

· 论 著 ·

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2007 )06-0567-04

## 肿瘤抗原致敏树突状细胞疫苗治疗晚期恶性肿瘤的临床观察

朱利明<sup>1</sup>, 张沂平<sup>1</sup>, 王晓稼<sup>1</sup>, 钟海均<sup>1</sup>, 范云<sup>1</sup>, 余新民<sup>1</sup>, 邓清华<sup>2</sup>, 孔祥明<sup>3</sup>, 应杰儿<sup>1</sup>, 李铁<sup>1</sup>, 娄广媛<sup>1</sup>, 吴稚兵<sup>3</sup>, 汤忠祝<sup>2</sup>, 马胜林<sup>2\*</sup> (浙江省肿瘤医院 1. 化疗中心; 2. 放疗科; 3. 综合治疗科, 杭州 310008)

[ 摘要 ] 目的: 观察肿瘤抗原致敏人树突状细胞( dendritic cell, DC )疫苗治疗各类晚期恶性肿瘤的不良反应, 初步观察其治疗疗效。方法: 91 例非小细胞肺癌、结直肠癌、恶性黑色素瘤、肾癌、乳腺癌等晚期恶性肿瘤患者入组, 均符合试验的纳入组及排除标准, 签署知情同意书, 并报医院伦理委员会审查批准。患者单采外周血单核细胞体外培育成 DC, 用抗原致敏后制备成 DC 疫苗回输, 每周回输 1 次, 3 次定义为 1 个周期。结果: 91 例患者共接受 96 个周期疫苗治疗; 不良反应主要表现为寒战、发热、肌肉酸痛、皮肤瘙痒、胸闷及一过性全身无力, 大部分为自限性; 76 例进行疗效评价, 无完全缓解( complete remission, CR )及部分缓解( partial remission, PR )病例, 治疗后稳定( stable disease, SD )31 例, 进展( progression disease, PD )45 例, 临床获益率 40.8%; 85 例患者获得随访资料, 患者中位达进展时间( median time to progression, mTTP )为 2.6 个月, 生存时间为 0.9 ~ 30.6 个月, 中位生存时间为 4.5 个月, 1 年生存率为 9.2%。结论: 肿瘤抗原致敏人 DC 疫苗治疗各类晚期恶性肿瘤耐受性良好, 亦可见临床获益, 疫苗临床应用方法有待进一步探讨。

[ 关键词 ] 树突状细胞; 疫苗; 恶性肿瘤; 免疫治疗; 不良反应; 临床试验

[ 中图分类号 ] R730.54

[ 文献标志码 ] A

## Tumor antigen-pulsed dendritic cell vaccine for treatment of patients with advanced malignant tumor: a clinical observation

ZHU Li-ming<sup>1</sup>, ZHANG Yi-ping<sup>1</sup>, WANG Xiao-jia<sup>1</sup>, ZHONG Hai-jun<sup>1</sup>, FAN Yun<sup>1</sup>, YU Xin-min<sup>1</sup>, DENG Qing-hua<sup>2</sup>, KONG Xiang-ming<sup>3</sup>, YING Jie-er<sup>1</sup>, LI Tie<sup>1</sup>, LOU Guang-yuan<sup>1</sup>, WU Zhi-bing<sup>3</sup>, TANG Zhong-zhu<sup>2</sup>, MA Sheng-ling<sup>2\*</sup> ( 1. Chemotherapy Center; 2. Department of Radiation Oncology; 3. Department of Comprehensive Therapy, Tumor Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310022, China )

[ Abstract ] **Objective:** To observe the safety and clinical efficacy of tumor antigen-pulsed dendritic cell ( DC ) vaccine in treatment of advanced malignant tumor. **Methods:** Ninety-one patients with non-small cell lung cancer, colon and rectal cancer, melanoma, renal carcinoma, breast cancer and other malignant tumors were enrolled in this study. All patients met the selecting standard and signed informed consent. Human dendritic cells were obtained from peripheral blood monocytes by culturing them with granulocyte macrophage-colony stimulating factor and interleukin-4. DC vaccine was prepared from tumor antigen pulsed immature dendritic cells *in vitro*. Patients received the vaccine therapy once every week and one cycle was defined as once every week for 3 weeks. **Results:** All the patients received 96 cycles of DC vaccine treatment. Symptoms of toxicity included fever, shivering, aching pain of muscle, asthenia, itching, stifle and transient fatigue; most of the symptoms automatically recovered. Clinical efficacy of the treatment was evaluated in 76 patients. Thirty-one of the 76 patients were stable after treatment and 45 were in progressive situation, with the clinical benefiting rate being 40.8%. Eighty-five patients were followed up. The median time for progression was 2.6 months; the overall survival time was 0.9-30.6 months; and the median survival period was 4.5 months, with the one year survival rate being 9.2%. **Conclusion:** The results suggest that the DC vaccine therapy is well tolerated in treating patients with advanced malignant tumors and has satisfactory clinical benefit; the clinical value of DC vaccine therapy needs to be further observed.

[ Key words ] dendritic cell, vaccine, malignant tumor, immunotherapy; faulty effect; clinical trial

[ Chin J Cancer Biother, 2007, 14( 6 ): 567-570 ]

[ 作者简介 ] 朱利明( 1975- ), 男, 浙江省嘉兴市人, 主治医师, 主要从事肿瘤化疗及生物治疗的研究, E-mail: hzhazlm@hotmail.com

\* Corresponding author. E-mail: Mashenglin@medmail.com.cn

树突状细胞(dendritic cell, DC)疫苗是针对抗肿瘤细胞免疫中抗原提呈环节缺陷而设计的肿瘤疫苗,国外自1995年开始进行临床试验,目前已有数十项研究报告,这些试验大多是I、II期临床研究,病种主要集中在恶性黑色素瘤和前列腺癌,但几乎涵盖了所有的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。这些研究中包括2项重要的前瞻性随机对照的III期临床试验,其中治疗激素抵抗的无症状的转移性前列腺癌的研究表明,DC疫苗治疗组在总生存上显著好于安慰剂组<sup>[2]</sup>;而在DC疫苗与标准化疗药物DTIC治疗晚期恶性黑色素瘤的比较研究中,两组在疗效上无显著性差异<sup>[3]</sup>。近年的研究<sup>[4]</sup>表明,DC疫苗的构建不论是采用肽类、重组蛋白还是肿瘤细胞裂解物,均有良好的治疗安全性,能够诱导出抗原特异性的免疫反应,并可使患者肿瘤缓解及生存延长。经医院伦理委员会批准同意,课题组从2003年8月起应用DC疫苗治疗晚期恶性肿瘤患者,以初步观察不良反应及疗效。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象的选择标准

纳入标准:经病理或细胞学证实诊断明确、常规治疗无效或者伴发其他疾病无手术、放疗、化疗指征的晚期恶性肿瘤患者;患者ECOG-PS评分 $\leq 3$ 级;自愿接受DC疫苗治疗,并签署知情同意书。

排除标准:严重心、肝、肾功能不良者;HBV大三阳患者;有精神疾病者;发生急性肝炎或其他急性传染病活动期;HIV感染者;近期接受过免疫抑制剂治疗者;对重组粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子等生物制品过敏者。

本临床试验对象的选择标准、全部的研究方案及其实施程序均报医院伦理委员会审查并获批准。

### 1.2 临床资料

2003年8月至2007年3月,共91例患者入组,其中男性57例,女性34例;中位年龄56(31~75)岁;非小细胞肺癌31例,结直肠癌19例,恶性黑色素瘤17例,肾癌5例,前列腺癌4例,乳腺癌3例,原发灶不明转移癌3例,鼻咽癌2例,卵巢癌2例,输尿管移行细胞癌1例,嗅神经母细胞瘤1例,肝癌1例,胃癌1例,小细胞肺癌1例;全组患者中1例为III<sub>B</sub>期非小细胞肺癌经正规治疗稳定者,1例为广泛转移性非小细胞肺癌伴发慢性肾衰未经抗肿瘤治疗者,其余患者均为转移性恶性肿瘤,前期经过手术和(或)多程化放疗;ECOG-PS评分0级7例,1级33例,2级32例,3级19例。

### 1.3 DC疫苗制备

全组患者均采用自体CD14<sup>+</sup>单核细胞来源DC,致敏抗原应用抗原肽者14例、自体肿瘤组织者35例、细胞抗原者41例、细胞抗原加自体肿瘤组织者1例。其中应用抗原肽者均进行HLA-A2检测,阳性者方可接受治疗。入组后患者进行血液分离,单采外周血单核细胞,体外培育成未成熟DC,再用自体肿瘤细胞裂解物或者细胞抗原、抗原肽致敏,进一步培育DC制备成为疫苗,经鉴定后收集、洗涤并回输患者,回输致敏的DC数为 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 个。

### 1.4 疫苗的使用方法

本研究中疫苗的回输多数患者主要采用静脉输注或皮下、淋巴结周注射,1例患者行腹腔内注射,2例患者行转移淋巴结内注射。疫苗回输前30 min肌注异丙嗪12.5 mg,静脉回输者将疫苗注入100 ml生理盐水中摇匀,输注过程中不断晃动输液袋直至输注完毕;皮下、淋巴结周注射者选择原发肿瘤引流淋巴结区或腋窝淋巴结周注射;淋巴结内注射者抽取疫苗后直接淋巴结内浸润性多点注射;腹腔内注射者将疫苗用生理盐水30 ml稀释后注入腹腔。疫苗回输每周1次,输注3次为1个周期,接受2个周期治疗者每周期间隔1个月以上。

### 1.5 观察指标

本研究主要对疫苗进行安全性观察,其次观察客观有效率、达进展时间(time to progression, TTP)和生存期。

### 1.6 评价标准

按照WHO统一评价标准,疗效分为完全缓解(complete remission, CR)、部分缓解(partial remission, PR)、稳定(stable disease, SD)、进展(progressive disease, PD)。不良反应按WHO抗癌药物不良反应分度标准评价。

### 1.7 统计学处理

所得数据应用SPSS10.0统计数据软件包采用Kaplan-Meier法进行生存分析。

## 2 结果

全组91例患者共接受96个周期疫苗治疗,其中5例患者进行了2个周期治疗。

### 2.1 DC疫苗注射后患者的不良反应

患者注射DC疫苗的不良主要表现为寒战、发热、肌肉酸痛、皮肤瘙痒、胸闷及一过性全身无力,大部分为自限性。1例患者寒战严重且持续,最高体温至40.5℃,经对症治疗1周后缓解,但未因此放弃治疗。全组患者治疗中未见血压下降,治疗后无治疗相关血液学毒性、肝肾功能异常以及心电

图异常;再次注射时未见急性超敏反应发生;随访过程中未见明显自身免疫疾病发生(表1)。

表1 肿瘤抗原致敏人树突状疫苗的不良反应(*n*)  
Tab.1 Toxicity of tumor antigen-pulsed DC vaccine(*n*)

| Group                                  | Fever( <i>t</i> /°C) |        |        | Shiver | Aching pain of muscle | Itching | Asthenia | Stifle |
|--|----------------------|--------|--------|--------|-----------------------|---------|----------|--------|
|  | <38                  | 38~39  | >39    |        |                       |         |          |        |
| Autologous tumor lysate                | 4                    | 3      | 2      | 3      | 1                     | 1       | 11       | 1      |
| Antigenic peptide                      | 2                    | 0      | 0      | 1      | 1                     | 2       | 5        | 0      |
| Cell antigen                           | 3                    | 4      | 0      | 5      | 3                     | 2       | 9        | 3      |
| Autologous tumor lysate + cell antigen | 0                    | 0      | 0      | 0      | 0                     | 0       | 1        | 0      |
| Total                                  | 9                    | 7      | 2      | 9      | 5                     | 5       | 2.6      | 4      |
|  | (9.9%)               | (7.7%) | (2.2%) | (9.9%) | (5.5%)                | (5.5%)  | (28.6%)  | (4.4%) |

## 2.2 近期疗效

有可观测病灶患者82例,进行疗效评价者76例,无CR、PR病例,治疗后SD31例,PD45例,临床获益率为40.8%。其中1例肾癌患者转移淋巴结内注射后局部淋巴结消失,1例前列腺癌患者转移淋巴结内注射后局部淋巴结部分缓解,此2例患者总体疗效评价均为SD。

## 2.3 远期疗效

随访至2007年5月10日,全组患者死亡68例,存活17例,失访6例,随访时间为1.7~30.6个月;患者TTP为0.8~6.8个月,中位达进展时间(median time to progression, mTTP)为2.6个月,生存时间为0.9~30.6个月,中位生存时间为4.5个月,半年生存率为32.5%,1年生存率为9.2%。

## 3 讨论

细胞免疫过程中,抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APCs)处于中心环节,而肿瘤免疫失效的一个很重要的原因是抗原提呈细胞的功能缺陷。因此,人们设想在体外培育扩增APC,并在体外让APC接触肿瘤抗原而促进APCs的成熟,然后回输体内直接诱导CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T细胞,从而形成抗肿瘤免疫反应,以改善机体的抗肿瘤免疫反应性。目前发现的APC有树突状细胞(dendritic cells, DC)、巨噬细胞和一些B淋巴细胞。1991年,Steinman<sup>[5]</sup>首次发现DC具有强大的抗原提呈功能,并远远强于其他的APCs,而且唯一有能力递呈蛋白质抗原并致敏初始T细胞。随即基于DC的肿瘤疫苗技术广泛应用到临床,现在其作为一种成熟的生物治疗技术使许多肿瘤患者获得了一定的效果<sup>[6]</sup>。

本研究进行了以安全性验证为主要目的的树突

状细胞疫苗临床试验,初步观察到APDC疫苗的不良反应主要表现为寒战、发热、肌肉酸痛、皮肤瘙痒、胸闷及一过性全身无力,大多为自限性,或者经对症支持治疗后缓解。在自体肿瘤组织致敏自体DC组中1例结肠癌患者寒战发热较重且持续时间较长,但患者仍可耐受。这些表现与目前常用生物制剂的不良反应相似。本研究中按抗原来源不同,基本上可分为3组,组间一般资料差异显著,故毒性分析上组间无可比性。但初步观察到上述毒性各组间均见分布,疫苗毒性与抗原选择可能无关。理论上,应用自体肿瘤组织裂解物作为抗原制备DC疫苗有产生自身免疫性疾病的可能。但本研究中35例应用自体肿瘤组织裂解物作为抗原的患者经随访未见有自身免疫性疾病发生,这可能与本组患者均为晚期疾病,生存时间及随访时间短,以及应用的疫苗数量( $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 个)有关,但在以后的相关研究中仍应值得注意。全组中有14例患者既往有药物过敏史,疫苗治疗后这部分患者无明显过敏反应发生;有5例患者治疗前肝酶I~II度异常,但治疗后复查肝功能无明显加重;自体肿瘤组织裂解物致敏自体DC组中有1例肺癌患者伴慢性肾衰,应用疫苗后患者肾功能无明显恶化,3个月后患者死于肿瘤进展所致肺部感染。因此,本研究认为除有GM-CSF、卡那霉素过敏者禁忌使用本疫苗外,其他药物过敏患者以及肝肾功能异常但非急性病期者仍可考虑纳入临床研究进行观察。

本研究同时也对部分患者进行了近期和远期疗效评价,但未与其他治疗方法作随机对照,故无法在疗效上作出肯定性结论。但分析这部分临床病例,发现DC疫苗可使部分患者获益,甚至可见肿瘤缩小好转。DC疫苗治疗的近期缓解率、远期疗效评价

指标如 TTP、OS 虽然是金标准,但好的免疫学评价体系,尤其是在手术后常规治疗结束后辅助 DC 疫苗治疗的临床研究中更加重要。Tuetttenberg 等<sup>[7]</sup>在应用 DC 疫苗辅助治疗 II 期高危恶性黑素瘤的临床试验对此进行了探讨,通过检测抗原特异性 CD4<sup>+</sup>T 细胞反应、MelanA/MART-1 特异性 CD8<sup>+</sup>T 细胞分泌  $\gamma$ -IFN 能力的变化,以及肿瘤抗原特异的 DTH,认为其辅助 DC 免疫治疗建立了强烈而持续的抗原特异性 T 细胞反应。这些工作将在以后的研究中逐步开展。

DC 具有独特的迁移功能,其发挥抗肿瘤免疫效应的基础是树突状细胞负载肿瘤抗原后能够迁移至 T 淋巴细胞富集的二级淋巴器官,从而激活抗肿瘤免疫反应,因此 DC 疫苗的输注途径与其能否更好地发挥生物学功能密切相关。关于 DC 疫苗回输途径,国外有较多研究,一般认为皮下、淋巴管内注射好于静脉注射,皮内注射好于皮下或静脉注射,淋巴结内注射好于皮内、静脉注射<sup>[8-9]</sup>。本研究中疫苗主要是通过静脉回输,部分患者行皮下、引流淋巴结周或腋窝淋巴结周注射,2 例患者淋巴结内注射,1 例腹膜腔内注射。其中 1 例肾癌患者手术后锁骨上、腹膜后淋巴结、腹腔转移,第 1 次予左锁骨上淋巴结内注射后注射淋巴结消失,腹膜后淋巴结稳定;1 例激素治疗抵抗的前列腺癌患者淋巴结内注射后局部淋巴结明显缩小,提示结内注射对特异性免疫应答的诱导效率更高,这可与 Bedrosian<sup>[9]</sup>的研究相佐证。但此 2 例患者远处病灶的控制并不如注射部位淋巴结理想,或许局部注射联合静脉注射是个可供考虑的选择。

目前,DC 疫苗治疗各种类型的肿瘤均见报道,但主要应用于传统认为免疫相关性较密切的肿瘤,如恶性黑素瘤、前列腺癌、肾癌,对其他肿瘤的治疗较少见到疗效突出的报道,这其中存在较多未知因素。非小细胞肺癌单独应用 DC 疫苗疗效欠佳。本研究中有 14 例晚期非小细胞肺癌患者联合局部热疗,其中半数患者治疗后稳定,生存统计上 mTTP 为 2.7 个月,其中 TTP 最长 1 例患者达到 6.8 个月。由此可见,抗原致敏人 DC 疫苗联合热疗的治疗方法可使部分患者在临床及生存上受益;推测这与热疗改善了肿瘤的免疫原性,提高了 DC 疫苗的治疗有效性有关。课题组目前同时参与进行抗原致敏的人 DC 联合化疗治疗转移性大肠癌的多中心随机 II 期临床研究,该研究的初步结果显示联合治疗组有效率高于对照组,两组间差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。

因此本试验认为 DC 疫苗联合其他治疗的综合治疗方法,如联合化疗、热疗、放疗等也许是改善疫苗治疗疗效的有效手段。

DC 疫苗是肿瘤免疫治疗的一项新技术,初步研究认为这项技术在目前的制备方式及剂量范围内相对安全,部分患者使用后可见临床获益。以后的研究中,寻找更理想的 DC 疫苗输注方法、负载方法、回输剂量、使用次数以及共用一些免疫佐剂、联合其他治疗如热疗、放化疗、小肿瘤负荷时使用等,将可能有助于更进一步提高 DC 疫苗的抗肿瘤效应。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Nencioni A, Brossart P. Cellular immunotherapy with dendritic cells in cancer: current status[ J ]. *Stem Cells*, 2004, 22( 4 ): 501-513.
- [ 2 ] Small EJ, Schellhammer PF, Higano CS, *et al.* Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T ( APC8015 ) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer[ J ]. *J Clin Oncol*, 2006, 24( 19 ): 3089-3094.
- [ 3 ] Schadendorf D, Ugurel S, Schuler-Thurner B, *et al.* Dacarbazine ( DTIC ) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells ( DC ) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG[ J ]. *Ann Oncol*, 2006, 17( 4 ): 563-570.
- [ 4 ] Ovali E, Dikmen T, Sonmez M, *et al.* Active immunotherapy for cancer patients using tumor lysate pulsed dendritic cell vaccine: a safety study[ J ]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2007, 26( 2 ): 209-214.
- [ 5 ] Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity[ J ]. *Annu Rev Immunol*, 1991, 9: 271-296.
- [ 6 ] Shuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy[ J ]. *Curr Opin Immunol*, 2003, 15( 2 ): 138-147.
- [ 7 ] Tuetttenberg A, Becker C, Huter E, *et al.* Induction of strong and persistent MelanA/MART-1-specific immune responses by adjuvant dendritic cell-based vaccination of stage II melanoma patients[ J ]. *Int J Cancer*, 2006, 118( 10 ): 2617-2627.
- [ 8 ] Mullins DW, Sheasley SL, Ream RM, *et al.* Route of immunization with peptide-pulsed dendritic cells controls the distribution of memory and effector T cells in lymphoid tissues and determines the pattern of regional tumor control[ J ]. *J Exp Med*, 2003, 198( 7 ): 1023-1034.
- [ 9 ] Bedrosian I, Mick R, Xu S, *et al.* Intranodal administration of peptide-pulsed mature dendritic cell vaccines results in superior CD8<sup>+</sup> T-cell function in melanoma patients[ J ]. *J Clin Oncol*, 2003, 21( 20 ): 3826-3835.

[ 收稿日期 ] 2007 - 09 - 12

[ 修回日期 ] 2007 - 11 - 04

[ 本文编辑 ] 郁晓路