к ОАА антигенам в 10–30 раз ниже, чем к вирусным антигенам. С одной стороны, такой результат отражает объективную низкую иммуногенность или полную толерантность иммунной системы к ОАА в сравнении с вирусными антигенами. С другой стороны, иммуногенность может быть усилена с применением сильных адъювантов.

В заключение следует сказать, что это исследование ДНК-вакцинации против НБ показало, что данная терапевтическая опция хорошо переносима, не токсична и может быть использована как элемент ИТ при лечении пациентов с НБ группы высокого риска как в рецидиве заболевания, так и в 1-й линии лечения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Jäger E., Jäger D., Knuth A. Antigen-specific immunotherapy and cancer vaccines. *Int J Cancer* 2003;106(6):817–20. doi: 10.1002/ijc.11292.
- Stevenson F.K., Ottensmeier C.H., Rice J. DNA vaccines against cancer come of age. *Curr Opin Immunol.* 2010;22(2):264–70. doi: 10.1016/j.coi.2010.01.019.
- Rice J., Ottensmeier C.H., Stevenson F.K. DNA vaccines: precision tools for activating effective immunity against cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(2):108–20. doi: 10.1038/nrc2326.
- Larocca C., Schlom J. Viral Vector-Based Therapeutic Cancer Vaccines. *Cancer J.* 2011;17(5):359–71. doi: 10.1097/PPO.0b013e3182325e63.
- Timmerman J.M., Singh G., Hermanson G., Hobart P., Czerwinski D.K., Taidi B., Rajapaksa R., Caspar C.B., Van Beckhoven A., Levy R. Immunogenicity of a plasmid DNA vaccine encoding chimeric idiotype in patients with B-cell lymphoma. *Cancer Res.* 2002;62(20):5845–52. PMID: 12384547.
- van den Berg J.H., Nuijen B., Schumacher T.N., Haanen J.B.G., Storm G., Beijnen J.H., Hennink W.E. Synthetic vehicles for DNA vaccination. *J Drug Target.* 2010;18(1):1–14. doi: 10.3109/1061860903278023.
- Grant E.V., Thomas M., Fortune J., Klivanov A.M., Letvin N.L. Enhancement of plasmid DNA immunogenicity with linear polyethylenimine. *Eur J Immunol.* 2012;42(11):2937–48. doi: 10.1002/eji.201242410.
- Shen C., Li J., Zhang Y., Li Y., Shen G., Zhu J., Tao J. Polyethylenimine-based micro/nanoparticles as vaccine adjuvants. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:5443–60. doi: 10.2147/IJN.S137980.
- Berger E., Soldati R., Huebener N., Hohn O., Stermann A., Durmus T., Lobitz S., Zenclussen A.C., Christiansen H., Lode H.N., Fest S. Salmonella SL7207 application is the most effective DNA vaccine delivery method for successful tumor eradication in a murine model for neuroblastoma. *Cancer Lett.* 2013;331(2):167–73. doi: 10.1016/j.canlet.2012.12.026.
- Niethammer A.G., Lubenau H., Mikus G., Hohmann N., Leowardi C., Beckhove P., Akhisaroglu M., Ge Y., Springer M., Grenacher L., Buchler M.W., Koch M., Weitz J., Haefeli W.E., Schmitz-Winnenthal F.H. Double-blind, placebo-controlled first in human study to investigate an oral vaccine aimed to elicit an immune reaction against the VEGF-Receptor 2 in patients with stage IV and locally advanced pancreatic cancer. *BMC Cancer.* 2012;12(1):361. doi: 10.1186/1471-2407-12-361.
- Le D.T., Wang-Gillam A., Picozzi V., Greten T.F., Crocenzi T., Springett G., Morse M., Zeh H., Cohen D., Fine R.L., Onners B., Uram J.N., Laheru D.A., Lutz E.R., Solt S., Murphy A.L., Skoble J., Lemmens E., Grous J., Dubensky T., Brockstedt D.G., Jaffee E.M. Safety and survival with GVAX pancreas prime and Listeria monocytogenes-expressing mesothelin (CRS-207) boost vaccines for metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol.* 2015;33(12):1325–33. doi: 10.1200/JCO.2014.57.4244.
- Stegantseva M.V., Shinkevich V.A., Tumar E.M., Meleshko A.N. Conjugation of new DNA vaccine with polyethylenimine induces cellular immune response and tumor regression in neuroblastoma mouse model. *Exp Oncol.* 2020;42(2):120–5. doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-2.14473.
- Stegantseva M.V., Shinkevich V.A., Tumar E.M., Meleshko A.N. Multi-antigen DNA vaccine delivered by polyethylenimine and *Salmonella enterica* in neuroblastoma mouse model. *Cancer Immunol Immunother.* 2020;69(12):2613–22. doi: 10.1007/s00262-020-02652-2.
- Meleshko A., Piatrouskaya N., Vashkevich K., Lutskovich D., Wang C., Dormeshkin D., Savelyeva N., Katsin M. Safety and Immunogenicity of Combined DNA-Polyethylenimine and Oral Bacterial Idiotypic Vaccine for Patients with B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma: A Pilot Study. *Cancers (Basel).* 2022;14(14):3298. doi: 10.3390/cancers14143298.
- Стёганцева М.В., Мелешко А.Н. Противораковая ДНК-вакцинация: принцип и возможности метода. *Медицинская иммунология.* 2017;19(2):145–56. [Stegantseva M.V., Meleshko A.N. Anticancer DNA vaccination: principle and possibilities of the method. *Medicinskaya immunologia = Medical Immunology.* 2017;19(2):145–56. (In Russ.)].
- Kunath K., Von Harpe A., Fischer D., Petersen H., Bickel U., Voigt K., Kissel T. Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: Comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine. *J Control Release.* 2003;89(1):113–25. doi: 10.1016/S0168-3659(03)00076-2.
- Ma Y.F., Yang Y.W. Delivery of DNA-based cancer vaccine with polyethylenimine. *Eur J Pharm Sci.* 2010;40(2):75–83. doi: 10.1016/j.ejps.2010.02.009.
- Oh Y.K., Kim J.P., Yoon H., Kim J.M., Yang J.S., Kim C.K. Prolonged organ retention and safety of plasmid DNA administered in polyethylenimine complexes. *Gene Ther.* 2001;8:1587–92. doi: 10.1038/sj.gt.3301516.
- Chen Y., Liu X., Jin C.G., Zhou Y.C., Navab R., Jakobsen K.R., Chen X.Q., Li J., Li T.T., Luo L., Wang X.C. An orally administered DNA vaccine targeting vascular endothelial growth factor receptor-3 inhibits lung carcinoma growth. *Tumour Biol.* 2016;37(2):2395–404. doi: 10.1007/s13277-015-4061-3.
- Zuo S.G., Chen Y., Wu Z.P., Liu X., Liu C., Zhou Y.C., Wu C.L., Jin C.G., Gu Y.L., Li J., Chen X.Q., Li Y., Wei H.P., Li L.H., Wang X.C. Orally administered DNA vaccine delivery by attenuated *Salmonella typhimurium* targeting fetal liver kinase 1 inhibits murine Lewis lung carcinoma growth and metastasis. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(2):174–82. doi: 10.1248/bpb.33.174.
- Schmitz-Winnenthal F.H., Hohmann N., Schmidt T., Podola L., Friedrich T., Lubenau H., Springer M., Wiecekowsky S., Breiner K.M., Mikus G., Büchler M.W., Keller A.V., Koc R., Springfield C., Knebel P., Bucur M., Grenacher L., Haefeli W.E., Beckhove P. A phase 1 trial extension to assess immunologic efficacy and safety of prime-boost vaccination with VXM01, an oral T cell vaccine against VEGFR2, in patients with advanced pancreatic cancer. *Oncoimmunology.* 2018;7(4):e1303584. doi: 10.1080/2162402X.2017.1303584.
- Le D.T., Picozzi V.J., Ko A.H., Wainberg Z.A., Kindler H., Wang-Gillam A., Oberstein P., Morse M.A., Zeh H.J., Weekes C., Reid T., Borazanci E., Crocenzi T., LoConte N.K., Musher B., Laheru D., Murphy A., Whiting C., Nair N., Enstrom A., Ferber S., Brockstedt D.G., Jaffee E.M. Results from a phase IIb, randomized, multicenter study of GVAX pancreas and CRS-207 compared with chemotherapy in adults with previously treated metastatic pancreatic adenocarcinoma (ECLIPSE study). *Clin Cancer Res.* 2019;25(18):5493–502. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-2992.

Статья поступила в редакцию: 10.07.2023. Принята в печать: 22.09.2023.

Article was received by the editorial staff: 10.07.2023. Accepted for publication: 22.09.2023.