

ПРИМЕНЕНИЕ БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА HSP70 В ИММУНОТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

© 2018 г. М. А. Шевцов^{1,2,3*}, Б. А. Маргулис², И. В. Гужова², Б. П. Николаев⁴,
А. М. Ищенко⁴, Г. Мультихофф⁵, А. С. Симбирцев⁴

*E-mail: shevtsov-max@mail.ru

¹Институт цитологии Российской Академии Наук, Санкт-Петербург, Россия;

²Российский нейрохирургический институт им. проф. А. Л. Поленова – Филиал СЗФМИЦ
им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия;

³Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;

⁴ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов»
Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия;

⁵Технический Университет Мюнхена, Мюнхен, Германия

Белки теплового шока, в особенности HSP70, способны активировать врождённый и приобретённый противоопухолевый иммунный ответ организма. Применение экзогенного HSP70 привело к повышению чувствительности раковых клеток к цитолитической активности натуральных киллеров. Внутриопухолевое введение белка в модели внутричерепной глиомы С6 у крыс и подкожной меланомы В16 у мышей вызывало замедление прогрессии опухоли за счёт активации иммунного ответа. Пилотное исследование возможности внутриопухолевой инъекции HSP70 у нейро-онкологических больных продемонстрировало безопасность метода и возможность стимуляции иммунного ответа.

Ключевые слова: белок теплового шока, Hsp70, иммунотерапия, глиобластома, меланома

DOI: 10.31857/S102872210002682-5

Адрес: 194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр. д.4, ФГБУН «Институт цитологии Российской академии наук», лаборатория защитных механизмов клетки. Шевцов Максим Алексеевич.

Тел.: +7(812) 2971829 Факс: +7(812) 2973541

E-mail: shevtsov-max@mail.ru

Авторы:

Шевцов М. А., к.б.н., с.н.с. лаборатории защитных механизмов клетки ФГБУН «Институт цитологии Российской академии наук»; с.н.с., Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова; с.н.с., Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт имени профессора А.Л. Поленова, Санкт-Петербург, Россия;

Маргулис Б. А., д.б.н., г.н.с. лаборатории защитных механизмов клетки ФГБУН «Институт цитологии Российской академии наук», Санкт-Петербург, Россия;

Николаев Б. П., к.ф.-м.н., заведующий лабораторией медицинских нанотехнологий ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия;

Ищенко А. М., к.б.н., заведующий лабораторией биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия;

Мультихофф Г., проф., заведующая лабораторией экспериментальной радиоонкологии Технический Университет Мюнхена, Мюнхен, Германия;

Симбирцев А. С., д.м.н., проф., чл.-корр. РАН, научный руководитель «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия.

Введение. Иммунотерапия злокачественных новообразований является одним из приоритетных направлений в современной клинической онкологии. Белки теплового шока, в особенности шаперон HSP70, способны активировать врождённый и приобретённый противоопухолевый иммунный ответ организма и могут применяться в качестве адъювантов в разработке новых подходов в лечении опухолей [1].

Цель исследования заключалась в оценке иммунотерапевтических свойств рекомбинантного белка теплового шока человека HSP70.

Материалы и методы. Иммуномодулирующие свойства рекомбинантного белка HSP70 изучались *in vitro*. Шаперон меченый флуоресцентной меткой добавлялся в среду к раковым клеткам (глиома С6, клетки эритроидной лейкемии U937 и K562, клетки меланомы В16), и далее интернализация белка оценивалась с применением конфокальной микроскопии и проточ-

ной цитометрии. Влияние экзогенного HSP70 на повышение чувствительности опухолевых клеток к цитолитической активности натуральных киллеров (NK-клетки) изучалось с применением колориметрического метода оценки выхода внутриклеточного фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в клеточную среду.

Терапевтическая активность очищенного белка оценивалась в модели интракраниальной глиомы С6 у крыс породы Wistar, подкожной опухоли меланомы В16 у мышей линии С57/В16. На 14-е сутки от момента имплантации клеток С6 производилось однократное либо пролонгированное (посредством осмотической помпы Alzet®) внутриопухолевое введение HSP70. Прогрессия опухоли анализировалась с применением высокопольной (11Т) магнитно-резонансной томографии (МРТ) (Bruker, Germany) с последующей оценкой выживаемости животных. Активация NK-клеток оценивалась по ИФА продукции гранзима В; активация цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов – в тесте IFN γ энзим-связывающего иммуноспотинга (ELISPOT). Иммуногистохимически оценивалась инфильтрация опухоли Ly-6с⁺ (NK-клетки), CD3⁺, CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами и CD11b⁺ макрофагами.

Оценка возможности внутриопухолевого введения HSP70 была исследована у 12 пациентов с новообразованиями головного мозга. После резекции опухоли было выполнено 5 инъекций рекомбинантного HSP70 (всего 2,5 мг) в резидуальную полость. До и после проведения иммунотерапии был выполнен кожный тест на ГЗТ при введении аутологического опухолевого лизата. Дополнительно оценивался субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови. Период наблюдения составил 12 месяцев.

Результаты. Внесение в клеточную культуру экзогенного HSP70 приводило к интернализации белка в цитоплазму клеток. Применение ингибиторного анализа и транспортных маркеров показало, что захват HSP70 опосредован классическими и неклассическими путями (с особенной ролью липидных рафтов). Накопление экзогенного белка приводило к выходу собственного внутриклеточного аналога на поверхность мембраны раковых клеток, что повышало чувствительность клеток к цитотоксической активности NK-клеток [2].

Внутриопухолевое введение HSP70 приводило к существенному замедлению прогрессии глиомы С6 (по данным МРТ) и увеличению выживаемости животных [3]. При этом продолжи-

тельная инъекция белка через предварительно имплантированную канюлю в головной мозг животного приводила к ещё более выраженному терапевтическому эффекту. Задержка роста опухоли была вызвана активацией врождённого (NK-клетки) и приобретённого иммунного ответа. Наблюдалось усиление инфильтрации глиомы Ly-6с⁺ (NK-клетками), CD3⁺, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками. Терапевтическая активность внутриопухолевого введения HSP70 также была подтверждена в модели меланомы В16 [4].

Внутриопухолевые инъекции HSP70 хорошо переносились больными [5]. У одного пациента наблюдался полный клинический ответ (по данным МРТ) и у ещё одного пациента – частичный ответ. Положительный ГЗТ тест отмечался у 3-х пациентов. В периферической крови больных был отмечен сдвиг продукции цитокинов Th2-опосредованного клеточного ответа в сторону Th1, что сопровождалось и изменением субпопуляции лимфоцитов. Наблюдалось снижение субпопуляции иммуносупрессивных Т-регуляторных клеток и продукции интерлейкина 10 (IL-10).

Выводы. Белок теплового шока HSP70 по данным *in vitro* и *in vivo* исследований обладает выраженной противоопухолевой иммуномодулирующей активностью. Проведённые клинические испытания продемонстрировали безопасность введения HSP70 и активацию иммунного ответа. Необходимы дальнейшие клинические исследования по оценке терапевтической эффективности шаперона HSP70.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Shevtsov M., Multhoff G. Heat shock protein-peptide and HSP-based immunotherapies for the treatment of cancer. *Front Immunol.* 2016, 7, 171.
2. Shevtsov M. A., Komarova E. Y., Abkin S. V., Meshalkina D. A., Bychkova N. V., Aksenov N. D., Margulis B. A., Guzhova I. V. Exogenously delivered heat shock protein 70 displaces its endogenous analogue and sensitizes cancer cells to lymphocytes-mediated cytotoxicity. *Oncotarget*, 2014;5(10):3101–3114.
3. Shevtsov M. A., Pozdnyakov A. V., Mikhrina A. L., Yakovleva L. Y., Nikolaev B. P., Dobrodumov A. V., Meshalkina D. A., Ischenko A. M., Pitkin E., Guzhova I. V., Margulis B. A. Effective immunotherapy of rat glioblastoma with prolonged intratumoral delivery of exogenous heat shock protein Hsp70. *International Journal of Cancer.* 2014;135(9):2118–28.
4. Abkin S. V., Ostroumova O. S., Komarova E. Y., Meshalkina D. A., Shevtsov M. A., Margulis B. A., Guzhova I. V. Phloretin increases the anti-tumor efficacy of intratumorally delivered heat-shock protein 70 kDa (HSP70)

in a murine model of melanoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2016;65(1):83–92.

5. *Shevtsov M. A., Kim A. V., Samochernych K. A., Romanova I. V., Margulis B. A., Guzhova I. V., Yakovenko I. V.,*

Ischenko A. M., Khachatryan W. A. Pilot study of intratumoral injection of recombinant heat shock protein Hsp70 in treatment of malignant brain tumors in children. *OncoTargets and Therapy*, 2014;7:1071–1081.

APPLICATION OF HEAT SHOCK PROTEIN HSP70 FOR IMMUNOTHERAPY OF MALIGNANT TUMORS

© 2018 **M. A. Shevtsov^{1,2,3*}, B. A. Margulis², I. V. Guzhova², B. P. Nikolaev⁴, A. M. Ischenko⁴, G. Multhoff⁵, A. S. Simbirtsev⁴**

*E-mail: shevtsov-max@mail.ru

¹*Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences (RAS), St. Petersburg, Russia;*

²*Polenov Russian Scientific Research Institute of Neurosurgery, St. Petersburg, Russia;*

³*Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia;*

⁴*Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia;*

⁵*Technische Universität München, Klinikum rechts der Isar, Munich, Germany*

Heat shock proteins, especially HSP70, could activate innate and adaptive immune responses. Application of the exogenous HSP70 resulted in the enhancement of tumor cells sensitivity towards cytolytic activity of natural killers. Intratumoral injection of protein in the model of C6 glioma in rats and subcutaneous B16 melanoma in mice delayed tumor progression due to the activation of immune response. Pilot study of the feasibility of intratumoral HSP70 injection in neuro-oncological patients demonstrated safety and possibility to activate immune system.

Key words: heat shock protein, Hsp70, immunotherapy, glioblastoma, melanoma

Authors:

Shevtsov M. A., MD, PhD, Senior Researcher of the Laboratory of Cell Protection Mechanisms, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences (RAS), St. Petersburg, Russia; Senior Researcher, Polenov Russian Scientific Research Institute of Neurosurgery, St. Petersburg, Russia; Senior Researcher, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia; E-mail: shevtsov-max@mail.ru;

Margulis B. A., DrSci, Leading Researcher of the Laboratory of Cell Protection Mechanisms, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences (RAS), St. Petersburg, Russia;

Nikolaev B. P., PhD, Head of the Laboratory of medical nanotechnologies, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia;

Ischenko A. M., PhD, Head of the Laboratory of protein biochemistry, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia;

Multhoff G., Professor, Head of the Laboratory of Experimental Radio-oncology, Technical University of Munich, Munich, Germany;

Simbirtsev A. S., DrSci, Professor, Corresponding member of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia.