

Тернистый путь макрофаг-активирующего фактора (GcMAF): от открытия к клинической практике

А.А. Останин¹, С.С. Кирикович², Е.В. Долгова², А.С. Проскурина², Е.Р. Черных¹, С.С. Богачев² 

¹ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

 e-mail: labmolbiol@mail.ru

Витамин D₃-связывающий белок (DBP) представляет собой полифункциональный гликопротеин, основная роль которого заключается в транспорте витамина D₃ и его метаболитов; но он также является предшественником макрофаг-активирующего фактора (GcMAF). DBP конвертируется в GcMAF в результате сайт-специфического селективного дегликозилирования под действием β-галактозидазы и сиалидазы, локализованных на активированных В- и Т-лимфоцитах соответственно. Биологическая активность GcMAF выражается, прежде всего, в его способности активировать макрофаги, усиливая их фагоцитарную функцию и продукцию реактивных форм кислорода. В результате активации на макрофагах повышается экспрессия специфических рецепторов, участвующих в распознавании опухоль-ассоциированных антигенов, а также в реализации прямой противораковой активности через индукцию апоптоза/некроза опухолевых клеток. Повышенный интерес к GcMAF связан с его потенциальной возможностью использования в клинике в качестве нового противоопухолевого препарата. Роль GcMAF проявляется не только при онкологических, но и при целом ряде вирусных и нейродегенеративных заболеваний, при которых в сыворотке больных повышена активность N-ацетилгалактозаминидазы (нагалазы). Нагалаза – это фермент, который полностью, а не селективно дегликозилирует DBP и блокирует, таким образом, образование GcMAF, что приводит к иммунным нарушениям. В обзоре подробно рассмотрены современные данные о структуре и функциях DBP как основного предшественника GcMAF. По своему составу находящийся в циркуляции DBP – это смесь немодифицированных и O-гликозилированных молекул, степень гликозилирования которых определяется генотипом по гену, кодирующему DBP. На роль DBP в устойчивости организма к ряду заболеваний указывает тот факт, что у индивидуумов, гомозиготных по аллелю, кодирующему дефектный DBP, не образуется ни одной молекулы GcMAF, вследствие чего эти индивидуумы имеют высокий риск развития различных тяжелых заболеваний (боковой амиотрофический склероз, колоректальный рак и др.). В обзоре представлены данные об основных механизмах противоопухолевого эффекта GcMAF, опухолевой стратегии нейтрализации активности GcMAF, результаты клинических испытаний GcMAF при различных нозологических формах рака, а также обсуждены имеющиеся противоречия относительно позиционирования GcMAF в качестве эффективного противоопухолевого препарата.

Ключевые слова: витамин D₃-связывающий белок (DBP); макрофаг-активирующий фактор (GcMAF); N-ацетилгалактозамин (GalNAc); α-N-ацетилгалактозаминидаза (нагалаза); противоопухолевая терапия.

Для цитирования: Останин А.А., Кирикович С.С., Долгова Е.В., Проскурина А.С., Черных Е.Р., Богачев С.С. Тернистый путь макрофаг-активирующего фактора (GcMAF): от открытия к клинической практике. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(5):624-631. DOI 10.18699/VJ19.535

A thorny pathway of macrophage activating factor (GcMAF): from bench to bedside

A.A. Ostanin¹, S.S. Kirikovich², E.V. Dolgova², A.S. Proskurina², E.R. Chernykh¹, S.S. Bogachev² 

¹ Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

 e-mail: labmolbiol@mail.ru

Vitamin D₃ Binding Protein (DBP) is a multifunctional glycoprotein whose main role is to transport vitamin D₃ and its metabolites, but it also is the precursor of the macrophage activating factor (GcMAF). DBP is converted to GcMAF as a result of site-specific selective deglycosylation under the action of β-galactosidase and sialidase, localized on activated B and T cells, respectively. GcMAF exerts its biological activity primarily as the capability of activating macrophages by enhancing their phagocytic function and producing ROS. Activation results in elevated expression of the specific macrophageal surface receptors involved in the recognition of tumor-associated antigens, as well as in the implementation of direct anticancer activity by inducing the apoptosis or necrosis of tumor cells. Increased interest in GcMAF is associated with its potential to be used in the clinic as a new antitumor drug. Besides its anti-tumor activity, GcMAF exerts a potential against a number of viral and neurodegenerative diseases associated with increased activity of N-acetylgalactosaminidase (nagalase) in the blood serum of patients. Nagalase is an enzyme that completely (rather than selectively)

deglycosylates DBP so it cannot be converted to GcMAF, leading to immunodeficiency. Circulating DBP is composed of unmodified and O-glycosylated molecules with the glycosylation degree being dependent on the allelic variants of the gene encoding DBP. The role of DBP in the resistance of organism against a number of diseases is supported by the increased risk of a variety of severe illnesses (amyotrophic lateral sclerosis, colorectal cancer etc.) in patients deficient for GcMAF due to homozygosity for defective DBP alleles. In this review, we also will examine in detail the current data i) on the structure and functions of DBP, as the main precursor of GcMAF, ii) on the main mechanisms of GcMAF anticancer effect, iii) on the tumor strategy for neutralizing GcMAF activity, iv) on the results of GcMAF clinical trials in various cancers; and will discuss the available controversies regarding the positioning of GcMAF as an effective antitumor drug. Key words: vitamin D₃-binding protein (DBP); Gc protein-derived macrophage activating factor (GcMAF); N-acetylgalactosamine (GalNAc); α-N-acetylgalactosaminidase (nagalase); anticancer therapy.

For citation: Ostanin A.A., Kirikovich S.S., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Chernykh E.R., Bogachev S.S. A thorny pathway of macrophage activating factor (GcMAF): from bench to bedside. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(5):624-631. DOI 10.18699/VJ19.535 (in Russian)

Введение

Специфический активатор макрофагов, GcMAF, – компонент плазмы крови, который образуется в результате сайт-специфического селективного дегликозилирования витамин D₃-связывающего белка (DBP) под действием ферментов β-галактозидазы и сиалидазы, локализованных на клеточных мембранах активированных В- и Т-лимфоцитов соответственно. Многочисленные экспериментальные данные, а также результаты пилотных клинических исследований свидетельствуют о выраженной противоопухолевой активности GcMAF, что открывает широкие перспективы его потенциального использования в качестве нового лекарственного средства при онкологических заболеваниях.

Цель настоящего обзора – представление данных о структуре и функции DBP как предшественника GcMAF, основных механизмах противоопухолевого эффекта GcMAF, опухолевой стратегии нейтрализации активности GcMAF, результатах клинических испытаний GcMAF при различных нозологических формах рака, а также обсуждение имеющихся критических замечаний в отношении позиционирования GcMAF в качестве эффективного противоопухолевого препарата.

Структура и функции DBP как предшественника GcMAF

Витамин D₃-связывающий белок (DBP) – это полифункциональный гликопротеин, относящийся к семейству белков крови (Group-specific component, Gc-белки размером 51–58 кДа), представленных в том числе альбумином, α-фетопроотеином и афамином (α-альбумин, витамин E-связывающий белок). DBP синтезируется гепатоцитами и попадает в кровотоки в форме зрелого мономера, несущего три функциональных домена. Домен, связывающий витамин D₃ и жирные кислоты, расположен между аминокислотными остатками 35–49, актин-связывающий домен находится между аминокислотными остатками 350–403. Два сайта связывания с клеточной мембраной нейтрофилов расположены на N- и C-концах молекулы гликопротеина (Haddad et al., 1992; Otterbein et al., 2002; Verboven et al., 2002; Malik et al., 2013).

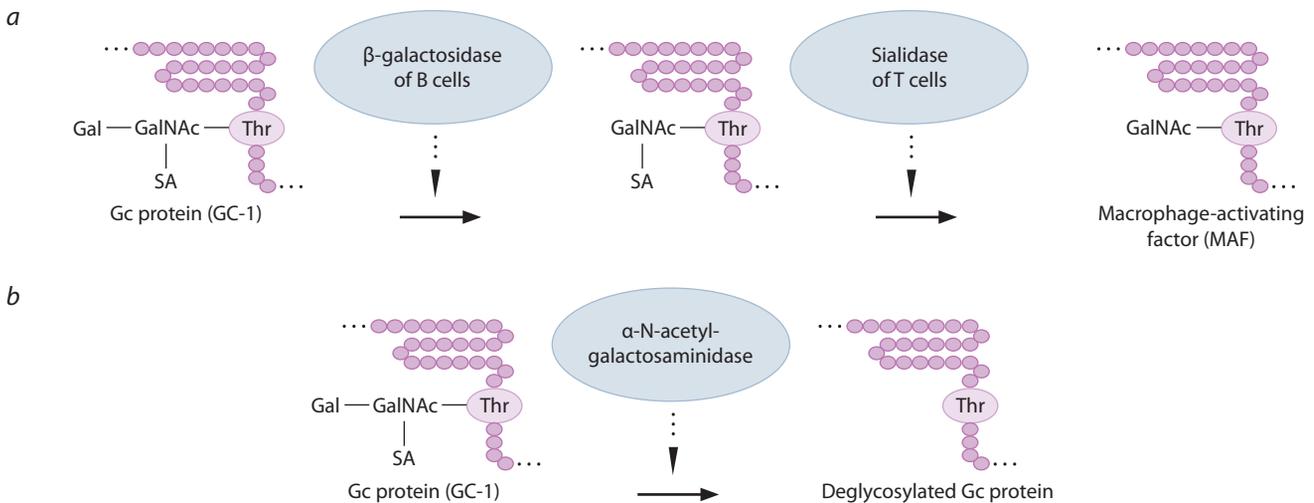
Белок DBP кодируется геном, находящимся на длинном плече 4-й хромосомы (4q11-q13) и представленным единственной копией (NCBI ID: 2638), состоящей из 15 экзонов и 12 интронов (Song et al., 1999). DBP присутствует в плазме крови человека в большом количестве

(300–600 мг/л) и выступает в качестве основного переносчика витамина D₃ и его производных. К другим функциям DBP относятся: а) связывание и выведение актина, высвобождающегося при некрозе клеток, а также выведение жирных кислот и бактериальных эндотоксинов; б) активация хемотаксиса нейтрофилов; в) активация Т-лимфоцитов через механизм макропиноцитоза; г) участие в метаболизме костной ткани. DBP обнаруживается в различных жидкостях – сыворотке крови, моче, грудном молоке, асцитной жидкости, ликворе, слюне, эякуляте, а также органах человека – мозге, сердце, легких, селезенке, почках, плаценте, семенниках, матке (Malik et al., 2013; Delanghe et al., 2015; Morales, 2017).

Еще одна очень важная функция DBP – его способность активировать макрофаги, которую Gc-белок приобретает в результате сайт-специфического селективного дегликозилирования (рисунок, а).

Гликозилированный DBP содержит один трисахарид, ковалентно связанный с треонином в 420-й позиции и состоящий из N-ацетилгалактозамина (GalNAc) с двумя разветвленными остатками сахаров галактозы и сиаловой кислоты. DBP конвертируется в GcMAF под действием ферментов β-галактозидазы и сиалидазы, локализованных на клеточных мембранах активированных В- и Т-лимфоцитов соответственно. В результате образуется активный белок GcMAF, содержащий остаточный сахар N-ацетилгалактозамин с освобожденными от галактозы и сиаловой кислоты сайтами связывания (Yamamoto, Kumashiro, 1993; Yamamoto et al., 2008a–c). Следует отметить, что такое селективное дегликозилирование DBP происходит естественным образом при развитии воспалительного ответа. Считается, что именно GalNAc в составе GcMAF обеспечивает активацию макрофагов. Полное дегликозилирование DBP под действием фермента N-ацетилгалактозаминидазы (нагалазы) приводит к разрыву связи GalNAc с треонином (см. рисунок, б), и таким образом нагалаза блокирует DBP → GcMAF конверсию.

По своему составу находящийся в циркуляции DBP представляет собой смесь немодифицированных и O-гликозилированных молекул, степень гликозилирования которых определяется генотипом DBP (Malik et al., 2013). Для человека описаны три мажорных аллельных варианта белка: DBP1F, DBP1S и DBP2. Варианты DBP1F и DBP1S могут быть конвертированы в GcMAF под действием β-галактозидазы и сиалидазы, тогда как вариант DBP2, в котором треонин в 420-й позиции заменен на лизин, не



Schematic presentation of DBP deglycosylation (Yamamoto et al., 1996): (a) selective, (b) complete.

может связывать GalNAc, поскольку в нем отсутствует основной сайт O-связанного гликозилирования сахаридов. Поскольку у индивидуумов, гомозиготных по аллелю DBP2, в принципе не может образоваться ни одной молекулы GcMAF, не удивительно, что именно вариант *DBP2/DBP2* полиморфизма ассоциируется с повышенным риском развития различных тяжелых заболеваний, таких как боковой амиотрофический склероз, колоректальный рак и др. (Morales, 2017).

Механизмы противоопухолевого эффекта GcMAF

Биологическая активность GcMAF проявляется в его способности активировать макрофаги, усиливая их фагоцитарную функцию и продукцию реактивных форм кислорода. Кроме того, GcMAF стимулирует пролиферацию миелоидных клеток-предшественников и индуцирует их дифференцировку в зрелые макрофаги (Yamamoto, Nomma, 1991; Nomma et al., 1993; Mohamad et al., 2002a, b; Yamamoto et al., 2008a–c; Uto et al., 2012; Thyer et al., 2013a; Ishikawa et al., 2014). В результате активации на макрофагах повышается экспрессия специфических рецепторов, участвующих в распознавании и презентации опухоль-ассоциированных антигенов, а также в реализации прямой противораковой активности через индукцию апоптоза/некроза опухолевых клеток (Yamamoto et al., 2008a–c; Rehder et al., 2009; Сахно и др., 2016). Так, например, показано, что макрофаги человека, активированные GcMAF в дозе 100 пг/мл, индуцируют гибель 51 и 82 % клеток линии LNCaP (рак простаты человека) через 4 и 18 ч сокультивирования соответственно (Yamamoto et al., 2008b). В культуре *in vitro* GcMAF усиливает также дифференцировку «профессиональных» антиген-презентирующих дендритных клеток (ДК), что проявляется значимым увеличением зрелых HLA-DR⁺CD86⁺ДК до уровня > 80 % в общей популяции.

В работе (Gregory et al., 2010) показано, что GcMAF характеризуется прямым ингибиторным действием на пролиферацию и миграцию клеток линий рака простаты (LNCaP и PC3), а также снижает экспрессию на них uPAR

(urokinase plasminogen activator receptor), активация которого коррелирует с метастазированием опухоли. GcMAF в дозе 40 нг/мл ингибирует пролиферацию клеток линии аденокарциномы молочной железы (MCF-7) в среднем на 50 %. При этом регистрируется снижение экспрессии опухолевыми клетками виментина, маркера прогрессии и метастазирования рака молочной железы, вызванного трансформацией эпителиальных клеток и приобретением ими фенотипа мезенхимальных клеток с повышенной устойчивостью к апоптозу, высокой миграционной активностью и инвазивностью (феномен эпителиально-мезенхимального транзита) (Pacini et al., 2012b; Thyer et al., 2013b). В экспериментах с золотистыми сирийскими хомяками в модели канцерогенеза, индуцированного 9,10-диметил-1,2-бензантраценом (DMBA), также был выявлен ингибирующий эффект GcMAF на рост опухоли и увеличение продолжительности жизни животных (Toyohara et al., 2011).

Как известно, рост опухоли – это ангиогенез-зависимый процесс. Поэтому еще одним очень важным механизмом противоопухолевого действия GcMAF являются его антиангиогенная активность и способность ингибировать пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, а также образование новых микрососудов в опухоли (Nonaka et al., 2012). В исследовании (Pacini et al., 2011, 2012a) с использованием анализа хориоаллантоической мембраны (chorioallantoic membrane [CAM] assay) было показано, что GcMAF в концентрации 1 нг/мл ингибирует стимулированный простагландином E₁ ангиогенез у куриных эмбрионов.

Противоопухолевая активность GcMAF была продемонстрирована в различных экспериментальных моделях *in vivo*. Kisker с коллегами (2003) показали, что ежедневное интраперитонеальное введение GcMAF в дозе 4 нг/кг ингибирует рост графта рака поджелудочной железы человека (B × PC-3; 2.5 × 10⁶ клеток; п/к) у иммунодефицитных SCID мышей. При использовании GcMAF в дозе 4 мкг/кг наблюдалась полная регрессия опухолевого трансплантата. Гистологические исследования выявили выраженную инфильтрацию графта Mac-3⁺ макрофагами, меньшую

плотность капилляров и более высокий уровень апоптоза по сравнению с контролем (Kisker et al., 2003). Пятнадцатичасовая инкубация перитонеальных макрофагов ICR мышей с сывороткой человека, обогащенной GcMAF в дозе 10 нг по белку, приводила к значимому усилению их фагоцитарной активности в среднем на 73 %. Интраперитонеальное введение такой сыворотки (в дозе 1.552 мкг/кг/день в течение 7 дней) мышам с привитым асцитом карциномы Эрлиха (10×10^6 клеток/мышь) сопровождалось достоверным увеличением продолжительности жизни (Kuchiike et al., 2013). В работе (Korbelik et al., 1997) на мышинной модели SCCVII (плоскоклеточная карцинома) было показано, что сочетание фотодинамической терапии (ФДТ) с адьювантной терапией GcMAF в виде комбинации внутривентральных и перитуморальных инъекций (по 50 и 0.5 нг/кг⁻¹ соответственно), вводимых в дни 0, 4, 8 и 12 после ФДТ, приводило к 100 % выживаемости животных против 25 % при использовании ФДТ в режиме монотерапии.

Анализ данных литературы позволяет заключить, что противоопухолевый эффект GcMAF реализуется не только через активацию опухоль-инфильтрирующих макрофагов (ОИМ), но и с участием других механизмов, связанных с прямым ингибиторным действием GcMAF на пролиферацию, миграцию и метастазирование опухолевых клеток, а также с подавлением неопластического ангиогенеза в опухолевой ткани.

Опухолевая стратегия нейтрализации активности опухоль-инфильтрирующих макрофагов и GcMAF

Хорошо известно, что в процессе канцерогенеза трансформированные опухолевые клетки используют различные стратегии, позволяющие им как ускользать от иммунного надзора, так и подавлять развитие эффективного противоопухолевого иммунного ответа (Dunn et al., 2002; Kim et al., 2007). Одна из этих стратегий направлена, в частности, на нейтрализацию опухолецидной активности макрофагов в опухолевом микроокружении. Под действием TGF- β 1, секретируемого опухолевыми клетками, способность ОИМ к фагоцитозу снижается, и они приобретают фенотип макрофагов 2-го типа (M2-клетки), который ориентирован на поддержание роста опухоли (Toutirais et al., 2003; Allavena et al., 2008). M2-клетки – одна из субпопуляций тканевых макрофагов, для которых характерна экспрессия аргиназы и секреция IL-10, простагландина E₂ и самого TGF- β 1, поддерживающего данный фенотип ОИМ через аутокринный механизм. M2-клетки отличаются также повышенной экспрессией фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), активирующего ангиогенез и являющегося одним из факторов опухолевой иммуносупрессии (Martinez et al., 2006). Совместное воздействие TGF- β 1 и VEGF инициирует формирование опухолевой стромы, необходимой для обеспечения трофики опухолевых клеток, локальной иммуносупрессии и поддержки процесса метастазирования (Ohm, Carbone, 2001; Mantovani et al., 2002).

Вирус-инфицированные, а также опухолевые клетки способны секретировать фермент нагалазу (экзо- и эндотипа), который также может участвовать в перепрограммировании ОИМ в M2-направлении (Mohamad et al., 2002a). Экзотип нагалазы в физиологических условиях

секретируется нормальными гепатоцитами и не дегликозилирует трисахарид DBP, тем самым не влияет на конвертацию этого предшественника в GcMAF (Ioannou et al., 1992; Nagasawa et al., 2005). В норме активность фермента в плазме крови варьирует от 0.35 до 0.65 нМ/мин/мг субстрата. При различных онкологических заболеваниях сывороточный уровень нагалазы значительно повышается и регистрируется в диапазоне от 0.63 до 5.21 нМ/мин/мг (Yamamoto et al., 1996; McCarty, 2013). Нагалаза экзо- и эндотипа, продуцируемая опухолевыми клетками, может полностью дегликозилировать как трисахарид DBP, так и остаточный сахар N-ацетилгалактозамин GcMAF (Yamamoto et al., 1996; Mohamad et al., 2002a; Matsuura et al., 2004). В опухолевом микроокружении возможны оба варианта тотального дегликозилирования, в результате которого либо блокируется конвертация DBP в GcMAF, либо инактивируется уже существующий GcMAF (Yamamoto et al., 1996; Saburi et al., 2017). Дегликозилированный GcMAF не в состоянии активировать опухолеинфильтрирующие макрофаги, что клинически проявляется развитием иммуносупрессии и прогрессией заболевания, связанной с потерей макрофагами противоопухолевой активности (Nagasawa et al., 2005; McCarty, 2013).

Результаты клинических испытаний GcMAF

Первые результаты открытых, пилотных клинических исследований препарата GcMAF 1-й генерации были опубликованы в 2008 г. (Yamamoto et al., 2008a–c). Следует отметить, что N. Yamamoto еще в 1991 г. разработал способ получения GcMAF 1-й генерации методом аффинной хроматографии на колонках, нагруженных 25-гидрокси-витамином D₃, с последующим дегликозилированием выделенного DBP растворимыми или иммобилизованными на носителе ферментами (β -галактозидазой и сиалидазой) (Yamamoto, Homma, 1991). Получаемый продукт характеризовался низкой концентрацией (100 нг/0.25 мл, 1 доза), нестабильностью при комнатной температуре и при отсутствии антиоксидантов в виде альбумина и мочевиной кислоты. В своих пионерных работах N. Yamamoto с коллегами использовали GcMAF в дозе 100 нг, который вводили больным внутримышечно, 1 раз/нед, курсом от 3.5 до 6 мес. Было пролечено 16 больных раком простаты в возрасте от 46 до 76 лет (медиана, Me – 63.5), 16 больных раком молочной железы с метастазами в возрасте от 44 до 77 лет (Me – 62.5) и 8 больных колоректальным раком с метастазами в возрасте от 41 до 82 лет (Me – 65.5). Исследователи показали, что терапия GcMAF приводит к снижению до нормы активности сывороточной нагалазы и полному излечению пациентов. Продолжительность безрецидивного периода для рака молочной железы составила более 4 лет, для рака простаты и колоректального рака – 7 лет. Снижение нагалазы в процессе терапии свидетельствовало, по мнению авторов, об эрадикации опухоли, что для рака простаты было подтверждено томографическим сканированием.

В 2009 г. N. Yamamoto с коллегами опубликовали результаты иммунотерапии с использованием GcMAF 1-й генерации у ВИЧ-инфицированных больных ($n = 15$) (Yamamoto et al., 2009). Препарат вводили больным также внутримышечно, в дозе 100 нг, 1 раз/нед в течение

4.5 мес. После окончания курсового лечения у больных регистрировались снижение активности нагалазы в сыворотке крови, увеличение количества циркулирующих CD4+Т-лимфоцитов, нормализация индекса CD4/CD8. При этом нормальное содержание Т-клеток в кровотоке сохранялось у больных в течение 7 лет наблюдения.

Полученные группой Yamamoto результаты были настолько многообещающими, что послужили своего рода катализатором для дальнейших исследований клинической эффективности GcMAF. В 2013 г. были опубликованы данные по использованию препарата GcMAF 1-й генерации (в дозе 100 нг, в/м, 1 раз/нед) в группе 20 больных (9 мужчин и 11 женщин в возрасте от 42 до 76 лет) с продвинутыми стадиями рака различной локализации (мочевой пузырь, яичники, простата, молочная железа и т.д.). Было показано, что активность сывороточной нагалазы у больных значительно снижалась с исходного уровня 2.8 ± 0.26 до 1.6 ± 0.17 нМ/мин/мг после окончания иммунотерапии ($p < 0.01$), при этом интервал между обследованиями составлял в среднем 263 ± 45 дней (Thyer et al., 2013a).

Следует отметить, что в 2010 г. сотрудниками Университета Токушима и частной клиники Saisei Mirai (Япония) был разработан и запатентован способ получения GcMAF 2-й генерации (Uto et al., 2012). В этом случае GcMAF выделяют путем ферментативной обработки сыворотки конкретного больного, индивидуально без очистки аффинной хроматографией на 25-гидроксивитамин D₃ колонках. GcMAF 2-й генерации отличается от препарата первого поколения более высокой концентрацией (1500 нг/0.5 мл/1 доза) и стабильностью. Было предложено использовать препарат GcMAF 2-й генерации в качестве одного из компонентов интегративной иммунотерапии рака (Inui et al., 2013). Был разработан протокол, включающий: 1) GcMAF 1500 нг/0.5 мл; в/м или п/к; 1–2 раза/нед; в течение всего курса иммунотерапии; 2) клеточная терапия с использованием Т- и NK-клеток (Natural Killer cells), 1 раз/нед, $n = 6$; 3) высокие дозы VitC (50–100 г); в/в; 2 раза/нед; 4) альфа-липоевая кислота (600 мг); per os; ежедневно; 5) VitD3 (5–10 000 МЕ); per os; ежедневно. По данной схеме с апреля 2011 г. по март 2013 г. на базе клиники Saisei Mirai было пролечено более 345 больных с различными нозологическими формами рака. Но в опубликованной работе авторы приводят только три клинических наблюдения, которые, по их мнению, наиболее убедительно свидетельствуют об эффективности предложенного подхода.

Пациент 1. М/71 год, диагноз: карцинома тимуса с метастазами в легкие. Интегративная иммунотерапия в течение 6 мес. Результат: отсутствие опухолевой прогрессии в течение 12 мес. после завершения терапии.

Пациент 2. М/74 года, диагноз: рак простаты с множественными метастазами в кости. Интегративная иммунотерапия в течение 3 мес. в сочетании с гипертермией. Результат: через 6 мес. после завершения терапии скинтиграммы костей в норме, метастазы не обнаруживаются.

Пациент 3. Ж/72 года, диагноз: метастатический рак печени после удаления сигмовидной кишки и двусторонней овариэктомии. Интегративная иммунотерапия в течение 6 мес. в сочетании с радиотерапией (55 Гр). Результат: в течение 6 мес. после завершения терапии

отсутствие рецидива по данным позитронной (ПЭТ) и компьютерной (КТ) томографии.

Накопленный опыт клинического применения препарата GcMAF свидетельствует о его безопасности, поскольку он нетоксичен и его длительное применение не приводит к появлению побочных нежелательных явлений. Основная концепция противоопухолевого эффекта GcMAF состоит в активации макрофагов, редукции опухоли вплоть до ее полной эрадикации, что проявляется снижением активности сывороточной нагалазы как диагностического маркера эффективности терапии.

Следует отметить еще одну область клинического применения GcMAF. Bradstreet с коллегами при обследовании когорты из 40 детей (32 мальчика и 8 девочек в возрасте от 1.5 до 21 лет; Me – 7 лет) с заболеваниями аутистического спектра (ASD) обнаружили, что активность сывороточной нагалазы выходит за верхнюю границу нормативного диапазона (> 0.95 нМ/мин/мг) в 95 % случаев (у 38/40 детей) и составляет в среднем по группе 1.93 нМ/мин/мг (Bradstreet et al., 2012). После курсового лечения в виде внутримышечного введения препарата GcMAF (1 раз/нед, в течение 3.5 мес., с постепенным увеличением дозы от 4 до 100 нг) активность нагалазы снизилась у всех больных ASD (за исключением одного ребенка) и составляла в среднем 1.03 нМ/мин/мг ($p < 0.0001$). На момент повторного тестирования у 24 из 40 детей (60 %) уровень нагалазы находился в границах нормативного диапазона (< 0.95 нМ/мин/мг). Оставшихся 16 пациентов (40 %), у которых полной нормализации активности сывороточной нагалазы достичь не удалось, авторы рассматривают в качестве кандидатов на продолжение курса GcMAF терапии. В процессе лечения не было отмечено развития каких-либо серьезных побочных осложнений, но при этом у значительной части детей регистрировалось улучшение разговорной речи, социализации и когнитивных функций.

Является ли GcMAF эффективным противоопухолевым препаратом?

Следует сказать, что пионерные работы N. Yamamoto (Yamamoto et al., 2008a–c, 2009) не только послужили катализатором дальнейших исследований клинической эффективности GcMAF, но вызвали также определенную волну критических замечаний. Так, A. Ugarte с коллегами в своем письме редакторам журнала Cancer Immunology, Immunotherapy указывают на противоречивость данных группы Yamamoto и сомневаются в надежности полученных ими результатов (Ugarte et al., 2014). Высказывались следующие замечания: 1) нет базовой информации по больным (диагноза по TNM, стадии/тяжести рака, гистологии); 2) нет контрольной группы; 3) о наличии метастазов авторы судят по повышенному уровню нагалазы, что не является общепризнанным в онкологии; 4) авторы активно себя самоцитируют; 5) разрешительные документы на проведение клинических испытаний недоуверенны; 6) упоминаемые в статье спонсоры на самом деле не поддерживали эти исследования; 7) в статье много неточностей и ошибок, в том числе некорректных ссылок. Сделано заключение: полученные результаты не являются научно подтвержденными. В результате по решению редакторских советов три статьи N. Yamamoto с соавто-

рами (2008а, с, 2009) были отозваны после публикации в журналах с формулировкой «некорректно проведенные клинические испытания и некорректно оформленная документация, сопровождающая эти испытания».

Существуют определенные факты, противоречащие рабочей гипотезе, на которой базируется GcMAF-терапия. В пионерных работах N. Yamamoto было показано, что у обследованных больных раком снижен эндогенный уровень GcMAF, поскольку в биологическом тесте обработка макрофагов сывороткой этих больных не стимулирует образование активных форм кислорода (Yamamoto et al., 2008а–с, 2009). В то же время D.S. Rehder с коллегами, используя масс-спектральный анализ, показали, что количество GalNAc DBP (что принято считать GcMAF) в сыворотке крови больных раком и здоровых доноров практически не различается (Rehder et al., 2009). Более того, по данным этих авторов, абсолютное количество GalNAc DBP у больных раком составляет в среднем 4–5 мг/л, что многократно превышает дозу экзогенно вводимого препарата GcMAF, которую N. Yamamoto использовал в качестве терапевтической (100 нг; 1 раз/нед). Кроме того, авторы не исключают вероятности, что поскольку у больных раком повышен уровень сывороточной гаалазы, то вводимый препарат GcMAF может сразу инактивироваться вследствие тотального дегликозирования GalNAc. Не исключено также, что во фракции, содержащей GalNAc DBP, может присутствовать фракция белка, обладающая признаками GcMAF, но, по сути, таковой не являющаяся и не активирующая макрофаги. О такой возможности свидетельствовали тесты по связыванию лектина при отсутствии медиаторов воспаления (Kanan et al., 2000).

Для объяснения выявленных противоречий следует принять во внимание следующие факты. По всей видимости, в общей массе GalNAc DBP (GcMAF), определяемой в работе (Rehder et al., 2009), все-таки присутствует белок, который несет GalNAc после селективного дегликозирования β -галактозидазой и сиалидазой на активированных воспалением В- и Т-лимфоцитах. Одновременно это не какой-то аллельный вариант DBP1S, который доминирует в семействе Gc-белков сыворотки крови и поэтому хорошо детектируется масс-спектрометрией. Повидимому, существуют два типа GalNAc DBP, один из которых способен индуцировать макрофаги и является, таким образом, «истинным» GcMAF, а второй имеет аналогичное гликозилирование, но структурно организован иначе и не способен активировать макрофаги. Показано, что среди DBP1S белков, основная масса которых имеет трисахаридную группу в позиции T420, присутствует гликозилированная форма, имеющая карбогидрат в позиции T418. Именно DBP1S белок, гликозилированный в позиции T418, может быть вовлечен в формирование активного GcMAF. Поскольку T420 и T418 в структуре белковой молекулы расположены очень близко, а содержание этой формы GalNAc DBP в сыворотке чрезвычайно мало, его детекция при масс-спектральном пептидном картировании требует больших дополнительных усилий и понимания направления поиска.

Не исключена еще одна возможность. В отличие от других работ D.S. Rehder с коллегами выделяли DBP

белок методом аффинной хроматографии на колонках, нагруженных поликлональными антителами против Gc-белков, а не 25-(ОН) витамином D₃ (Rehder et al., 2009). Возможно, в этом случае выделяется дериват с дефектным витамин D₃-связывающим доменом, который необходим для активности GcMAF. И, следовательно, несмотря на все атрибуты GcMAF, выделенный таким образом белок, который в больших количествах содержится в сыворотке крови как больных раком, так и здоровых людей, не будет «истинным» GcMAF или будет содержать следовые концентрации функционально активного GcMAF.

Кроме того, GcMAF образуется при прямом контакте DBP с активированными Т- и В-клетками, инфильтрирующими опухоль. Здесь же присутствуют потенциальные клетки-мишени – тумор-инфильтрирующие макрофаги. Возможно, что активный GcMAF утилизируется *in situ*, поэтому его содержание в периферической крови как реального макрофаг-активирующего фактора снижено.

И наконец, возможно, что при различного рода выделениях на колонках сорбируется некая иная третичная конформация известного по сайту гликозирования Gc-белка и, таким образом, для получения активного GcMAF нужно использовать систему, где его активность (конкретного белка из конкретной пробирки) валидируется в биологических тестах, по крайней мере, до тех пор, пока не будет четко определена его молекулярная структура.

Заключение

Несмотря на критические замечания относительно позиционирования GcMAF в качестве перспективного противоопухолевого препарата, следует все-таки отметить, что в течение примерно двух десятилетий эффекты GcMAF независимо изучались несколькими исследовательскими группами как в витральных тестах, так и на различных экспериментальных моделях *in vivo*. Имеются также положительные результаты клинических испытаний, которые еще нуждаются в подтверждении на более высоком уровне доказательной медицины. Тем не менее уже сейчас препарат GcMAF как лекарственная форма разрешен для практического применения в Японии. К настоящему времени на базе клиники Saisei Mirai пролечено более 3000 больных различными формами рака с использованием интегративной иммунотерапии, одним из компонентов которой является GcMAF-терапия. В Израиле (компания Efranat Pharma) завершена I фаза клинических испытаний GcMAF (препарат EF-022, с эскалацией дозы от 100 до 1000 нг, в/м, еженедельно) в группе 24 больных с метастатическими формами солидных опухолей. Фармацевтическая компания планирует продолжение исследований и проведение клинических испытаний II–III фаз. В Европе и США также имеется широко не афишируемое лабораторное производство препарата GcMAF (Reno Integrative Medical Center, Nevada; Immuno Biotech Ltd). Кроме того, после некоторого затишья в литературе вновь стали появляться экспериментальные статьи, посвященные исследованию GcMAF. Все это свидетельствует, что фактор интересен в клинической перспективе, поэтому одна из актуальных задач – корректное определение молекулярной структуры белка, обладающего GcMAF активностью.

Список литературы / References

- Сахно Л.В., Шевела Е.Я., Тихонова М.А., Останин А.А., Черных Е.Р. Молекулярные механизмы иммуносупрессорной активности M2-макрофагов. *Иммунология*. 2016;37(6):311-315. [Sakhno L.V., Shevela E.Ya., Tikhonova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Molecular mechanisms of M2 macrophage immunosuppressive activity. *Immunologia = Immunology*. 2016;37(6):311-315. DOI 10.18821/0206-49522016-37-6-311-315. (in Russian)]
- Allavena P., Sica A., Garlanda C., Mantovani A. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol. Rev.* 2008;222(1):155-161. DOI 10.1111/j.1600-065X.2008.00607.x.
- Bradstreet J.J., Vogelaar E., Thyer L. Initial observations of elevated alpha-N-acetylgalactosaminidase activity associated with autism and observed reductions from Gcprotein-macrophage activating factor injections. *Autism Insights*. 2012;4:31-38. DOI 10.4137/AUI.S10485.
- Delanghe J.R., Speeckaert R., Speeckaert M.M. Behind the scenes of vitamin D binding protein: more than vitamin D binding. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015;29(5):773-786. DOI 10.1016/j.beem.2015.06.006.
- Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H., Old L.J., Schreiber R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 2002;3(11):991-998. DOI 10.1038/ni1102-991.
- Gregory K.J., Zhao B., Bielenberg D.R., Dridi S., Wu J., Jiang W., Huang B., Pirie-Shepherd S., Fannon M. Vitamin D binding protein-macrophage activating factor directly inhibits proliferation, migration, and uPAR expression of prostate cancer cells. *PLoS One*. 2010;5(10):e13428. DOI 10.1371/journal.pone.0013428.
- Haddad J.G., Hu Y.Z., Kowalski M.A., Laramore C., Ray K., Robzyk P., Cooke N.E. Identification of the sterol- and actin-binding domains of plasma vitamin D binding protein (Gc-globulin). *Biochemistry*. 1992;31(31):7174-7181. DOI 10.1021/bi00146a021.
- Homma S., Yamamoto M., Yamamoto N. Vitamin D-binding protein (group-specific component) is the sole serum protein required for macrophage activation after treatment of peritoneal cells with lysophosphatidylcholine. *Immunol. Cell Biol.* 1993;71(Pt. 4):249-257. DOI 10.1038/icb.1993.29.
- Inui T., Kuchiike D., Kubo K., Mette M., Uto Y., Hori H., Sakamoto N. Clinical experience of integrative cancer immunotherapy with GcMAF. *Anticancer Res.* 2013;33(7):2917-2919.
- Ioannou Y.A., Bishop D.F., Desnick R.J. Overexpression of human alpha-galactosidase A results in its intracellular aggregation, crystallization in lysosomes, and selective secretion. *J. Cell Biol.* 1992;119:1137-1150. DOI 10.1083/jcb.119.5.1137.
- Ishikawa M., Inoue T., Inui T., Kuchiike D., Kubo K., Uto Y., Nishikata T. A novel assay system for macrophage-activating factor activity using a human U937 cell line. *Anticancer Res.* 2014;34(8):4577-4581.
- Kanan R.M., Cook D.B., Datta H.K. Lectin immunoassay for macrophage-activating factor (Gc-MAF) produced by deglycosylation of Gc-globulins for noninducible generation of Gc-MAF. *Clin. Chem.* 2000;46:412-414.
- Kim R., Emi M., Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*. 2007;121(1):1-14. DOI 10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x.
- Kisker O., Onizuka S., Becker C.M., Fannon M., Flynn E., D'Amato R., Zetter B., Folkman J., Ray R., Swamy N., Pirie-Shepherd S. Vitamin D binding protein-macrophage activating factor (DBP-maf) inhibits angiogenesis and tumor growth in mice. *Neoplasia*. 2003;5(1):32-40. DOI 10.1016/S1476-5586(03)80015-5.
- Korbelik M., Naraparaju V.R., Yamamoto N. Macrophage-directed immunotherapy as adjuvant to photodynamic therapy of cancer. *Br. J. Cancer*. 1997;75(2):202-207. DOI 10.1038/bjc.1997.34.
- Kuchiike D., Uto Y., Mukai H., Ishiyama N., Abe C., Tanaka D., Kawai T., Kubo K., Mette M., Inui T., Endo Y., Hori H. Degalactosylated/desialylated human serum containing GcMAF induces macrophage phagocytic activity and *in vivo* antitumor activity. *Anticancer Res.* 2013;33(7):2881-2885.
- Malik S., Fu L., Juras D.J., Karmali M., Wong B.Y., Gozdzik A., Cole D.E. Common variants of the vitamin D binding protein gene and adverse health outcomes. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2013;50(1):1-22. DOI 10.3109/10408363.2012.750262.
- Mantovani A., Sozzani S., Locati M., Allavena P., Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002;23(11):549-555. DOI 10.1016/S1471-4906(02)02302-5.
- Martinez F.O., Gordon S., Locati M., Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J. Immunol.* 2006;177(10):7303-7311. DOI 10.4049/jimmunol.177.10.7303.
- Matsuura T., Uematsu T., Yamaoka M., Furusawa K. Effect of salivary gland adenocarcinoma cell-derived alpha-N-acetylgalactosaminidase on the bioactivity of macrophage activating factor. *Int. J. Oncol.* 2004;24(3):521-528. DOI 10.3892/ijo.24.3.521.
- McCarty F. Overview of macrophage activating factor and the nagalase assay – potential for control of micrometastatic or early primary cancer. 2013. Available at <https://pdfs.semanticscholar.org/8c6d/d28ae1280f52d857145bbd7b14d4a6146e2d.pdf>.
- Mohamad S.B., Nagasawa H., Uto Y., Hori H. Tumor cell alpha-N-acetylgalactosaminidase activity and its involvement in GcMAF-related macrophage activation. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 2002a;132(1):1-8. DOI 10.1016/S1095-6433(02)00190-3.
- Mohamad S.B., Nagasawa H., Uto Y., Hori H. Preparation of Gc protein-derived macrophage activating factor (GcMAF) and its structural characterization and biological activities. *Anticancer Res.* 2002b;22(6C):4297-4300.
- Morales E.M. GcMAF: a polemic or a highly promising molecule? *World Scientific News*. 2017;65:20-36.
- Nagasawa H., Uto Y., Sasaki H., Okamura N., Murakami A., Kubo S., Kirk K.L., Hori H. Gc protein (vitamin D-binding protein): Gc genotyping and GcMAF precursor activity. *Anticancer Res.* 2005;25:3689-3696.
- Nonaka K., Onizuka S., Ishibashi H., Uto Y., Hori H., Nakayama T., Matsuura N., Kanematsu T., Fujioka H. Vitamin D binding protein-macrophage activating factor inhibits HCC in SCID mice. *J. Surg. Res.* 2012;172(1):116-122. DOI 10.1016/j.jss.2010.07.057.
- Ohm J.E., Carbone D.P. VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency. *Immunol. Res.* 2001;23(2-3):263-272. DOI 10.1385/IR:23-2-3:263.
- Otterbein L.R., Cosio C., Graceffa P., Dominguez R. Crystal structures of the vitamin D-binding protein and its complex with actin: structural basis of the actin-scavenger system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002;99:8003-8008. DOI 10.1073/pnas.122126299.
- Pacini S., Morucci G., Punzi T., Gulisano M., Ruggiero M. Gc protein-derived macrophage-activating factor (GcMAF) stimulates cAMP formation in human mononuclear cells and inhibits angiogenesis in chick embryo chorioallantoic membrane assay. *Cancer Immunol. Immunother.* 2011;60(4):479-485. DOI 10.1007/s00262-010-0953-7.
- Pacini S., Morucci G., Punzi T., Gulisano M., Ruggiero M., Amato M., Aterini S. Effect of paricalcitol and GcMAF on angiogenesis and human peripheral blood mononuclear cell proliferation and signaling. *J. Nephrol.* 2012a;25(4):577-581. DOI 10.5301/jn.5000035.
- Pacini S., Punzi T., Morucci G., Gulisano M., Ruggiero M. Effects of vitamin D-binding protein-derived macrophage-activating factor on human breast cancer cells. *Anticancer Res.* 2012b;32(1):45-52.
- Rehder D.S., Nelson R.W., Borges C.R. Glycosylation status of vitamin D binding protein in cancer patients. *Protein Sci.* 2009;18(10):2036-2042. DOI 10.1002/pro.214.
- Saburi E., Saburi A., Ghanei M. Promising role for Gc-MAF in cancer immunotherapy: from bench to bedside. *Caspian J. Intern. Med.* 2017;8(4):228-238. DOI 10.22088/cjim.8.4.228.
- Song Y.H., Naumova A.K., Liebhaber S.A., Cooke N.E. Physical and meiotic mapping of the region of human chromosome 4q11-q13

- encompassing the vitamin D binding protein DBP/Gc-globulin and albumin multigene cluster. *Genome Res.* 1999;9(6):581-587.
- Thyer L., Ward E., Smith R., Branca J.J., Morucci G., Gulisano M., Noakes D., Eslinger R., Pacini S. GC protein-derived macrophage-activating factor decreases α -N-acetylgalactosaminidase levels in advanced cancer patients. *Oncoimmunology.* 2013a;2(8):e25769. DOI 10.4161/onci.25769.
- Thyer L., Ward E., Smith R., Fiore M.G., Magherini S., Branca J.J., Morucci G., Gulisano M., Ruggiero M., Pacini S. A novel role for a major component of the vitamin D axis: vitamin D binding protein-derived macrophage activating factor induces human breast cancer cell apoptosis through stimulation of macrophages. *Nutrients.* 2013b;5(7):2577-2589. DOI 10.3390/nu5072577.
- Toutirais O., Chartier P., Dubois D., Bouet F., Leveque J., Catros-Quemener V., Genetet N. Constitutive expression of TGF-beta1, interleukin-6 and interleukin-8 by tumor cells as a major component of immune escape in human ovarian carcinoma. *Eur. Cytokine Netw.* 2003;14(4):246-255.
- Toyohara Y., Hashitani S., Kishimoto H., Noguchi K., Yamamoto N., Urade M. Inhibitory effect of vitamin D-binding protein-derived macrophage activating factor on DMBA-induced hamster cheek pouch carcinogenesis and its derived carcinoma cell line. *Oncol. Lett.* 2011;2(4):685-691. DOI 10.3892/ol.2011.306.
- Ugarte A., Bouche G., Meheus L. Inconsistencies and questionable reliability of the publication "Immunotherapy of metastatic colorectal cancer with vitamin D-binding protein-derived macrophages-activating, GcMAF" by Yamamoto et al. *Cancer Immunol. Immunother.* 2014;63(12):1347-1348. DOI 10.1007/s00262-014-1587-y.
- Uto Y., Hori H., Kubo K., Ichihashi M., Sakamoto N., Mette M., Inui T. GcMAF: our next-generation immunotherapy. *Nature.* 2012;485: S67-S70.
- Verboven C., Rabijns A., De Maeyer M., Van Baelen H., Bouillon R., De Ranter C. A structural basis for the unique binding features of the human vitamin D-binding protein. *Nat. Struct. Biol.* 2002;9(2):131-136. DOI 10.1038/nsb754.
- Yamamoto N., Homma S. Vitamin D3 binding protein (group-specific component) is a precursor for the macrophage-activating signal factor from lysophosphatidylcholine-treated lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991;88(19):8539-8543. DOI 10.1073/pnas.88.19.8539.
- Yamamoto N., Kumashiro R. Conversion of vitamin D3 binding protein (group-specific component) to a macrophage activating factor by the stepwise action of beta-galactosidase of B cells and sialidase of T cells. *J. Immunol.* 1993;151(5):2794-2802.
- Yamamoto N., Naraparaju V.R., Asbell S.O. Deglycosylation of serum vitamin D3-binding protein leads to immunosuppression in cancer patients. *Cancer Res.* 1996;56(12):2827-2831.
- Yamamoto N., Suyama H., Nakazato H., Yamamoto N., Koga Y. Immunotherapy of metastatic colorectal cancer with vitamin D-binding protein-derived macrophage-activating factor, GcMAF. *Cancer Immunol. Immunother.* 2008a;57:1007-1016. DOI 10.1007/s00262-007-0431-z.
- Yamamoto N., Suyama H., Yamamoto N. Immunotherapy for prostate cancer with Gc protein-derived macrophage-activating factor, GcMAF. *Transl. Oncol.* 2008b;1(2):65-72. DOI 10.1593/tlo.08106.
- Yamamoto N., Suyama H., Yamamoto N., Ushijima N. Immunotherapy of metastatic breast cancer patients with vitamin D-binding protein-derived macrophage activating factor (GcMAF). *Int. J. Cancer.* 2008c;122:461-467. DOI 10.1002/ijc.23107.
- Yamamoto N., Ushijima N., Koga Y. Immunotherapy of HIV-infected patients with Gc protein-derived macrophage activating factor (GcMAF). *J. Med. Virol.* 2009;81:16-26. DOI 10.1002/jmv.21376.

ORCID ID

A.A. Ostanin orcid.org/0000-0001-6895-938X
S.S. Kirikovich orcid.org/0000-0002-3426-4501
E.V. Dolgova orcid.org/0000-0002-5543-248X
A.S. Proskurina orcid.org/0000-0002-7650-4331
E.R. Chernykh orcid.org/0000-0003-2346-6279
S.S. Bogachev orcid.org/0000-0002-2019-9382

Acknowledgements. This work was supported by State Budgeted Project 0324-2019-0042. The authors also acknowledge the financial support provided by I.N. Zaytseva, BA-Farma Company.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received March 27, 2019. Revised May 6, 2019. Accepted May 6, 2019.