

**Противоопухолевый иммунитет.
Опухолевые антигены. Механизм
противоопухолевой защиты.
Диагностика и лечение.**

**профессор Бажукова Т.А.
зав.каф.микробиологии, вирусологии и
иммунологии**

Этиология

Основные химические канцерогены

Группы веществ	Представители групп
Полициклические ароматические углеводороды	Бензопирен, диметилбензантрацен
Ароматические амины	2-Ацетиламинофлуорен, 14-метил-4-аминоазобензол
Нитрозамины	Диметилнитрозамин, диэтилнитрозамин
Алкилирующие агенты	Циклофосфамид, диэтилстильбэстрол
Природные вещества	Дактиномицин
Неорганические вещества	Хром, бериллий, асбест, свинец, кадмий

Этиология

Эндогенные канцерогены

- **пищевые и гиповитаминозы**
(пониженное содержание витамина В₆, С, А, Е)
- **сезонный недостаток витамина С**
- **нарушение гормонального равновесия**
(длительное использование эстрогенов и глюкокортикоидов)
- **наследственные нарушения обмена аминокислот: триптофана и тирозина;**

Этиология

Вирусы

- ***ДНК-содержащие вирусы*** частично или полностью встраиваются в клеточный геном человека. Вирус папилломы человека (типы 16, 18, 48, 56) ассоциирован с раком шейки матки, вирус Э-Б - с раком носоглотки и лимфомой Беркитта, вирус герпеса типа 8 – с саркомой Капоши, вирус гепатита В – с раком печени.
- ***РНК-содержащие вирусы***, попадая в клетки человека, синтезируют ДНК с помощью обратной транскриптазы и частично или полностью включают её в геном эукариотов в виде провируса. ВИЧ вызывает возникновение сарком.

Этиология

Наследственная предрасположенность

- **Предрасположенность к раку может наследоваться как доминантный признак с той или иной степенью пенетрантности и возникновением в более раннем возрасте, чем спорадические формы (ретинобластома, полипоз толстой кишки).**
- **Доминантный** тип наследования характерен для **онкогенов и гена p53**, **рецессивный** тип – для **генов-супрессоров** опухолей.
- **Нестабильность хромосомной ДНК может быть связана с дефектом ферментов репарации** (пигментная ксеродерма).

Взаимодействие системы иммунитета и опухоли

В настоящее время выделяют четыре группы опухолевых антигенов, различающихся по своему происхождению:

- **вирус-специфические антигены** вирусов человека, вызывающих злокачественную трансформацию опухолевых клеток, такие как EBV, HTLV-I, HBV, HCV, HSV;
- **специфические опухолевые антигены**, синтезирующиеся преимущественно в опухолевой ткани и редко экспрессирующиеся в нормальных тканях, за исключением герминогенов: MAGE, BAGE, GAGE, RAGE, LAGE;
- **неоантигены**, появляющиеся в результате соматических мутаций: FLICE, CDK-4;
- **клеточные белки**, контролирующие пролиферацию опухолевых клеток - теломераза.

Иммунология опухолей

- Опухоли представляют собой вариант «биологической агрессии изнутри», родственной по своей природе с феноменом тканевой несовместимости. Неэффективность иммунитета в отношении сформировавшихся опухолей является следствием предшествующих взаимоотношений опухолевых клеток с организмом.
- Подавляющая часть трансформированных клеток элиминируется иммунными механизмами и **опухоль формируется лишь при условии преодоления иммунной защиты организма.**
- Практически значимая задача состоит в восстановлении и усилении иммунных механизмов, подавленных в процессе этой адаптации.

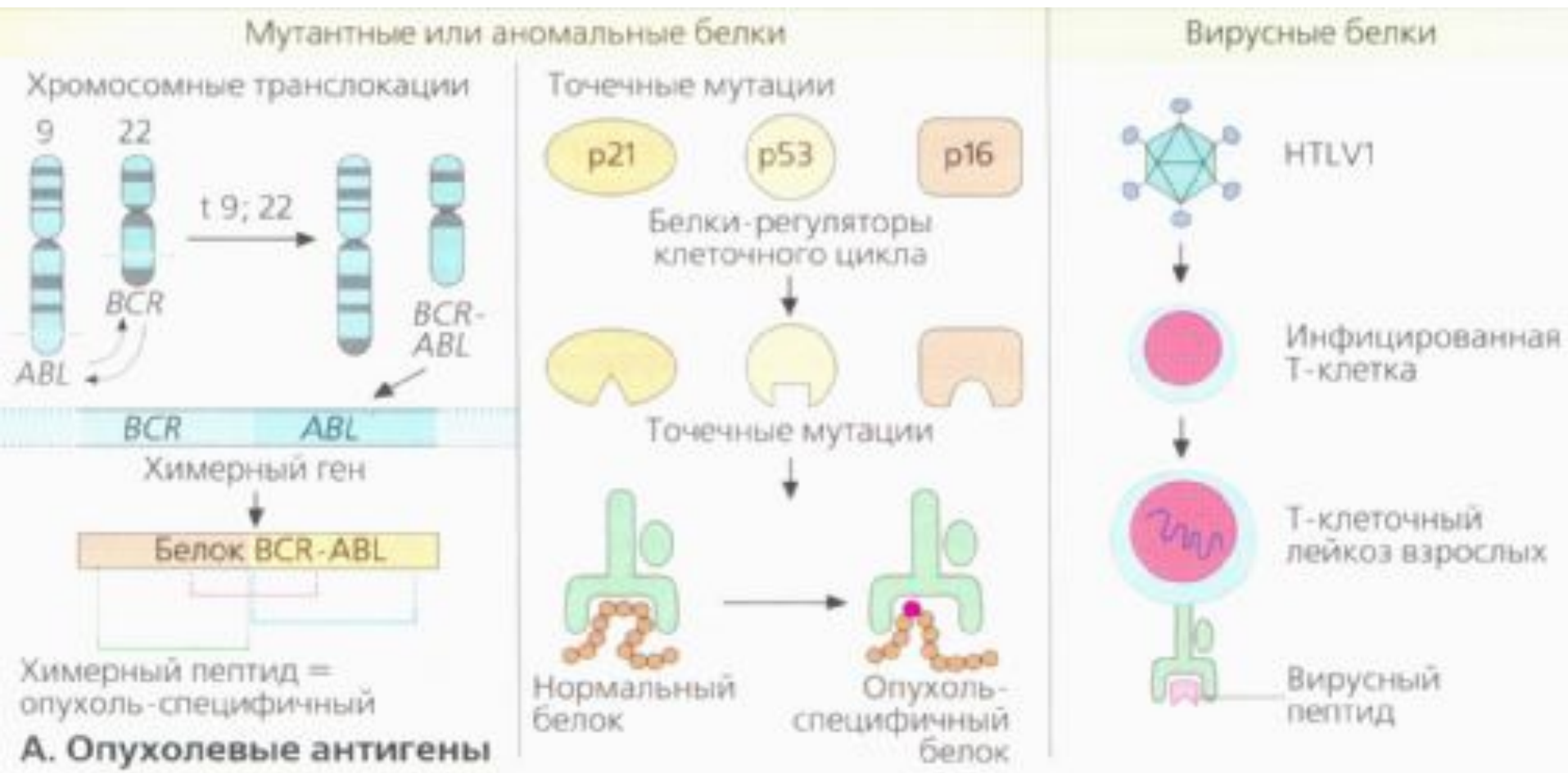
Классификация опухолевых антигенов

Группа антигенов	Антигены	Тип белка, функция	Опухоли
Тканеспецифические	Тирозиназа Melan A PSA mIg, CD20	Участие в синтезе меланина? Простата-специфический АГ Рецептор и корецептор В-клеток	Меланома Меланома Рак простаты В-клеточный лейкоз
Эмбриональные	MAGE-1-12 CEA α -фетопротеин	Белки семенников Мембранный белок Эмбриональный белок	Меланома Рак кишечника, молочной и поджелудочной желёз Рак печени
Уникальные (мутантные)	Cdk4 β -катенин Каспаза	Регулятор митоза Сигнальный белок Фактор апоптоза	Меланома Меланома Сквamousноклеточный рак головы и шеи
Онковирусные	Белки E6 и E7 HPV-16 EBNA-1 HTLV-1	Белки папилломавируса Белок вируса Эпштейна–Барр Белок вируса Т-лейкоза	Меланома Рак желудочно-кишечного тракта Рак печени
Продукты онкогенов	Her-2/Neu Ctr/Abl	Рецептор EGF-тирозинкиназа Сигнальный белок	Рак молочной железы, яичников Хронический миелолейкоз
Продукты аномальной модификации	MUC-1, MUC-2	Недостаточно гликозилиро- ванный муцин	Рак молочной и поджелудочной желёз
Ганглиозиды	GM2, GD2, GD3	Мембранные молекулы	Различные формы рака

Опухолевые антигены



Опухолевые антигены



Узнавание опухолевых антигенов

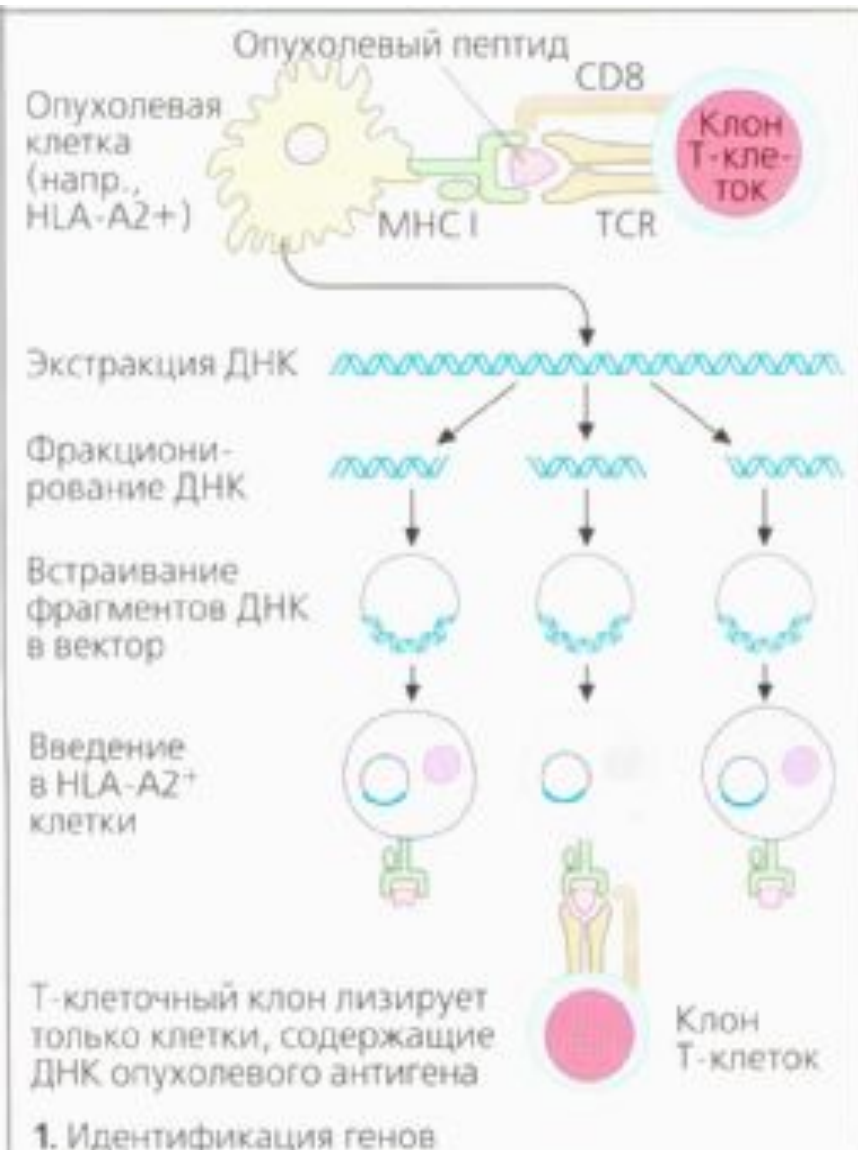
- Т-клетки способны узнавать опухолевые Аг. После разрушения в клетке Аг (мутантные белки) могут быть представлены цитотоксическим CD8+ Т-клеткам в виде пептидов, связанных с молекулами МНС-1.
- Т-клеточный ответ является HLA-зависимым, (подходит ли мутантный опухолевый пептид к участку связывания Аг на молекуле HLA).
- Опухолевые клетки осуществляют презентацию антигена с низкой эффективностью, поскольку лишены важных ко-стимулирующих молекул.

Узнавание опухолевых антигенов



А. Узнавание опухолевых антигенов

Идентификация опухолевых АГ



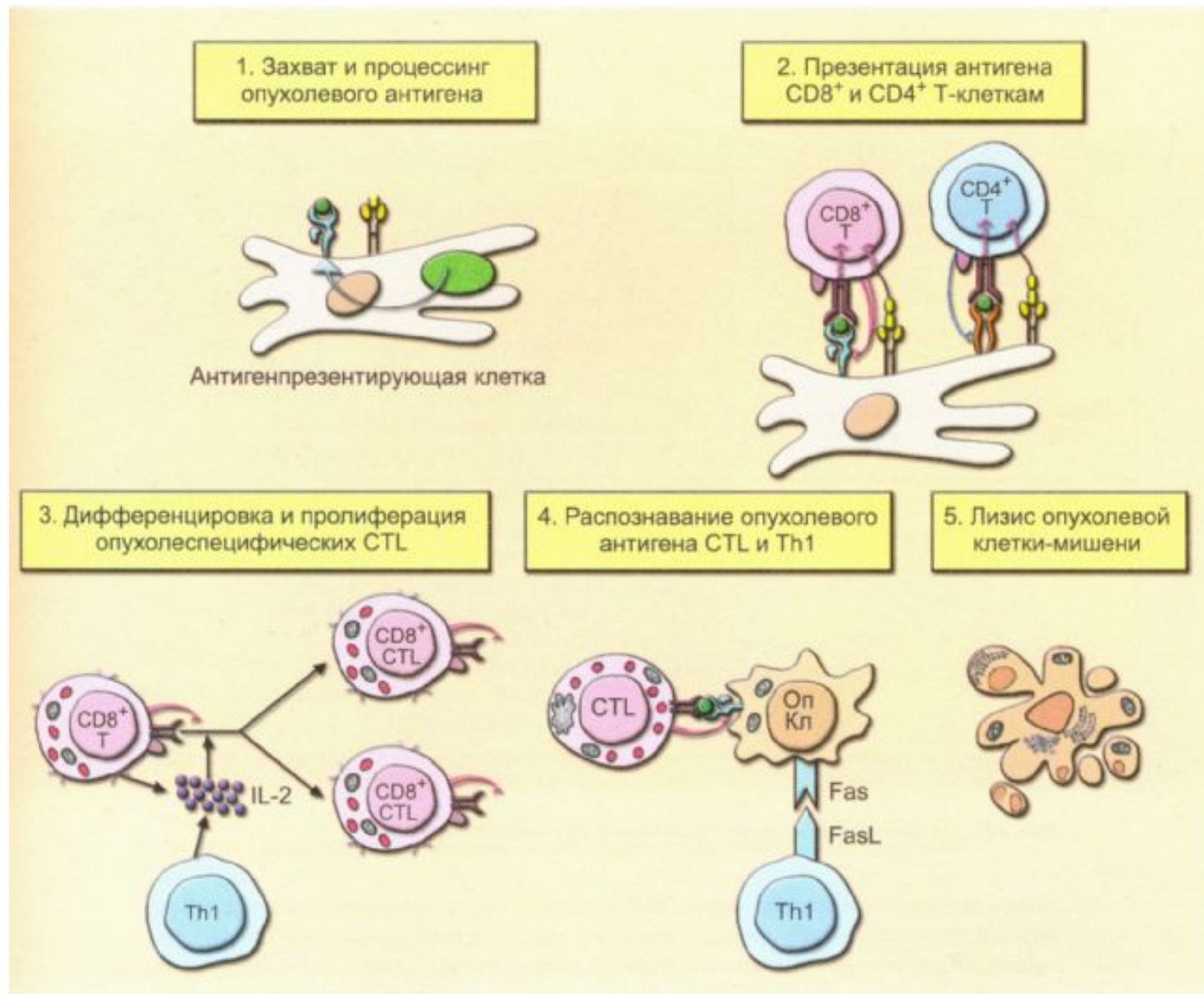
- Для идентификации последовательностей ДНК опухолевых АГ тотальную ДНК опухолевой клетки встраивают в векторы в виде множества мелких фрагментов.
- Векторы со вставками вводят в клетки с таким же характером HLA-зависимости, как у опухолевых клеток.
- Клетки, которые содержат соответствующий фрагмент ДНК, осуществляют его презентацию с помощью молекул МНС, они распознаются и уничтожаются Т-клеточными клонами.

Идентификация опухолевых АГ



- **Элюирование пептида** с поверхности опухолевой клетки. Специфичные пептиды (связанные с МНС), растворяют в подкисленной среде.
- Разделяют с помощью ВЭЖХ.
- Отдельные пептидные фракции инкубируют с ТАР-дефицитными клетками (не происходит связывания молекул МНС с пептидами).
- Не несущие пептида молекулы МНС разрушаются.
- Добавление пептидов стабилизирует молекулы МНС и происходит презентация пептидов.
- Презентирующая клетка узнается и уничтожается опухоль-специфичным клоном Т-клеток.
- Характеристика пептидов проводится масс спектрометрией.

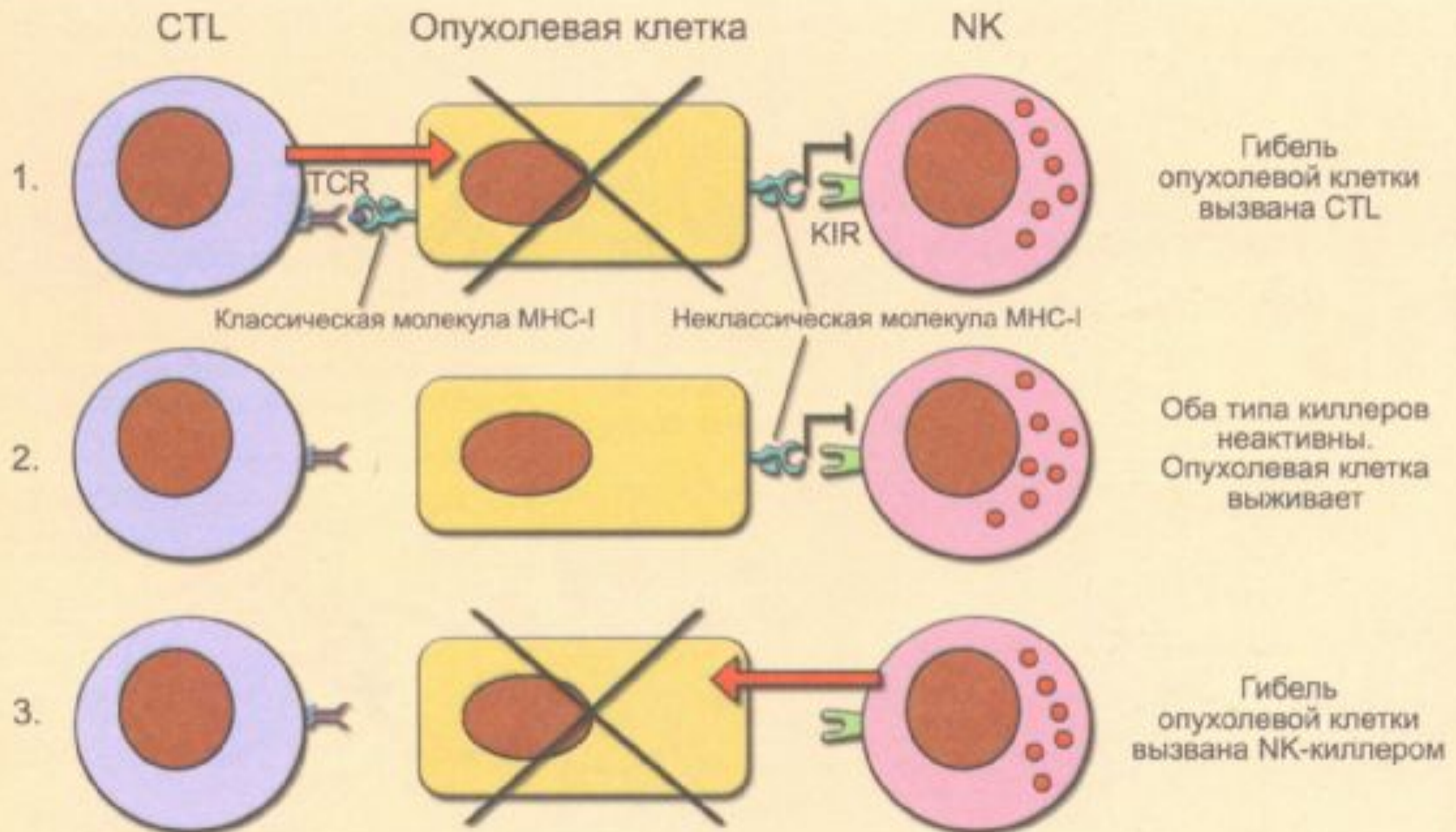
Распознавание и иммунный цитолиз опухолевых клеток



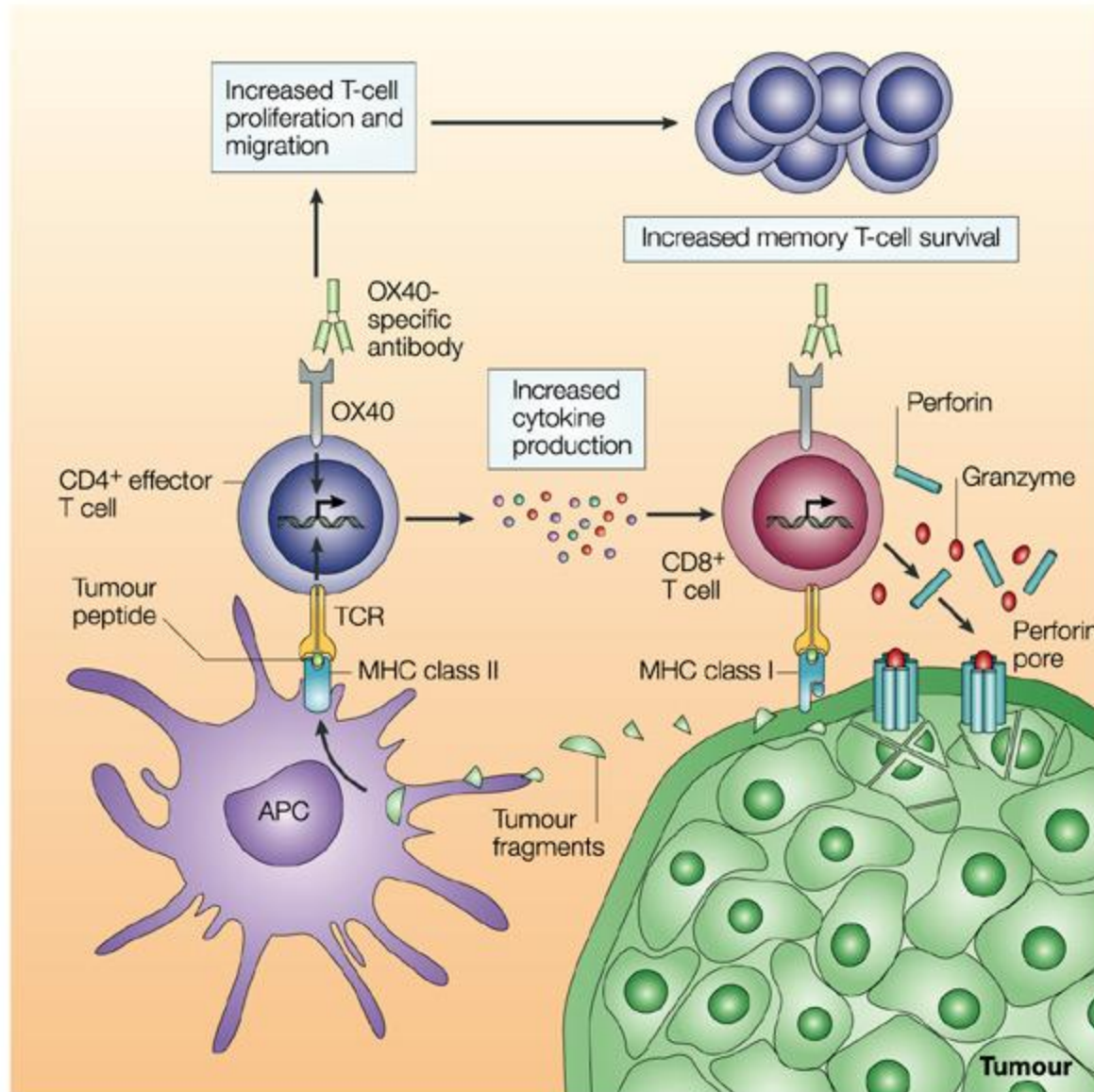
Участие Т- и НК-клеток в цитолизе опухолевой клетки

- 1. Экспрессия классических молекул МНС -1 (HLA- А, В, С) опухолевой клеткой делает её мишенью цитотоксического действия СВ8+ цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL).**
- 2. Экспрессия неклассических молекул МНС (у человека - HLA- F, G, H) защищает её от цитотоксического действия НК-клеток (запрет повреждения «своего»). Отсутствие классических и наличие неклассических молекул МНС обеспечивает избегание опухолевой клеткой цитолиза.**
- 3. Отсутствие молекул МНС обоих типов делает клетку чувствительной к действию НК-киллеров.**

Участие Т- и НК-клеток в цитолизе опухолевой клетки



T-лимфоциты: роль в иммунологическом надзоре



Т-лимфоциты: роль в иммунологическом надзоре

- **Главный элемент активной противоопухолевой защиты - цитотоксические Т-лимфоциты. Незрелой Т-клетке антиген представляет макрофаг с белком HLA класса I.**
- **Способность Т-к ответить на опухолевые клетки также зависит от молекул MHC опухолевой клетки. В опухолевых клетках человека кодируются генами HLA-A, HLA-B, HLA-C. CD8-корцептор Т-киллера эффективно связывается с молекулой HLA-A. Чем выше экспрессия гена HLA-B, тем чаще опухолевые клетки ускользают от иммунного ответа Т-киллеров в кровеносном русле и дают метастазы.**

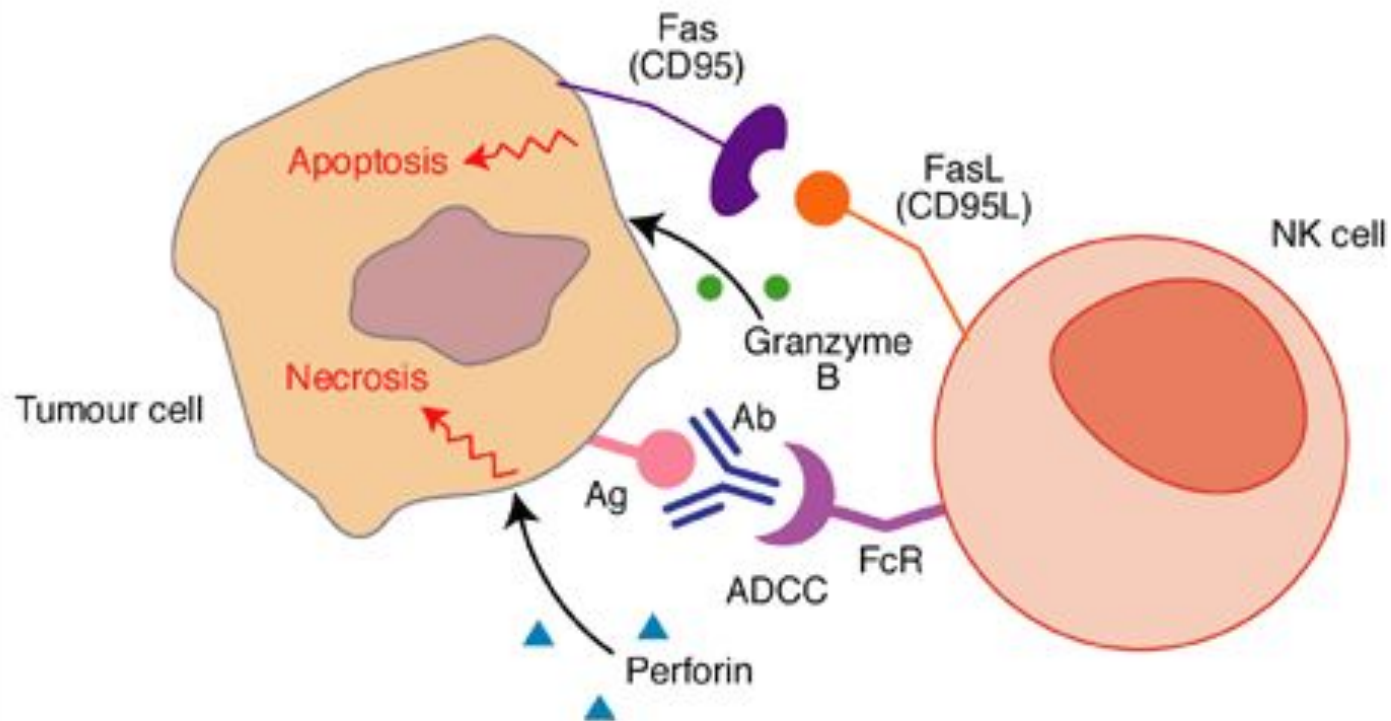
Т-лимфоциты: роль в иммунологическом надзоре

- Т-киллер, связавшись своими рецепторами с опухолевой клеткой, вступает с ней в плотный контакт, для чего необходимы ионы магния, и выбрасывает белки перфорины. Перфорины встраиваются в мембрану опухолевой клетки и в присутствии кальция полимеризуются, образуя каналы, через которые в клетку входит избыточное количество воды, и опухолевая клетка разрывается.**
- Т-киллер уничтожает лишь несколько опухолевых клеток, после чего в нём истощаются запасы энергии и перфоринов, и он погибает сам.**

Участие НК-клеток

- **НК-клетка присоединяется к опухолевой клетке через антитела G класса на поверхности опухолевой клетки с участием CD16 .**
- **CD158 молекулы (KIR) на поверхности НК-клеток исполняют роль рецепторов для молекул HLA I класса нормальных клеток. Уменьшение экспрессии молекул HLA I класса опухолевыми клетками отменяет ингибирующее действие KIR молекул НК-клеток.**
- **После плотного контакта натурального киллера с опухолевой клеткой осуществляется выброс НК-клеткой белков – перфоринов.**
- **Взаимодействие CD16 с IgG, активация НК-клеток IL-2, IL-12 приводит к усилению экспрессии FAS-лиганда (CD 178) на НК-клетках, и уничтожение опухолевой клетки происходит и через взаимодействие CD178 с рецепторами апоптоза на ней.**

Участие НК-клеток



The natural killer (NK)-cell response to tumour cells

Expert Reviews in Molecular Medicine ©2003 Cambridge University Press

Взаимодействие системы иммунитета и опухоли

ЛАК-клетки

- ЛАК-клетки происходят из "нулевой" популяции лимфоцитов. Они уничтожают опухолевые клетки без предварительного распознавания определённого антигена. Их противоопухолевая активность усиливается при одновременном введении с IL-2.

Макрофаги (МФ)

- Активированный Т-лимфоцит выделяет γ -IFN. Он подаёт сигнал, мишенью которого является ядро МФ. Этот сигнал вызывает образование синтазы окиси азота, превращающей аргинин в окись азота, которая разрушает опухолевые клетки, подавляя энергообразование в цикле Кребса и при транспорте электронов в митохондриях и синтез ДНК. Производные аргинина, особенно метильные, блокируют образование нитратов в МФ.

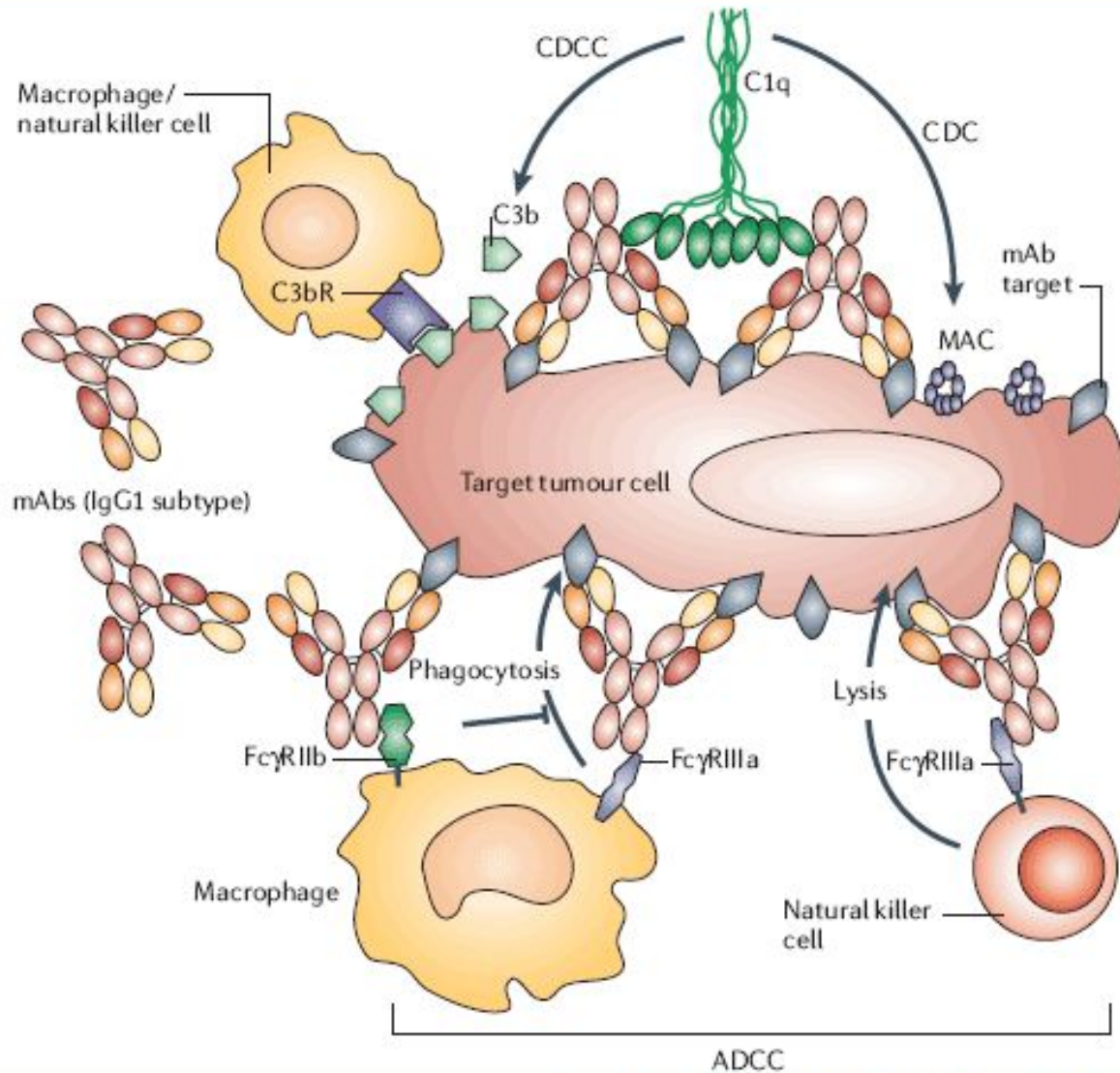
Макрофаги: роль в иммунологическом надзоре

- Активированный Т-лимфоцит выделяет γ -IFN. Он подаёт сигнал, мишенью которого является ядро МФ.
- Этот сигнал вызывает образование синтазы окиси азота, превращающей аргинин в окись азота, которая разрушает опухолевые клетки, подавляя энергообразование в цикле Кребса и при транспорте электронов в митохондриях и синтез ДНК.
- Производные аргинина, особенно метильные, блокируют образование нитратов в МФ.

Макрофаги: роль в ИММУНОЛОГИЧЕСКОМ НАДЗОРЕ

Medscape®

www.medscape.com



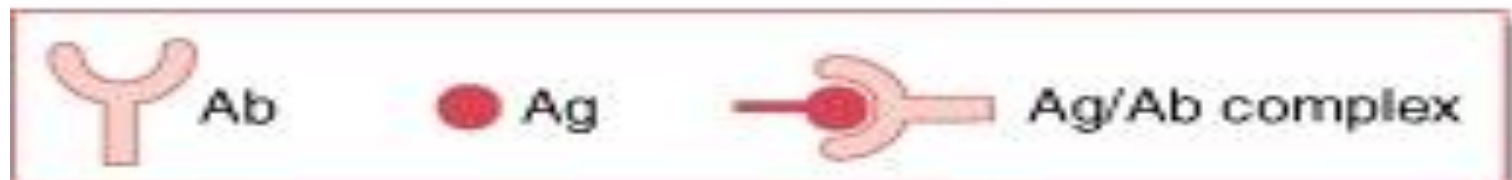
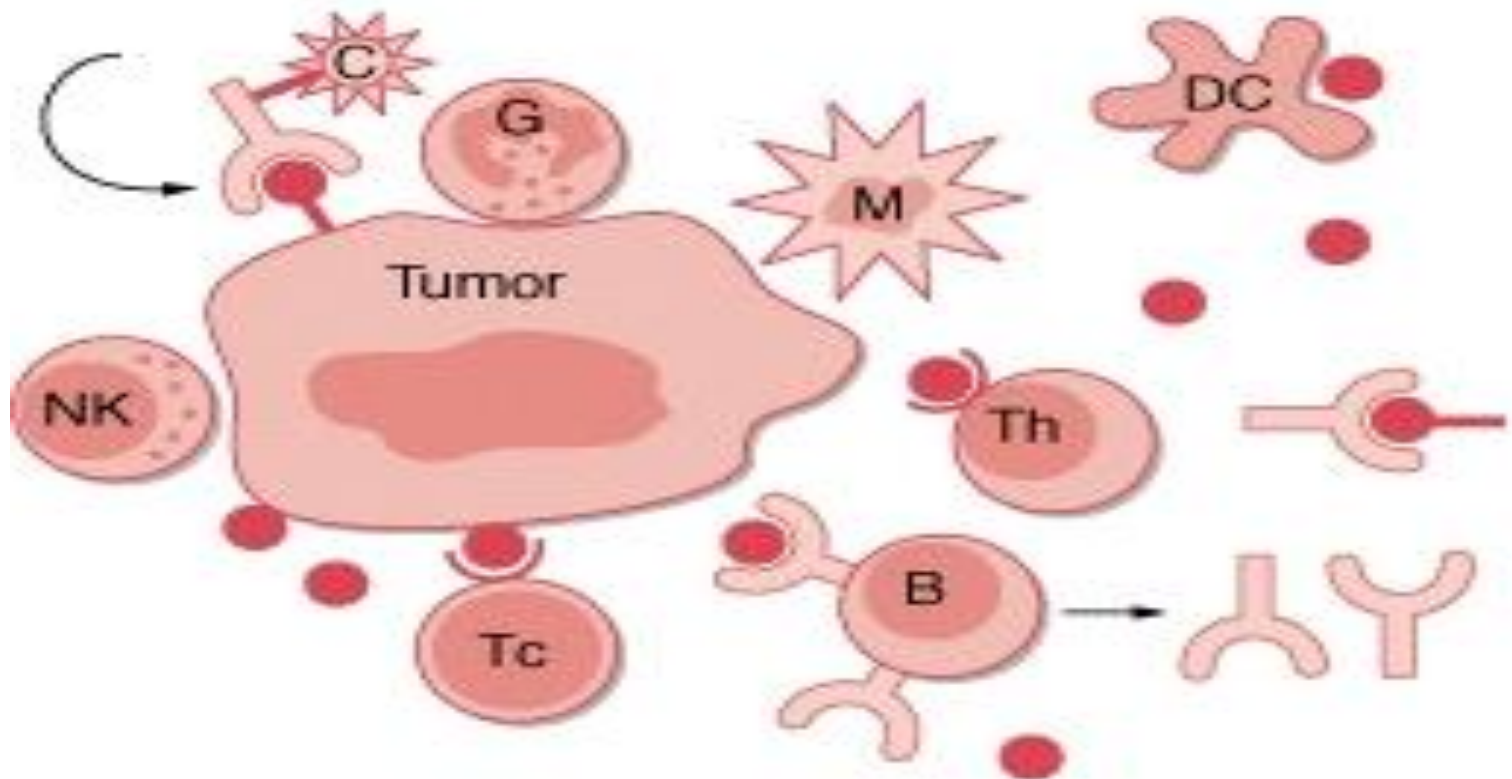
Макрофаги: роль в иммунологическом надзоре

- Опухолевые клетки синтезируют фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (MIF). Под действием MIF макрофаги, пришедшие к опухоли, теряют свою подвижность и возможность передать информацию об обнаруженной опухоли другим ИКК.**
- Обездвиженный МФ производит большое количество активатора плазминогена, благодаря чему опухолевые клетки приобретают способность проникать в кровеносное русло и распространяться по организму.**

В-лимфоциты: роль в иммунологическом надзоре

- При взаимодействии опухолевого Аг происходит отбор и активация В-лимфоцитов. Процессированный Аг представлен на ЦПМ в комплексе с белком МНС-II.**
- Т-h связывается с активированным В-лимфоцитом. Это приводит к выделению Т-h ИЛ-2, под действием которого В-клетка делится и дифференцируется, превращаясь в плазматическую клетку, секретирующую АТ.**
- АТ связываются с антигенами опухоли, но клетка может терять свои поверхностные АГ. Комплекс АГ-АТ покидает опухолевую клетку раньше, чем происходит активация и полимеризация комплемента.**
- Противоопухолевые АТ и циркулирующие иммунные комплексы усугубляют развитие болезни. Они блокируют антигены опухолевых клеток и рецепторы Т-киллеров.**

В-лимфоциты: роль в иммунологическом надзоре



Противоопухолевый ИММУНИТЕТ

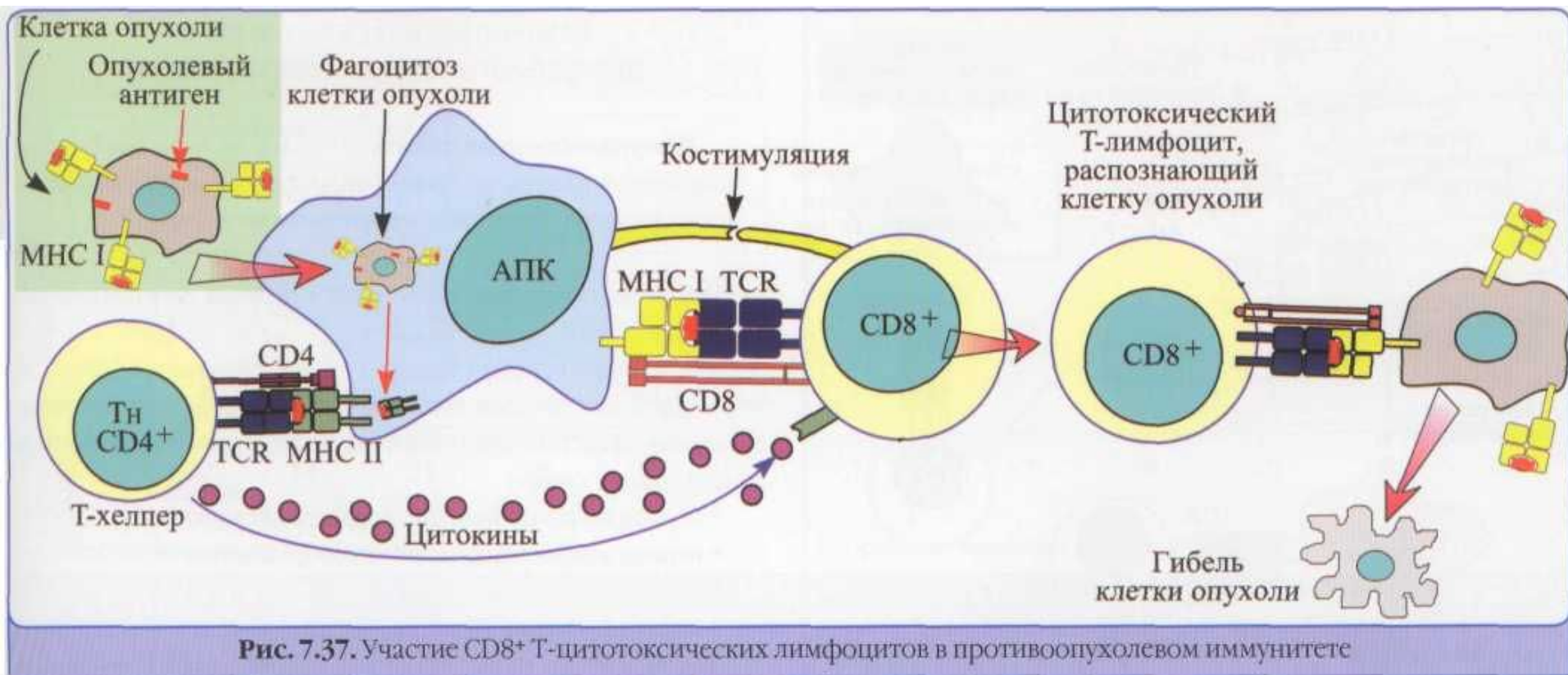
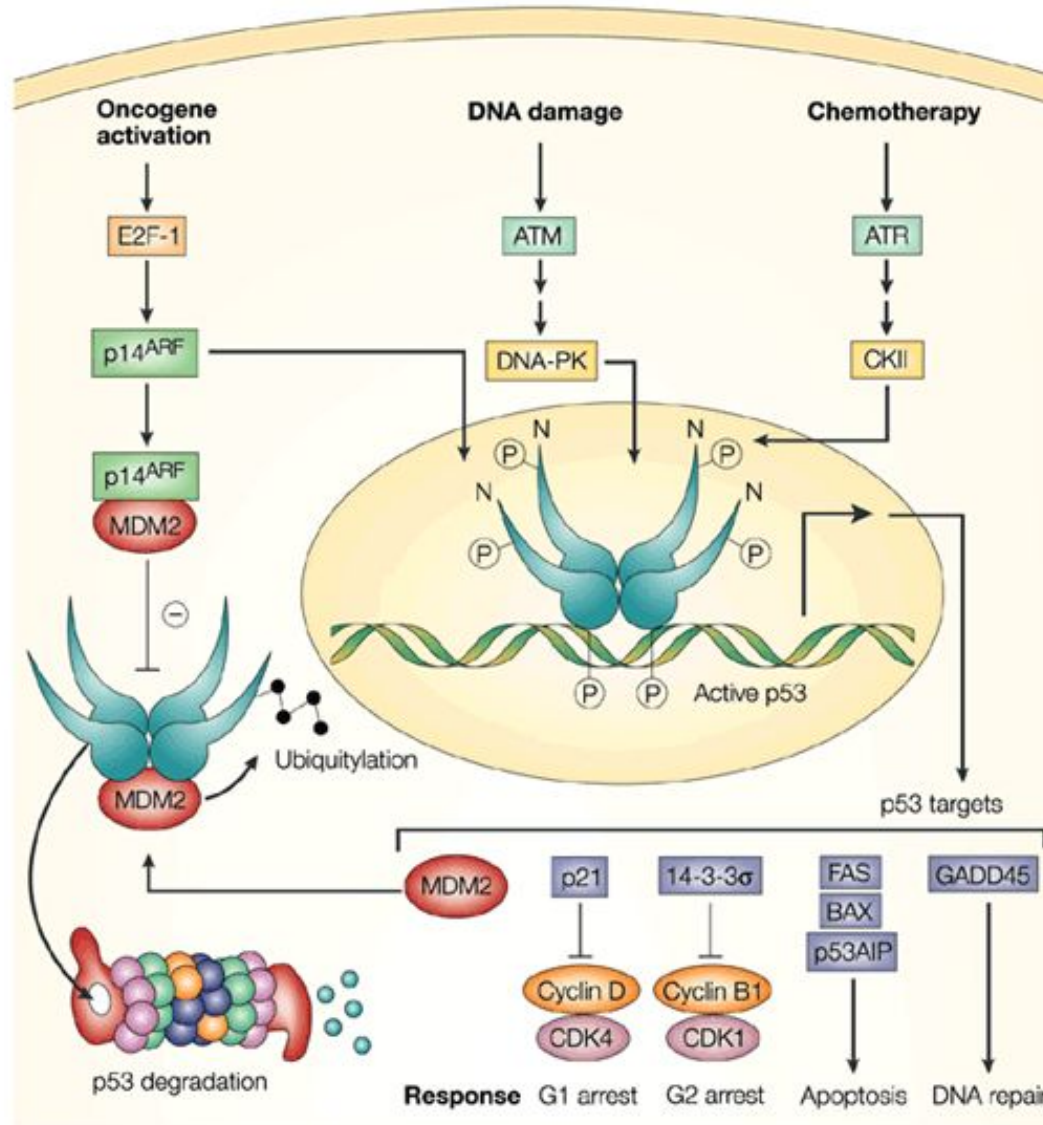


Рис. 7.37. Участие CD8⁺ Т-цитотоксических лимфоцитов в противоопухолевом иммунитете

АПОПТОЗ



Механизмы избегания опухолями иммунного отторжения

Механизмы ослабления иммунного ответа	Конкретные причины ослабления ответа
Слабость антигенного стимула	Отсутствие опухолевых антигенов Слабая экспрессия МНС-I или ее отсутствие Отсутствие костимуляции
Изменчивость и модуляция опухолевых антигенов	Мутационная изменчивость антигенов Модуляция экспрессии антигенов (в частности, под влиянием антител)
Супрессия иммунного ответа	Выделение растворимых антигенов Секреция супрессорных цитокинов (TGF β и др.) Повышение содержания и активация супрессорных клеток (Treg и др.) Экспрессия FasL, индуцирующего гибель Fas ⁺ эффекторных клеток Индукция анергии или толерантности к опухолевым антигенам (в частности, в связи с отсутствием костимуляции)

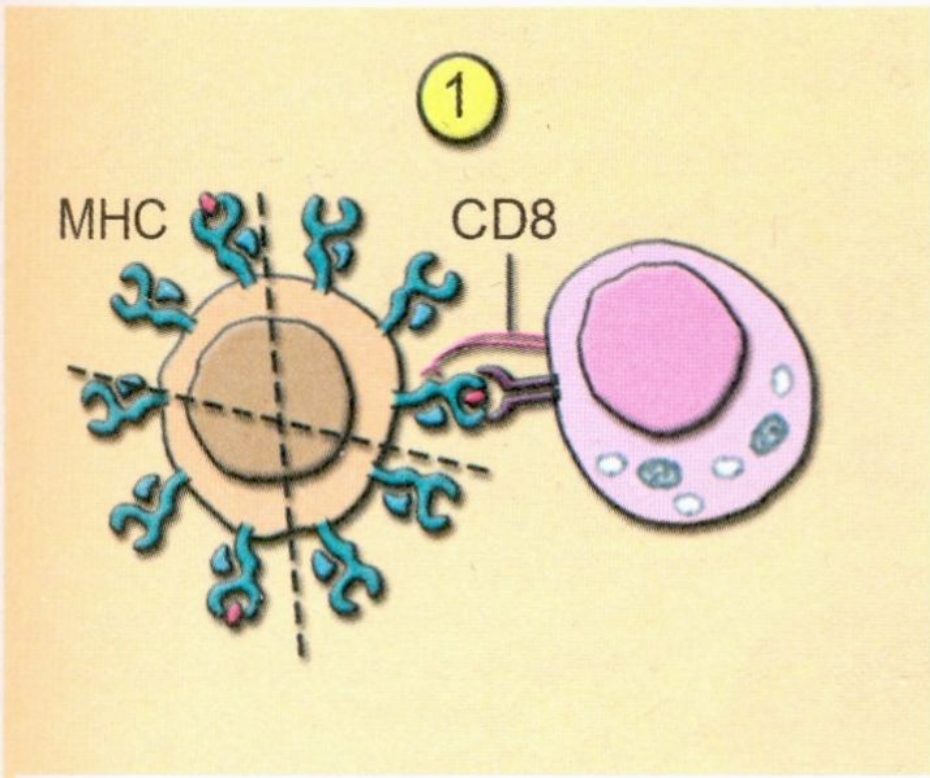
Механизмы избегания опухолями иммунного отторжения

- Опухоль избегает агрессии со стороны организма, используя следующие механизмы:**
- синтез и секреция цитокинов, блокирующих функции лимфоцитов (TGF- β , IL-10);**
- секреция ганглиозидов, блокирующих передачу сигнала в клетке, в интерстициальное пространство (GD Ia, GD2, GD3, GM1, GM2);**
- синтез и секреция факторов периферической селекции Th, «переключающих» иммунный ответ с клеточного пути на гуморальный (IL-4);**

Механизмы избегания опухолями иммунного отторжения

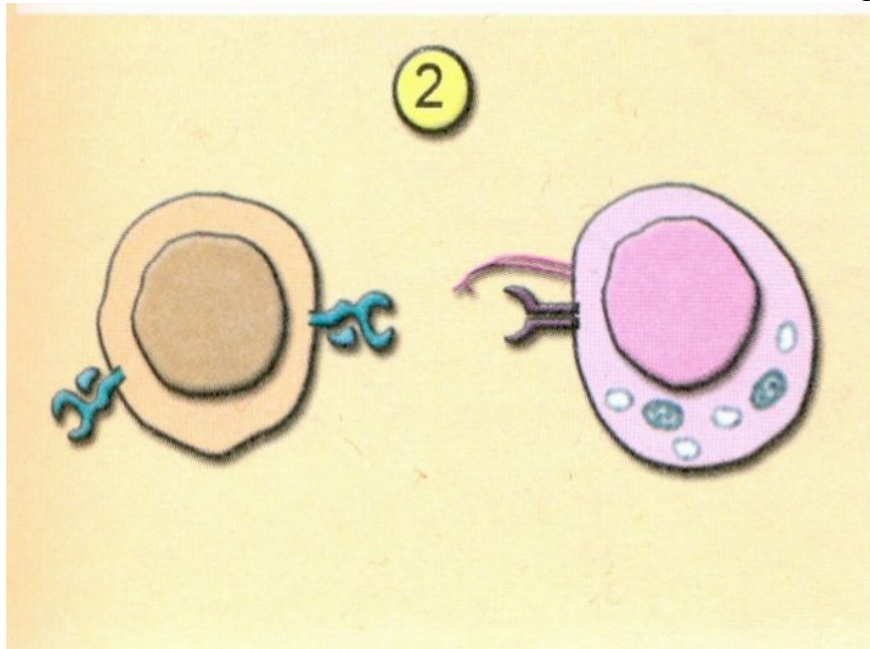
- **экспрессия на поверхности опухолевых клеток факторов, блокирующих образование МАК, что делает абсолютно неэффективными гуморальные механизмы иммунитета;**
- **опухолевые клетки «экранируются» иммуноглобулинами от эффекторных клеток иммунной системы;**
- **«сращивание» с поверхности опухолевых клеток антигенов, связывающих рецепторы эффекторных клеток иммунной системы, приводит к неэффективности защитной реакции со стороны CTL и NK.**

Иммунный цитолиз и механизмы его подавления



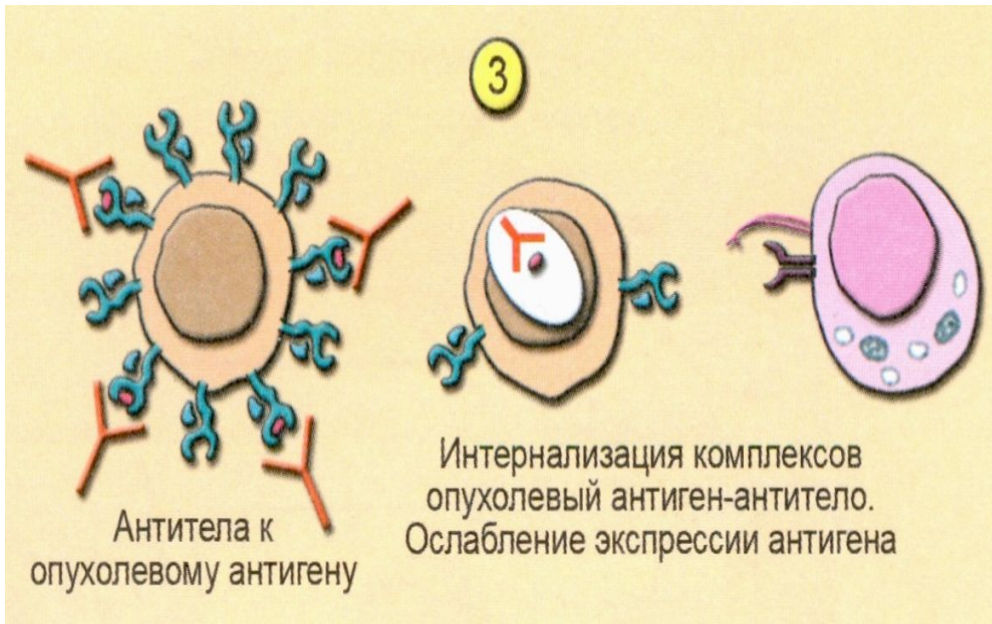
- 1. Выраженный ответ на опухолевый АГ, предотвращающий развитие опухоли:
- CD8+ Т-клетка различает и убивает опухолевую клетку, сильно экспрессирующую комплексы МНС-I-пептид (предшествует презентация опухолевого антигена Т-лимфоцитам дендритными клетками).

Иммунный цитолиз и механизмы его подавления



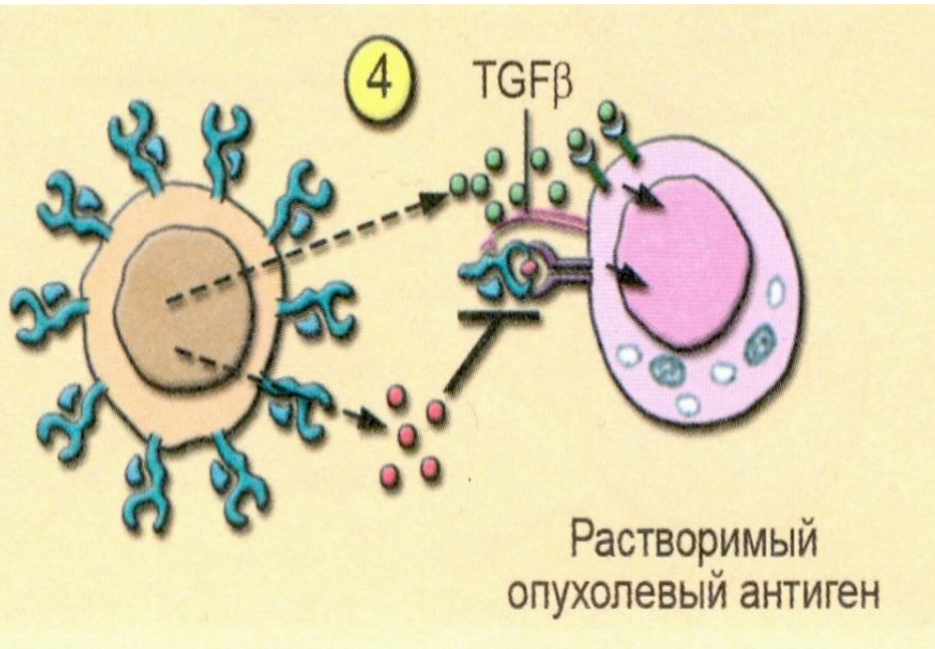
- 2. CD8+ Т-клетка игнорирует опухолевую клетку, слабо экспрессирующую комплексы МНС-I-пептид.

Иммунный цитолиз и механизмы его подавления



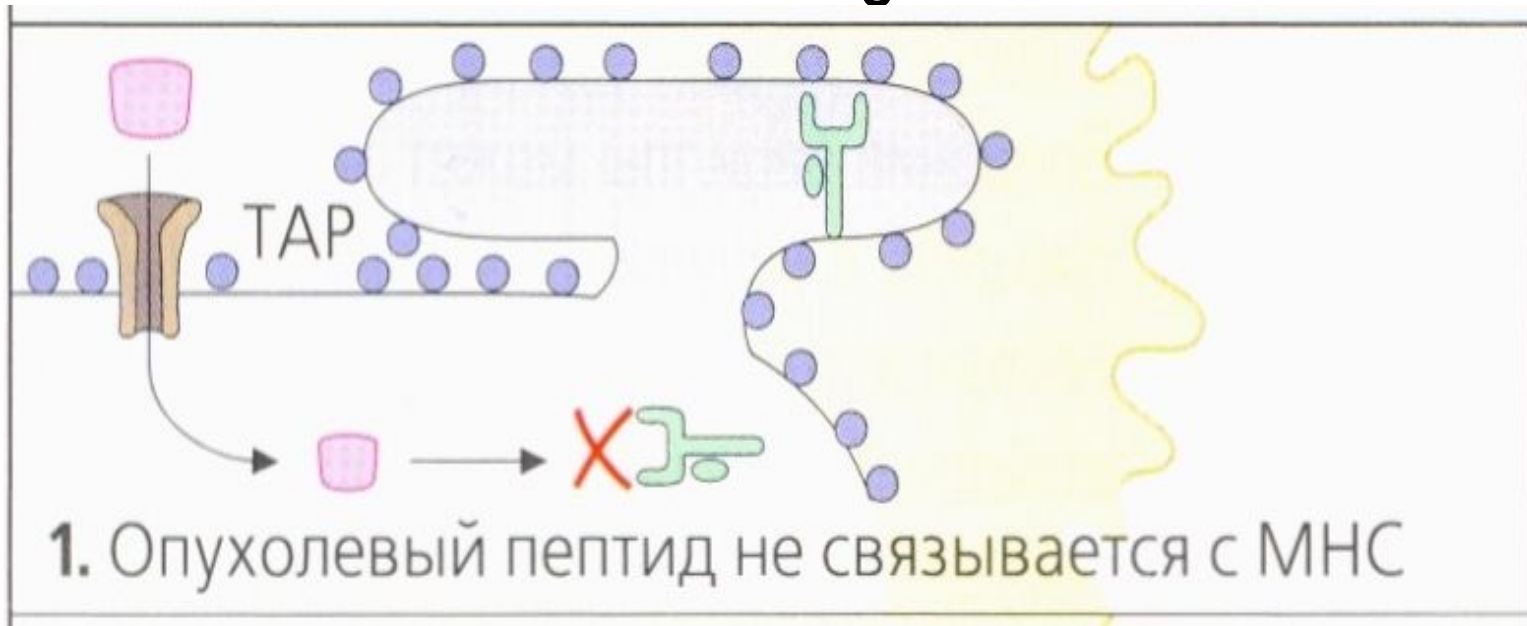
- 3. Экспрессия комплексов МНС-I-пептид ослабляется под влиянием антител к опухолевому АГ.
- В результате интернализации комплекса опухолевый АГ (красные кружки) – антитело, CD8+ Т-клетки не распознают опухолевую клетку.

Иммунный цитолиз и механизмы его подавления



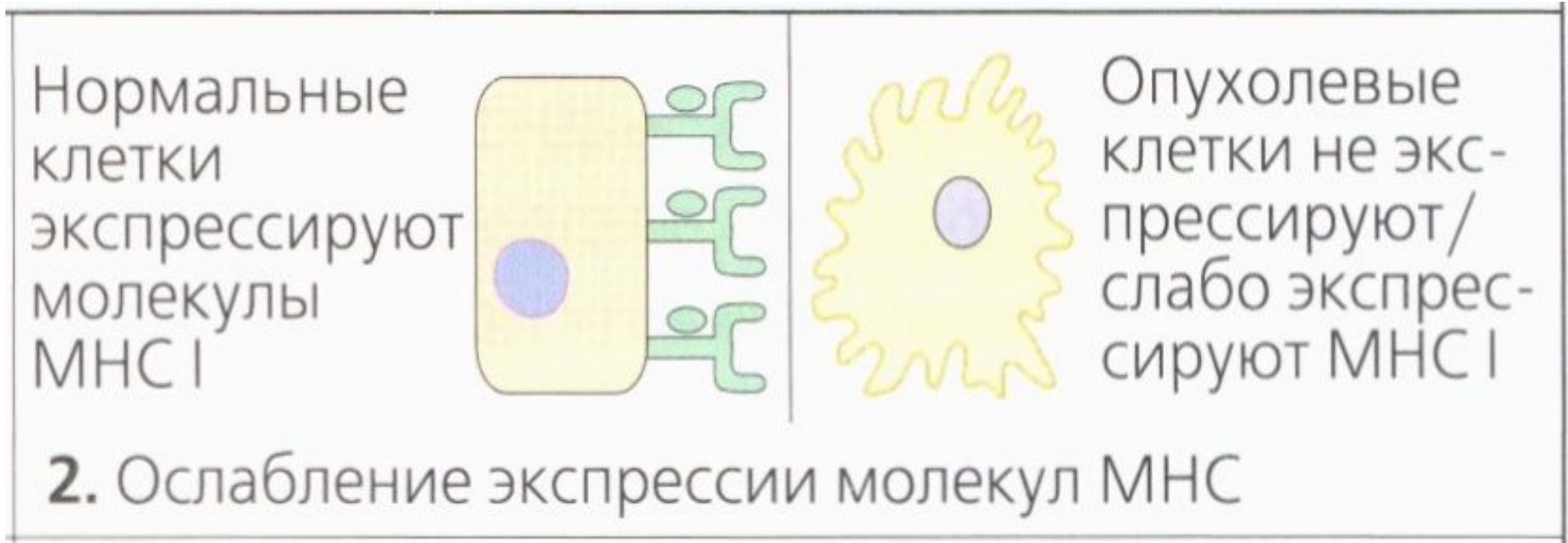
- 4. Ответ CD8+ Т-клетки против опухолевой клетки подавляется **растворимым опухолевым АГ** (эффект АГ помечен знаком блокады) и **супрессорными цитокинами (TGFβ и др.)**:
- взаимодействие с рецептором на поверхности Т-клетки порождает ингибирующий сигнал.

Механизмы, позволяющие опухолевым клеткам избежать



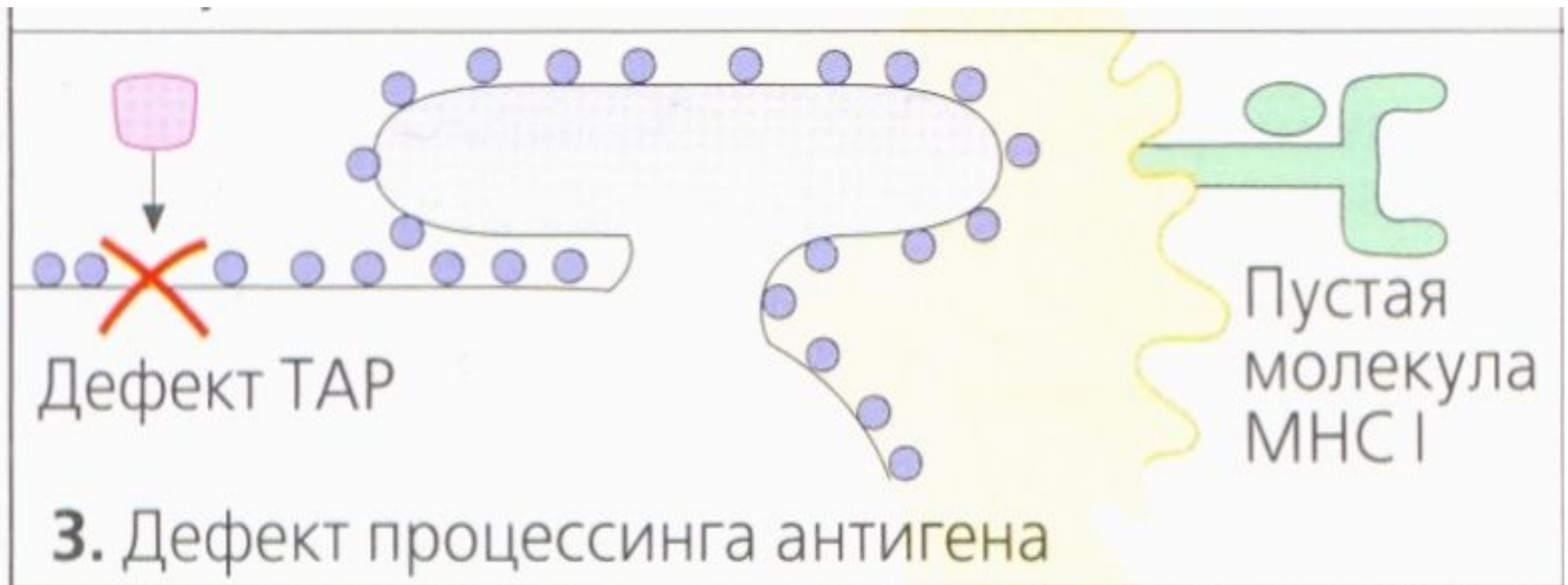
- В некоторых опухолях может не быть пептидов, соответствующих участкам связывания на молекулах МНС больного.

Механизмы, позволяющие опухолевым клеткам избежать иммунной реакции



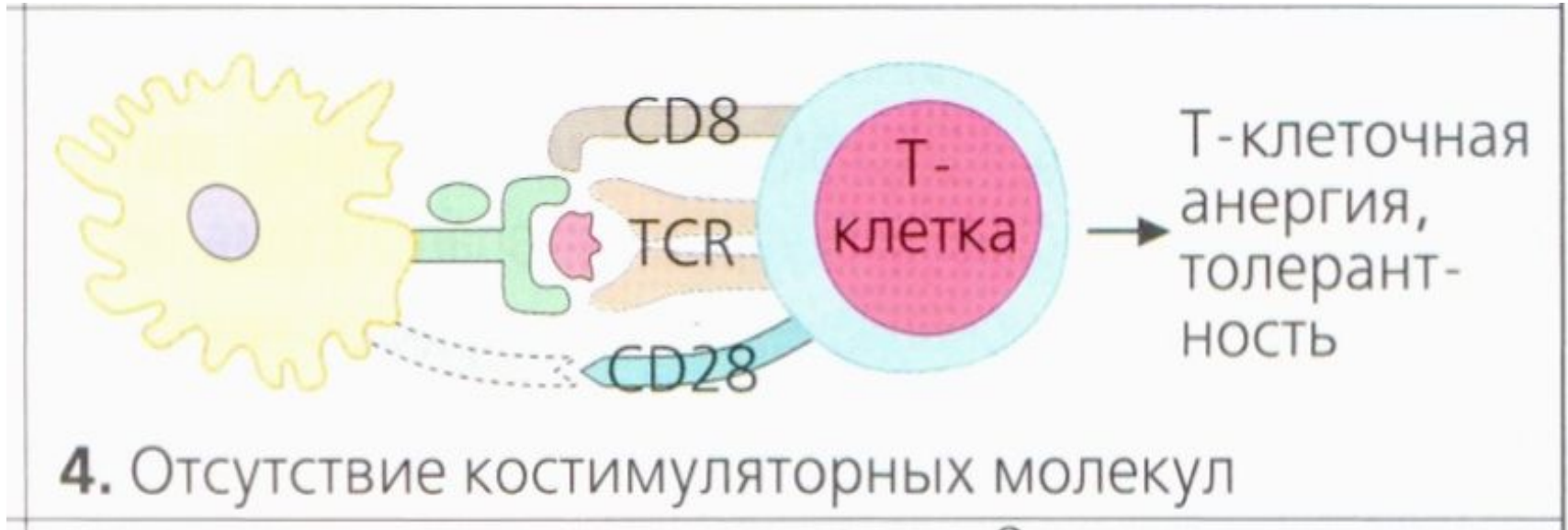
- Происходит потеря молекул МНС класса 1 на поверхности опухолевых клеток, связанная со снижением экспрессии генов МНС. В результате опухолевые антигены не распознаются цитотоксическими Т-клетками.

Механизмы, позволяющие опухолевым клеткам избежать иммунной реакции



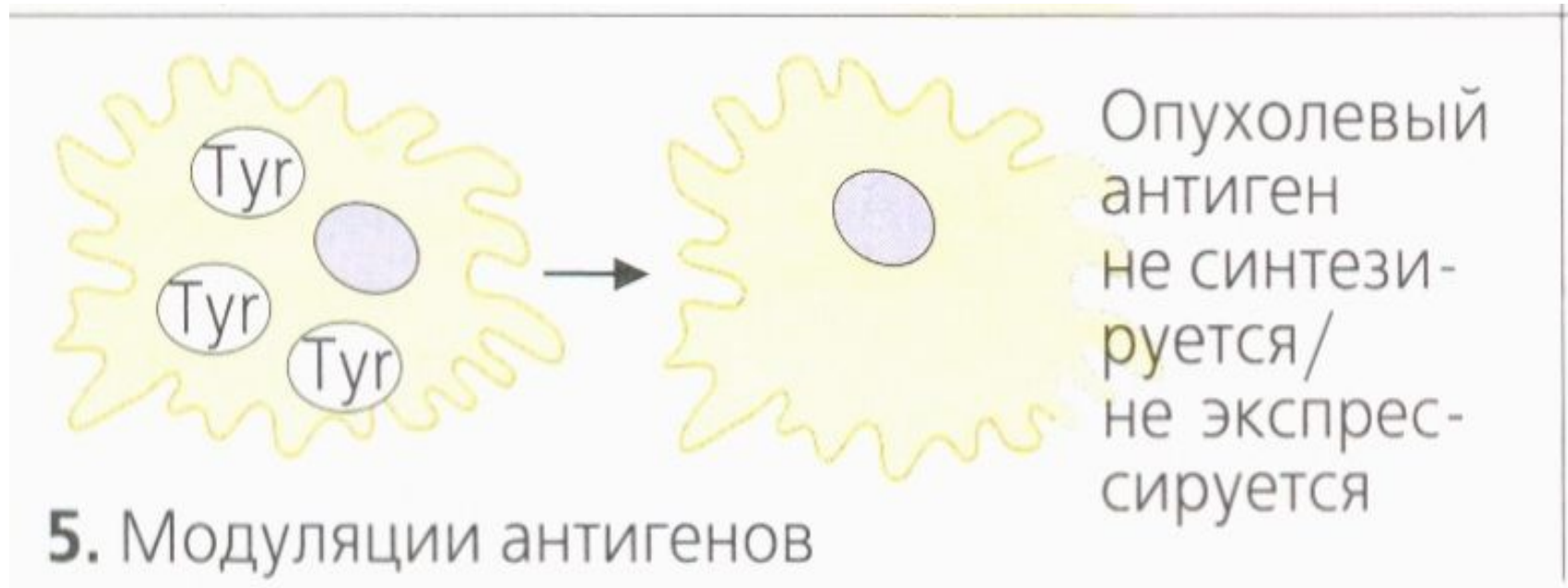
- В опухолевых клетках с нарушением механизма процессинга Аг (с дефицитом ТАР) опухолевые пептиды не транспортируются в ЭР и не происходит их презентации на поверхности клетки.

Механизмы, позволяющие опухолевым клеткам избежать иммунной реакции



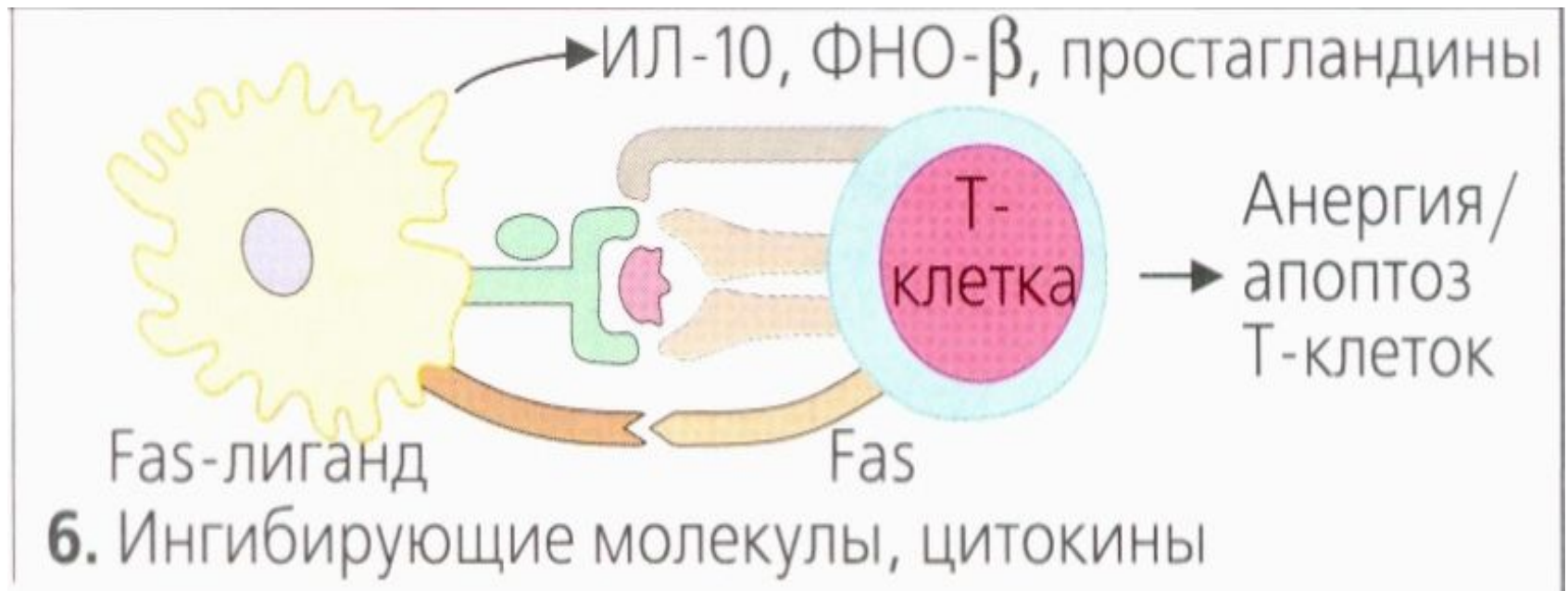
- Опухолевые клетки не являются профессиональными АПК. У них **нет ко-стимулирующих молекул CD80 и CD86**, необходимых для активации Т-клеток. Без костимуляции презентация пептида посредством комплекса МНС/TCR приводит к анергии и толерантности Т-клеток.

Механизмы, позволяющие опухолевым клеткам избежать иммунной реакции



- **Некоторые опухолевые клетки прекращают синтезировать опухолевые антигены, чтобы избежать иммунной реакции.**

Механизмы, позволяющие опухолевым клеткам избежать иммунной реакции



- Опухоль может производить иммуносупрессоры типа ИЛ-10 и ТФР- β , и МНС 1-подобные молекулы, которые взаимодействуют с ингибирующими лигандами на Т-клетках.

Диагностика опухолей

- В настоящее время комплексная лабораторная биохимическая и иммунологическая диагностика строится на определении
- опухолевых маркеров,
- гормонов,
- биологически активных соединений,
- изоформ ферментов,
- метаболитов костного ремоделирования в случае метастатического поражения костей.

Диагностика опухолей

- **Современные иммуноморфологические и цитологические исследования позволяют изучать биоптаты не только самой опухоли, но и различных выделений (мокроты, мочи, асцитической жидкости).**

Диагностика опухолей

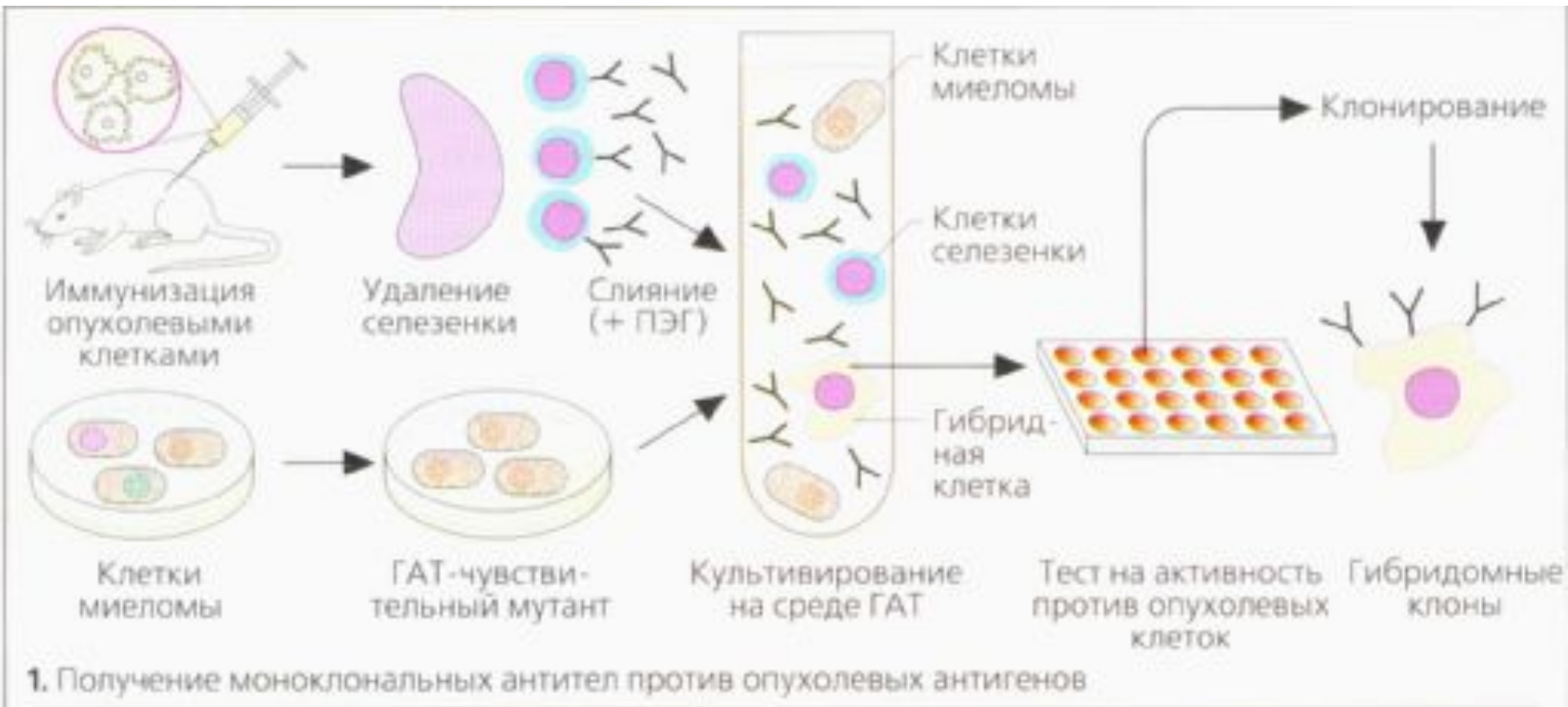
Биохимические сдвиги

- **увеличение содержания мочевины** при нормальной концентрации креатинина свидетельствует об интенсивном распаде опухоли, а при повышенной его концентрации - о нарушении функции почек;
- **снижение содержания глюкозы** указывает на значительную утилизацию глюкозы опухолевыми клетками (при лимфосаркоме и некоторых быстро растущих опухолях у детей);
- **увеличение содержания общего белка** (при снижении концентрации альбумина) - характерный признак миеломной болезни; снижение содержания общего белка и альбумина обнаруживается у онкологических больных при поражении печени метастазами и в ряде других случаев как отражение общего действия опухоли на организм;

Биохимические сдвиги

- **повышение активности щелочной фосфатазы** свидетельствует о нарушении функции печени, в частности, в результате появления в ней метастазов (появление избыточных количеств фермента в крови может быть также следствием его гиперпродукции клетками остеогенной саркомы);
- **гипопротеинемия и гипоальбуминемия** - показатель общего воздействия опухоли на организм как следствие снижения синтеза белка и усиленного его распада.

Иммунодиагностика



Опухолевые маркеры

- **Опухолевые маркеры** - это вещества, образующиеся в связи с измененным метаболизмом злокачественно трансформированной клетки, при возникновении опухоли их уровни повышаются.
- Современные биохимические и иммунологические методы позволяют выявить новообразования, когда минимальный уровень секретируемого опухолью маркера — от одного до нескольких фемтомолей (в пересчете на 1 мл сыворотки крови). Большая эффективность использования опухолевых маркеров в клинике может быть достигнута путем комбинации разных тестов.

Классификация опухолевых маркеров

По химической природе:

- **гликопротеины,**
- **полипептиды,**
- **углеводные детерминанты гликопротеинов,**
- **гликолипиды,**
- **белки,**
- **полиамины,**
- **иммуноглобулины и др.**

Классификация опухолевых маркеров

- **По биологической функции:**
- **онкофетальные антигены** (РЭА, α 1-фетопротеин, ХГЧ, специфический β 1-протеин беременности, СА125, СА153, СА19-9, СА50, СА72-4),
- **энзимы** (фукозилтрансфераза, кислая фосфатаза простаты, лактатдегидрогеназа, нейронспецифическая енолаза, тимидинкиназа, тимидилатсинтетаза, специфический антиген простаты),
- **гормоны** (АКТГ, антидиуретический гормон, плацентарный лактоген, паратгормон, пролактин, кальцитонин),
- **рецепторы** (прогестероновые, эстрогеновые) и
- **другие соединения** (ферритин, β -2-микроглобулин, иммуноглобулины, тканевой полипептидный специфический антиген, ЦИФРА 21-1, тканевый полипептидный антиген)

Диагностика опухолей

Опухолевые маркеры используют в следующих случаях:

А) скрининг

Б) оценка эффективности терапии

В) прогноз

Г) длительное наблюдение с целью раннего выявления рецидивов и генерализации заболевания.

Молекулярная диагностика опухолей

ДНК-диагностика

- Раннее выявление опухолей наиболее часто основывается на определении **мутаций Ras и p53**, обнаружение которых позволяет в некоторых случаях судить о стадии опухолевого процесса.
- Информативным ранним маркером рака толстой кишки служат **мутации гена APC**, обнаруживаемые более чем в 70% аденом.
- **Микросателлитные маркеры** высоко эффективны в ранней диагностике рака мочевого пузыря и простаты. Широкий спектр опухолей может быть диагностирован с использованием протоколов **активности телоизомеразы**.
- Широкое применение находит определение **HPV вирусов** при раке шейки матки и молекулярных тестов для выявления мутаций онкогенов непосредственно на гистологических срезах.
- ДНК-тестирование применяется при наследуемых опухолях: ретинобластоме, полипозе кишечника, множественных эндокринных опухолях второго типа (MEN2), раке молочной железы и яичников (BRCA1, BRCA2).

Направления и средства иммуноterapiи

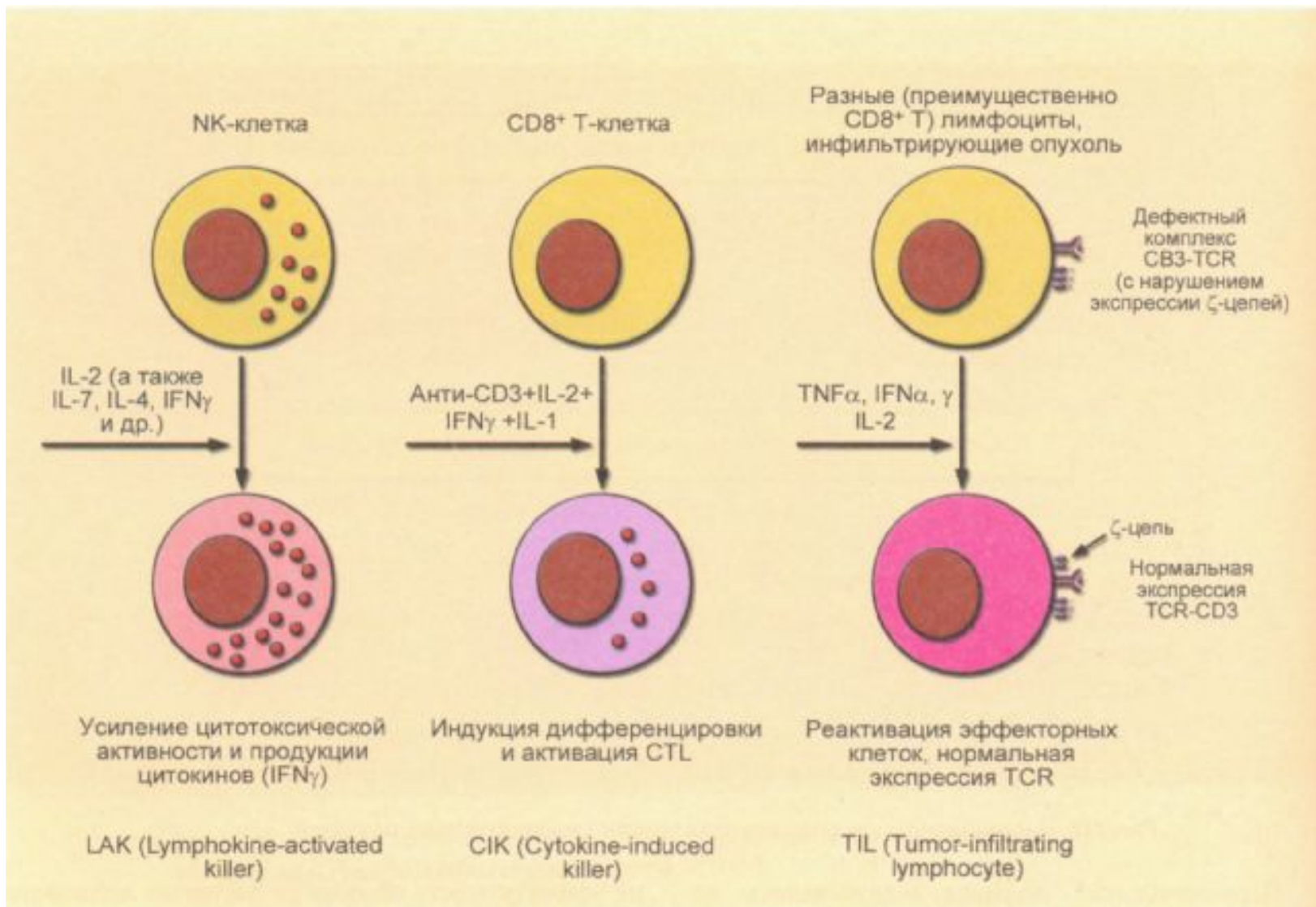
I. Первоначальные подходы к иммуноterapiи опухолей

1. Вакцинация убитыми опухолевыми клетками
2. Вакцинация очищенными опухолеспецифическими трансплантационными антигенами (ОСТА)
3. Использование опухолевых клеток/антигенов в сочетании с микобактериями или коринебактериями

II. Современные подходы к иммуноterapiи опухолей

1. Использование дендритных клеток, процессировавших ОСТА
2. Цитокинотерапия (интерфероны, интерлейкины)
3. Адаптивная цитотерапия (LAK, CIK, TIL)
4. Терапия гуманизированными моноклональными антителами к ОСТА
5. Применение иммунотоксинов
6. Генотерапия (использование клеток, трансфицированных генами B7, цитокинов и т.д.)

Индукция эффекторных клеток в цитотерапии опухолей



Индукция эффекторных клеток в цитотерапии опухолей

- Для получения клеток, предназначенных для адаптивной иммуноцитотерапии, используют **нормальные НК- и Т-клетки**, которые подвергают *in vitro* активации цитокинами, или лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (другой источник этих клеток - асцитная жидкость, образующаяся при прорастании опухолей в серозные полости).
- В случае **TIL** эффект активации сводится преимущественно к восстановлению экспрессии ζ -цепей комплекса CD3-TCR, утраченной под влиянием опухолевых продуктов. результате восстанавливается передача внутриклеточных сигналов от TCR, вызывающая активацию Т-клетки.

Лечение онкологических больных

- радикальное хирургическое удаление опухоли
- химиотерапия (алкилирующие агенты, повреждающие ДНК, антиметаболиты, которые ингибируют синтез нуклеиновых кислот, антибиотики, гормоны и природные соединения)
- радиотерапия
- симптоматическое лечение

Новые направления в лечении опухолей:

- фотодинамическая терапия
- направленная доставка лекарств в клетки-мишени
- подавление ангиогенеза
- генная терапия
- иммунотерапия

Методы клеточной иммунотерапии

- **LAK-терапия** (*Lymphokine-activated killers*) - метод иммунотерапии, основанный на использовании полученных от больного лимфокинактивированных киллеров - лимфоцитов, большая часть из которых представлена НК, культивируемыми в присутствии интерлейкина-2.
- **TIL-терапия** (*Tumor-infiltrating lymphocytes*) - метод иммунотерапии, основанный на использовании полученных от больного лимфоцитов, которые инфильтрируют опухоль и содержат в своем составе разные субпопуляции клеток.

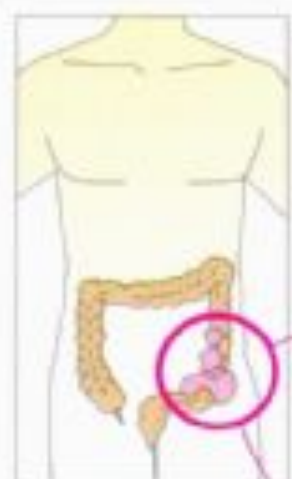
Методы клеточной иммунотерапии

- **Терапия сенсibilизированными лимфоцитами** - метод, основанный на использовании полученных от больного лимфоцитов, которые вне организма подвергаются ионизирующему облучению, воздействию ультрафиолетовых лучей или каких-либо других физических факторов, вызывающих активацию клеток.
- **Терапия дендритными клетками** - использование полученных от больного и культивируемых вне организма дендритных клеток.

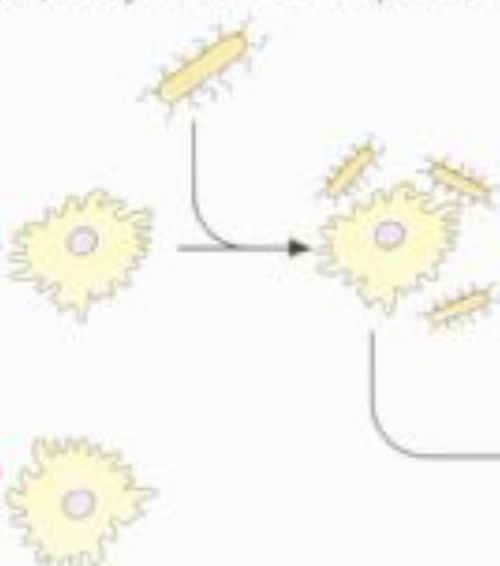
Усиление неспецифического иммунитета

- В конце XIX в. американский хирург Уильям Колей вводил больным лизаты опухолевых клеток, которые были заражены бактериями из-за не разработанности методик стерильной работы. У некоторых пациентов происходила регрессия опухоли.
- В XX в. опыт с противоопухолевой вакцинации был вновь повторен, использование немодифицированных опухолевых клеток не приводило к возникновению ощутимого иммунного ответа.
- Вскоре в вакцину стали добавлять адъюванты. Сначала использовали ослабленные штаммы микобактерий: бациллу Кальметта-Герена (БЦЖ) и *Corynebacterium parvum*. В более поздних экспериментах для этой цели пытались использовать вирус ньюкастлской болезни.
- Некоторые положительные данные указывают на возможность применения усовершенствованных методов вакцинации в будущем.

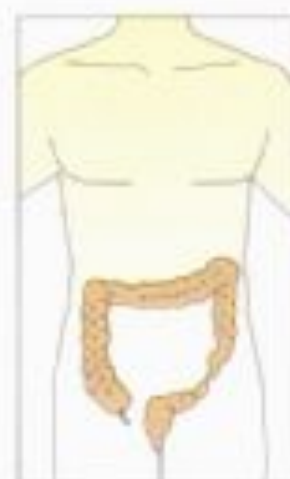
Добавление адъювантов:
БЦЖ, *Corynebacterium parvum*



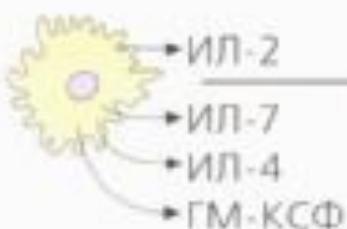
Удаление опухоли,
выделение
опухолевых клеток



Постоперационное
введение (п/к)



Встраивание генов цитокинов
в опухолевые клетки
(ретровирусы, аденовирусы,
физические методы)



1. Вакцинация с адъювантами –
цитокин-производящими клетками

А. Усиление неспецифического иммунитета



α -ИНФ: ХМЛ
Плазмоцитома
Лимфома
Миелома
Почечная
карцинома

ИЛ-2: Почечная
карцинома
Меланома
Лейкозы

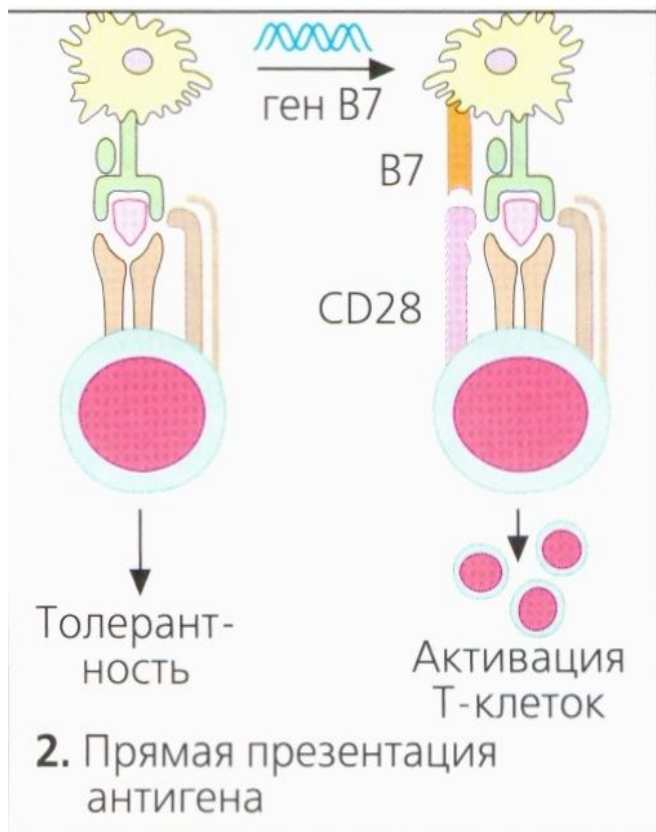
ФНО- α : Местная перфузия
при саркоме/
меланоме

2. Терапия с применением
цитокинов

Усиление неспецифического иммунитета

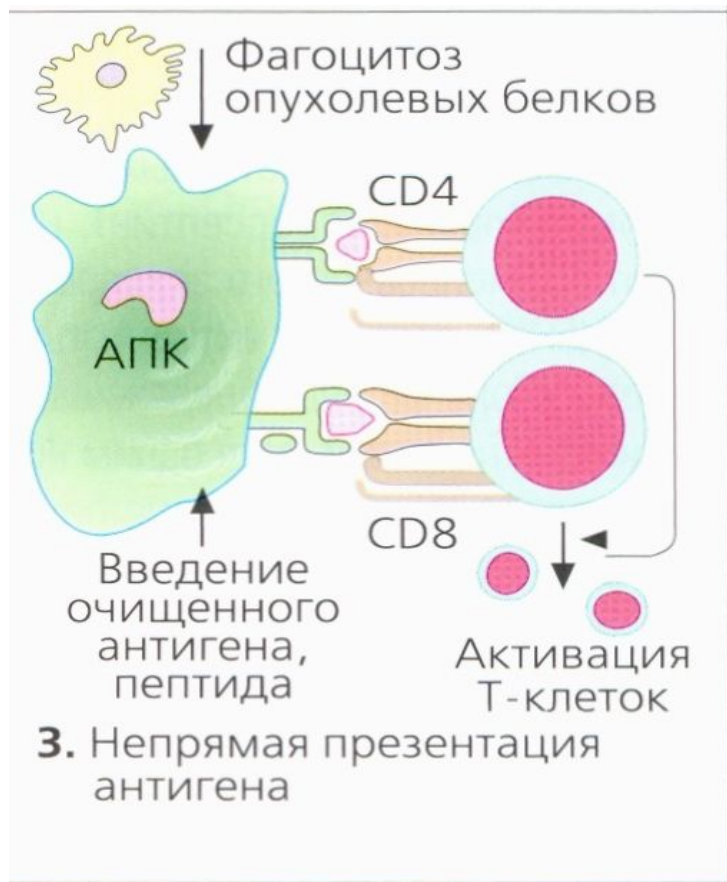
- В терапевтических целях можно использовать **системное введение цитокинов**. Однако на практике при отдельных видах опухолей используются только **α -ИНФ** и **ИЛ-2**. Кроме иммуностимулирующей активности, α -ИНФ обладает и прямым антипролиферативным действием, что может объяснять наблюдаемый терапевтический эффект.
- Лучше остальных видов опухолей на иммунотерапию реагируют почечные карциномы и злокачественные меланомы.
- При лечении пациентов с саркомами и меланомами при перфузии конечностей для усиления воздействия на опухолевые клетки используется также фактор некроза опухолей **ФНО- α** в сочетании с противоопухолевыми препаратами.

Индукция специфического Т-клеточного ответа

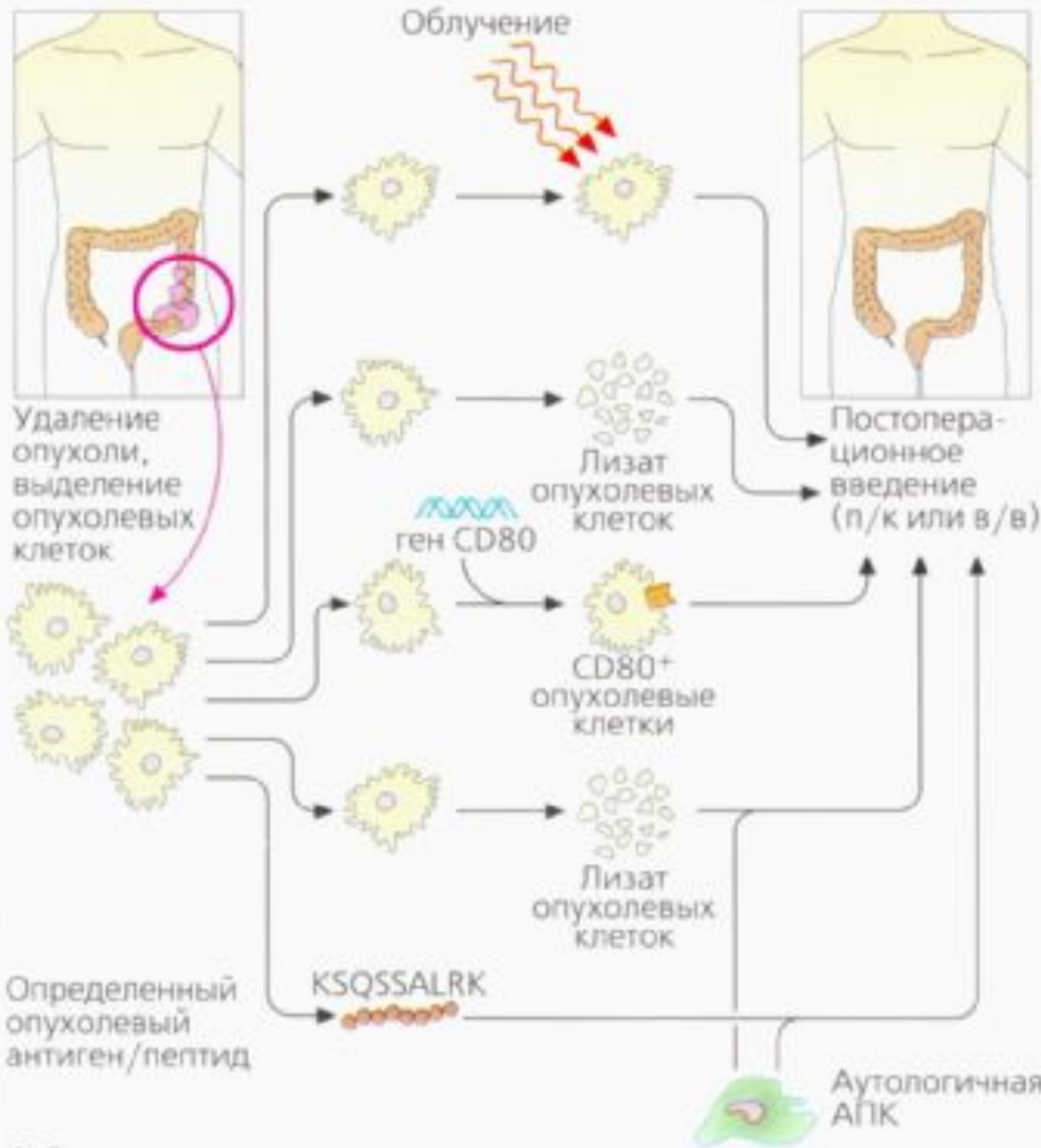


- Даже в идеальной ситуации, когда опухолевые клетки осуществляют презентацию опухолевого антигена Т-клеткам, сильный иммунный ответ не достигается из-за отсутствия у опухолевых клеток ко-стимуляторных молекул типа В7 (CD80/CD86).
- Проведен целый ряд испытаний генетически модифицированных опухолевых клеток, экспрессировавших В7 для усиления иммуногенности.

Индукция специфического Т-клеточного ответа

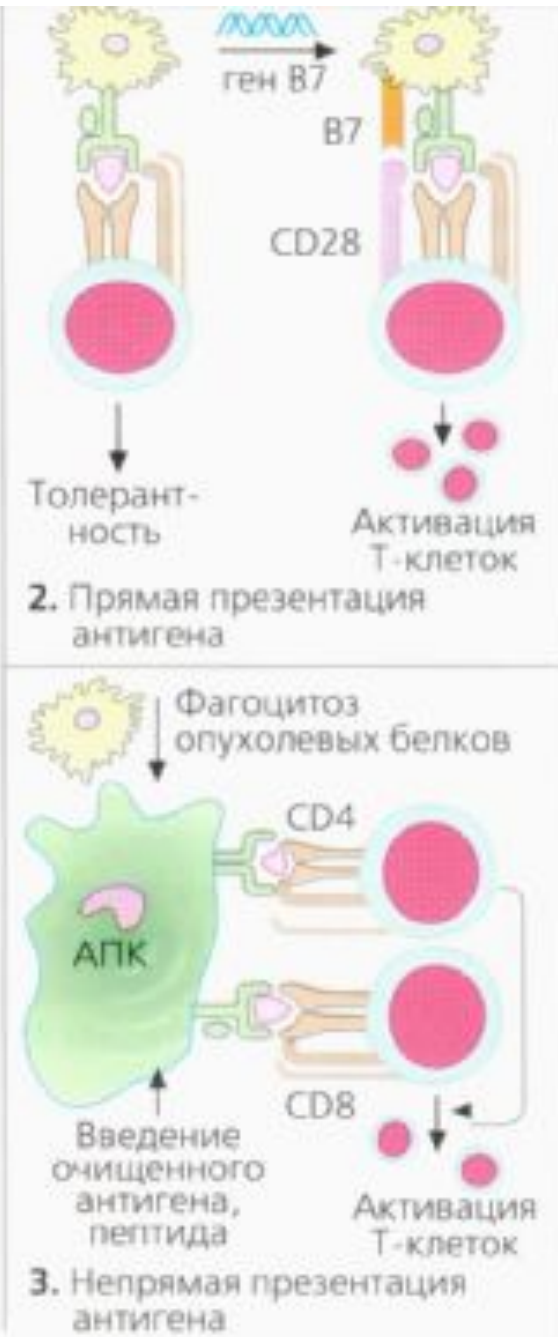


- Специализированные АПК экспрессируют все необходимые ко-стимуляторные молекулы, необходимые для индукции эффективного Т-клеточного ответа.
- Вместе с лизатами опухолевых клеток, очищенными опухолевыми АГ или специфическими опухолевыми пептидами можно ввести **дендритные клетки**, образованные *ex vivo*.



1. Стратегия вакцинации

Б. Индукция специфического Т-клеточного ответа



Цитокиноterapia

Цитокин	Использование для терапии опухолей
IFN α	Применяется в клинике в сочетании с базисной терапией
IL-2	Клиническое применение приостановлено в связи с риском индукции Treg
IL-15	Испытывается в качестве заменителя IL-2
TNF α	Применяется для локальной терапии (перфузия), а также в форме мутеинов
GM-CSF	Применяется для активации макрофагов и стимуляции миелопоэза
G-CSF, IL-1	Применяется для стимуляции миелопоэза на фоне химиотерапии
IFN γ , IL-12	Испытываются в качестве дополнительных средств иммуно- и генотерапии
IL-4, 5, 6, 7	Испытываются в качестве дополнительных средств иммунотерапии
Хемокины	Испытываются в качестве антиангиогенных средств

Цитокиноterapia

- В качестве средства иммунотерапии используется IFN α . Его противоопухолевая активность обусловлена активирующим действием на эффекторные клетки (CTL, NK), усилением экспрессии MHC-I, антиангиогенным, антипролиферативным и дифференцирующим действием.
- Применение препаратов на основе IL-2, ранее использовавшихся для иммунотерапии опухолей, приостановлено в связи со способностью этого цитокина поддерживать развитие и пролиферацию естественных регуляторных T-клеток (Treg).

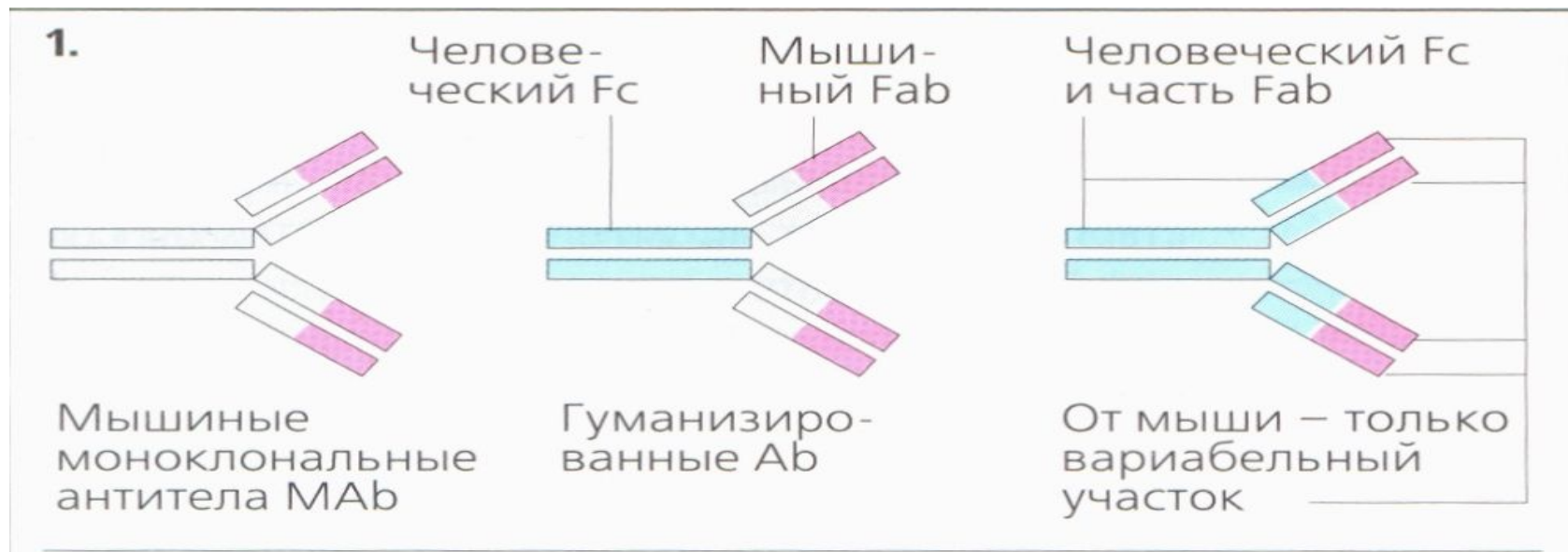
Цитокиноотерапия

Моноклональные АТ

Злокачественный процесс	Мишени моноклональных антител
В-клеточные лейкозы и лимфомы	CD5 CD20 (Mabthera) CD52 (CAMPATH-1) Идиотип mlg
Солидные эпителиально-клеточные опухоли	Гликопротеины, углеводы: CEA, Muc-1, CA-125, Le ^x Рецепторы ростовых факторов: EGF-R, HER2/Neu, IL-2R Белки межклеточного матрикса: тенасцеин, металлопротеиназа, FAP α

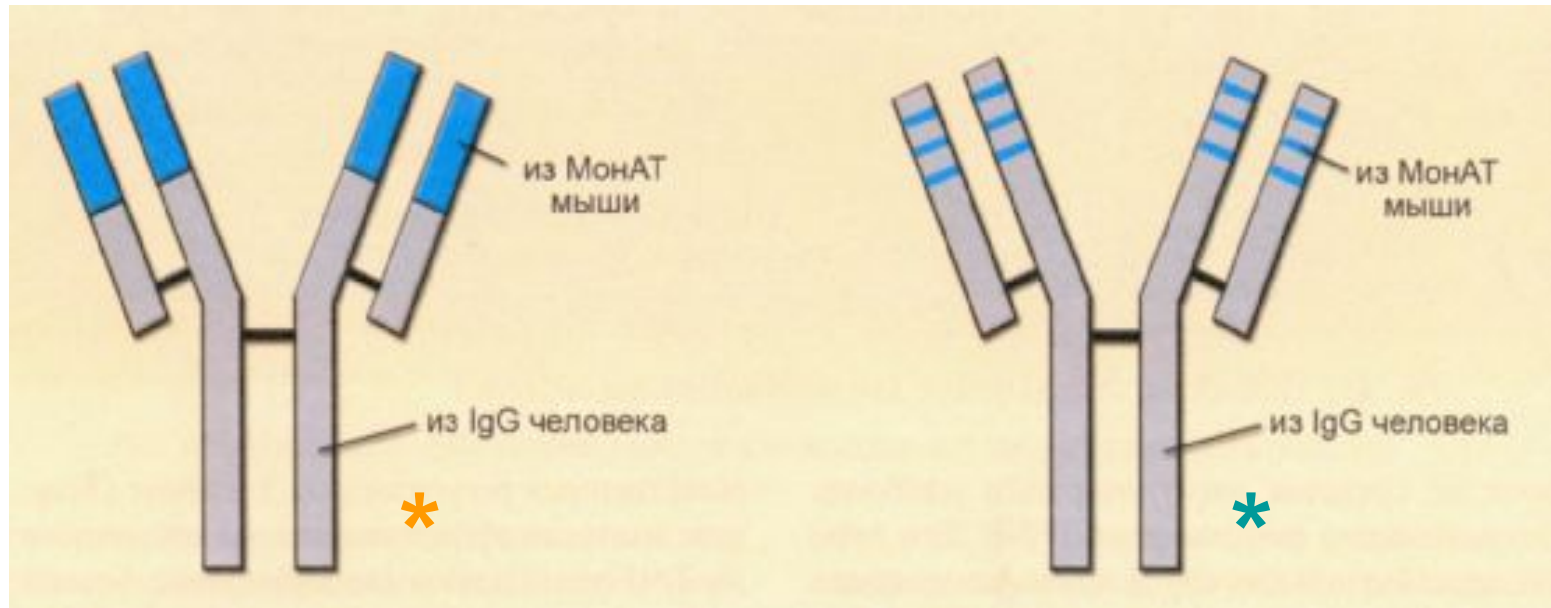
- **CEA** (*Carcino-embryonal antigen*) - ракоэмбриональный АГ;
- **MUC-1** - муцин 1, **CA-125**, **Le^x** - АГ группы крови Le^x ;
- **EGF-R** — рецептор эпидермального фактора роста, тип 1;
- **HER2/Neu** — продукт онкогена neu;
- **IL-2R** — рецептор ИЛ- 2;
- **FAP α** (*Fetal α -protein*) — альфафетопротейн.

«Гуманизация» моноклональных АТ



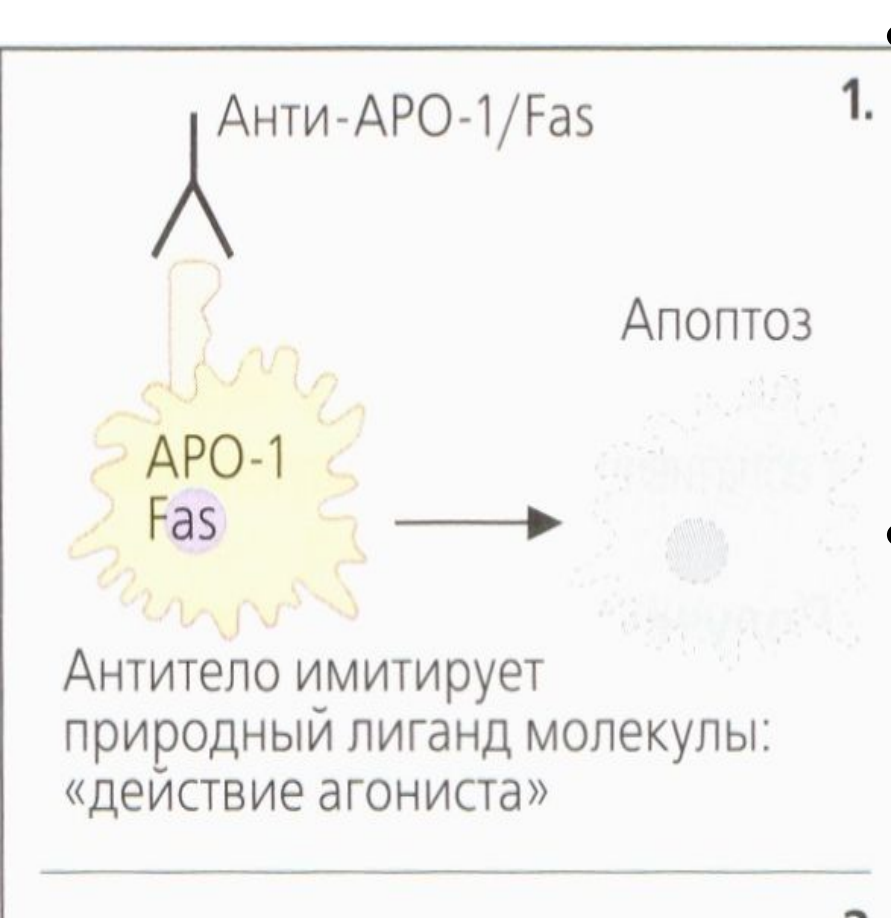
- Моноклональные антитела (MAb) используются для лечения рака уже на протяжении более 20 лет. Их получают в мышах. Лечение мышинными антителами приводит к образованию человеческих анти-мышинных антител (НАМА), что снижает эффективность мышинных MAb. В связи с этим была разработана технология получения гуманизированных MAb.

«Гуманизация» моноклональных АТ



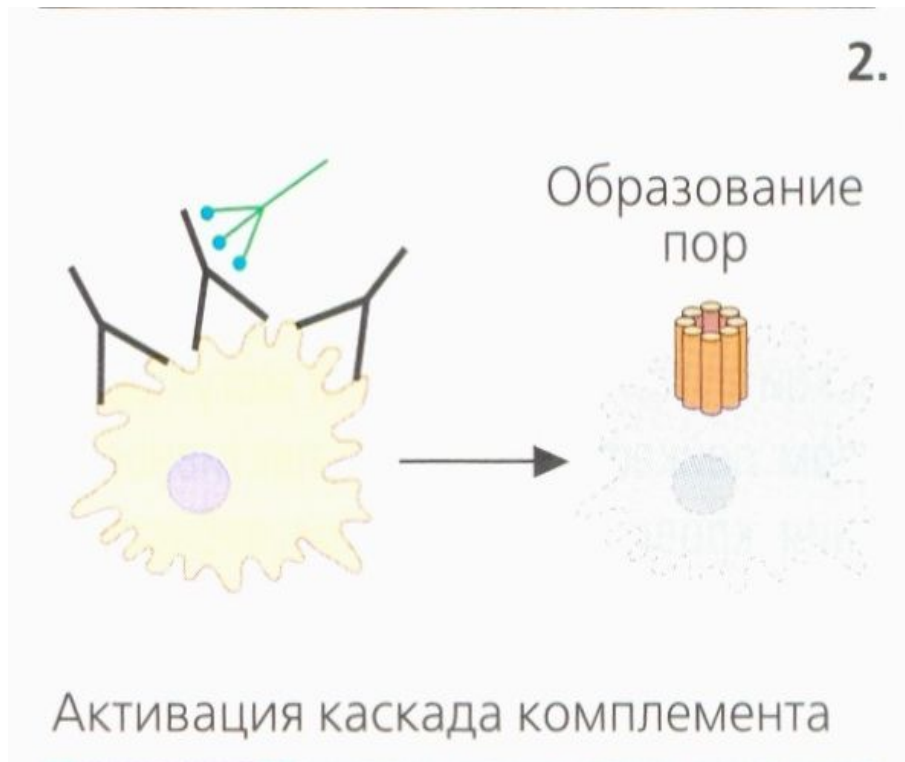
- Для устранения иммуногенности моноклональных АТ с помощью методов генной инженерии в их молекуле замещают наиболее иммуногенную часть — **С-домены** или **С-домены и каркасную последовательность V-доменов** (остаются лишь три гипервариабельных участка в V-доменах Н- и L-цепей). Возможно лишь проявление иммуногенности идиотопов, которая свойственна и аутологичным антителам.

Механизмы терапевтического действия МАб



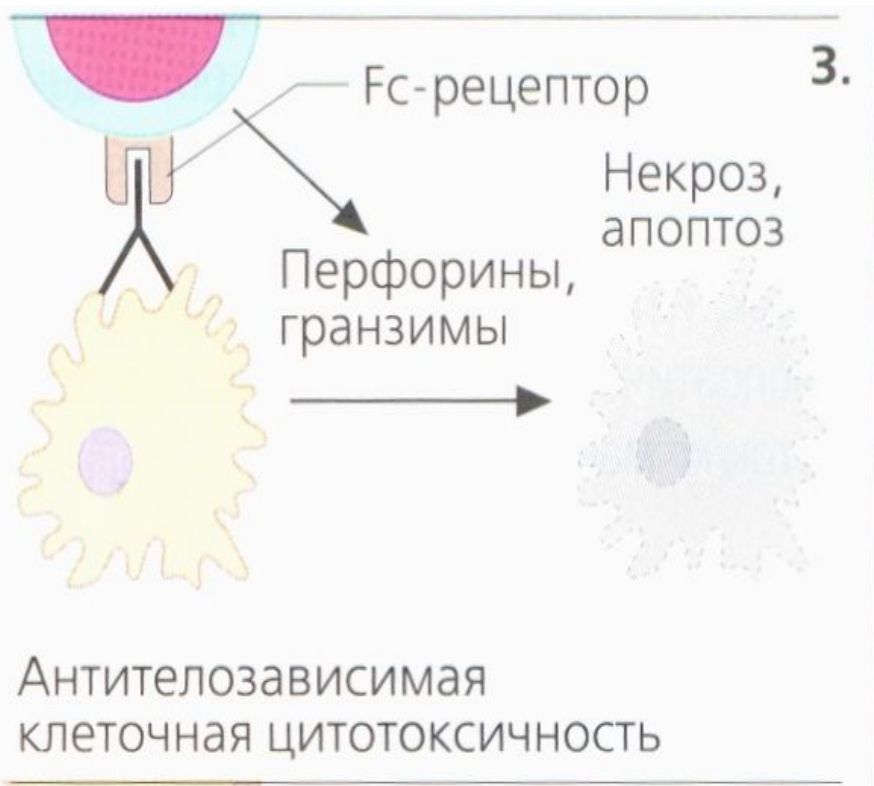
- Моноклональные антитела могут имитировать или блокировать естественные лиганды рецепторов.
- анти-CD95 антитела активируют рецептор Fas/АРО-1 (CD95), запуская апоптоз.

Механизмы терапевтического действия МАб



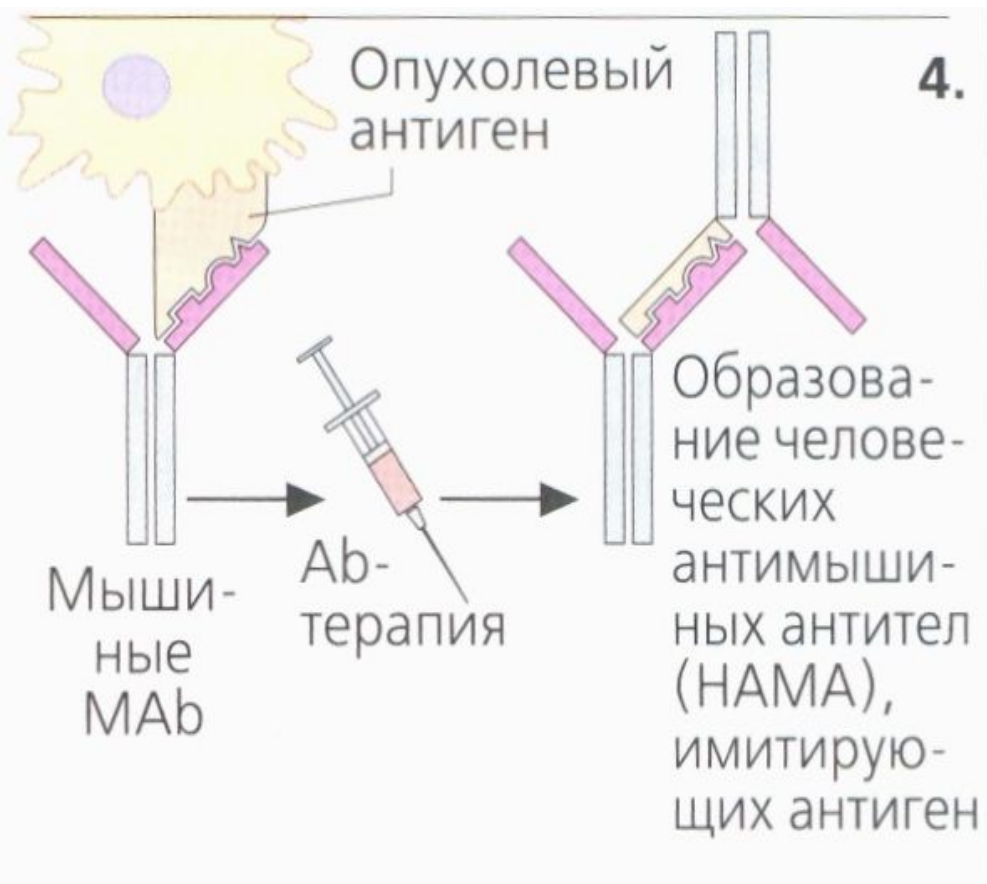
- Антитела могут активировать комплемент и индуцировать образование пор в клеточной мембране.

Механизмы терапевтического действия МАб



- При АЗКЦ клетки-киллеры, несущие Fc-рецепторы, узнают Fc-фрагмент связанных с клеткой Ат, что приводит к высвобождению цитоплазматических гранул, содержащих цитотоксические перфорины и гранзимы

Механизмы терапевтического действия МАб



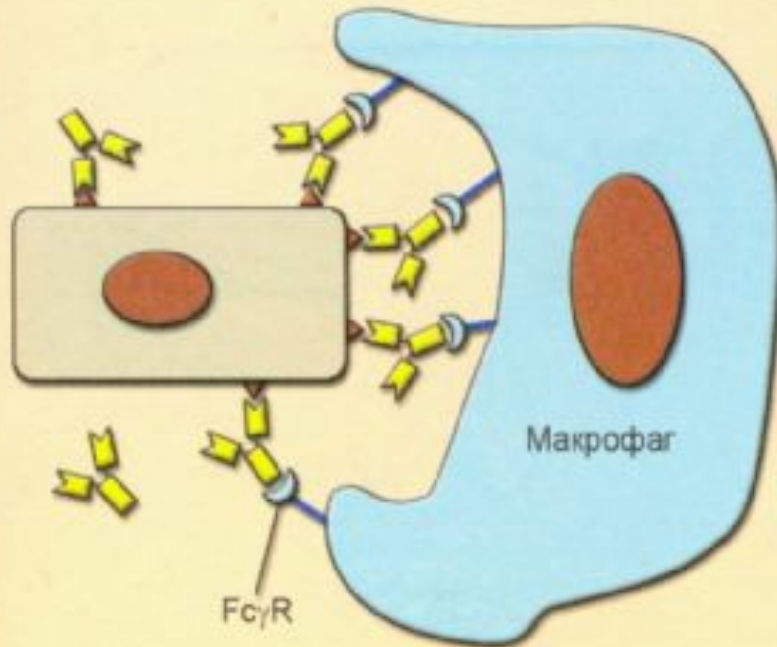
- Мышиные антитела могут индуцировать образование НАМА. Некоторые из этих анти-мышечных антител могут быть направлены против специфических идиотипических связывающих областей мышечных антител.

Механизмы терапевтического действия МАб

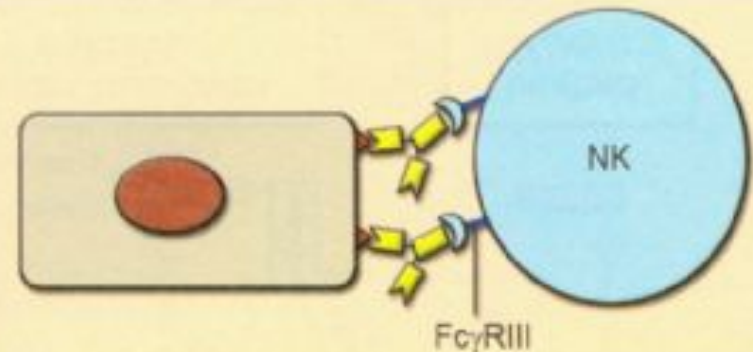
- Антиидиотипические антитела имитируют опухолевые антигены и могут служить опухолевыми суррогатами в вакцинах.**
- Они также могут приводить к образованию анти-анти-идиотипических моноклональных антител, которые узнают опухолевый антиген, подобно мышинным МАб. В результате реализации этого каскада действие мышинных моноклональных антител усиливается.**

Механизм действия моноклональных АТ

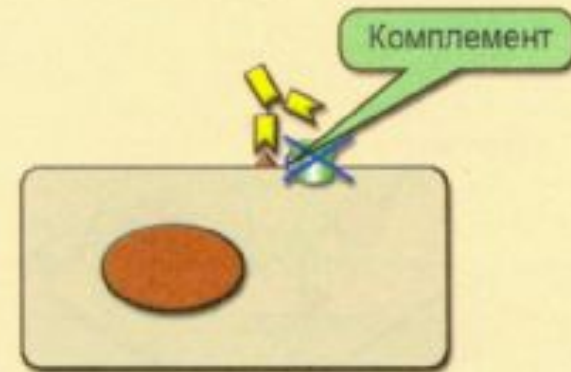
1. Опсонизация, стимулирующая фагоцитоз



2. Опсонизация, стимулирующая антителозависимую клеточную цитотоксичность



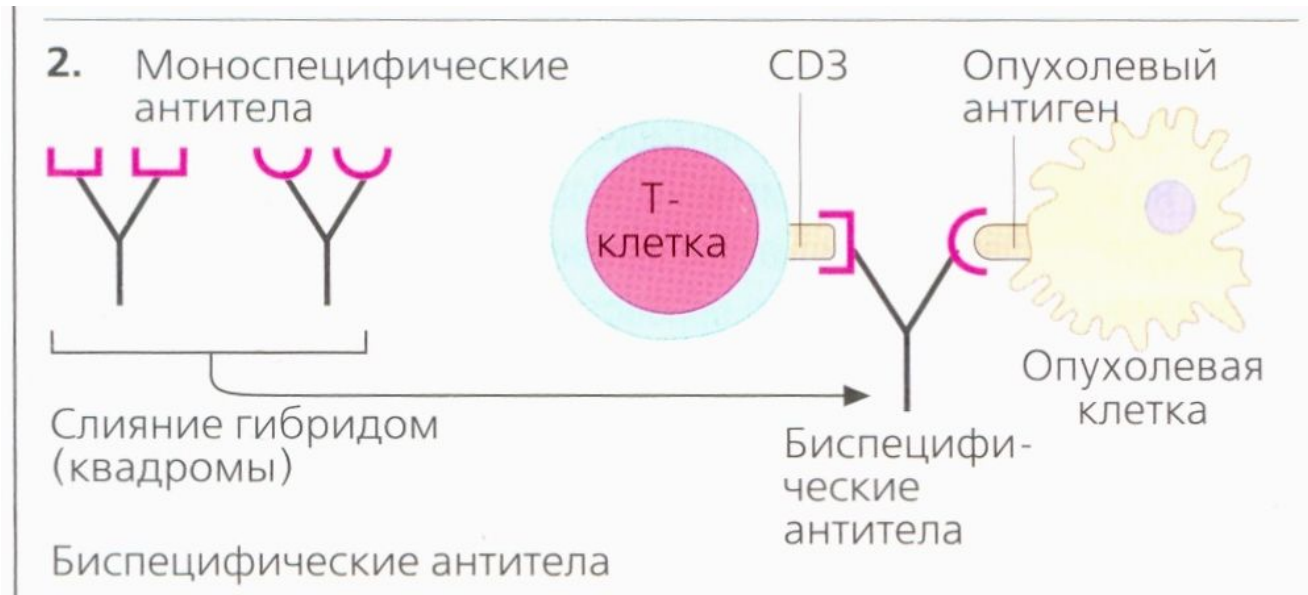
3. Комплементзависимый цитолиз



Механизм действия моноклональных АТ

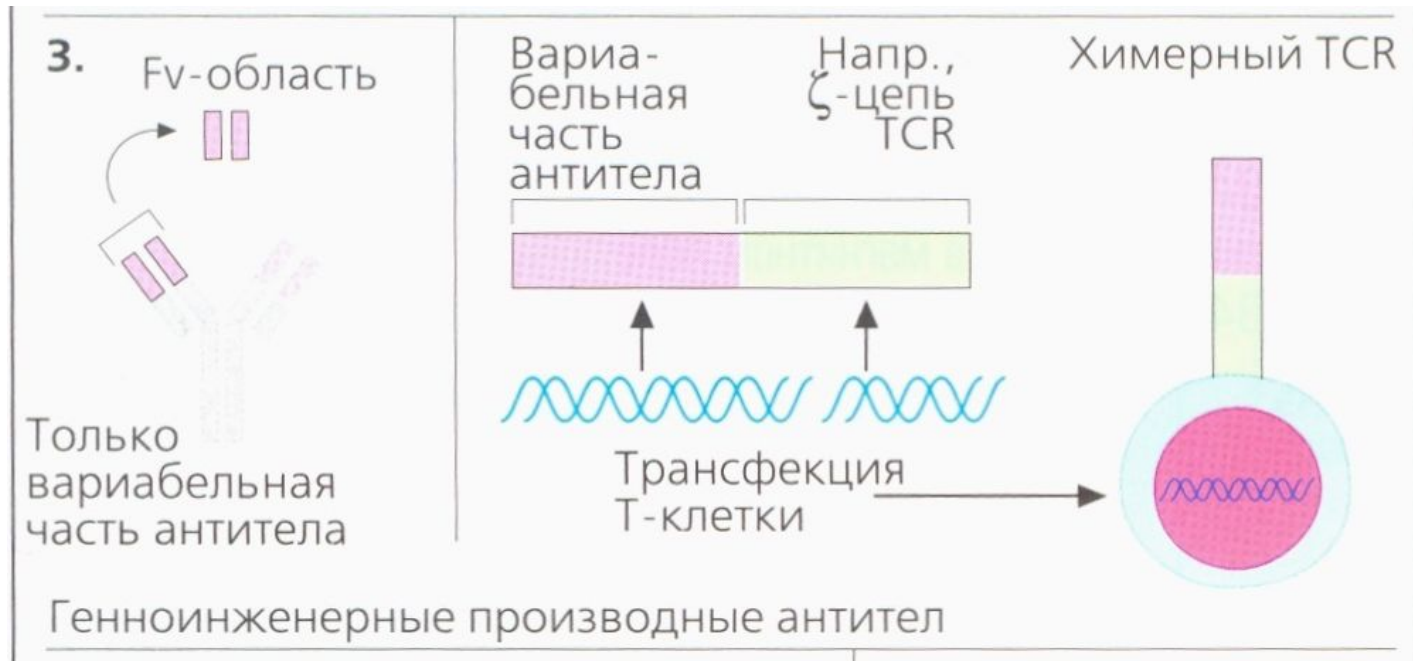
- **Моноклональные антитела оказывают противоопухолевое действие по механизму антителозависимого клеточного цитолиза, опосредованного МФ (1) или НК-клетками (2). Оба типа эффекторных клеток распознают Fc-часть антител, связавшихся с опухолевым АГ, с помощью Fc-рецепторов (FcγI, II и III на МФ и FcγIII на НК-клетках). Для МФ это служит сигналом для фагоцитоза или внутриклеточного цитолиза клетки-мишени, для НК-клеток - для контактного цитолиза.**
- **Комплементзависимый цитолиз опухолевых клеток (3) не играет существенной роли в реализации лечебного действия антител, так как мембрана опухолевых клеток располагает факторами, инактивирующими компоненты C'.**

Биспецифические АТ



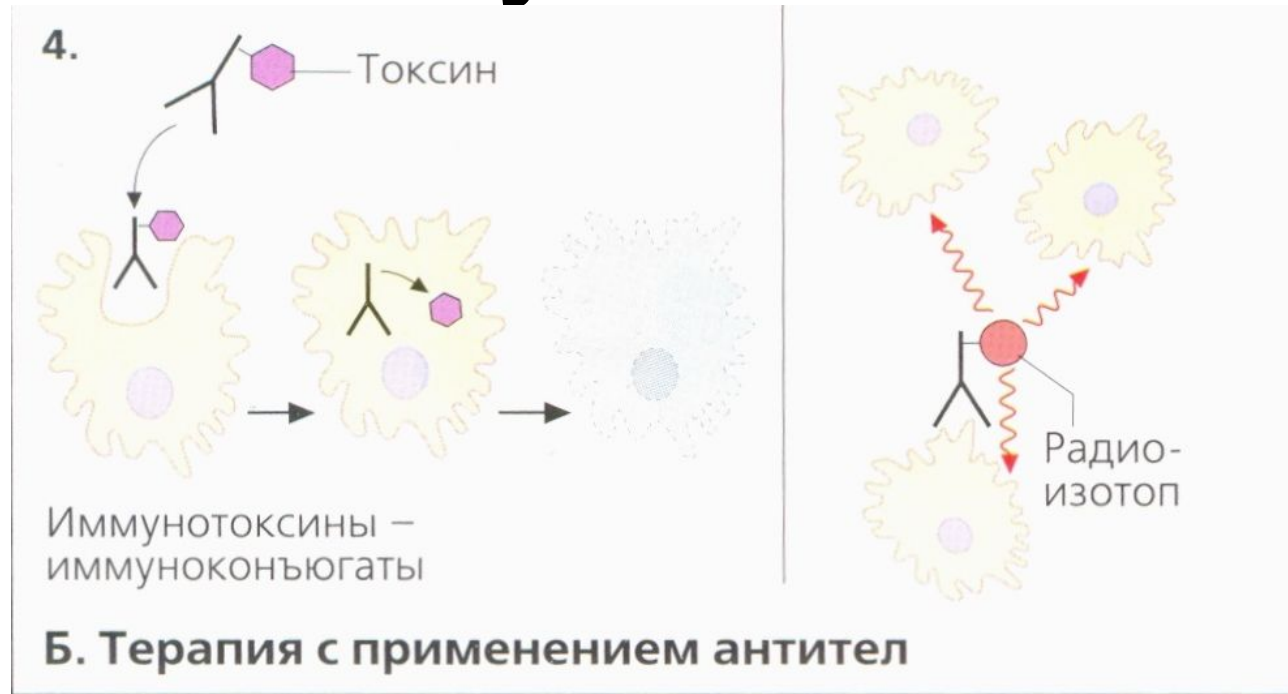
- **Биспецифические антитела** образуются путем слияния двух гибридом, каждая из которых секретирует специфические моноклональные антитела.
- Гибридомы связывают эпитопы опухолевых клеток и Т- CD3.
- Т-клетки вступают в контакт с опухолевыми клетками и активируются при помощи CD3.
- Новшеством в данной стратегии стало использование **синтетических антител**, состоящих из одной цепи .

Генноинженерные производные АТ



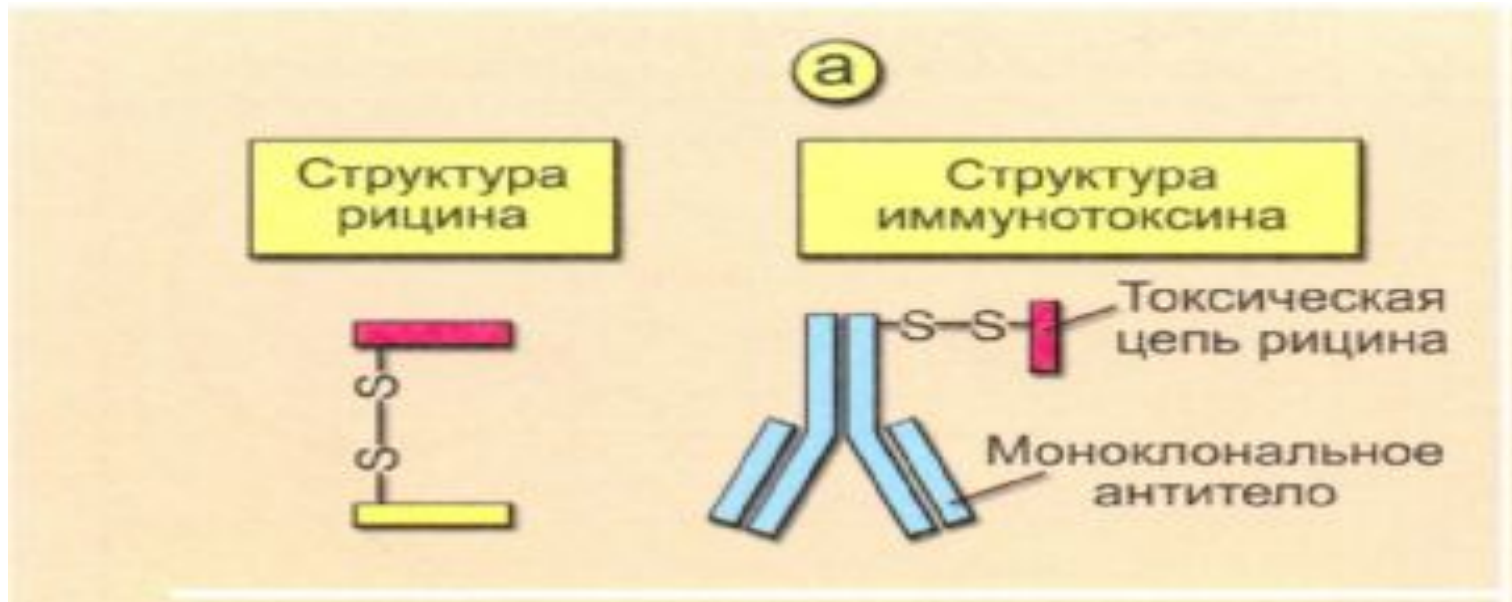
- Ат состоят только из легкой и тяжелой цепи переменной области (**Fv**) МАb.
- Единичные цепи от двух Ат скреплены при помощи связывающего фрагмента (спейсера).
- Ат, узнающие опухолевый эпитоп, могут быть связаны с дзета-цепью, играющей важную роль при передаче сигнала TCR.
- Осуществляют трансфекцию Т-клеток такими конструкциями, узнают опухолевый антиген АТ и передают сигнал внутрь клетки при помощи дзета-цепи TCR.

Иммунотоксины



- Ат против опухолевых Аг, можно связать с иммунотоксинами или радиоизотопами.
- Токсический компонент иммунотоксина, блокирующий синтез РНК, высвобождается в результате интернализации АТ.
- Радиоактивное вещество (радиоактивный иттрий или йод) меченных радиоизотопами конъюгатов вызывает лизис клетки-мишени, также страдают расположенные рядом клетки (эффект «невинного свидетеля»).

Иммунотоксины



- Растительные токсины обычно имеют две полипептидные цепи, одна из которых ответственна за доставку, другая - за токсичность молекулы.
- Для получения иммунотоксина изолированную токсическую цепь ковалентно подсоединяют к моноклональному антителу, направленному против опухолевого АГ.

Доставка токсина в клетку

б

Доставка токсина в клетку

Иммунотоксин

Опухолевый антиген

Эндоцитоз

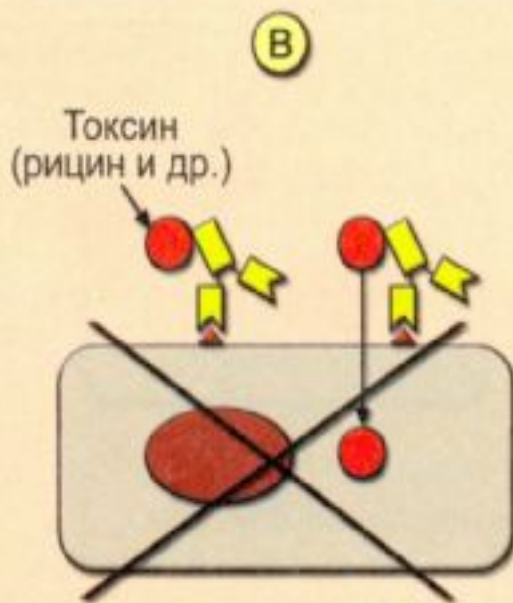
Эндосома

Выход токсина в цитозоль

Блокада ферментов.
Гибель клетки

- Связывание иммунотоксина с мембранным АГ
- Интернализация комплекса в составе эндосомы.
- Токсическая субъединица иммунотоксина поступает в цитозоль,
- Реализация токсического действия - гибель клетки.

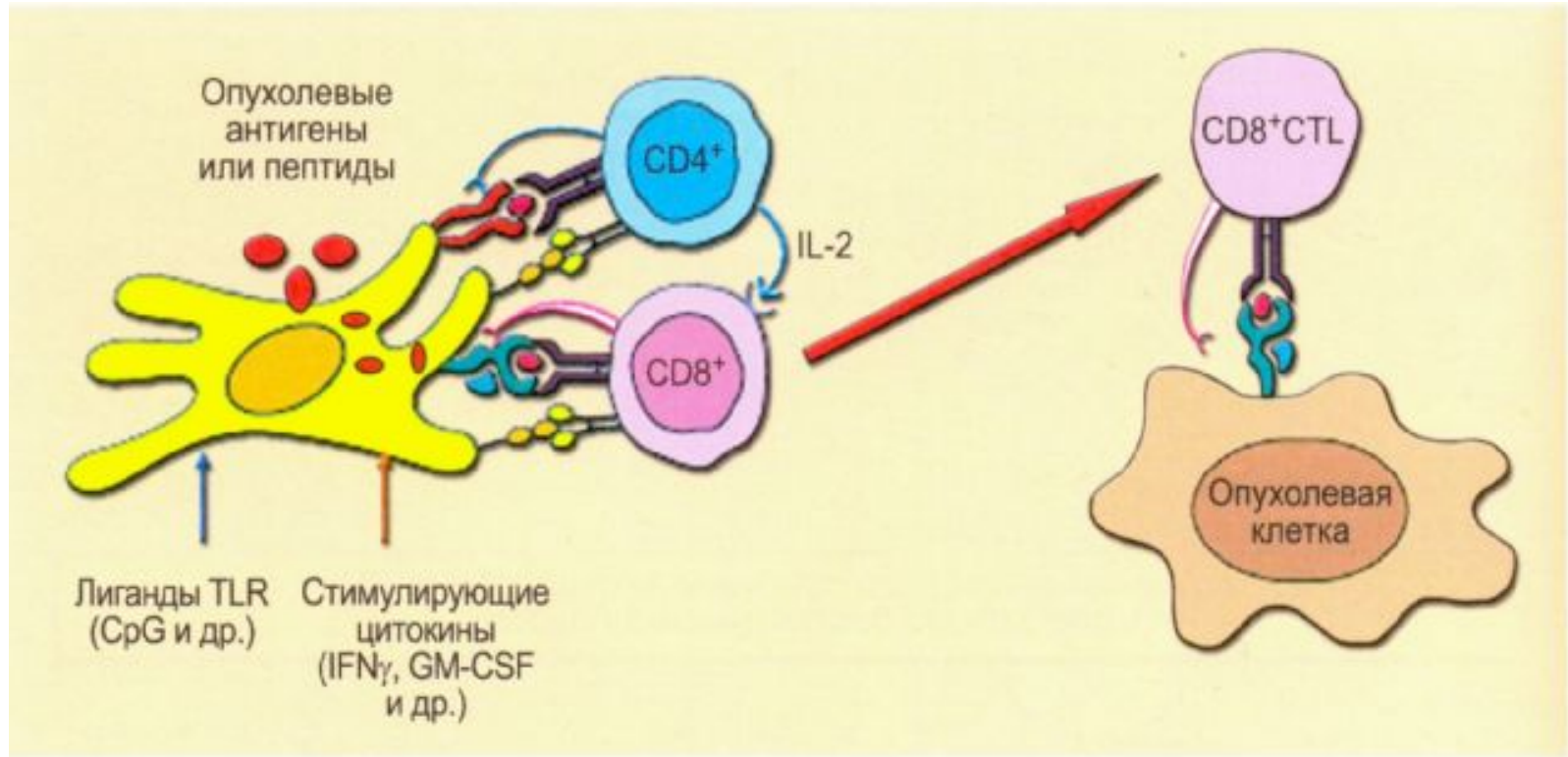
Специфический цитолиз



Антитела, конъюгированные с токсином (иммунотоксин), вызывают избирательный лизис опухолевой клетки

- Иммунотоксин вызывает **специфический цитолиз** опухолевой клетки, несущей АГ, против которого направлены **моноклональные антитела**.

Противоопухолевые вакцины



- Выращенные *in vitro* дендритные клетки носителя опухоли нагружают опухолевым АГ или пептидом и активируют воздействием лигандов TLR и CD40, а также цитокинов (IFN γ и др.).
- При инкубации таких клеток с сингенными Т-лимфоцитами происходит **индукция цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL)**, специфичных к опухолевым эпитопам, а также Т-хелперов (Th1), способствующих развитию CTL.

Создание противоопухолевых вакцин

- С лечебной целью используют как ДК, нагруженные опухолевым АГ *in vitro* (в этом случае индукция CTL происходит *in vivo*) или CTL, индуцированные *in vitro*. В обоих случаях именно CTL реализуют цитолиз опухолевых клеток.
- Возникают препятствия на пути реализации указанной программы (одно из них отсутствие эффективной доставки CTL к опухоли).

Генноинженерные опухоль-специфичные Т-клеточные рецепторы

- Были предприняты попытки выделять инфильтрующие опухоль лимфоциты TIL из удаленных опухолей и вновь переливать их пациенту.
- Возможно определить последовательность ДНК переменных доменов α - и β -цепей TCR TIL.
- С помощью вирусных векторов можно получить генетически измененные Т-лимфоциты, специфическим образом реагирующие с опухолевыми клетками.
- Затем следует осуществить адаптивную терапию, вводя пациенту эти размноженные *ex vivo* клетки.

Генноинженерные опухоль-специфичные Т-клеточные рецепторы

