

С.В. Олишевский
В.В. Козак
Ю.В. Яниш
С.Л. Рыбалко
В.А. Шляховенко

Институт экспериментальной
патологии, онкологии
и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины

Киевский научно-
исследовательский
институт эпидемиологии
и инфекционных болезней
им. Л.В. Громашевского
АМН Украины, Киев, Украина

Ключевые слова: адъювант,
иммунотерапия рака, опухоль,
противоопухолевые вакцины,
СрG-ДНК, СрG-ОДН.

ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩАЯ СрG-ДНК: ПЕРСПЕКТИВЫ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ В ОНКОЛОГИИ

Резюме. Представлены сведения о новом перспективном направлении в иммунотерапии рака — применении ДНК, обогащенной неметилированными СрG-мотивами. Приведены данные об иммуностимулирующих свойствах СрG-ДНК, путях передачи сигнала в клетке и классификации синтетических СрG-олигодезоксинуклеотидов (СрG-ОДН). Рассмотрены вопросы перспективности применения СрG-ОДН для иммунотерапии больных со злокачественными новообразованиями.

Еще сравнительно недавно было принято считать, что нуклеиновые кислоты, как правило, иммунологически инертны [55–56]. Однако исследования последних лет позволили не только пересмотреть мнение о низкой иммуногенности ДНК, но и признать ее одной из наиболее иммуногенных молекул природного происхождения.

Несмотря на то что иммуностимулирующие свойства ДНК впервые были открыты только в 80-е годы XX века, начало так называемой иммуностимулирующей терапии рака положено намного раньше. В 1880 г. ньюйоркский хирург W. Coley впервые применил живые микроорганизмы для лечения больных раком. Он вводил живые бактерии *Streptococcus pyogenes* отдельно или совместно с *Serratia marcescens* непосредственно в опухоль, что приводило к выраженной ее регрессии или к длительной ремиссии, однако сопровождалось сильной токсичностью и высоким риском развития рожистого воспаления [14]. Изменив тактику, W. Coley начал вводить больным убитые нагреванием бактерии, а также неочищенные бактериальные экстракты, получившие название токсины Coley [93]. Результат на то время был ошеломляющим: в группе из 894 пациентов с неоперабельными формами злокачественных опухолей после лечения токсинами Coley 5-летняя выживаемость составила 45%. Составные компоненты, входящие в «новое лекарство», на то время, конечно, не могли быть известны, а немного позже основную роль почему-то приписывали бактериальным эндотоксинам, хотя настоящего успеха W. Coley достиг лишь при использовании не содержащих эндотоксина грамположительных бактерий. Со временем в составе различных бактериальных экстрактов были идентифицированы и

охарактеризованы более простые компоненты, которым и приписывались иммуностимулирующие и противоопухолевые свойства, однако бактериальная ДНК ни разу не упоминалась [41]. В 1984 г. в Японии группа ученых под руководством Т. Tokunaga доложила о том, что ДНК-содержащая фракция, изолированная из BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*), активирует природные клетки-киллеры (НК-клетки), а также вызывает регрессию некоторых экспериментальных опухолей [71, 72]. Позже выяснилось, что при обработке нуклеолитическими ферментами большинство бактериальных экстрактов теряют иммуностимулирующие свойства, это свидетельствует о том, что именно ДНК является их ключевым иммуногенным ингредиентом [41, 72]. Факт повышения активности НК-клеток высокоочищенной бактериальной ДНК был подтвержден в исследованиях [63, 96]; показано [51], что такая ДНК, в отличие от ДНК позвоночных, активирует также В-лимфоциты.

Долго не удавалось понять: почему, будучи структурно почти одинаковыми, обладая сходными физико-химическими свойствами и, главное, выполняя фактически одни и те же функции, ДНК бактерий и позвоночных так сильно отличаются между собой в плане проявления иммуностимулирующих свойств? Ответ на этот вопрос был найден только в середине 1990-х группой американских исследователей под руководством А. Krieg, которые при изучении влияния антисенсовых олигодезоксинуклеотидов (ОДН) на В-клетки установили, что именно неметилированные CG-динуклеотиды определяют иммуностимулирующие свойства ДНК [42]. Основания, фланкирующие неметилированный CG-динуклеотид и составляющие так называемый нуклеотидный

контекст, также играют немаловажную роль в определении иммуностимулирующих свойств ДНК, в частности оптимальным иммуностимулирующим мотивом оказался следующий: $R_1R_2CGY_1Y_2$, где R_1 — пурин (предпочтительно G), R_2 — пурин или Т, а Y_1 и Y_2 — пиримидины [42].

Следует отметить, что в геноме позвоночных частота CG-динуклеотидов намного ниже ожидаемой, а также таковой в геноме бактерий. Кроме того, большинство цитозиновых остатков в ДНК позвоночных, и особенно цитозинов в составе CpG-мотивов, являются метилированными, что также объясняет низкую иммуногенность такой ДНК. Таким образом, было доказано, что присутствие в бактериальной ДНК неметилованных CpG-мотивов обуславливает ее иммуностимулирующую активность в отличие от ДНК позвоночных [6]. Высокополимерную ДНК или ее короткие последовательности, содержащие неметилованные CpG-мотивы и имеющие выраженное стимулирующее влияние на иммунную систему, принято называть иммуностимулирующими CpG-ДНК.

Активация иммунной системы под воздействием CpG-ДНК. Для объяснения иммуностимулирующей активности CpG-ДНК была выдвинута теория «сигнала опасности», согласно которой бактериальная ДНК, попав в организм, воспринимается иммунной системой как патогенный агент, способный вызвать инфекционный процесс [40]. Реакция организма на ДНК, обогащенную неметилованными CpG-мотивами, в первую очередь заключается в стремительной и мощной активации различных неспецифических механизмов иммунологической защиты, представляющих собой первую «линию обороны» против инфекционных возбудителей, паразитов и трансформированных клеток [3, 39, 40].

CpG-ДНК непосредственно или как ко-стимулирующий сигнал активирует фактически все клетки иммунной системы [2, 3, 36, 38, 42, 64]. Поглощаясь клетками иммунной системы, CpG-ДНК специфически взаимодействует с Toll-like рецептором (TLR9), присутствующим в цитоплазматических эндцитозных везикулах [5, 30, 70], что приводит к стремительной генерации реактивных форм кислорода и активации NO-синтазы [70, 98]. Дальше TLR9-опосредованная активация иммунокомпетентных клеток происходит через сигнальный каскад, вовлекающий myeloid differentiation primary response gene 88 (MYD88) и такие сигнальные молекулы, как IL-1 receptor-activated kinase (IRAK) и tumour-necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). Кульминацией в этом сигнальном каскаде является активация нескольких транскрипционных факторов, включая nuclear factor-κB (NF-κB) и activating protein 1 (AP1) [36, 37, 40, 70], что непосредственно приводит к повышению регуляции экспрессии генов провоспалительных цитокинов и хемокинов [38, 40, 80].

Открытие иммуногенных свойств бактериальной ДНК привело к созданию ее синтетических CpG-содержащих олигонуклеотидных аналогов, различающихся не только нуклеотидной последовательностью, но и спецификой опосредуемых иммуностимулирующих эффектов [2, 36, 37, 65, 83]. Недавно, основываясь на особенностях структурных характеристик, а также иммуностимулирующей активности, все CpG-ОДН были разделены на 3 основных типа [43, 79]. CpG-ОДН типа А, или D-ОДН, — фосфоэфирные ОДН, которые, как и бактериальная ДНК, являются мощными индукторами IFN-α и активаторами NK-клеток [3, 34, 39, 43]; CpG-ОДН типа В, или К-ОДН [2, 43], являются фосфоротиоатными нуклеотидными последовательностями с одним или несколькими CpG-мотивами. В отличие от CpG-ОДН типа А, они резистентны к действию нуклеаз и поэтому в исследованиях *in vivo* часто демонстрируют длительные эффекты по типу лимфаденопатии [29, 48], а также активируют В-лимфоциты и индуцируют секрецию фактора некроза опухоли (TNF)-α и IL-12 [38–41, 76], но при этом слабо активируют NK-клетки [3, 67, 97]; и, наконец, ОДН типа С, которые, подобно К-ОДН, имеют фосфоротиоатный остов и стимулируют секрецию IL-6 В-лимфоцитами, но при этом, подобно D-ОДН, также обладают выраженной интерферонотропной активностью [25, 49].

Следует отметить, что CpG-ОДН, оптимальные для активации иммунной системы грызунов, часто оказываются низкоактивными у приматов, для которых оптимальными CpG-мотивами являются TCGTT и/или TCGTA [2, 43, 78, 79]. Кроме того, если у мышей TLR9 экспрессируют В-лимфоциты, моноциты/макрофаги, а также дендритные клетки (ДК) плазмацитоидного и миелоидного происхождения и соответственно могут быть непосредственно активированы CpG-ДНК, то у человека экспрессия TLR9 ограничивается только В-лимфоцитами и плазмацитоидными ДК [5, 34, 80].

Одним из наиболее примечательных свойств CpG-ДНК является ее способность значительно повышать уровень иммунного ответа даже на очень низкоиммуногенные антигены [40]. CpG-ДНК оказалась самым мощным иммуоадьювантом (превосходя полный Ад Фрейнда) Тх1-типа [36, 37, 39, 40, 76]. Адьювантное влияние CpG-ДНК объясняется ее способностью опосредованно через ДК или другие антигенпрезентующие клетки (АПК) активировать цитокиновую секрецию Тх1-лимфоцитами [36, 40, 65]. Кроме того, основным преимуществом CpG-ДНК является то, что в отличие от полного Ад Фрейнда, который так и не получил клинического применения, CpG-ДНК не имеет выраженной токсичности [32, 36, 76].

Исследования эффектов применения CpG-ДНК в экспериментальной иммунотерапии (ИТ) опухоли. Среди существующего разнообразия подходов к применению CpG-ДНК в ИТ рака можно выде-

лить несколько основных стратегий, среди которых: а) монотерапия CpG-ДНК [1, 7, 11, 85]; б) CpG-ДНК в составе ДНК-вакцин [57]; в) применение CpG-ДНК в качестве Ад для повышения эффективности противоопухолевых вакцин (ПВ) [4, 15, 52, 64] или моноклональных антител (МкАТ) [33] и г) применение CpG-ДНК в качестве иммуностимулятора (ИС) или иммунопротектора при сопроводительной терапии [84].

Отбор и очистка значимого опухолевого антигена (ОАг), на введение которого в организме индуцировался бы иммунный ответ, являются весьма непростыми и не всегда выполнимыми задачами, что очень ограничивает возможности вакцинотерапии по поводу рака. Сделано предположение о том, что при введении CpG-ДНК непосредственно в опухоль иммунная система, возможно, сама выберет и распознает большинство важных и необходимых ОАг. Впервые эта идея была проверена на модели нейробластомы [11]. Более высокая эффективность применения пери- (п/о) или интраопухолевых (и/о) инъекций CpG-ОДН, по сравнению с интраперитонеальным (и/п) введением, была продемонстрирована на большинстве моделей подкожно растущих опухолей [1, 10, 11, 27, 35].

Иммунотерапевтические эффекты применения CpG-ДНК могут состоять в выраженном торможении опухолевого роста (ОР), увеличении продолжительности жизни животных с опухолью, угнетении развития и роста метастазов, а также в полном отторжении первично трансплантированных опухолевых клеток (ОК) или уже развившихся опухолевых узлов и повторно трансплантированных опухолей [1, 10–12]. Было показано, что выраженность данных эффектов зависит от режима применения CpG-ДНК (профилактический или терапевтический) [7, 10, 64, 91], дозы, количества и частоты инъекций [7, 12, 16], количества трансплантированных ОК, агрессивности опухолевой модели [26, 27, 45, 60], степени развития опухоли перед началом терапии CpG-ДНК [26, 88] и чувствительности опухоли к другим способам лечения [45]. Фосфоротионатная модификация или липосомальная доставка CpG-ОДН значительно снижают их деградацию в организме под действием нуклеаз сыворотки крови и внутриклеточных нуклеаз, что также отражается на эффектах ИТ CpG-ДНК [19, 36, 45, 54, 59, 92]. На модели мезотелиомы у мышей показано, что повторные и/п инъекции CpG-ОДН в комплексе с катионными липидами, в отличие от их раздельного применения, приводят к отторжению развившихся в брюшной полости опухолевых узлов и выживанию 100% животных [45].

В экспериментах на модели рака мочевого пузыря было доказано, что достаточно всего лишь одного внутривенного введения (в/в) CpG-ОДН, чтобы вызвать существенное торможение ОР [28]. Однако в случае таких опухолей, как нейробластома, глиома, меланома В16, Т-клеточная лимфома, карци-

нома Эрлиха и др., для достижения существенного эффекта ИТ применяли серию последовательных инъекций CpG-ДНК с различным суточным интервалом между введениями [2, 11, 15, 64, 69].

Противоопухолевый иммунный ответ, регистрируемый после введения CpG-ДНК, характеризуется преимущественно активацией НК-клеток, НКТ-клеток, макрофагов и цитотоксических Т-лимфоцитов [1, 7, 9, 15, 19, 32, 35, 85], а эффективность проводимой ИТ коррелирует с антигенностью опухоли [35]. Согласно результатам гистологических исследований и/о или п/о введение CpG-ДНК приводит к массивной инфильтрации опухолевого узла Т-лимфоцитами и макрофагами, за счет цитотоксического влияния которых преимущественно и происходит уничтожение отдельных ОК и разрушение опухоли в целом [1, 20, 22]. N. Garbi и соавторы [22] показали, что иммуностимуляция CpG-ДНК имеет также влияние на микроокружение опухоли. При этом, действуя как провоспалительный стимул, CpG-ДНК повышает экспрессию молекул адгезии на клетках эндотелия и тем самым способствует проникновению эффекторных клеток в ткань опухоли.

Важно отметить, что факты отторжения развившихся и повторно трансплантированных опухолей, а также регрессия контрлатеральных мест введения CpG-ДНК опухолей, что на введение CpG-ДНК развивается не локальный, а системный иммунный ответ [2, 11, 12, 26, 27, 45, 60]. Отторжение или регрессивные изменения обеих контрлатерально расположенных и гистогенетически различных опухолей при п/о введениях CpG-ОДН свидетельствуют об отсутствии видоспецифичности действия CpG-ДНК [27].

Специфика иммунобиологической активности CpG-ОДН относительно индуцируемого иммунного ответа также варьирует в зависимости от последовательности ОДН, особенностей их остова, а также от исследуемой опухолевой модели. Показано [2], что введение CpG-ОДН 1585 вызывает выраженную опосредованную НК-клетками регрессию меланомы, но является абсолютно неэффективным при лимфоме. После введения CpG-ОДН 1826 отмечали выраженное угнетение роста лимфомы, опосредованное НК- и Т-клетками. Согласно результатам некоторых исследований продукция таких цитокинов, как IFN- γ и IL-12, а также активация НК-клеток играют важную роль в индуцированном CpG-ОДН 1826 угнетении роста гепатомы [84] и выраженном антиметастатическом эффекте CpG-ДНК [16, 19, 23]. На двух разных опухолевых линиях, метастазирующих в легкие и печень, было показано, что антиметастатический эффект CpG-ДНК не зависит от линии мышей, линии ОК или органа-мишени для метастазов [23].

ОК редко представляют на своей поверхности антигены, необходимые для формирования эффективного Т-клеточного иммунного ответа. Для

преодоления этой проблемы в последнее время разрабатывают новые иммунотерапевтические подходы, одним из которых является направленная модификация экспрессии ко-стимулирующих молекул или секреции цитокинов ОК с целью повышения их способности функционировать в виде АПК. Такой подход может быть особенно эффективен в случае ИТ лимфопролиферативных малигнизаций В-клеточного происхождения, так как CpG-ДНК имеет непосредственное влияние на В-лимфоциты [18, 42]. Установлено, что значительно возрастает экспрессия вовлеченных в ко-стимуляцию, презентацию антигенов и апоптоз молекул (CD40, CD54, CD80, CD86, CD95 и МНС I и II класса) на поверхности пре-В-лимфобластоидных клеток, обработанных CpG-ОДН *in vitro*, а также их способность функционировать в виде АПК [31, 58]. Следует отметить, что стимуляция малигнизированных В-клеток CpG-ОДН вызывает усиленную экспрессию на их поверхности рецептора к IL-2. Кроме того, малигнизированные CD40⁺-В-клетки, стимулированные CpG-ОДН в сочетании с IL-2, намного активнее индуцируют пролиферацию и продукцию IFN- γ аллогенными и аутологичными Т-клетками, что также является весьма перспективной стратегией при ИТ таких малигнизаций [17].

Сегодня ДНК-вакцины с успехом используют для генерирования противоопухолевого иммунного ответа на такие антигены-мишени, наиболее часто экспрессируемые злокачественными опухолями человека, как раково-эмбриональный антиген, ErbB2/neu, меланомаассоциированные антигены и др. [57]. В исследовании A. Schneeberger и соавторов [61] показано, что вакцинация мышей ДНК-вакциной, кодирующей меланомаспецифический антиген и обогащенной CpG-мотивами, приводит к отторжению трансплантированных клеток меланомы, опосредованному специфическими цитотоксическими Т-лимфоцитами.

Применение CpG-ДНК в качестве Ад совместно с облученными ОК или ОАг, входящими в состав ПВ, зачастую способствует более выраженной противоопухолевой активности в профилактических, нежели терапевтических схемах применения [4, 9, 15, 52, 64, 91]. Проведены исследования, в которых сделаны успешные попытки применить CpG-ОДН в сочетании с ПВ, которые представляют собой живые облученные генетически модифицированные ОК, способные секретировать определенный цитокин [60, 69]. Вакциноterapia такого плана весьма эффективна, так как параллельно с присутствием уже готовых к презентации ОАг в организме также создается «выгодное» цитокиновое микроокружение. В одной из работ было отмечено, что хотя ПВ и CpG-ДНК отдельно способны индуцировать мощный цитотоксический иммунный ответ, только при их совместном применении этот эффект коррелировал с противоопухолевым ответом [69]. Кроме того, по данным гистологических исследований

такое комбинированное применение отражается на васкуляризации опухоли, приводя к ее массивному некрозу. Вероятно, это происходит за счет высоких локальных концентраций TNF- α и сильных антиангиогенных свойств IL-12 и IFN- γ [23, 68, 69]. Не менее успешно применение CpG-ДНК в сочетании с высокоочищенными нативными пептидными ОАг или их синтетическими аналогами [52, 64, 68].

CpG-ОДН существенно повышают эффективность МкАТ для ИТ при злокачественных опухолях. На модели В-клеточной лимфомы у мышей был показан значительный противоопухолевый эффект совместного применения антиидиотипических МкАТ с CpG-ОДН: опухоли развивались лишь у 20% животных по сравнению с 90% в случае проведения лишь терапии МкАТ [94]. Кроме того, комбинированное применение МкАТ с CpG-ОДН оказалось намного эффективным и менее токсичным, чем таковое с использованием IL-2 [33]. Дальнейшие исследования установили, что введение мышам с трансплантированной лимфомой 38С13 CpG-ОДН через 2 сут после проведения МкАТ-терапии еще больше повышает противоопухолевую эффективность МкАТ [86]. Комбинированное применение CpG-ДНК и МкАТ к рецептору эпидермального фактора роста приводит к выраженной регрессии ксенотрансплантатов колоректального рака у мышей, а совместное применение их с иринотеканом — к отторжению уже развившихся опухолей у 90% животных [73].

Однако N. Garbi и соавторы [22] сообщают, что применение CpG-ДНК отдельно или в виде Ад для белковых ПВ является недостаточным для полного излечения от опухолевого процесса, тогда как использование CpG-ДНК совместно с адоптивной ИТ на основе Т-клеток может оказаться более перспективным. O. Egeter и соавторы [20] в своих исследованиях вводили животным с опухолями преинкубированные с CpG-ДНК CD4⁺-лимфоциты, достигая полного отторжения уже развившихся опухолей даже у CD8⁻-мышей. Кроме того, под воздействием CpG-ДНК происходит созревание незрелых ДК и активация продукции цитокинов зрелыми ДК [9, 25, 50]. ДК, активированные *in vitro* с помощью CpG-ДНК, являются потенциальными ПВ [9, 13, 50, 89]. На различных моделях ОР показано, что комбинированное применение нагруженных ОАг ДК и CpG-ДНК приводит к регрессии и даже к отторжению развившихся нечувствительных к химиотерапии опухолей больших размеров [13, 26, 50].

Применение CpG-ДНК в сочетании с цитостатиками может потенцировать противоопухолевую активность последних. На модели рабдомиосаркомы показано, что совместное применение CpG-ОДН 2006 и таких химиопрепаратов, как циклофосфамид или топотекан, способствует значительному увеличению продолжительности жизни мышей с опухолями больших размеров по сравнению с применением этих препаратов отдельно [88]. В другом исследовании

довании также показано, что локальное введение CpG-ДНК и циклофосамида крысам с глиомой приводит к выраженной регрессии ОР [10]. Недавно было доложено об успешных экспериментальных результатах комбинированного применения паклитаксела и CpG-ОДН 7909 на модели метастазирующей карциномы легких Льюис. Значительное увеличение продолжительности жизни животных, а также отсутствие каких-либо дополнительных токсических проявлений со стороны цитостатика при совместном применении с CpG-ОДН свидетельствуют о перспективности этого лечения у больных немелкоклеточным раком легкого [87]. Хорошие экспериментальные результаты получены при системном применении CpG-ОДН 2006 для предупреждения развития рецидивов после хирургической резекции опухоли [88].

Исследуют возможности применения CpG-ДНК в сочетании с лучевой терапией (ЛТ). Применение CpG-ОДН значительно усиливает эффект ЛТ, что приводит к существенному увеличению продолжительности жизни экспериментальных животных, у которых выявлены повышенная чувствительность опухоли к облучению и четкие гистологические изменения, состоящие в появлении больших некротизированных участков, выраженной инфильтрации воспалительными иммунокомпетентными клетками и снижении плотности ОК [53]. Полученные данные свидетельствуют о значительном потенциале CpG-ДНК для улучшения результатов ЛТ у больных онкологического профиля.

Безусловно, что химиотерапевтические препараты проявляют более выраженные противоопухолевые эффекты по сравнению с различными агентами, стимулирующими или модулирующими противоопухолевый иммунный ответ. Однако угнетая ОР и убивая трансформированные, активно пролиферирующие ОК, цитостатики, к сожалению, вызывают серьезные повреждения нормальных клеток, особенно гемопоэтических клеток костного мозга, что влечет за собой выраженную иммуносупрессию. CpG-ДНК является сильным ИС и, как было выявлено, помимо активации различных иммунокомпетентных клеток, способна индуцировать экстрамедуллярный гемопоэз [48, 66], а также повышать цитотоксическую активность Т-лимфоцитов у облученных мышей [66]. Кроме того, применение CpG-ДНК сопровождается намного меньшими побочными эффектами, чем цитостатиков или таких ИС, как IFN- γ и IL-12 [85], что может сделать ее более привлекательной для лечения пациентов с рядом злокачественных новообразований. Поэтому применение CpG-ДНК в качестве сопроводительной терапии для нивелирования иммуносупрессирующего влияния цитостатиков или ЛТ на сегодня рассматривается как весьма перспективное направление. X.S. Wang и соавторы [84], исследующие в эксперименте комбинированное применение флуороурацила и CpG-ОДН 1826, установили,

что CpG-ДНК способна устранять иммуносупрессию, индуцированную химиопрепаратами. При этом введение мышам с перевитой гепатомой H-22 CpG-ДНК индуцировало высокий уровень IFN- γ и IL-12 в сыворотке крови и значительно повышало цитотоксическую активность НК-клеток даже на фоне применения флуороурацила [84].

Следует отметить, что получены положительные результаты применения CpG-ДНК в ИТ рака на нокаутных линиях мышей, включая nude, SCID, beige и др. [1, 7, 10, 11, 68]. Так, еженедельные и/п инъекции CpG-ДНК трансгенным мышам Her-2/neu значительно снижали частоту спонтанного возникновения аденокарциномы молочной железы и обеспечивали выраженный антиметастатический эффект у животных после в/в введения ОК [62]. В другом исследовании в/в введение CpG-ДНК способствовало существенному снижению частоты возникновения аутохтонных опухолей поджелудочной железы у мышей RIP1-Tag5, однако не обеспечивало заметного терапевтического эффекта у животных с уже развившимися опухолями [22].

Результаты первых клинических испытаний CpG-ДНК в онкологической практике. Несмотря на то что CpG-ДНК и распознающий ее рецептор были открыты сравнительно недавно, уже начаты и проводятся больше десятка клинических испытаний различных CpG-ОДН [36]. Предварительные результаты свидетельствуют о том, что CpG-ОДН могут значительно усиливать продукцию антигенспецифических антител у здоровых добровольцев [24, 37]. Способность CpG-ДНК повышать и ускорять иммунный ответ является одним из главных преимуществ при выборе Ад, а способность повышать как мукозальный, так и системный иммунитет вообще делают ее непревзойденной, особенно в случае ИТ по поводу злокачественных новообразований [32, 40, 41].

Сравнительно недавно были начаты испытания CpG-ОДН 7909 у пациентов с меланомой и базальноклеточной карциномой [74, 75]. Участники получали CpG-ОДН 7909 в возрастающих дозах (от 0,01 до 10 мг) с интервалом в 2 нед интратуморально либо в окружающую опухоль ткань. При этом побочные эффекты состояли в покраснении и незначительной припухлости в месте инъекции, а также в таких типичных гриппоподобных симптомах, как лихорадка или озноб, которые проходили через 2 сут после введения препарата, и лишь у 1 пациента при введении CpG-ОДН 7909 в высоких дозах (2,5 и 10 мг) выявлено кратковременное повышение артериального давления. Уже после введения CpG-ОДН 7909 в самой низкой дозе у всех больных с базальноклеточной карциномой отмечали признаки регрессии ОР, при этом у 1 пациента регистрировали полный ответ, у 2 — частичный, выражающийся в уменьшении размера опухоли не менее чем на 50%, и у 1 больного — уменьшение размера опухоли на 43%.

В случае меланомы только у 2 из 4 пациентов выявлен ответ на проводимую СpG-ОДН-терапию. У одного из них также отмечена незначительная регрессия метастазов, у другого, получавшего СpG-ОДН 7909 в дозе 5 мг внутрь в опухоль, — полная регрессия опухолевых узлов, в то время как расположенные вблизи узлы продолжали прогрессировать и даже развиваться *de novo*. Таким образом, предварительные результаты проведенных испытаний свидетельствуют о том, что СpG-ОДН 7909, обладая достаточно приемлемой токсичностью, могут применяться интратуморально для лечения больных с опухолями кожи [41, 75].

Начаты клинические испытания (I фаза) монотерапевтического применения СpG-ОДН 7909 и у пациентов с рецидивирующей неходжкинской лимфомой после проведенной химиотерапии [47]. У 15 пациентов, принимавших участие в исследовании, на 21-е сутки после проведения СpG-ОДН-терапии отмечено дозозависимое повышение активности NK-клеток и эффекторов АЗКЦ. Кроме того, что пациенты довольно хорошо переносили введение СpG-ОДН 7909, ни в одном из случаев не выявлено прогрессирования ОР [95].

Закончился первый этап исследований новой ПВ, содержащей антиген меланомы MAGE-3, совместно с СpG-ОДН 7909 [44]. В исследовании принимали участие всего лишь 6 больных с метастатической MAGE-3⁺-меланомой, которые получали внутримышечные инъекции MAGE-3 и СpG-ОДН 7909 в дозах 300 мкг и 0,5 (или 1,0) мг соответственно. Оценивали безопасность и переносимость препаратов, содержащих СpG-ДНК, а также изучали их иммуностимулирующий и противоопухолевый эффект. Все пациенты получали по 4 инъекции вакцины совместно с Ад с 3-недельным интервалом, а в случае отсутствия ОР — еще 3 инъекции. Согласно шкале Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) у 2 пациентов выявлено прогрессирование ОР и еще у 2 — частичный ответ на проведенное лечение, который длился не менее 12 мес [41, 77]. Несмотря на столь небольшое количество пациентов, принимавших участие в этих клинических испытаниях, обнадеживает сам факт положительного клинического ответа на введение СpG-ДНК у больных меланомой IV стадии [77]. Следует отметить, что введение СpG-ОДН 7909 достаточно хорошо переносилось пациентами, отмечали токсические проявления I и II степени — кратковременную лихорадку, усталость, миалгию, головную боль, тошноту и (или) рвоту, общую болезненность и кожные реакции в месте введения препарата [44].

Одним из весьма перспективных подходов клинического использования СpG-ДНК, который начал разрабатываться одним из первых, является комбинированное применение СpG-ОДН и специфических противоопухолевых МкАТ [33]. Недавно опубликованы предварительные результаты I фазы клинических испытаний совместного применения

СpG-ОДН 1018 с препаратом Ритуксан (ритуксимаб) у пациентов с неходжкинскими лимфомами [21]. В испытаниях установлено, что СpG-ОДН 1018 хорошо переносится и в комбинации с ритуксаном не вызывает значительных токсических проявлений, а также характеризуется значительной иммунобиологической активностью, состоящей в повышении экспрессии генов IFN α/β , потенцировании АЗКЦ и антигенпрезентирующей функции ДК, макрофагов и В-лимфоцитов. У 6 из 18 принимавших участие в исследовании пациентов отмечали положительный ответ на проведенное лечение (у 1 — неподтвержденная полная ремиссия, у 5 — частичная ремиссия), у остальных — стабилизацию состояния. Медиана выживаемости при этом составила около 12 мес (5–23,5 мес). Более того, была начата II фаза испытаний совместного применения СpG-ОДН 1018 и ритуксимаба у пациентов с рецидивирующей фолликулярной неходжкинской лимфомой. В этих исследованиях планируется оценить влияние такого комбинированного лечения на опухолевое микроокружение и системный иммунный ответ, а также проследить возможную корреляцию этих показателей с клиническим ответом на проводимое лечение [21].

Проведены подобные клинические испытания ритуксимаба и СpG-ОДН 7909 [90]. Комбинированное применение двух препаратов хорошо переносили 50 пациентов, принимавших участие в исследовании, у которых при этом отмечали местные побочные реакции I и II степени, артралгию и миалгию. У некоторых (2–4%) больных выявлены более серьезные побочные эффекты, такие как лимфопения, нейтропения, диарея и дегидратация. Через 50 дней после начала лечения отмечали 7 случаев объективного клинического ответа (3 — полный и 4 — частичный), через 20 нед — еще 5 случаев (1 — полный и 4 — частичный). Продолжаются клинические испытания применения СpG-ОДН 7909 совместно с препаратом трастузумаб при лечении больных раком молочной железы [10, 33].

Проводятся клинические испытания комбинированного применения СpG-ДНК с некоторыми цитостатиками. В исследовании, в котором принимали участие 184 пациента с метастатической меланомой, применяли СpG-ОДН 7909 отдельно или совместно с дакарбазином [81, 82]. Установлено, что подкожное введение СpG-ОДН 7909 в дозах до 40 мг/нед является безопасным и хорошо переносится пациентами. Кроме того, применение СpG-ОДН 7909 не только не усложняет лечение с использованием дакарбазина, но и значительно улучшает клинический ответ у пациентов по сравнению с применением одного цитостатика [81]. В других исследованиях с привлечением 83 больных немелкоклеточным раком легкого выявлено, что сочетанное применение комплекса таксан—платина и СpG-ОДН 7909 значительно повышает выживаемость без прогрессирования опухолевого процесса, а также

общую выживаемость пациентов, не усложняя при этом химиотерапии [46].

Таким образом, анализ многочисленных литературных данных дает возможность подтвердить безусловную перспективность применения препаратов на основе CpG-ДНК в ИТ больных со злокачественными новообразованиями.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Auf G, Carpentier AF, Chen L, et al.** Implication of macrophages in tumor rejection induced by CpG-oligodeoxynucleotides without antigen. *Clin Cancer Res* 2001; **7**: 3540–3.

2. **Ballas Z, Krieg AM, Warren T, et al.** Divergent therapeutic and immunologic effects of oligodeoxynucleotides with distinct CpG motifs. *J Immunol* 2001; **167**: 4878–86.

3. **Ballas Z, Rasmussen WL, Krieg AM.** Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol* 1996; **157**: 1840–7.

4. **Baral RN, Saha SK, Chatterjee KA, et al.** Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides enhance the immune response of anti-idiotype vaccine that mimics carcinoembryonic antigen. *Cancer Immunol Immunother* 2003; **52**: 317–27.

5. **Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, et al.** Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 9237–42.

6. **Bird AP.** CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus. *Trends Genet* 1987; **3**: 342–7.

7. **Blazar BR, Krieg AM, Taylor PA.** Synthetic unmethylated cytosine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotides are potent stimulators of antileukemia responses in naïve and bone marrow transplant recipients. *Blood* 2001; **98**(4): 1217–25.

8. **Broide DH, Orozco EM, Roman M, et al.** Intradermal gene vaccination down-regulates both arms of the allergic response. *J Allergy Clin Immunol* 1997; **99**: 129–36.

9. **Brunner C, Seiderer J, Schlamp A, et al.** Enhanced dendritic cell maturation by TNF- α or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation *in vitro* and therapeutic anti-tumor immune responses *in vivo*. *J Immunol* 2000; **165**: 6278–86.

10. **Carpentier AF, Auf G, Delattre JY.** CpG-oligonucleotides for cancer immunotherapy: review of the literature and potential applications in malignant glioma. *Front Bioscience* 2003; **8**: 115–27.

11. **Carpentier AF, Chen L, Maltonti F, Delattre JY.** Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice. *Cancer Res* 1999; **59** (21): 5429–32.

12. **Carpentier AF, Xie J, Mokhtari K, Delattre JY.** Successful treatment in intracranial gliomas in rat by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 2469–73.

13. **Chagnon F, Tanguay S, Ozdal OL, et al.** Potentiation of a dendritic cell vaccine for murine renal cell carcinoma by CpG oligonucleotides. *Clin Cancer Res* 2005; **11** (3): 1302–11.

14. **Coley WB.** The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res* 1991; **262**: 3–11.

15. **Davila E, Celis E.** Repeated administration of cytosine-phosphorothiolated guanine-containing oligonucleotides together with peptide/protein immunization results in enhanced CTL responses with anti-tumor activity. *J Immunol* 2000; **165**: 539–47.

16. **Davis HL, Weeratna RD, Bourne LL, et al.** Role of dose intensity of TLR9 agonist CpG ODN (CPG 7909) in the treatment of metastatic murine renal cell carcinoma. 40th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, June 5–8, 2004, New Orleans, USA.

17. **Decker T, Schneller F, Kronschnabl M, et al.** Immunostimulatory CpG-oligonucleotides induce functional high affinity IL-2 receptors on B-CLL cells: Costimulation with IL-2 results in a highly immunogenic phenotype. *Exp Hematol* 2000; **28**: 558–68.

18. **Decker T, Schneller F, Sparwasser T, et al.** Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2000; **95**: 999–1006.

19. **Dow SV, Fradkin LG, Liggitt DH, et al.** Lipid-DNA complexes induce potent activation of innate immune responses and antitumor activity when administered intravenously. *J Immunol* 1999; **163**: 1552–61.

20. **Egeter O, Mocikat R, Ghoreschi K, et al.** Eradication of disseminated lymphomas with CpG DNA activated T helper type 1 cells from nontransgenic mice. *Cancer Res* 2000; **60**: 1515–20.

21. **Friedberg JW, Kim H, McCauley M, et al.** Combination immunotherapy with a CpG oligonucleotide (1018 ISS) and rituximab in patients with non-Hodgkin lymphoma: increased interferon- α/β -inducible gene expression, without significant toxicity. *Blood* 2005; **105** (2): 489–95.

22. **Garbi N, Arnold B, Gordon S, et al.** CpG motifs as proinflammatory factors render autochthonous tumors permissive for infiltration and destruction. *J Immunol* 2004; **172**: 5861–9.

23. **Hafner M, Zawatzky R, Hirtreiter, et al.** Antimetastatic effect of CpG DNA mediated by type I IFN. *Cancer Res* 2001; **61**: 5523–8.

24. **Halperin SA, Van Nest G, Smith B, et al.** A phase I study of the safety and immunogenicity of recombinant hepatitis B surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide adjuvant. *Vaccine* 2003; **21**: 2461–7.

25. **Hartmann G, Battiany J, Poeck H, et al.** Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN- γ induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2003; **33**: 1633–41.

26. **Heckelsmiller K, Beck S, Rall K, et al.** Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy. *Eur J Immunol* 2002; **32**: 3235–45.

27. **Heckelsmiller K, Rall K, Beck S, et al.** Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma models. *J Immunol* 2002; **169**: 3892–9.

28. **Hegele A, Dalpke A, Heeg K, et al.** Immunostimulatory CpG oligonucleotides reduce tumor burden after intravesical administration in an orthotopic murine bladder cancer model. *Tumour Biol* 2005; **26** (5): 274–80.

29. **Heikenwalder M, Polymenidou M, Junt T, et al.** Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. *Nat Med* 2004; **10** (2): 187–92.

30. **Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al.** A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; **408**: 740–5.

31. **Jahrsdorfer B, Hartmann G, Racila E, et al.** CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens. *J Leukocyte Biol* 2001; **69**: 81–8.

32. **Jahrsdorfer B, Weiner GJ.** CpG oligodeoxynucleotides for immune stimulation in cancer immunotherapy. *Curr Opin Investig Drugs* 2003; **4**: 686–90.

33. **Jahrsdorfer B, Weiner GJ.** Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides and antibody therapy of cancer. *Semin Oncol* 2003; **30**: 476–82.

34. **Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, et al.** Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001; **194**: 863–70.

35. **Kawarada Y, Ganss R, Garbi N, et al.** NK- and CD8⁺ T cell-mediated eradication of established tumors by peritumoral injection of CpG-containing oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2001; **167**: 5247–53.

36. **Klinman DM.** Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nature Rev Immunol* 2004; **4**: 1–10.

37. **Klinman DM, Ishii KJ, Gursel M, et al.** Immunotherapeutic applications of CpG-containing oligodeoxynucleotides. *Drug News Perspect* 2000; **13**: 289–96.
38. **Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, et al.** CpG motifs present in bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Pro Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 2879–83.
39. **Krieg AM.** Now I know my CpGs. *Trends Microbiol* 2001; **9**(6): 249–52.
40. **Krieg AM.** CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002; **20**: 709–60.
41. **Krieg AM.** CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? *Nature Medicine* 2003; **9** (7): 831–5.
42. **Krieg AM, Yi A-K, Matson S, et al.** CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; **374**: 546–9.
43. **Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, et al.** Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN α/β in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001; **31**: 2154–63.
44. **Kruit WH, van Ojik H, Portielje J, et al.** Phase I/II study with CpG 7909 as adjuvant to vaccination with MAGE-3 protein in patients with MAGE-3 positive tumors. 38th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, May 18–21, 2002, Orlando, Florida, USA.
45. **Lanuti M, Rudginsky S, Force SD, et al.** Cationic lipid: bacterial DNA complexes elicit adaptive cellular immunity in murine intraperitoneal tumor models. *Cancer Res* 2000; **60**: 2955–63.
46. **Leichman G, Gravenor D, Woytowicz D, et al.** CPG 7909, a TLR9 agonist, added to first line taxane/platinum for advanced non-small cell lung cancer, a randomized, controlled phase II study. 41st Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, May 13–17, 2005, Orlando, Florida, USA. *J Clin Oncol* 2005; **23**(16 suppl): 7039.
47. **Link BK, Ballas AK, Weisdorf D, et al.** Phase I study to assess safety and activity of oligodeoxynucleotide CpG 7909 in patients with previously treated non-Hodgkin's lymphoma [abstr]. *Blood* 2001; **98**: 608–9.
48. **Lipford GB, Sparwasser T, Zimmermann S, et al.** CpG-DNA-mediated transient lymphadenopathy is associated with a state of Th1 predisposition to antigen-driven responses. *J Immunol* 2000; **165**: 1228–35.
49. **Marshall JD, Fearon K, Abbate C, et al.** Identification of a novel CpG DNA class and motif that optimally stimulate B cell and plasmacytoid dendritic cell functions. *J Leukoc Biol* 2003; **73**: 781–92.
50. **Merad M, Sugie T, Engleman EG, Fong L.** *In vivo* manipulation of dendritic cells to induce therapeutic immunity. *Blood* 2002; **99** (5): 1676–82.
51. **Messina JP, Gilkeson CS, Pisetsky DS.** Simulation of *in vitro* murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J Immunol*, 1991, **147**: 1759–64.
52. **Miconnet I, Koenig S, Speiser D, et al.** CpG are efficient adjuvants for specific CTL induction against tumor antigen-derived peptide. *J Immunol* 2002; **168**: 1212–8.
53. **Milas L, Mason KA, Ariga H, et al.** CpG oligodeoxynucleotide enhances tumor response to radiation. *Cancer Res* 2004; **64**(15): 5074–7.
54. **Mui B, Raney SG, Semple SC, Home MJ.** Immune stimulation by a CpG-containing oligodeoxynucleotides is enhanced when encapsulated and delivered in lipid particles. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; **298**: 1185–92.
55. **Pisetsky DS, Grudier JP, Gilkeson GS.** A role of immunogenic DNA in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1990; **33**: 153–9.
56. **Plescica OJ, Braun W.** Nucleic acids as antigens. *Adv Immunol* 1967; **6**: 231–9.
57. **Prud'homme GJ.** DNA vaccination against tumors. *J Gene Med* 2005; **7** (1): 3–17.
58. **Rieger R, Kipps TJ.** CpG oligodeoxynucleotides enhance the capacity of adenovirus-mediated CD154 gene transfer to generate effective B-cell lymphoma vaccines. *Cancer Res* 2003; **63**: 4128–35.
59. **Rudginsky S, Siders W, Ingram L, et al.** Antitumor activity of cationic lipid complexes with immunostimulatory DNA. *Mol Ther* 2001; **4**: 347–55.
60. **Sandler AD, Chihara H, Kobayashi G, et al.** CpG oligonucleotides enhance the tumor antigen-specific immune response of a granulocyte macrophage colony-stimulating factor-based vaccine strategy in neuroblastoma. *Cancer Res*, 2003; **63**: 394–9.
61. **Schneeberger A, Wagner C, Zemann A, et al.** CpG motifs are efficient adjuvants for DNA cancer vaccines. *J Invest Dermatol* 2004; **123**: 371–9.
62. **Sfondrini L, Besusso D, Rumio C, et al.** Prevention of spontaneous mammary adenocarcinoma in HER-2/neu transgenic mice by foreign DNA. *FASEB J* 2002; **16**: 1749–54.
63. **Shimada S, Yano O, Tokunaga T.** *In vivo* augmentation of natural killer cell activity with a deoxyribonucleic acid fraction of BCG. *Jpn J Cancer Res*, 1986, **77**: 808–16.
64. **Shlyakhovenko VA, Olishesky SV, Kozak VV, et al.** Anticancer and immunostimulatory effects of nucleoprotein fraction of *Bacillus subtilis* 7025 culture medium filtrate. *Exp Oncol* 2003, **25**: 119–23.
65. **Silverman ES, Drazen JM.** Immunostimulatory DNA for asthma. Better than eating dirt. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; **28**: 645–7.
66. **Sparwasser T, Hültner L, Koch ES, Luz A, Lipford GB, Wagner H.** Immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides cause extramedullary hemopoiesis. *J Immunol* 1999; **162**: 2368–74.
67. **Stacey KJ, Sweet MJ, Hume DA.** Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J Immunol* 1996; **157** (5): 2116–22.
68. **Stern BV, Boehm BO, Tary-Lehmann M.** Vaccination with tumor peptide in CpG adjuvant protects via IFN- γ -dependent CD4 cell immunity. *J Immunol* 2002, **168**: 6099–6105.
69. **Switaj T, Jalili A, Jakubowska AB, et al.** CpG immunostimulatory oligodeoxynucleotide 1826 enhances antitumor effect of interleukin 12 gene-modified tumor vaccine in a melanoma model in mice. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 4165–75.
70. **Takehita F, Leifer CA, Gursel I, et al.** Cutting edge: Role of toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J Immunol* 2001; **167**: 3555–8.
71. **Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, et al.** Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst* 1984; **72** (4): 955–62.
72. **Tokunaga T, Yamamoto T, Yamamoto S.** How BCG led to the discovery of immunostimulatory DNA. *Jpn J Infect Dis* 1999; **52** (1): 1–11.
73. **Tortora G, Bianco R, de Placido S, et al.** A novel modified CpG inhibits EGF receptor signaling and synergistically enhances antitumor activity of cetuximab and irinotecan in colon cancer xenografts. 41st Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, May 13–17, 2005, Orlando, Florida, USA. *J Clin Oncol* 2005; **23**(16 suppl): 3191.
74. **Trefzer U, Kors C, Pelzer K, et al.** Preliminary results of a phase I trial of intralesional injection of CpG-DNA in basal cell carcinoma or melanoma. 2nd International Symposium «Activating immunity with CpG Oligos». October 7–10, 2001, Amelia Island, Florida, USA.
75. **Trefzer U, Kors C, Pelzer K, et al.** Preliminary results of a phase I trial of intralesional injection of CpG 7909 in patients with basal cell carcinoma or melanoma. 38th Annual Meetings of the American Society of Clinical Oncology. May 18–21, 2002, Orlando, Florida, USA.

76. Vaccine adjuvants. Preparation Methods and research protocols. Ed by DT O'Hagan. Totowa, NJ, USA: Humana Press 2000. 342 p.
77. van Ojik H, Kruit W, Portielje J, *et al.* Phase I/II study with CpG 7909 as adjuvant to vaccination with MAGE-3 protein in patients with MAGE-3 positive tumors [abstract]. *Ann Oncol* 2003; **13**: 157.
78. Verthelyi D, Ishii KJ, Gursel M, *et al.* Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CpG motifs. *J Immunol* 2001; **166**: 2372–7.
79. Verthelyi D, Kenney RT, Seder RA, *et al.* CpG oligodeoxynucleotides as vaccine adjuvants in primates. *J Immunol* 2002; **168**: 1659–63.
80. Verthelyi D, Klinman DM. Immunoregulatory activity of CpG oligonucleotides in humans and nonhuman primates. *Clin Immunol* 2003; **109**: 64–71.
81. Wagner S, Weber J, Redman T, *et al.* CPG 7909, a TLR9 agonist immunomodulator in metastatic melanoma: A randomized phase II trial comparing two doses and in combination with DTIC. 41st Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology. May 13–17, 2005, Orlando, Florida, USA. *J Clin Oncol* 2005; **23** (16 suppl): 7526.
82. Wagner S, Pashenkov M, Goess G, *et al.* TLR9-targeted CpG immunostimulatory treatment of metastatic melanoma: A phase II trial with CpG 7909 (ProMune). 40th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, June 5–8, 2004, New Orleans, USA; *J Clin Oncol* 2004; **22** (14 suppl): 7513.
83. Wang H, Rayburn E, Zhang R. Synthetic oligodeoxynucleotides containing deoxycytidyl-deoxyguanosine dinucleotides (CpG ODNs) and modified analogs as novel anticancer therapeutics. *Curr Pharm Des* 2005; **11** (22): 2889–907.
84. Wang X-S, Sheng Z, Ruan Y-B, *et al.* CpG oligodeoxynucleotides inhibit tumor growth and reverse the immunosuppression caused by the therapy with 5-fluorouracil in murine hepatoma. *World J Gastroenterol* 2005; **11** (8): 1220–4.
85. Warren TL, Wittrock C, Weiner GL. CpG DNA as monotherapy for lymphoma: linking innate and adaptive immunity [abstr]. *Blood* 2002; **100**: 203.
86. Warren TL, Gahle CE, Weiner GL. CpG oligodeoxynucleotides enhance monoclonal antibody therapy of a murine lymphoma. *Clin Lymphoma* 2000; **1**: 57–61.
87. Weeratna RD, Bourne SM, Sullivan, *et al.* Combination of a new TLR agonist immunomodulator (CpG 7909) and paclitaxel for treatment of metastatic Lewis Lung Carcinoma (LLC). 40th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, June 5–8, 2004, New Orleans, USA; *J Clin Oncol* 2004; **22** (14 suppl): 7346.
88. Weigel BJ, Rodeberg DA, Krieg AM, Blazar BR. CpG oligodeoxynucleotides potentiate the antitumor effects of chemotherapy or tumor resection in an orthotopic murine model of rhabdomyosarcoma. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 3105–14.
89. Weigel BJ, Nath N, Taylor PA, *et al.* Comparative analysis of murine marrow-derived dendritic cells generated by Flt3L or GM-CSF/IL-4 and matured with immune stimulatory agents on the *in vivo* induction of antileukemia responses. *Blood* 2002; **100** (12): 4169–76.
90. Weiner GJ, Link BK, Leonard C, *et al.* Combination of CpG 7909 and rituximab in patients with relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma (NHL): A phase I, open label dose escalation study of safety and tolerability. 40th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, June 5–8, 2004, New Orleans, USA; *J Clin Oncol* 2004; **22** (14 suppl): 6594.

91. Weiner GJ, Liu HM, Wooldridge JE, *et al.* Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 10833–7.

92. Whitmore MM, Li S, Falo J, Huang L. Systemic administration of LPD prepared with CpG oligonucleotides inhibits the growth of established pulmonary metastases by stimulating innate and acquired antitumor immune responses. *Cancer Immunol Immunother* 2001; **50**: 503–14.

93. Wiemann B, Starnes CO. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacol Ther* 1994; **64**: 529–36.

94. Wooldridge JE, Ballas Z, Krieg AM, Weiner GJ. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance the efficacy of monoclonal antibody therapy of lymphoma. *Blood* 1997; **89**: 2994–8.

95. Wooldridge J, Link BK, Weisdorf DJ, *et al.* Phase I study of oligodeoxynucleotide CpG 7909 in patients with previously treated non-Hodgkin's lymphoma. 39th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, May 31–June 3, 2003, Chicago, USA; *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003; **22**: 210.

96. Yamamoto S, Yamamoto T, Shimada T, *et al.* DNA from bacteria, but not vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microb Immunol* 1992; **36**: 983–8.

97. Yamamoto S, Yamamoto T, Kataoka T, *et al.* Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN and augment IFN-mediated natural killer activity. *J Immunol* 1992; **148**(12): 4072–6.

98. Yi AK, Tuetken R, Redford T, *et al.* CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. *J Immunol* 1998; **160**: 4755–61.

IMMUNOSTIMULATORY CpG DNA: PROSPECTS OF CLINICAL APPLICATION IN ONCOLOGY

S. V. Olisheskiy, V. V. Kozak, Y. V. Yanish,
S. L. Rybalko, V. A. Shlyakhovenko

Summary. *The review presents information about the new promising area in tumor immunotherapy, i.e. application of DNA enriched with non-methylated CpG-motives. Data is presented on the immunostimulatory characteristics of CpG DNA and ways of cell signaling, as well as about classification of synthetic CpG-oligodeoxydeoxynucleotides (CpG-ODN). The prospects for application of CpG-ODN for immunotherapy of patients with malignant neoplasm are discussed.*

Key Words: adjuvant, immunotherapy of cancer, tumor, anti-tumor vaccines, CpG DNA, CpG-ODN.

Адрес для переписки:

Олишевский С.В.
03022, Киев, ул. Васильковская, 45
Институт экспериментальной патологии,
онкологии и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины,
отдел энзимологии опухолей
E-mail: sergeyolisheskiy@yahoo.com