

Использование клеток «натуральных киллеров» (НК) для иммунотерапии

Rupert Handgretinger

Детская Университетская больница,
Тюбинген, Германия.





Значение иммунотерапии рака в прошлом вызывало вопросы, пока оно не стало мощной стратегией лечения в последние годы и даже было выбрано в качестве «прорыва науки в 2013 году».

Как правило, мы выделяем три основные стратегии клеточной иммунотерапии:

-Пациент может быть активно иммунизирован против опухоли.

-Его можно лечить с помощью Т-клеток, которыми управляют *ex vivo*, обеспечивая их функциональное взаимодействие с опухолевыми клетками.

-Для лечения также можно использовать агентов, которые запускают ранее существовавшие иммунные ответы в пределах опухолевой ниши, блокируя ингибирующие иммунный ответ контрольные точки.

Это - особый тип клеточной терапии.

История Иммунотерапии

Уильям Б. Коли (1862 - 1936)



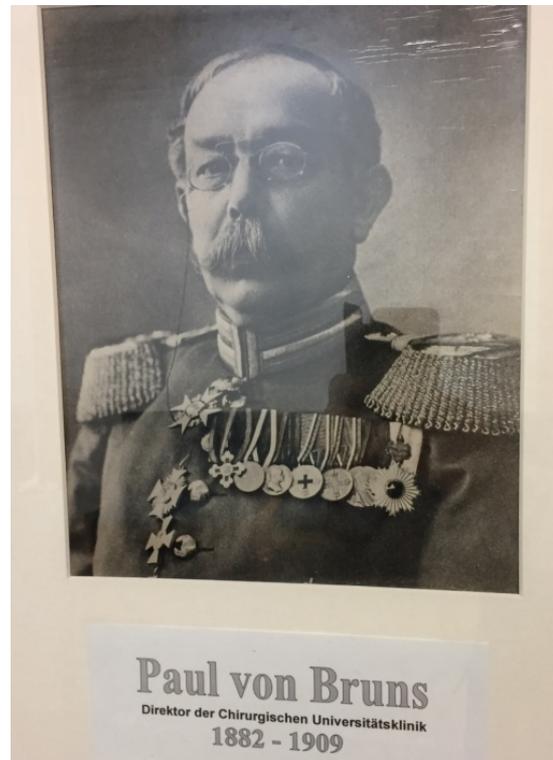
Figure 1. William B. Coley (1862-1936) from *Trans Am Surg Assoc* 54(1936):415. Courtesy of the Welch Library of the History of Medicine.

Токсин Коли: *Streptococcus pyogenes* und *Serratia marcescens*
Пиогенные стрептококки и серация марцесценс

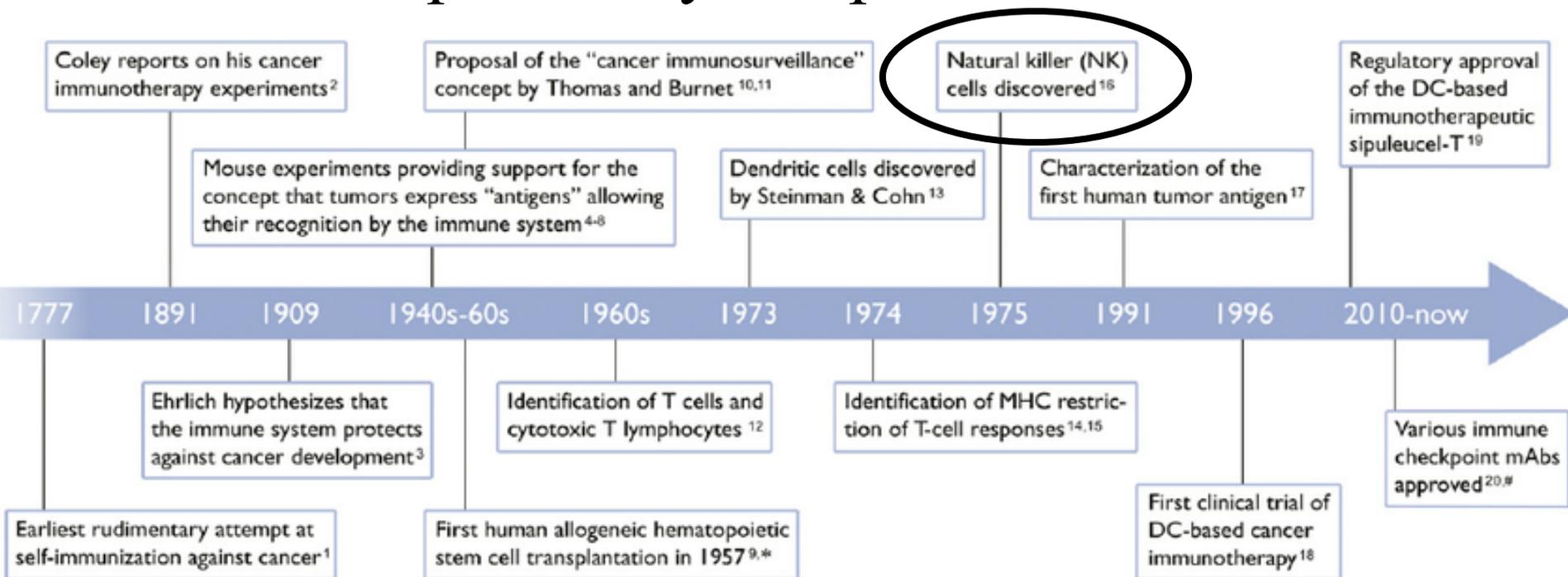
- Брунс П. Целебное действие рожистого воспаления на опухоль. Бейтр Клин Чир 1888; 3: 443.
- (преднамеренно вводили больному раком пиогенные стрептококки, чтобы вызвать рожистое воспаление, и заметили уменьшение объема опухоли)

Пол фон Брунс: 1881 -1914

Профессор хирургии, Университет Тюбингена 1882-1909



История иммунотерапии



самая ранняя рудиментарная попытка противораковой самоиммунизации 1777 г.

Коли сообщает о своих экспериментах по иммунотерапии рака 1891 г.

Эрлих выдвигает гипотезу, что иммунная система защищает от развития рака 1909 г.

Впервые трансплантированы человеческие аллогенные гематопозитические стволовые клетки 1957 г.

Эксперимент на мышах подтверждает предположение, что опухоль экспрессирует «антигены», не позволяющие иммунной системе распознавать ее. 1940-60 г.г.

Предложение концепции «иммунодефицита рака» Томасом и Бернеттом 1940-60 г.г.

Идентифицированы Т-клетки и цитотоксичные Т-лимфоциты 1960 г.

Обнаружены дендритные клетки Стейнманом и Кохом 1973 г.

Идентифицировано МНС-ограничение Т-клеточных ответов 1974 г.

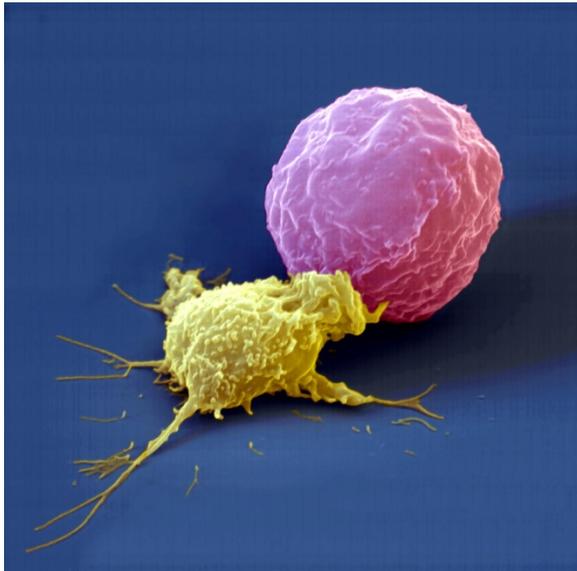
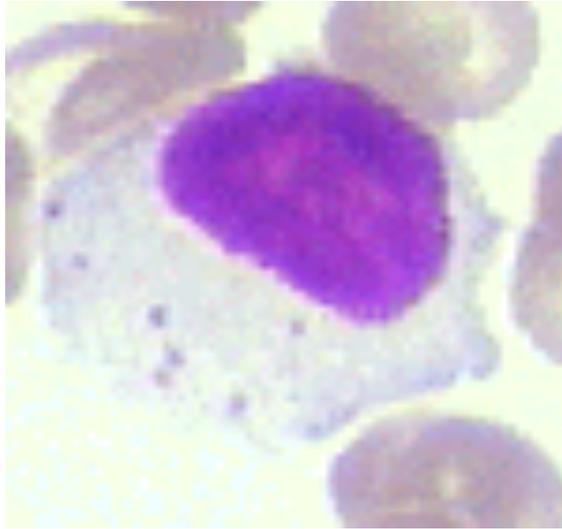
Обнаружены клетки натуральные киллеры (NK) 1975 г.

Охарактеризован первый человеческий опухолевый антиген 1991 г.

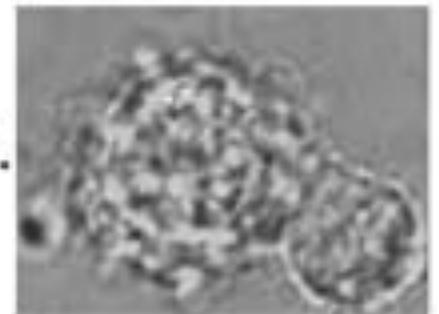
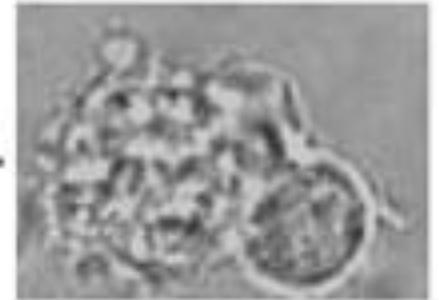
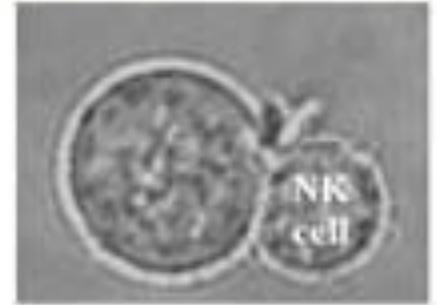
Первые клинические испытания иммунотерапии рака на основе ДК-клеток

Одобрены нормативы иммунотерапии Sipuleucel-T на основе ДК 2010 г. – по настоящее время

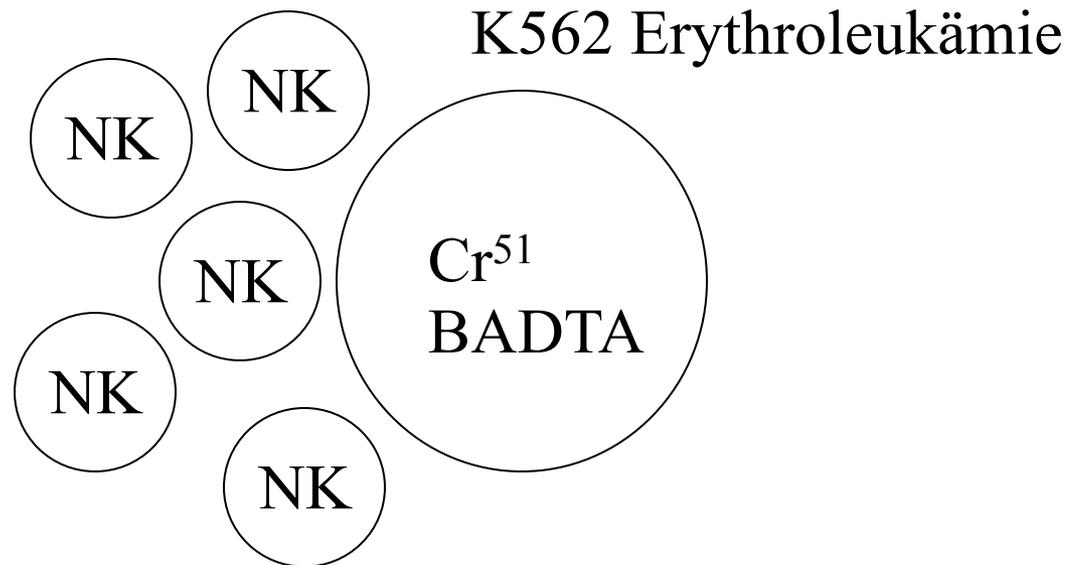
NK-клетки атакуют лейкемический бласт (K562 Эритролейкемия)



Eyeofscience, Reutlingen



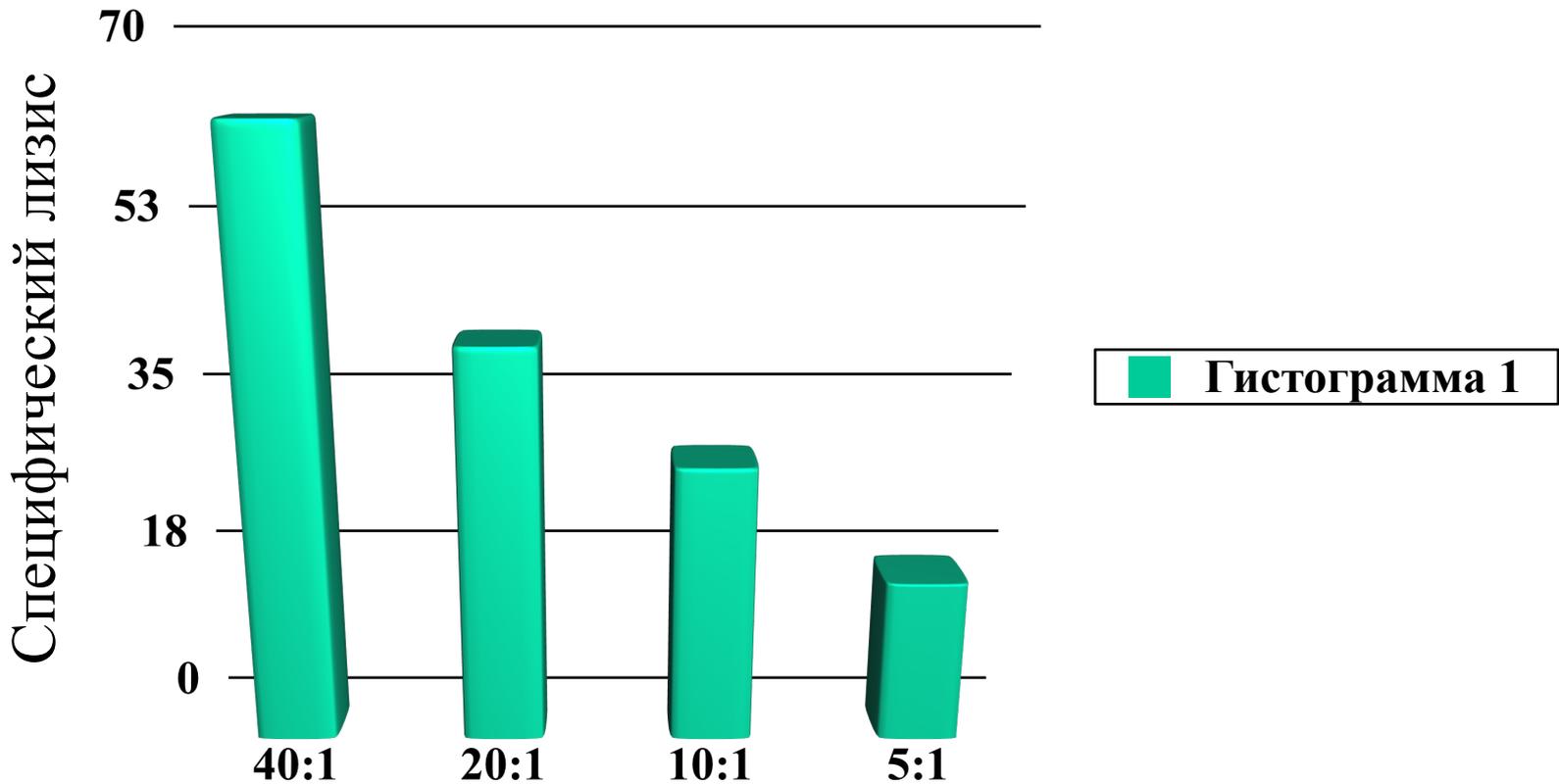
Определение активности НК клеток



Соотношение между эффектором и мишенью
5:1

ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ

Выброс хрома

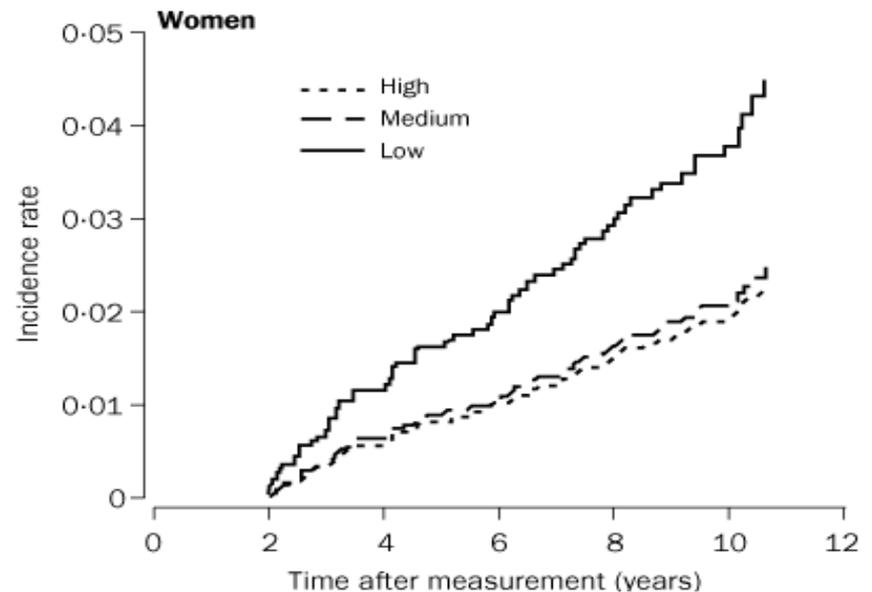
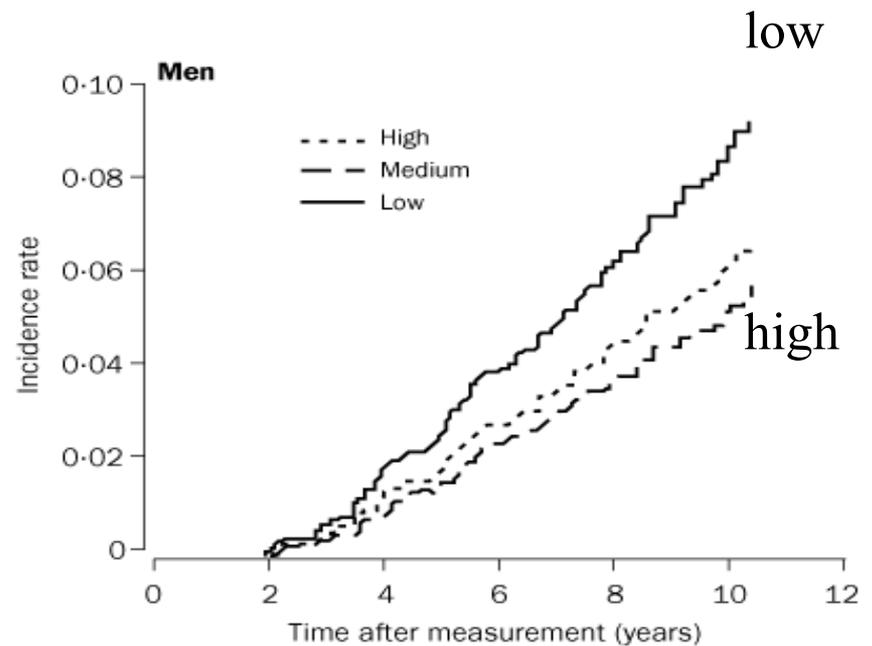


Соотношение между эффектором и мишенью

Противоопухолевое действие НК-клеток
в исследовании населения

- 3625 жителей Японии
- 1986 - 1990 гг.
- Деятельность НК против К562,
- Перспективное наблюдение за средней заболеваемостью раком в течение 11 лет

Lancet 356: 1795; 2000



Как NK клетки распознают опухолевые клетки?

Гипотеза распознавания «потери своего»

Как распознать иностранную подводную лодку
K.Kärre, Иммунологические обзоры 1997; 155: 5-9.

How to recognize a foreign submarine
K.Kärre, Immunological Reviews 1997; 155:5-9

Как распознать иностранную подводную лодку
К.Кärre, Immunological Reviews 1997; 155: 5-9

Подводная лодка вблизи Стокгольма



Тайна подводной лодки «холодной войны».

1982 год. Швеция. Так называемая «подводная лодка» в водах архипелага.

Запись, сделанная во время подводного наблюдения шведскими военными 12 октября 1982 года, усилила подозрения о том, что советские войска вторглись в шведские воды.

Какая из систем наблюдения за подводными лодками лучше?

- Местные рыбаки получают толстую книгу с тысячами страниц и фотографиями всех подводных лодок мира.
- Когда вы видите подводную лодку, которая находится в книге:

Позвоните в морскую охрану

Трудно, отнимает много времени

- Местные рыбаки получают одну страницу с фотографиями трех шведских подводных лодок.
- Когда вы видите что-то странное в воде, и оно выглядит как один из трех объектов:

Не звоните в морскую охрану

Быстро и эффективно

НК и гипотеза К.Кärge «распознавания своего»

Экспрессия МНС I для защиты против НК-клеточно-опосредованного лизиса: НК-клетки всегда проверяют ткани с нормальной экспрессией МНС I. Поскольку молекулы I класса экспрессируются всеми тканями, цитотоксичная активность НК-клеток обычно ингибируется.

НК-клетки активируются, когда они находят клетки с пониженной регуляцией или мутировавшими МНС I, и лизируют клетки-мишени.

Эта функция НК-клеток важна, потому что определенные вирусы способны снижать регуляцию МНС I в инфицированных ими клетках, защищая себя от обнаружения цитотоксичными Т-клетками.

Некоторые опухоли также способны уменьшать МНС I-экспрессию, их распознавание и лизис – основа «естественного убийства».

МНС: Основной комплекс гистосовместимости = HLA-антигены

Распознавание своего

НК-клетка

ингибиторный рецептор

Inhibitory Receptor

Self-MHC-I

Activatory Receptor

Target Cell

активационный рецептор

клетка-мишень

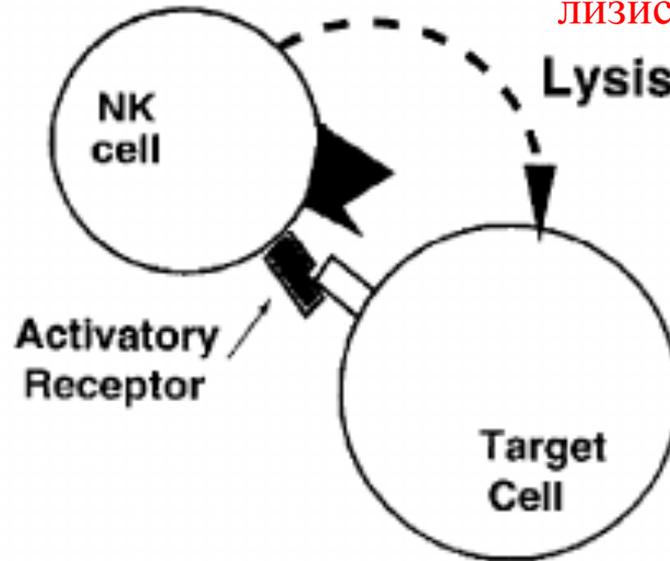
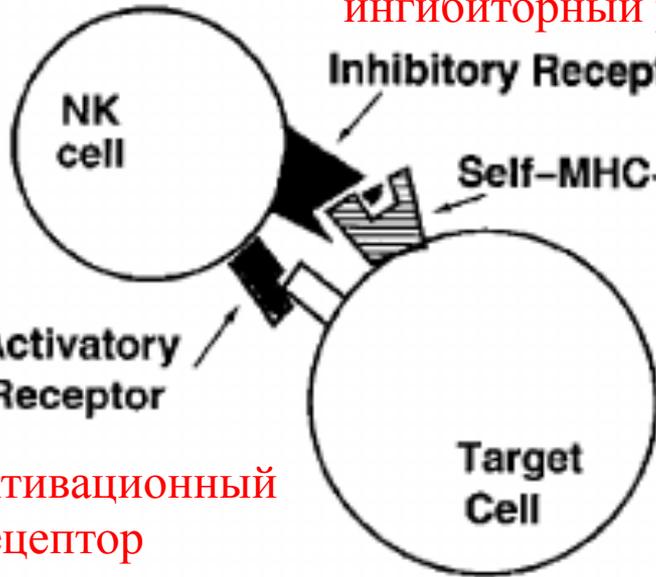
ЛИЗИС

Lysis

NK cell

Activatory Receptor

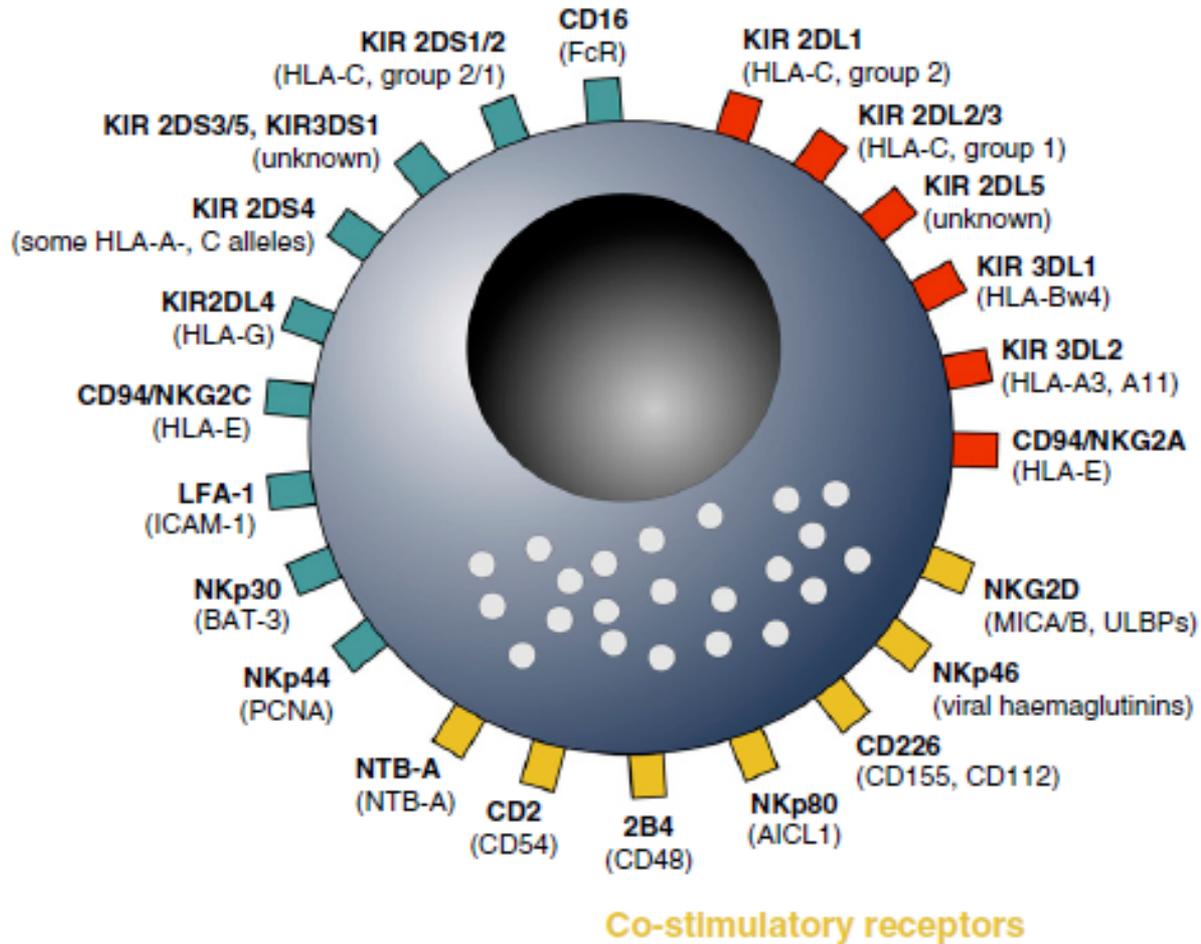
Target Cell



Рецепторы НК-клеток

Activatory Receptors

Inhibitory Receptors



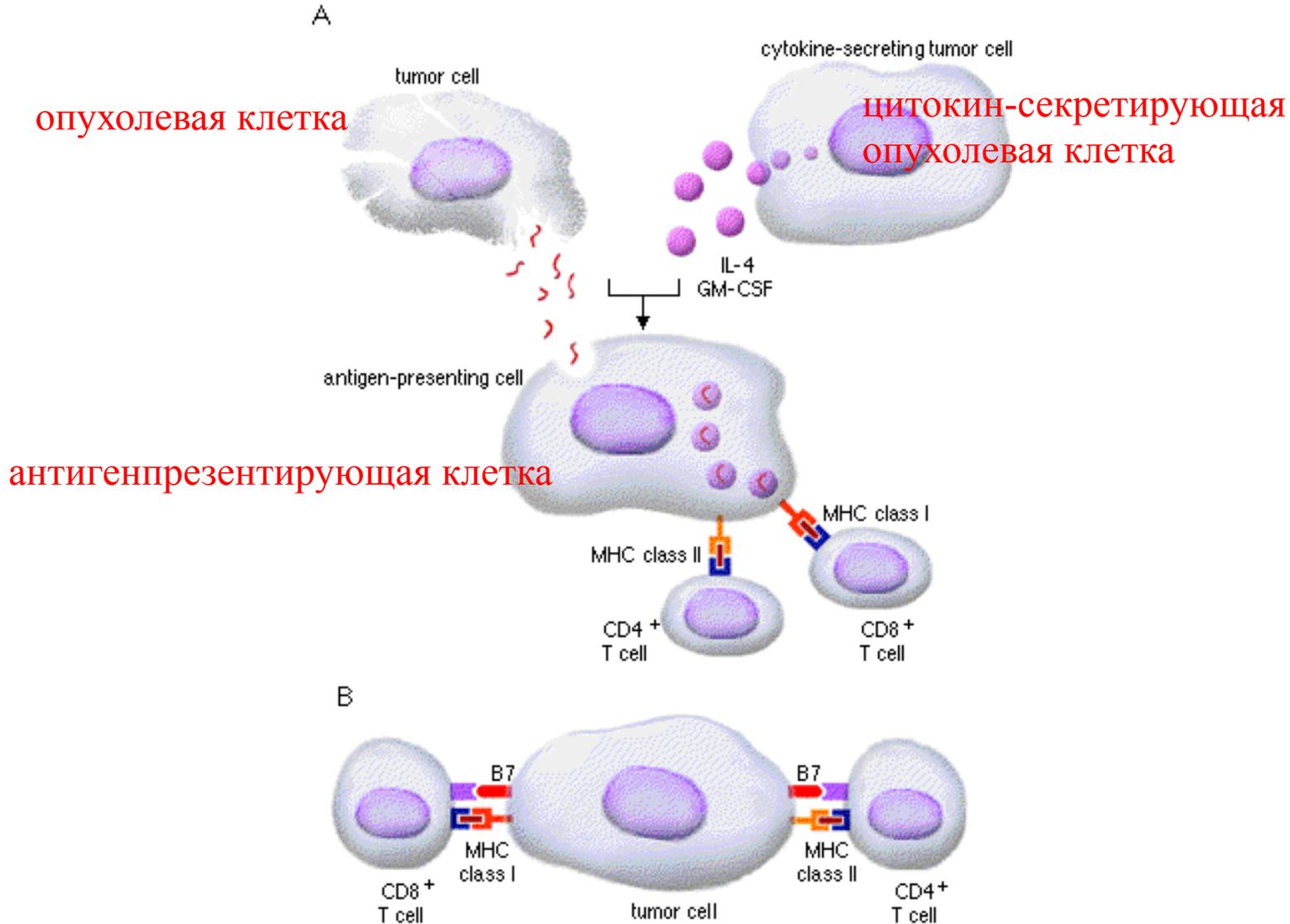
Handgretinger, R. et al., Использование натуральных клеток-киллеров для лечения лейкемии. BLOOD 2016; 127: 3341.

Handgretinger, R. et al., Exploitation of natural killer cells for the treatment of leukemia. BLOOD 2016; 127: 3341.

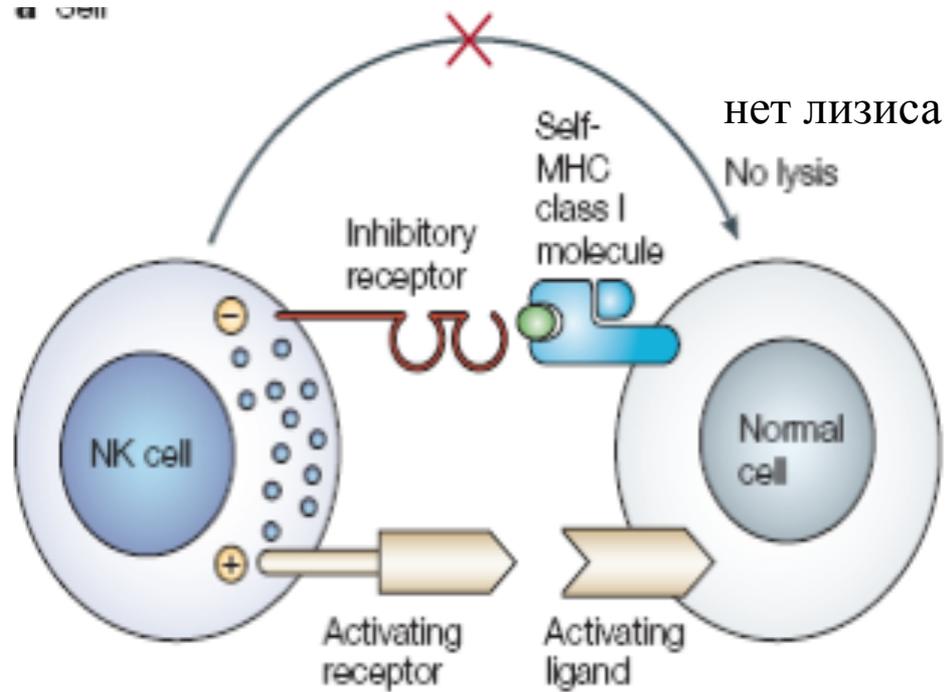
Как распознать иностранную подводную лодку

К.Кärre, Immunological Reviews 1997; 155: 5-9

Позвоните в морской департамент



НК-клетки имеют ингибирующие рецепторы, которые распознают антигены HLA класса I
Не звоните в морской департамент

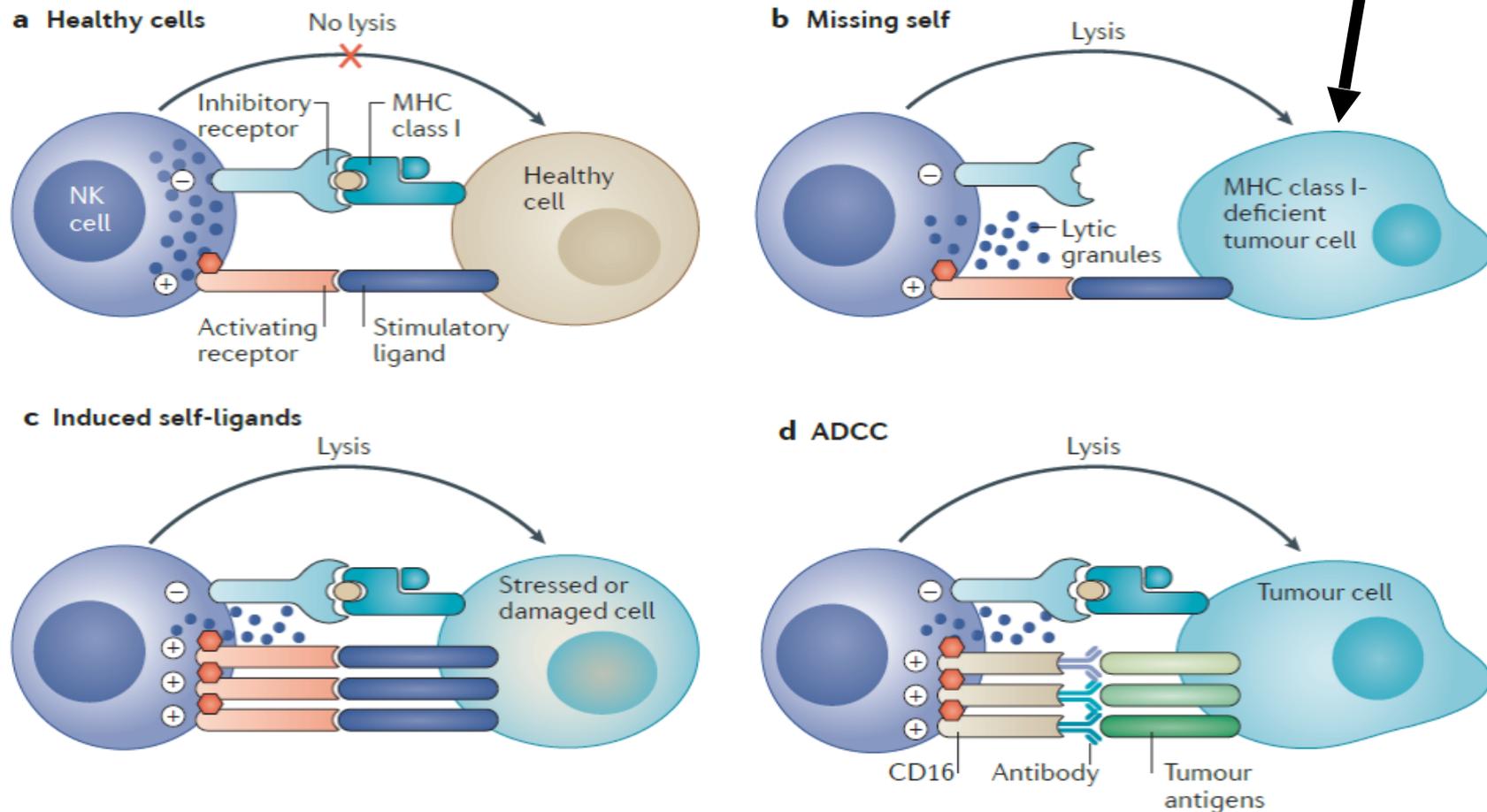


активирующие рецепторы

активирующие лиганды

НК-клеточная опосредованная регуляция гибели опухоли

K562

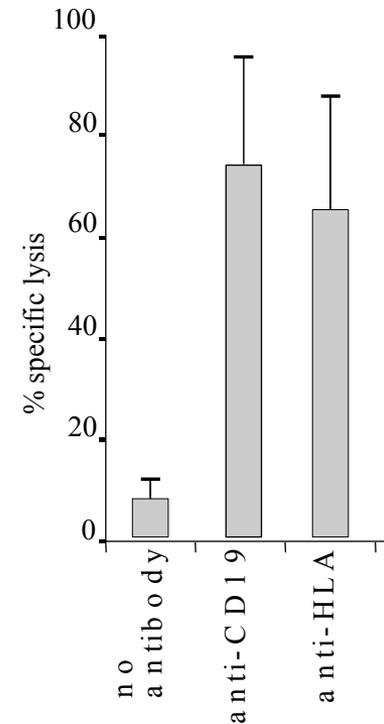
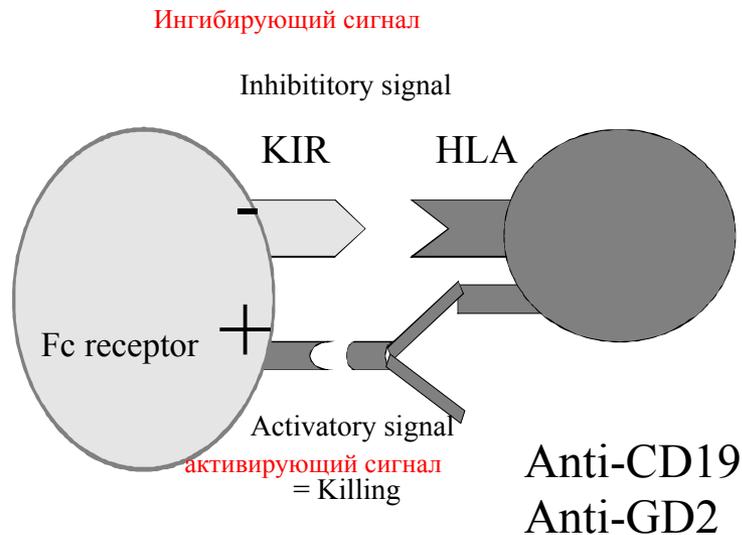


- a - здоровая клетка, нет лизиса, ингибирующие рецепторы, активирующие рецепторы, стимуляторные лиганды;
- b - отсутствуют лизирующие гранулы, лизис;
- c - самоиндуцирование лигандов стресс или повреждение клетки, лизис;
- d - ADCC опухолевая клетка, опухолевый агент, антитело.

Морван М.Г., Ланье Л.Л. NK-клетки и рак: можете ли вы научить клетки врожденного иммунитета новым привычкам? Nature Reviews Cancer 2016; 16: 7-19 .

Morvan MG., Lanier LL. NK cells and cancer: can you teach innate cells new tricks? Nature Reviews Cancer 2016; 16: 7-19

ADCC против ALL-Blasts преодолевает ингибирование KIR



Lang, P., Handgretinger R с соавт .:

Химерное антитело CD19 опосредует цитотоксическую активность против лейкемических бластов. Бласты с эффекторными клетками у детей с истощенными аллотрансплантатами Т-клеток. BLOOD 15: 3982, 2004.

Lang , P., Handgretinger R et al.:

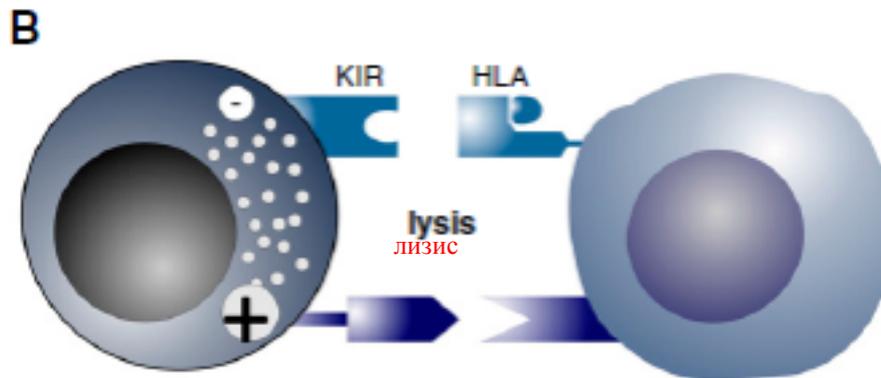
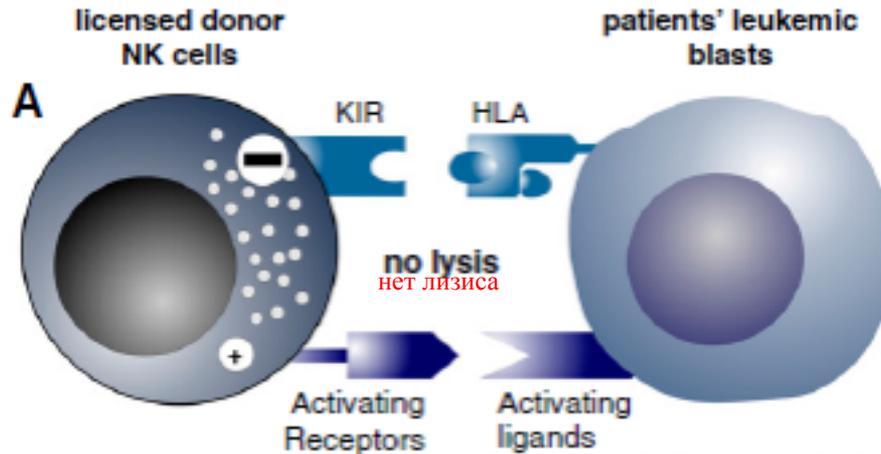
Chimeric CD19 antibody mediates cytotoxic activity against leukemic Blasts with effector cells from pediatric patients who received T-cell depleted allografts. Blood 15: 3982, 2004.

Аллореактивные НК-клетки в контексте аллогенной трансплантации стволовых клеток (лейкемии)

Неаллореактивные

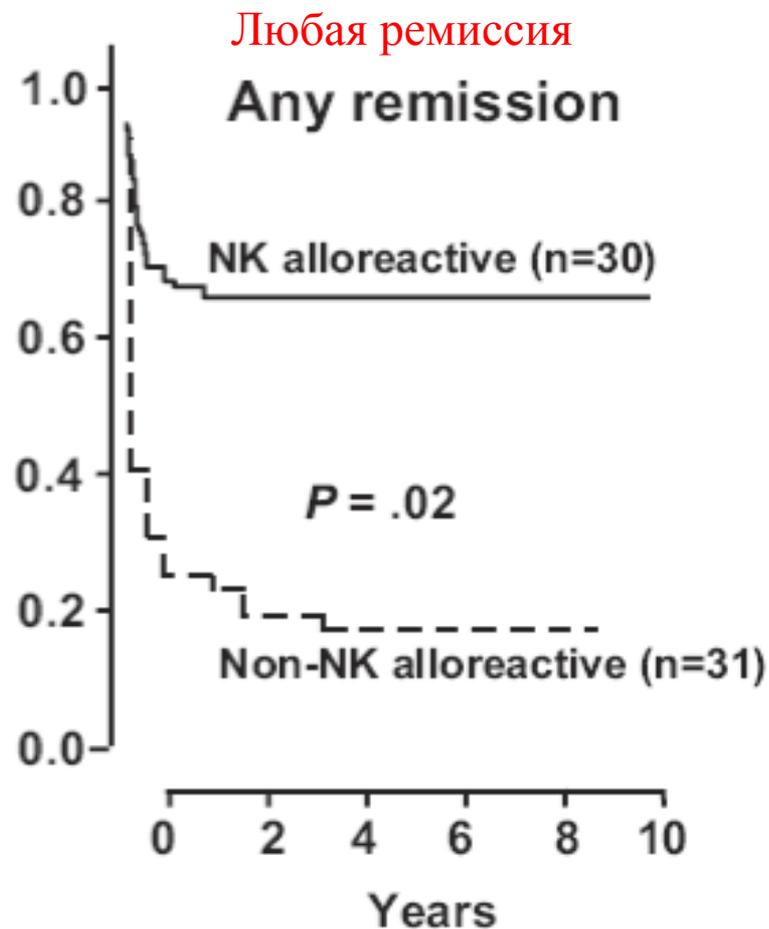
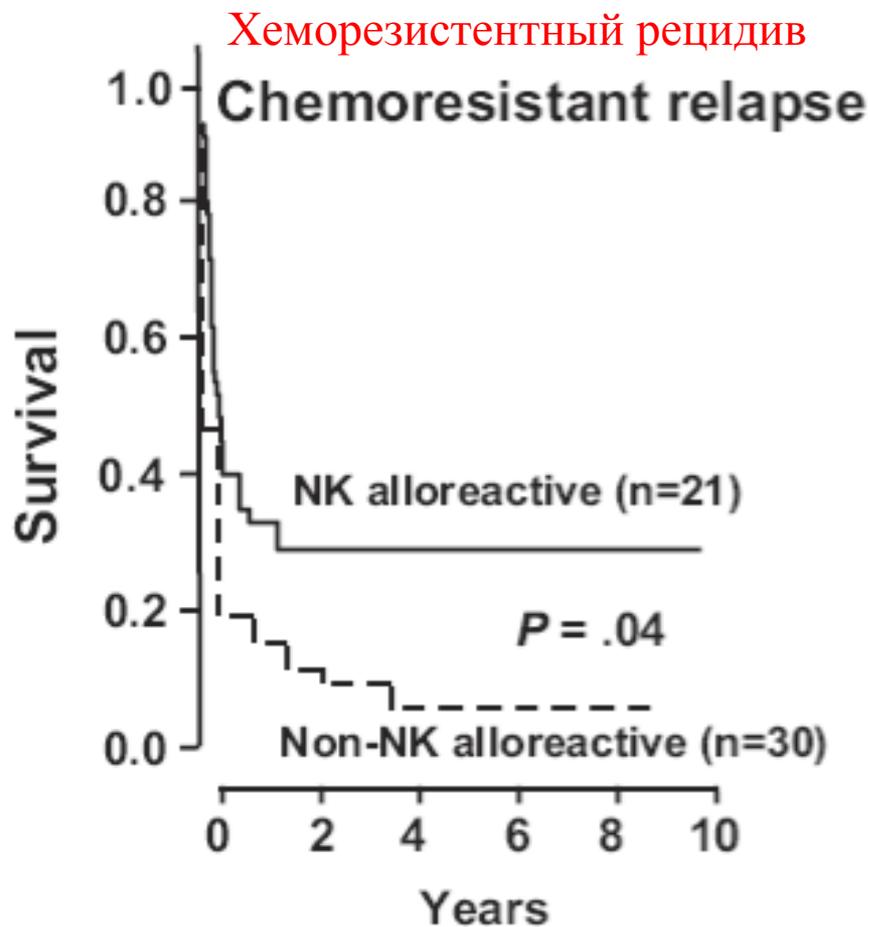
Лицензированные донорские НК-клетки

Лейкемические бласты пациента

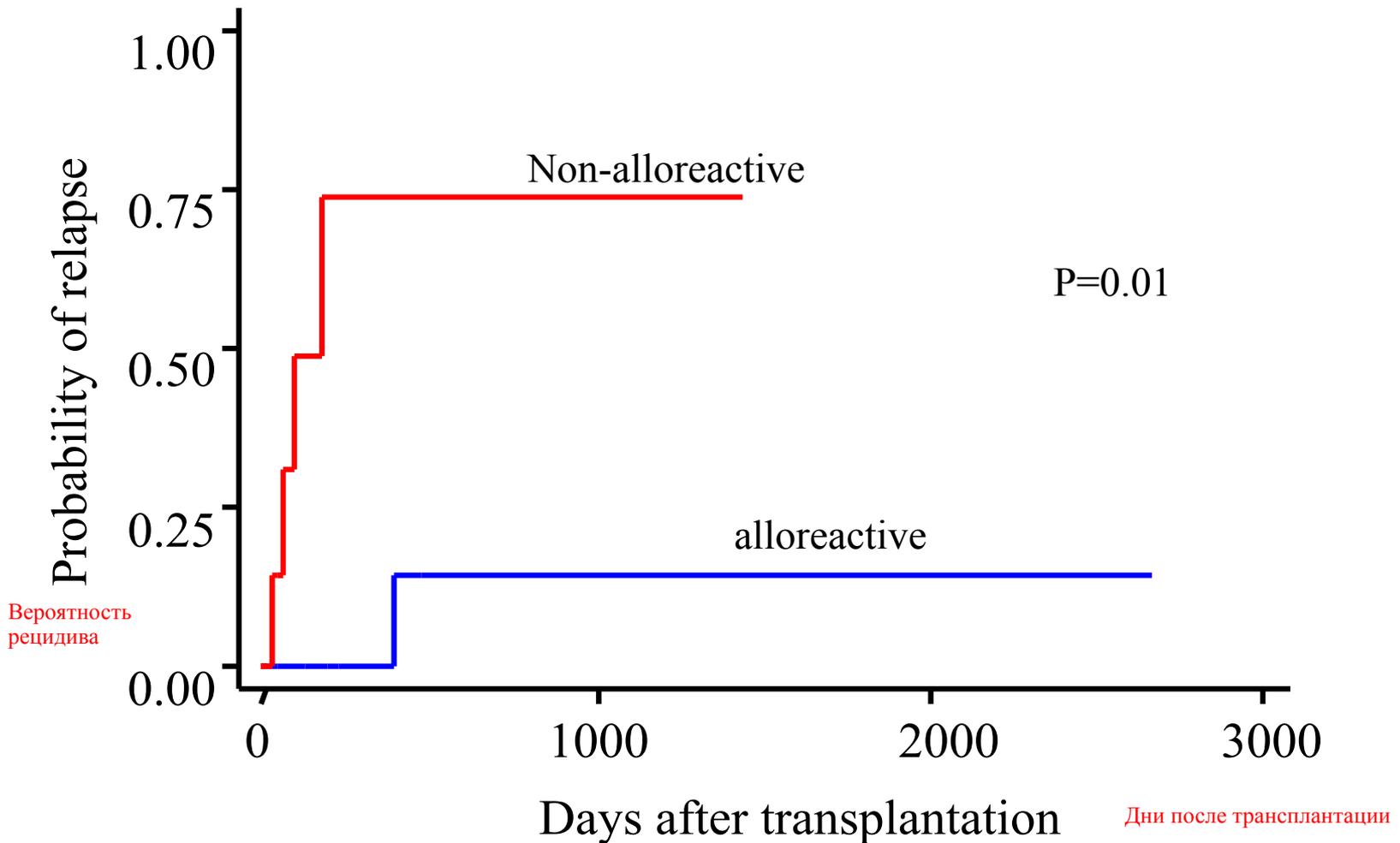


Аллореактивные

Важная роль аллореактивности НК у взрослых пациентов с АМЛ после гаплоидентичной трансплантации

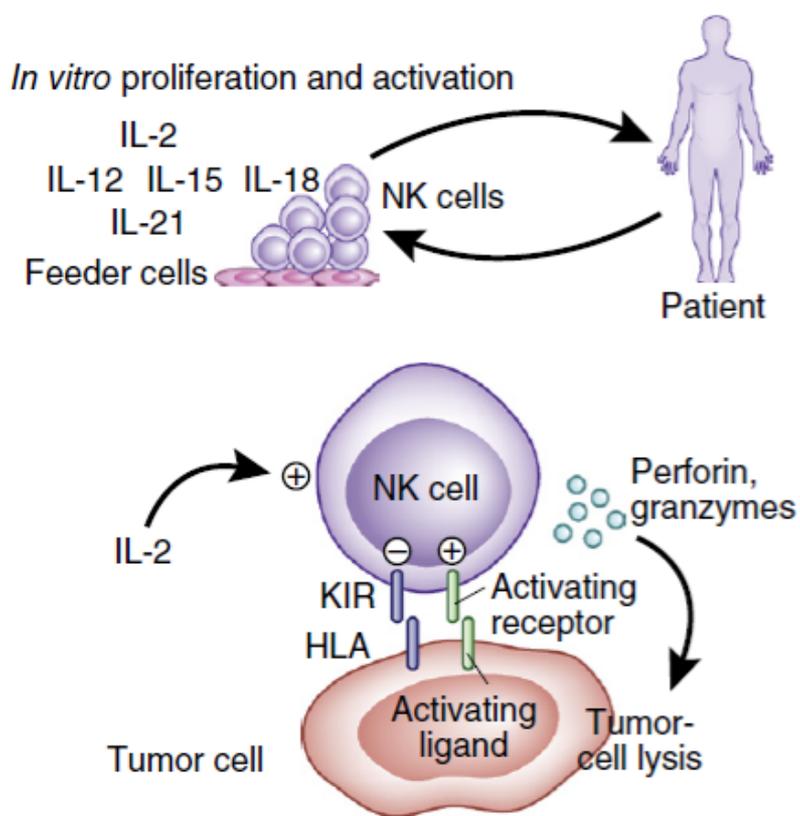


Риск рецидива у пациентов со ВСЕХ (n = 19) после гаплоидентичной трансплантации стволовых клеток CD34 + от NK-аллореактивного или NK-неаллореактивного донора

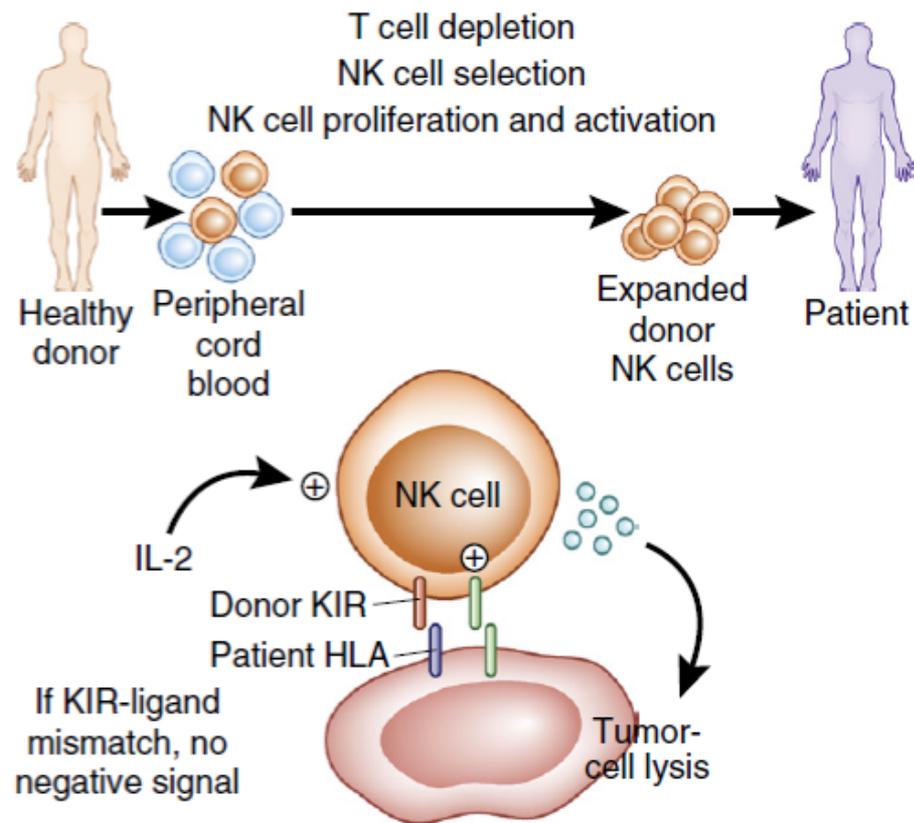


Адоптивный трансфер НК-клеток

a Autologous NK cell transfer



b Allogeneic NK cell transfer

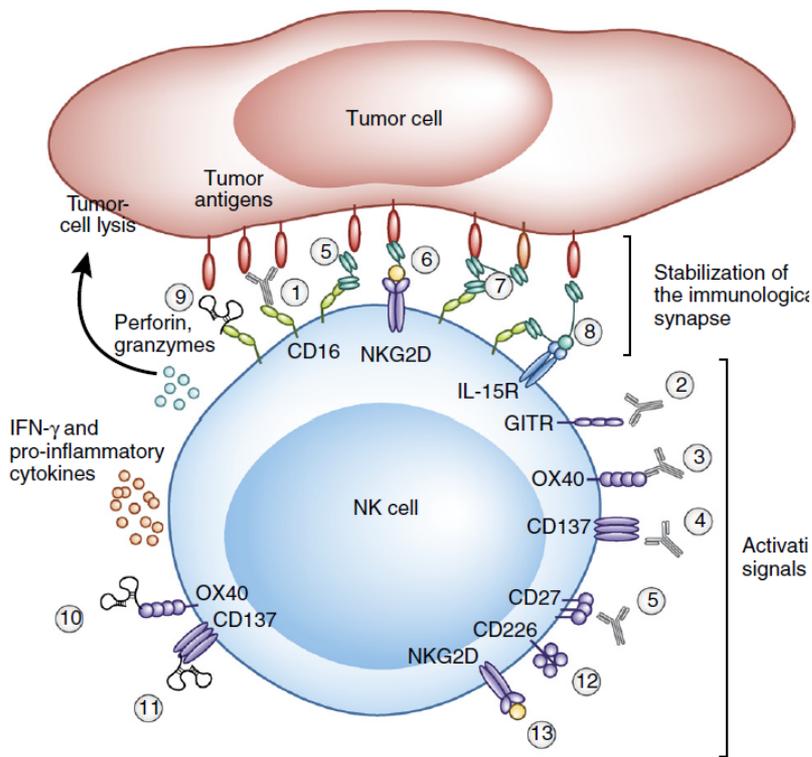


Надписи на рисунке:

А – трансфер аутологичных НК-клеток – пациент; НК-клетки; *in vitro* пролиферация и активация; питающие клетки; перфорин, гранзимы; НК-клетка; клетка опухоли; активирующие рецепторы; активационные лиганды; лизис опухолевой клетки.

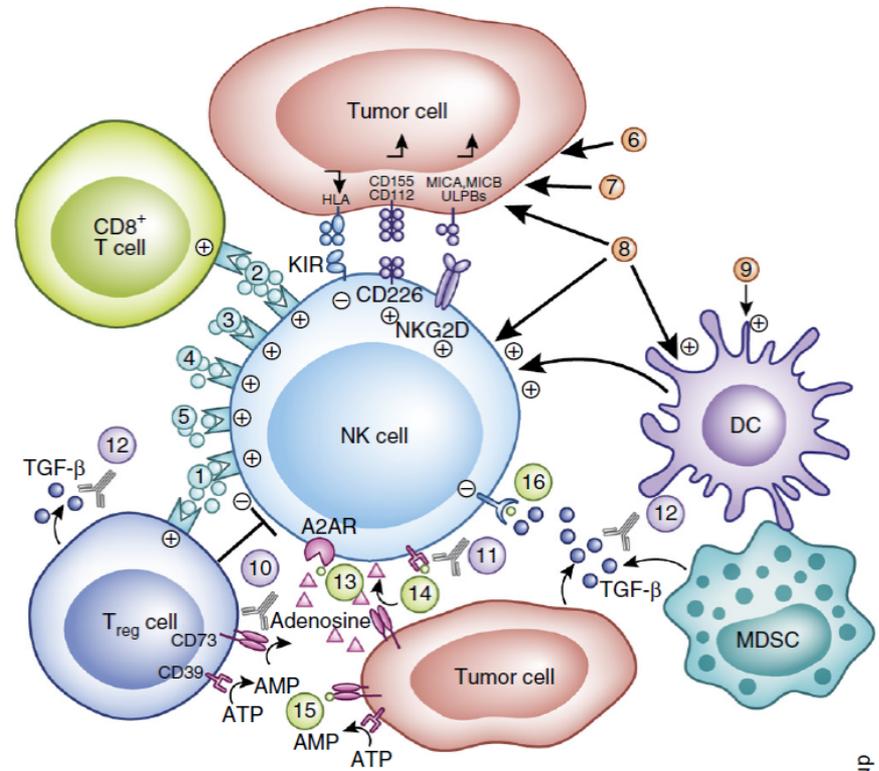
Б – трансфер аллогенных НК-клеток – Т-клеточное истощение; селекция НК-клеток; пролиферация и активация НК-клеток; здоровый донор, периферическая пуповинная кровь; развитые донорские клетки; пациент; нет негативного сигнала, если KIR-лиганды не соответствуют KIR-рецепторам.

Активация рецепторов НК-клеток



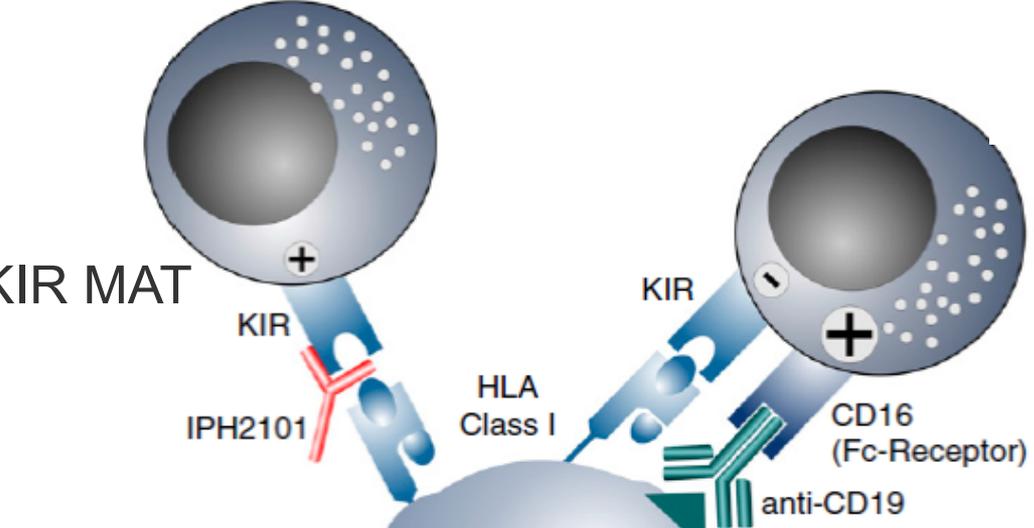
- | | |
|--|---|
| FDA approved | Preclinical development |
| ① Tumor-antigen-specific mAb | ⑤ BiKE |
| Clinical trials | ⑥ NKG2D ligand-antitumor Fv fusion |
| ② mAb to GITR (TRX518) | ⑦ TriKE that binds two different tumor antigens |
| ③ mAb to OX40 (MEDI6469, MEDI6383, MOXR0916) | ⑧ TriKE that incorporates IL-15 |
| ④ mAb to CD137 (urelumab, PFZ-05082566) | ⑨ Bispecific aptamer |
| ⑤ mAb to CD27 (varlilumab) | ⑩ OX40 agonistic aptamer |
| | ⑪ CD137 agonistic aptamer |
| | Not developed yet |
| | ⑫ CD226 agonist |
| | ⑬ Soluble activating NKG2D ligand |

Микроокружение как цель

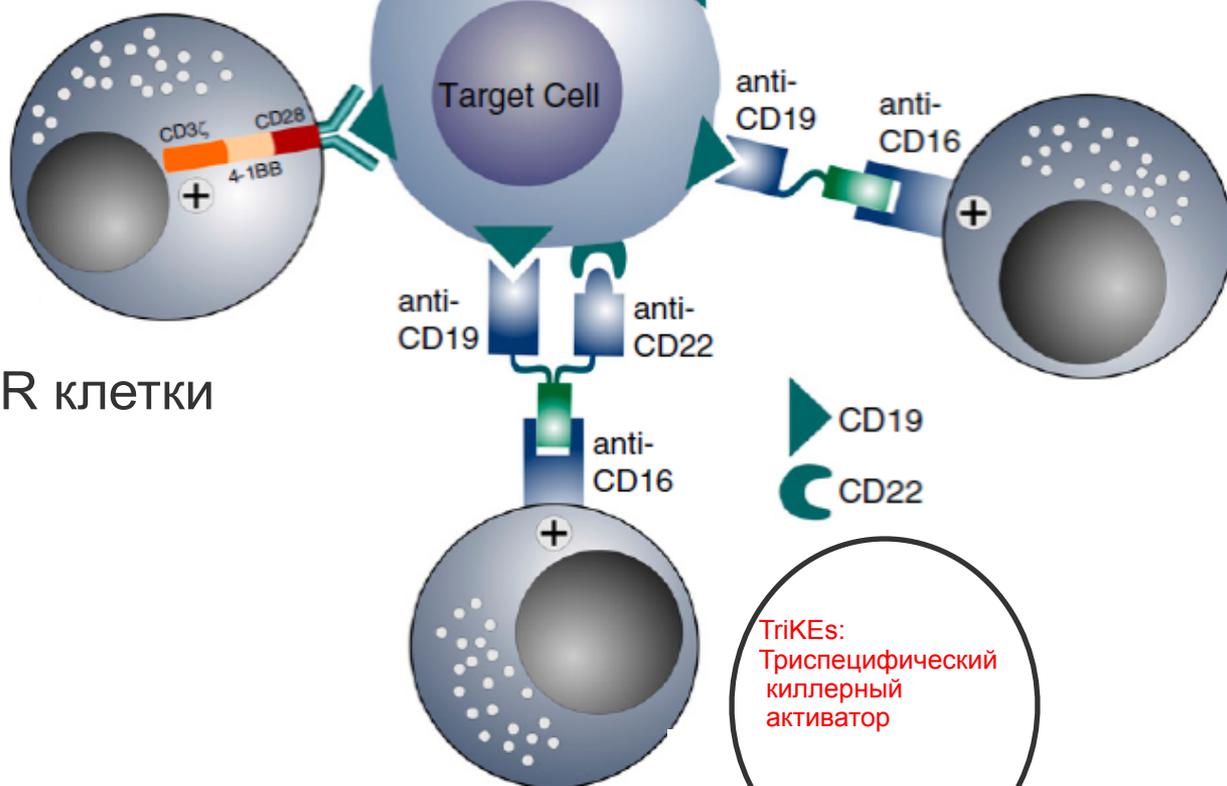


- | | |
|--------------------------|--|
| Activating cytokines | Chemotherapeutics |
| ① IL-2 | ⑥ Genotoxic drugs (demethylating agents, histone deacetylases) |
| ② IL-15 | ⑦ Proteasome inhibitors (bortezomib) |
| ③ IL-12 | ⑧ IMiDs (lenalidomide, pomalidomide) |
| ④ IL-18 | ⑨ Imatinib |
| ⑤ IL-21 | |
| Blocking antibodies | Small-molecule inhibitors |
| ⑩ mAb to CD73 | ⑬ A2A receptor antagonist (PBF-509) |
| ⑪ mAb to CD39 | ⑭ CD39 inhibitor (POM-1) |
| ⑫ TGF-β-neutralizing mAb | ⑮ CD73 inhibitor (APCP) |
| | ⑯ TGF-β receptor inhibitor |

Анти-KIR МАТ

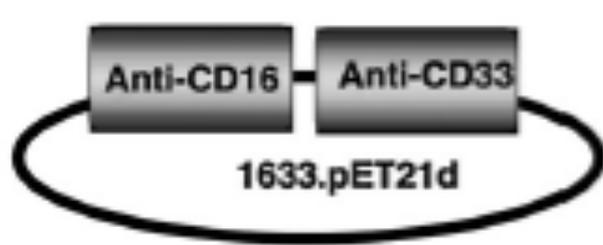


NK CAR клетки



BiKEs:
Биспецифический
киллерный
активатор

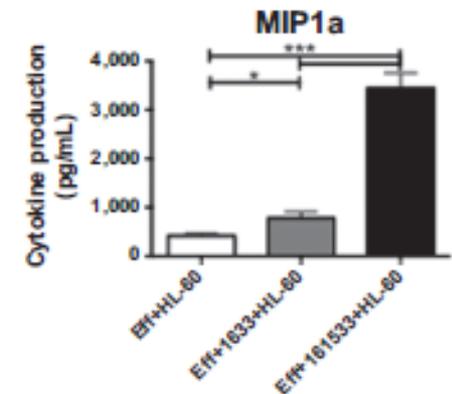
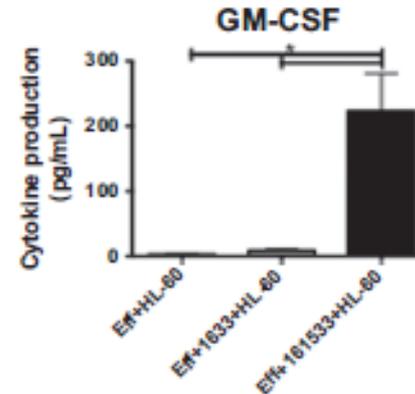
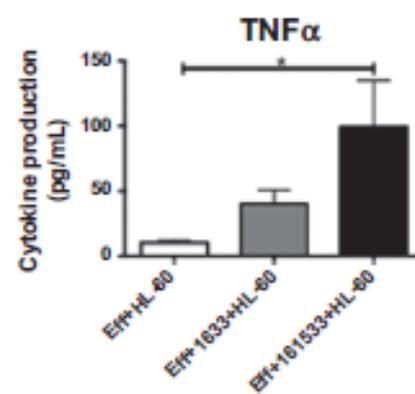
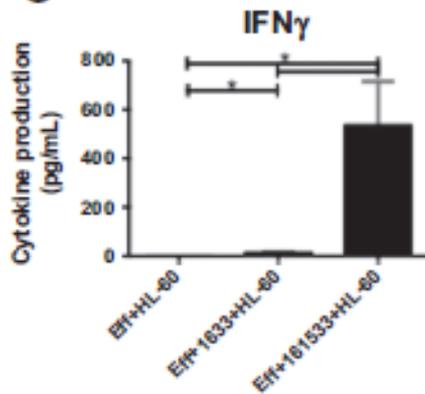
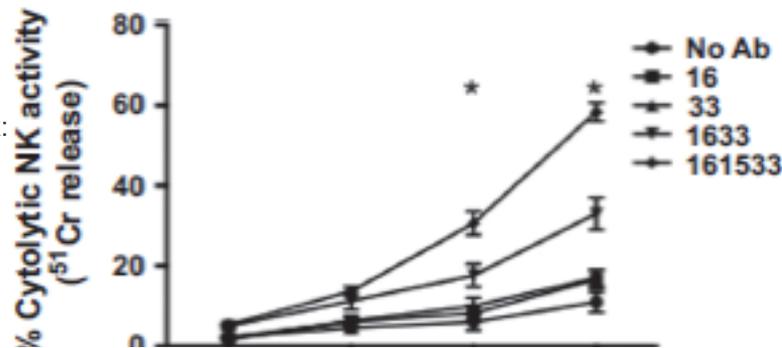
TriKEs:
Триспецифический
киллерный
активатор



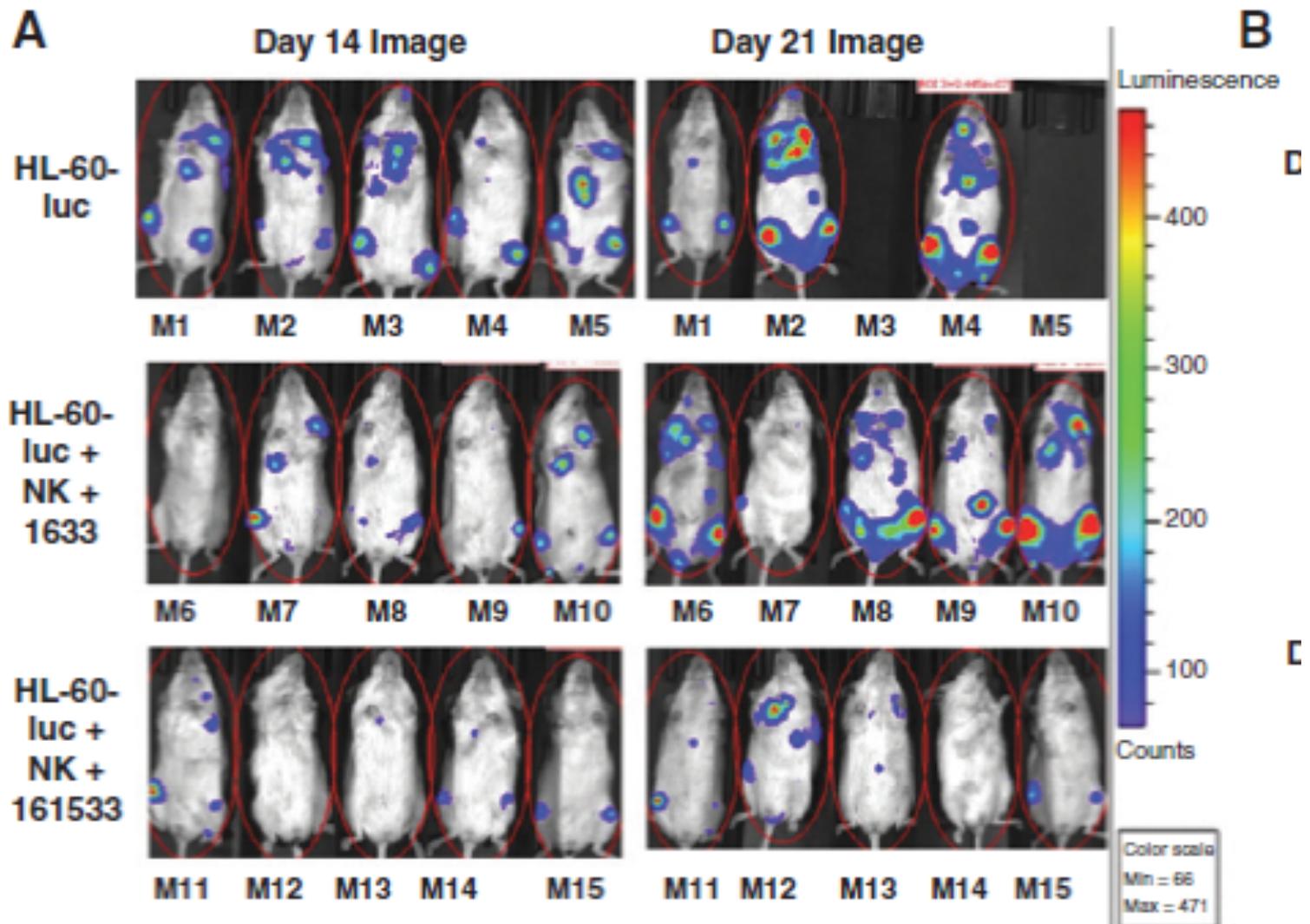
Вертикаль на большом графике:
Цитолитическая активность НК-клеток

Вертикаль на маленьких графиках:
выработка цитокинов

HL-60 Targets



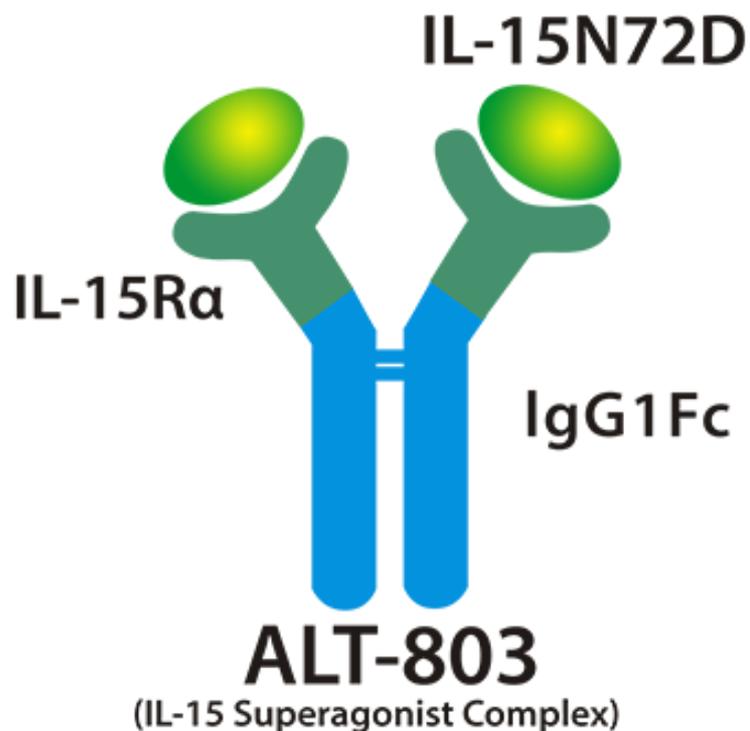
Vallera D. et al., Трижды специфический активатор киллеров (TriKe) IL15 делает естественные клетки-киллеры специфичными для CD33+мишень, одновременно стимулируя сохранение их эффективности, размножение in vivo и расширение функций. Clin Cancer Res. 2016; 22: 3440.



Vallera D. et al., Трижды специфический активатор киллеров (TriKe) IL15 делает естественные клетки-киллеры специфичными для CD33+мишень, одновременно стимулируя сохранение их эффективности, размножение *in vivo* и расширение функций.

Ким П.С. Et al., IL-15 / IL15R α Sushi-Fc (IL15SA / IL-15R α SU-Fc;ALT-803) заметно усиливает специфические субпопуляции NK и CD8 + T-клеток и опосредует их мощную противоопухолевая активность против карциномы толстой кишки у мышей. Oncotarget 2016; 13: 16130

Kim PS. Et al., IL-15 superagonist /IL15R α Sushi-Fc fusion complex (IL15SA/IL-15R α SU-Fc;ALT-803) markedly enhances specific subpopulations of NK and CD8+ T cells, and mediates Potent anti-tumor activity against murine and colon carcinomas. Oncotarget 2016; 13: 16130



IL15 комплекс суперагонистов

ALT-803

ClinicalTrials.gov

Try our beta test site

IMPORTANT: Listing of a study on this site does not reflect endorsement by the National Institutes of Health. Talk with a trusted healthcare professional before volunteering for a study. Read more...

19 studies found for: ALT-803

[Modify this search](#) | [How to Use Search Results](#)

List

By Topic

On Map

Search Details

Show Display Options

Download

Subscribe to RSS

Only show open studies

Rank Status Study

1	Recruiting	<u>A Phase 1 Study of the Clinical and Immunologic Effects of ALT-803 in Patients With Advanced Solid Tumors</u> Condition: Advanced Solid Tumors Intervention: Biological: ALT-803
2	Recruiting	<u>Proof of Principle Study of Pulse Dosing of IL-15 to Deplete the Reservoir in HIV Infected People</u> Conditions: HIV; Stable ART Intervention: Drug: ALT-803
3	Not yet recruiting	<u>QUILT-3.033: Haplo NK With SQ ALT-803 for Adults With Relapsed or Refractory AML</u> Condition: Acute Myeloid Leukemia

На сайте ClinicalTrials.gov можно найти материалы, касающиеся изучения иммунологической активности ALT-803 как на стадии клинических, так и доклинических исследований.

Table 1 The most promising approaches for targeting NK cells

Therapy		Development stage	Advantages	Drawbacks	Ref.	Trial
Adoptive transfer	Autologous NK cells	Clinical trial (or FDA approved if part of HSCT)	Safe	Low efficacy	40,41	UMIN00007527
	Allogeneic NK cells	Clinical trial (or FDA approved if part of HSCT)	Highly effective against some malignancies if KIR-ligand mismatch	Substantial depletion of T cells needed to avoid GVHD	26,43	NCT00187096
	NK cell lines	Clinical trials	Easy to expand; transfer safe after irradiation	Low efficacy if not modified	35	NCT00900809; NCT02465957
	CAR NK cells	Clinical trials	Redirect NK cell activity against a specific tumor antigen	Difficulty to manufacture large numbers of CAR NK cells	49,50	NCT0099513; NCT01974479
Cytokines	IL-2	FDA approved	Repeated injections well tolerated at low doses	Toxicity at high doses (capillary leak syndrome); activation of T _{reg} cells	55	
	IL-15	Clinical trials	Activates both NK cells and CD8 ⁺ T cells without activating T _{reg} cells	Potential toxicities: fever, thrombocytopenia and hypotension	60	NCT01385423; NCT01875601
	IL-15SA-IL-15R α -Su-Fc (ALT-803)	Clinical trial	More potent NK cell activator than IL-15	Potential toxicities remain to be evaluated	62	NCT02099539
Anti-cancer agents	IMiDs and imatinib mesylate	FDA approved	Direct anti-tumor effect combined with immunostimulatory effects		65	
	Bortezomib and genotoxic agents	FDA approved	Direct cytotoxicity toward tumor cells, Sensitize tumor cell to NK cell killing	Might have immunosuppressive effects and inhibit NK cell function	65	
	GSK3 inhibitors	Clinical trial	Direct anti-tumor effect; enhances NK cell killing activity	Might promote T _{reg} cell function	68	NCT01632306 NCT01287520 NCT01214603
Targeting immune-suppressive pathways	Depletion of T _{reg} cells (IL2DT)	Clinical trial	Improves efficacy of haploidentical NK cell transfer, Safe (short half-life of IL2DT)		56	NCT01106950
	Inhibitors of the TGF- β pathway	Clinical trial and FDA approved (not for cancer)	Broad effect on immune responses not restricted to NK cells	Effects of TGF- β blockade on tumor progression not well defined	24	NCT02304419
	Inhibitors of the adenosinergic pathway	Clinical trial	Safe; broad effect on immune responses not restricted to NK cells		138	NCT02403193
Agonists of NK cell activating receptors	Tumor-targeting mAbs	FDA approved	Redirect NK cell activity against a specific tumor antigen	Possible on-target, off-tumor effect	80	
	BiKEs and TriKEs	Pre-clinical development	Re-direct NK cell activity against a specific tumor antigen	Possible on-target, off-tumor effect	93	
	mAbs to CD137	Clinical trial	Stimulate NK cell ADCC; also stimulate T cells	Conflicting reports on the stimulation of human NK cells; severe liver toxicity at high doses	108	NCT02420938; NCR01775631; NCT01307267; NCT02110082
Checkpoint inhibition	mAbs to KIRs (IPH2101 (1-7F9) and lirilumab (IPH2102, BMS-986015))	Clinical trials	Safe; can be used in any patient without KIR genotyping	Low efficacy; needs combination	112,113	NCT02399917; NCT01592370; NCT02252263; NCT02599649; NCT02481297; NCT01687387; NCT01714739; NCT01750580
	mAbs: to NKG2A (monalizumab (IPH2201))	Clinical trials	Can be used in any patient without KIR genotyping		117	NCT02459301; NCT02331875; NCT02557516; NCT02643550; NCT02671435

Наиболее перспективные подходы к таргетингу НК-клетками

Адоптивный перенос

Аутологичные НК-клетки

Терапия

Этап разработки

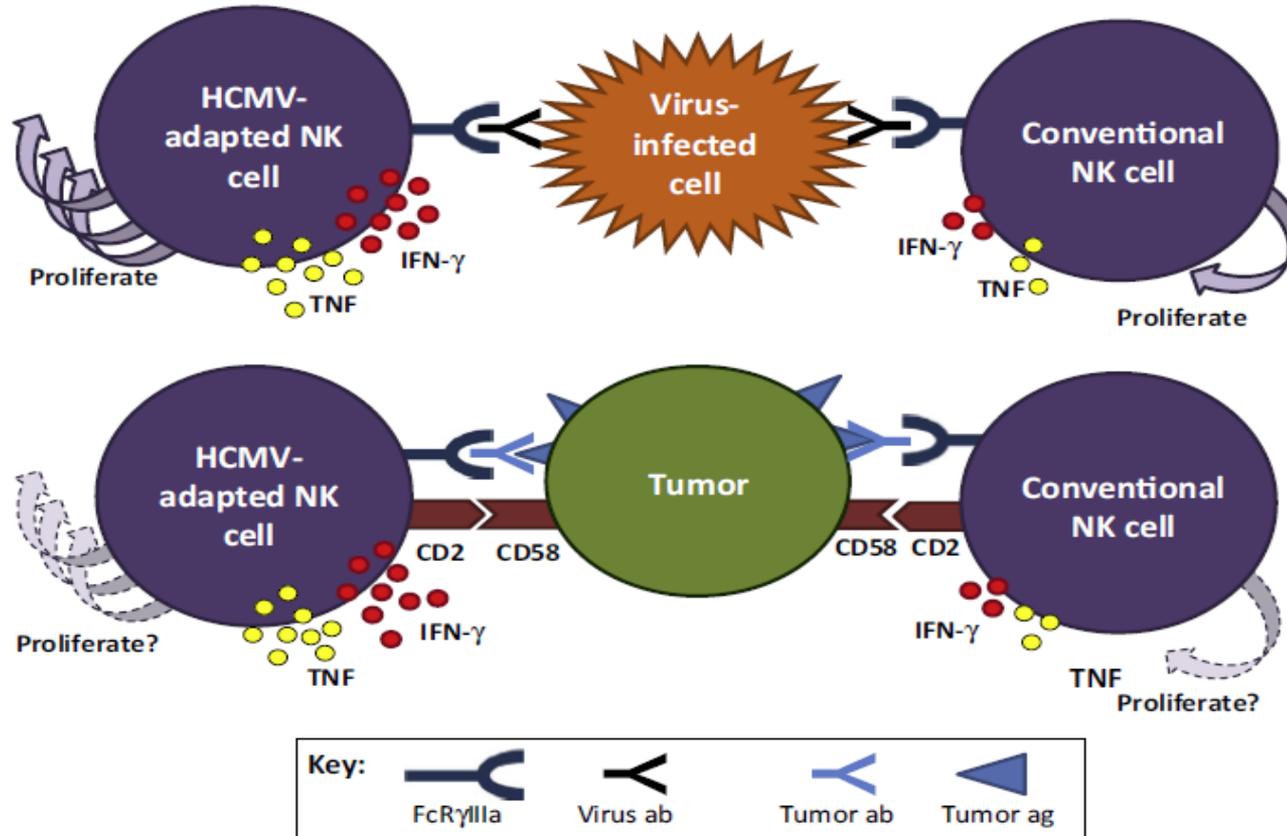
Преимущества

Недостатки

Ref

Исследование

Память НК-клеток

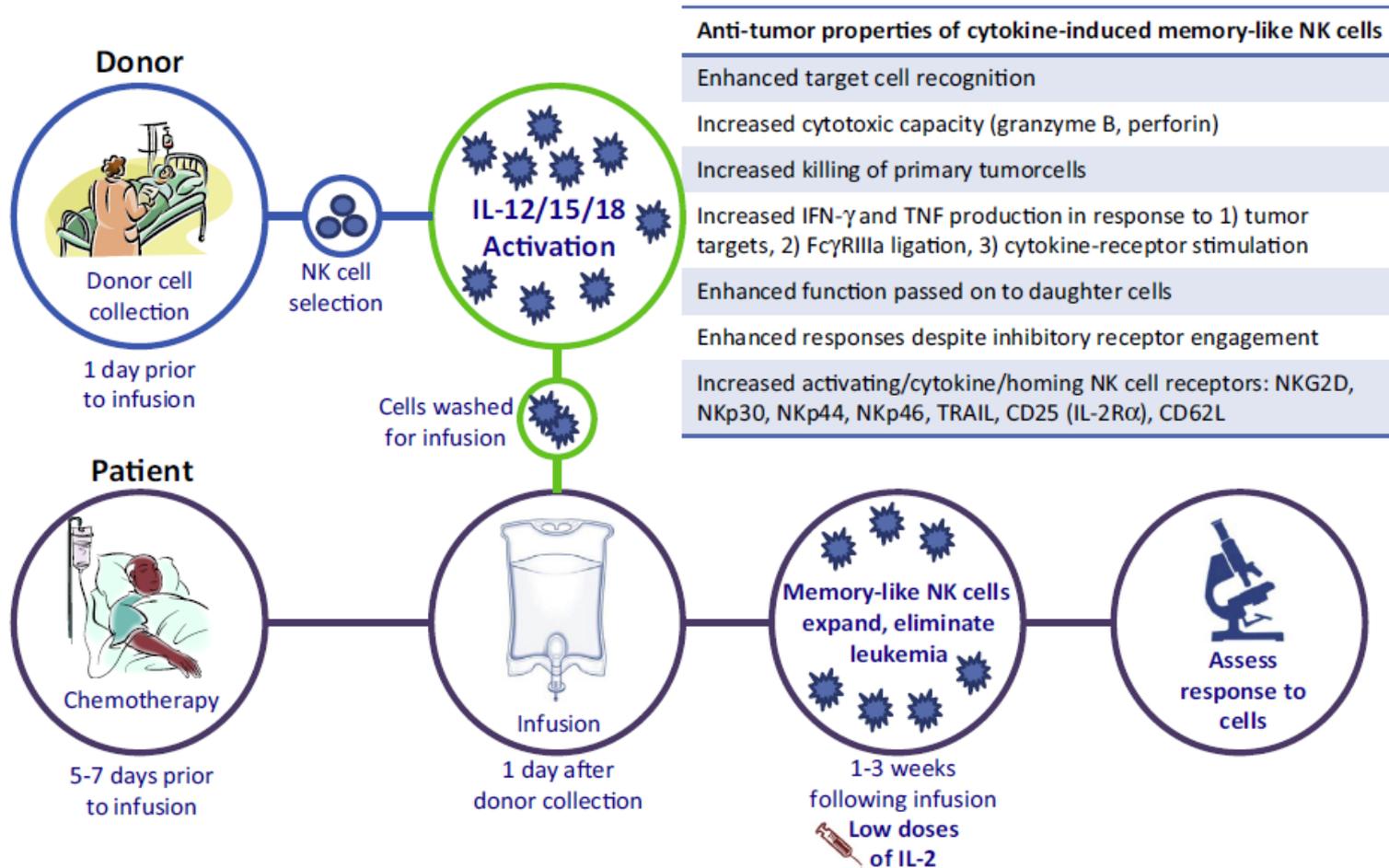


Пролиферация – HCMV-адаптированные НК-клетки – опухоль – конвенциональные НК-клетки – вирус-инфицированная клетка

Fehniger TA, Cooper MA. Harnessing NK Cell Memory for Cancer Immunotherapy. Trends in Immunology 2016; 37: 877.

Pal M., ...Handgretinger R. et al., Tumor-priming converts NK cells to memory-like NK cells. Oncoimmunology 2017, in press.

Трансфер аллореактивных NK-клеток памяти в беспересадоочую среду



Адоптивный трансфер аллогенных НК-подобных клеток памяти в беспересадочную среду

Выборка клинических характеристик доступных пациентов, получавших цитокин-индуцированные НК-подобные клетки памяти. Все пациенты были кавказцами. Сообщается о несоответствии КИР-лиганда у донора NR клеток и вектора пациента. Пациент 012 был повторно зачислен на более высокую дозу как пациент 019. UPN – Универсальный номер пациента; WHO – Всемирная Организация Здоровья (ВОЗ); DLT - дозолимитирующая токсичность; М – мужской, F женский; IWG (Интернациональная Рабочая Группа); TF-PD - отказ от лечения из-за прогрессирования заболевания; CR – полная ремиссия; MLFS – морфологический статус «свободный от лейкемии»; CRi – полная ремиссия с неполным восстановлением анализов крови; MDS – миелодиспластический синдром. Столбцы: номер 2 – уровень дозы, номер 3 – пол, номер 4 – диагноз ВОЗ, номер 5 – число предыдущих курсов терапии; номер - процент бластов перед лечением; номер 7 - КИР-лиганд несоответствие; номер 8 – ответ ИРГ; номер 9 – дозолимитирующая токсичность; номер 10 - РТПХ

Table 1. Summary of clinical characteristics of evaluable patients treated with cytokine-induced memory-like NK cells. All patients were Caucasian. KIR-ligand mismatch is reported in the NK cell donor versus patient vector. Patient 012 was reenrolled at a higher dose level as patient 019. UPN, universal patient number; WHO, World Health Or-

ganization; DLT, dose-limiting toxicity; M, male; F, female; IWG, International Working Group; TF-PD, treatment failure due to progressive disease; CR, complete remission; MLFS, morphologic leukemia-free state; CRi, CR with incomplete blood count recovery; MDS, myelodysplastic syndrome.

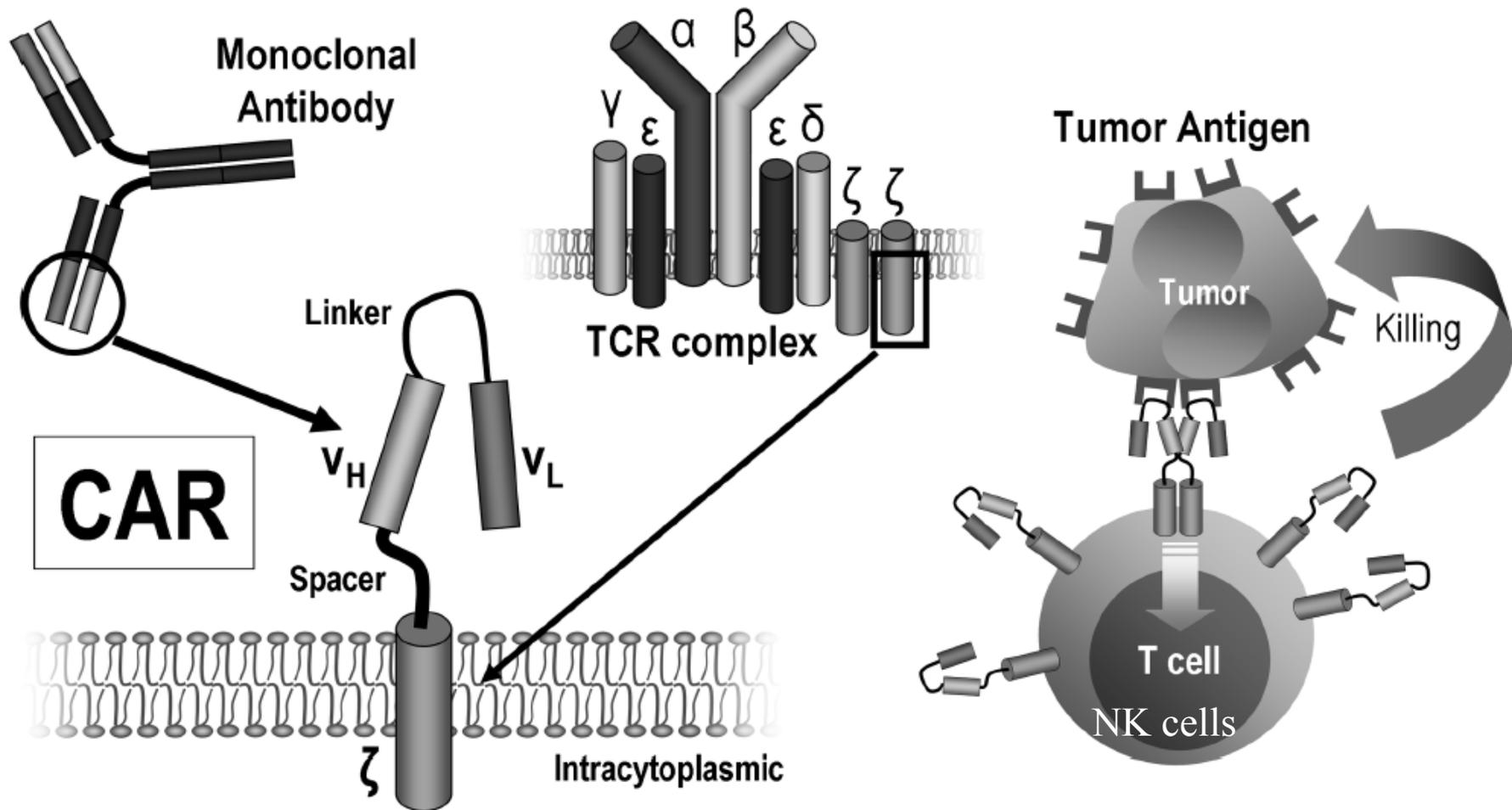
UPN	Dose level	Gender	Age (years)	WHO diagnosis	Number of previous therapies	Pretreatment BM blast (%)	KIR-ligand mismatch	IWG response	DLT	GVHD
001	1	M	73	M2	2	16	Yes	TF-PD	No	No
006	1	M	70	M0	3	28	Yes	TF-PD	No	No
007	1	M	77	M0	1	47	Yes	CR	No	No
008	2	M	76	t-AML	3	17	Yes	TF-PD	No	No
009	2	F	73	M1	3	80	No	MLFS	No	No
012	2	F	71	M5	3	15	Yes	CR	No	No
017	3	M	64	t-AML	3	69	Yes	TF-PD	No	No
019	3	F	71	M5	4	15	Yes	CR	No	No
020	3	M	60	MDS-AML	1	13	Yes	CRi	No	No

TABLE 1 | Phenotypes and NK cells recognition pattern of cancer stem cells and related tumors.

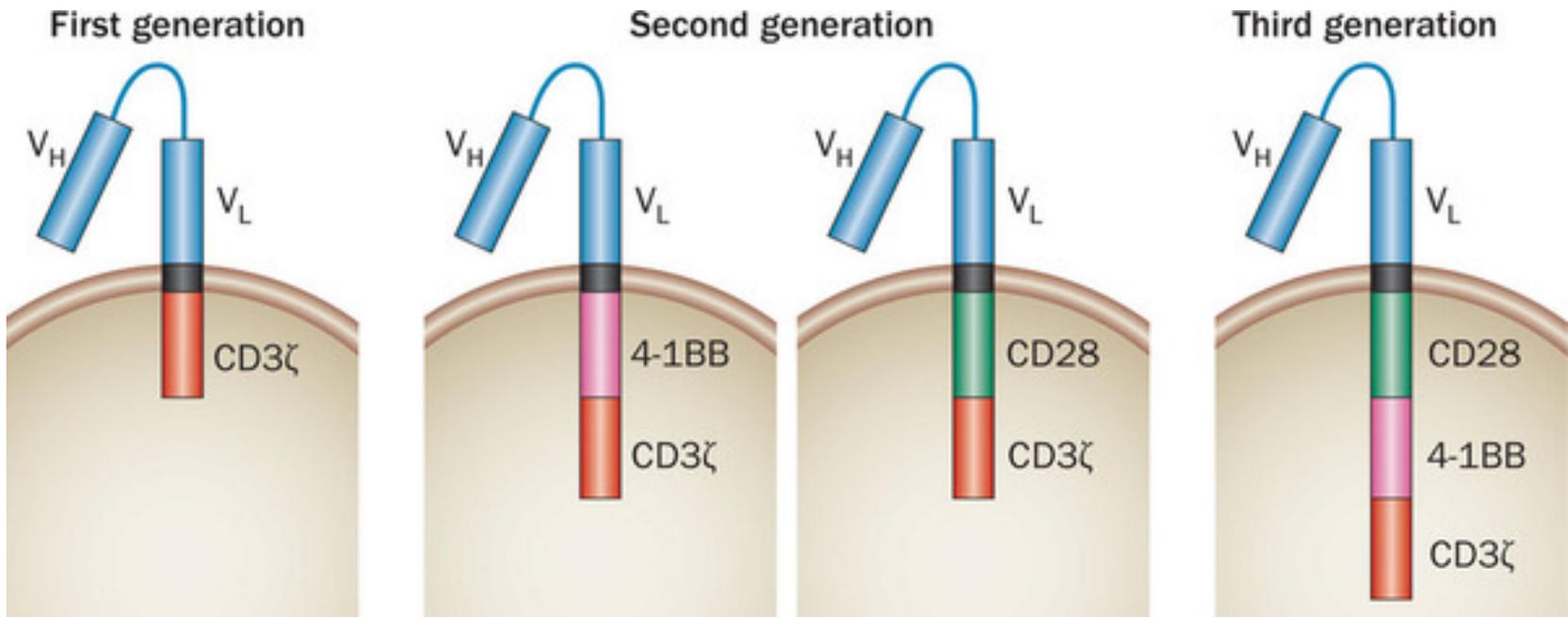
Human tumor	Type	PVR	NECTIN-2	MICA	MICB	ULBPs	NCR ligands	HLA	NK cell recognition
Colorectal carcinoma (39)	Tumor	NC	NC	NC	NC	NC	+/- NKp30L NKp44L	+ HLA-A, -B, -C	+/-
	Cancer stem cells	NC	NC	NC	NC	NC	+ NKp30L NKp44L	+/- HLA-A, -B, -C	++
Melanoma (40)	Tumor	+/-	+/-	+/-	ND	+/- ULBP2	ND	+ HLA-A, -B, -C	+
	Cancer stem cells	+/-	+/-	+/-	ND	+/- ULBP3	ND	- HLA-A, -B, -C	+
Glioblastoma (41)	Tumor	-	-	-	-	-	ND	+ HLA-E	+/-
	Cancer stem cells	+	+	+/-	+/-	+/-	ND	+ HLA-A, -B, -C HLA-E	++
Pancreatic adenocarcinoma (42)	Tumor	ND	ND	-	-	ND	-	NC	+/-
	Cancer stem cells	ND	ND	+	+	ND	-	NC	++
Sarcoma Ewing (42)	Tumor	ND	ND	-	-	ND	-	NC	+/-
	Cancer stem cells	ND	ND	+	+	ND	-	NC	++
Liposarcoma (42)	Tumor	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+/-
	Cancer stem cells	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	++
Breast carcinoma (42)	Tumor	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+/-
	Cancer stem cells	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	++
Glioblastoma (42)	Tumor	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+/-
	Cancer stem cells	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	++

NC, no change between tumor and CSC; ND, not detected.

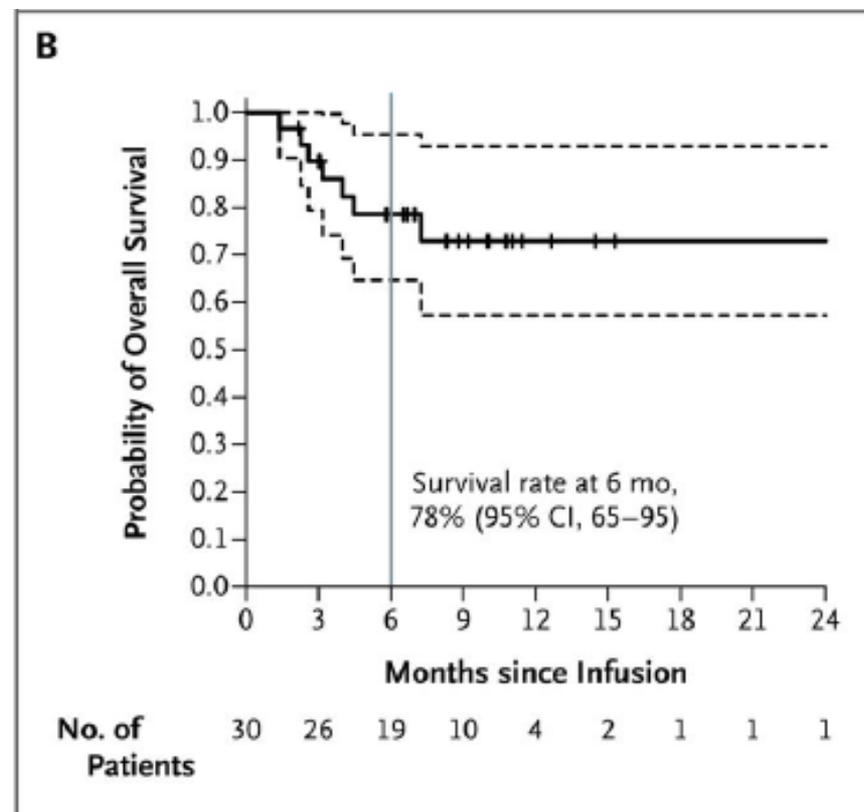
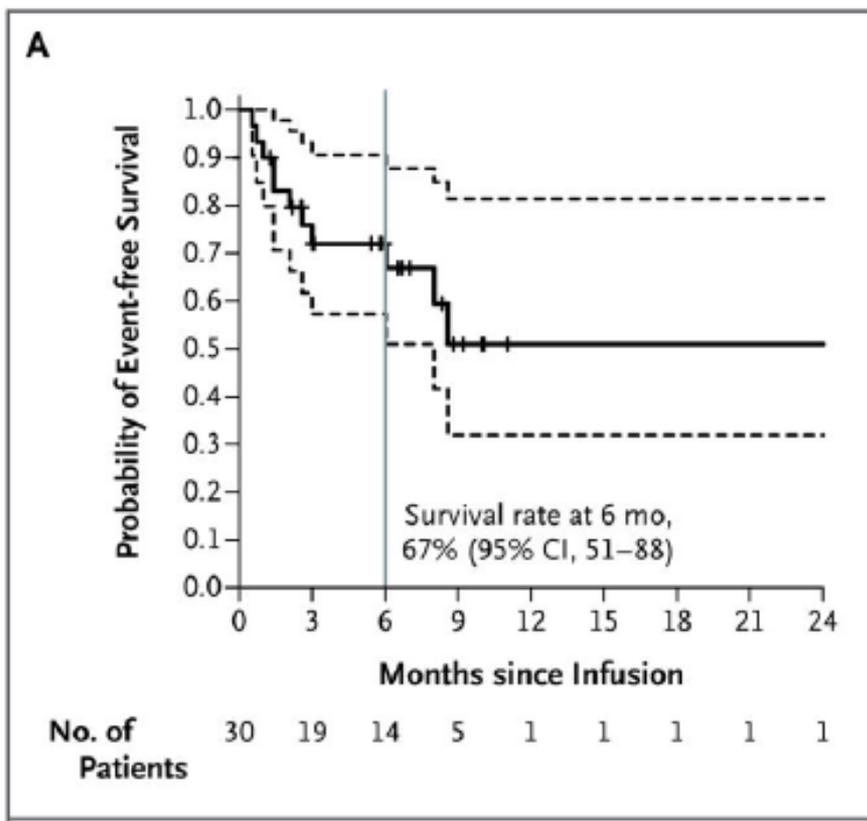
Химерные антигенные рецепторы (CAR) Т-клетки и NK-клетки



CARs



EFS и ОС и 6 месяцев у детей с хемореактивным pre-B ALL.



Графики:

А. Вертикаль: вероятность бессобытийной выживаемости. Горизонталь: месяцы после инфузии

В. Вертикаль: вероятность общей выживаемости. Горизонталь: месяцы после инфузии

Try our beta test site

IMPORTANT: Listing of a study on this site does not reflect endorsement by the National Institutes of Health. Talk with a trusted healthcare professional before volunteering for a study. [Read more...](#)

217 studies found for: CAR T-cells
[Modify this search](#) | [How to Use Search Results](#)

List

By Topic

On Map

Search Details

Show Display Options

Download

Subscribe to RSS

Only show open studies

Rank	Status	Study
1	Recruiting	<u>CD19-targeting CAR T Cells for B Cell Lymphoma</u> Condition: B Cell Lymphoma Intervention: Biological: CD19-targeting CAR T Cells infusion
2	Active, not recruiting	<u>CD19-targeting 3rd Generation CAR T Cells for Refractory B Cell Malignancy - a Phase I/IIa Trial.</u> Conditions: B Cell Lymphoma; B Cell Leukemia Intervention: Biological: Autologous 3rd generation CD19-targeting CAR T cells
3	Recruiting	<u>A Clinical Research of CAR T Cells Targeting EpCAM Positive Cancer</u> Conditions: Colon Cancer; Esophageal Carcinoma; Pancreatic Cancer; Prostate Cancer;

На сайте ClinicalTrials.gov можно найти материалы, касающиеся изучения иммунологической активности CAR-T клеток как на стадии клинических, так и доклинических исследований.

CAR для солидных опухолей?

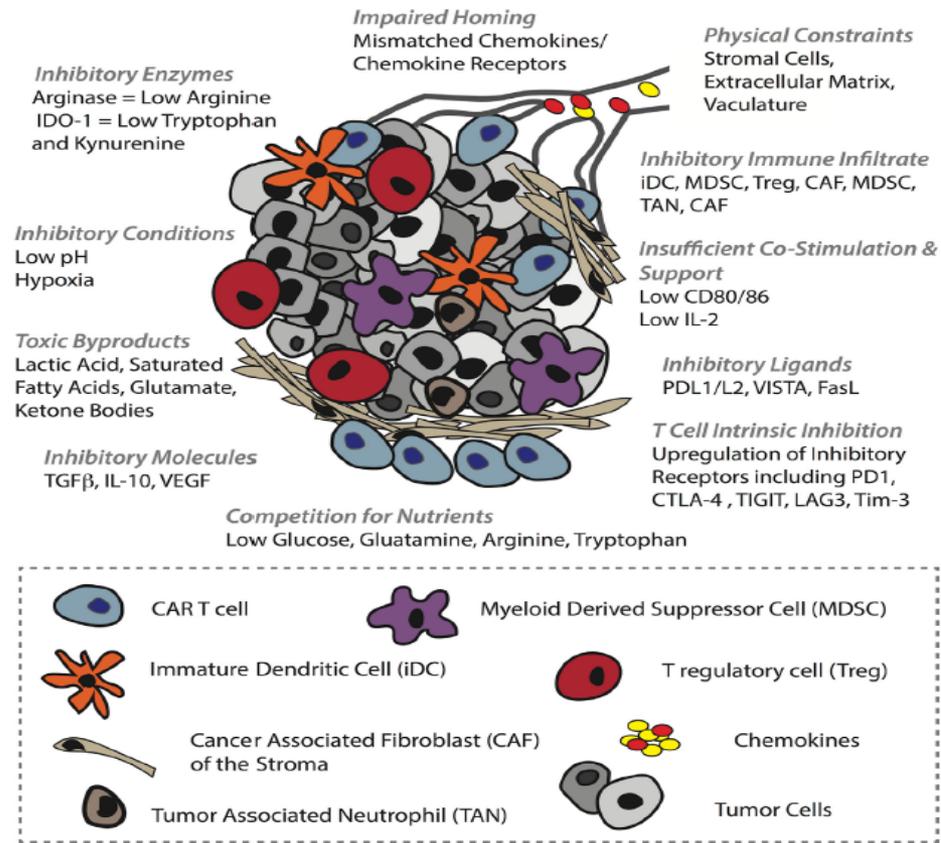


FIGURE 4 | Barriers in the solid tumor microenvironment (TME) that can hinder chimeric antigen receptor (CAR) T-cell activity.

На картинке: (слева-направо по кругу начиная с центра сверху) ослабление самонаведения некомплементарные хемокины/ рецепторы хемокинов – физические ограничители стромальные клетки, внеклеточная матрица (экстрацеллюлярный матрикс), сосудистая сеть – ингибиторы иммунных инфильтратов (далее сами названия) – недостаточная костимуляция и поддержка (далее сами названия) – ингибиторы лигандов (далее сами названия) – внутреннее ингибирование Т-клеток повышение регуляции ингибирующих рецепторов, включая (далее сами названия) – конкурирование за питательные вещества недостаток глюкозы, глутамина, аргинина, триптофана – ингибирующие молекулы (далее сами названия) – токсичные побочные продукты молочная кислота, насыщенные жирные кислоты, глутаматы, кетоновые тела – ингибирующие условия низкий pH, гипоксия – ингибирующие энзимы аргиназа=недостаток аргинина, IDO-1=недостаток триптофана и кинуренина .

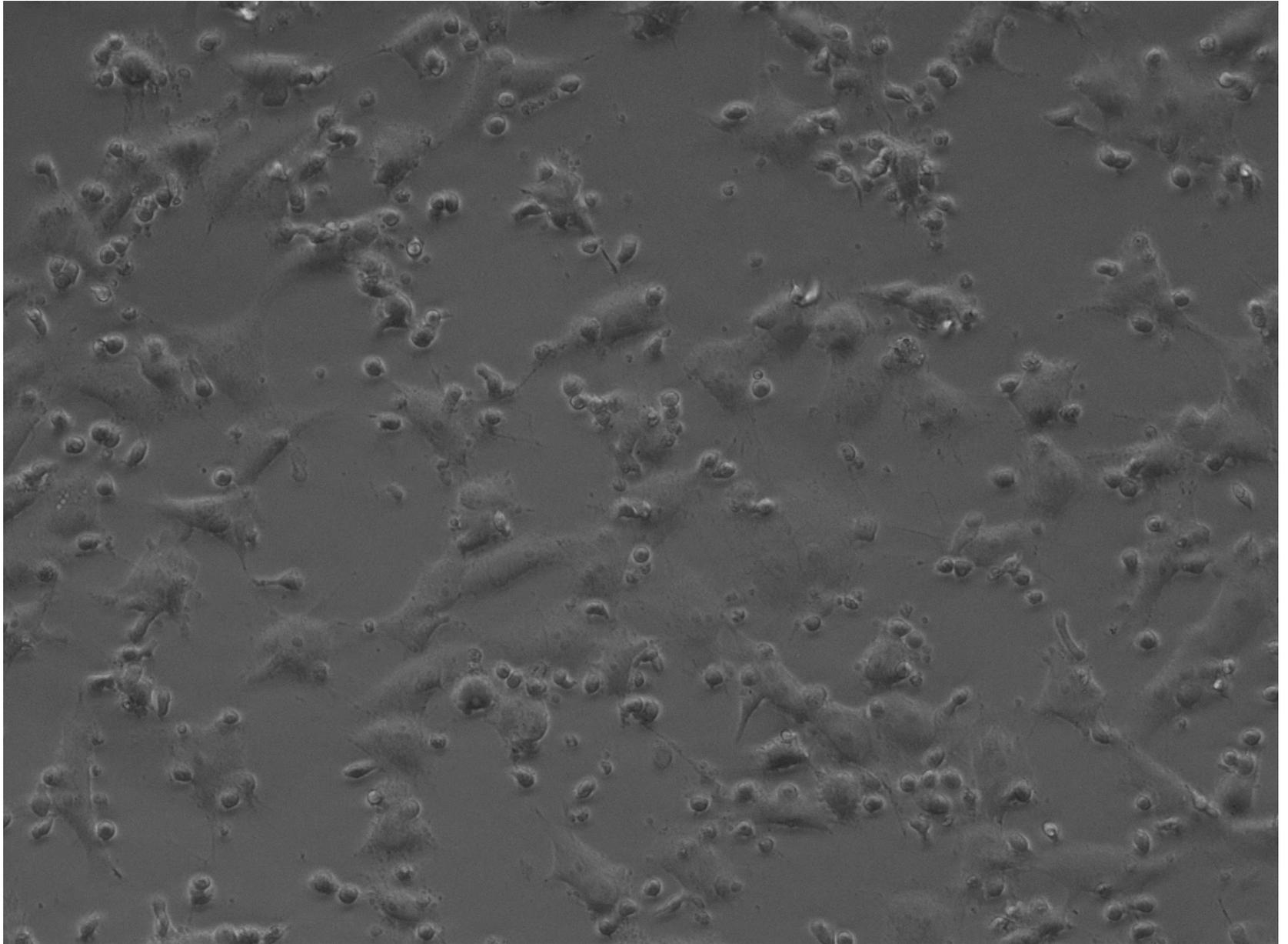
В нижнем квадрате: CAR T-клетки, супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC), незрелые дендритные клетки iDC, T-регуляторные клетки Treg, опухольассоциированные фибробласты стромы (CAF), хемокины, опухольассоциированные нейтрофилы (TAN), опухолевые клетки.

Ирвинг М. и др., Инжиниринг химерных антиген-рецепторных Т-клеток для внедрения в солидные опухоли: не забывайте об активации.

Горизонты иммунологии 2017; 8: Статья 267.

Irving M. et al., Engineering Chimeric Antigen Receptor T-Cells for Racing in Solid Tumors: Don't Forget the Fuel. *Frontiers in Immunology* 2017; 8: Article 267.

САР для солидных опухолей??



На рисунке:

A – опухоль-таргетированные CAR

B – самонаводящиеся рецепторы (например, CXCR2)

C – ферменты для проникновения сквозь строму (например, гепараназа)

D – анти-PD-L1 антитела

E – цитокины для самоподдержки и/или стимуляции адаптивного и врожденного иммунитета (например ИЛ-12 и ИЛ-15)

F – стимуляторы лигандов (например CD40L)

G – транспортеры (например для аминокислот или глюкозы)

H – гибридные приманки-рецепторы (например, PD-1 эктодомен и CD28 эндодомен)

Подпись: Рисунок 5. Т-клеточные со-инжиниринговые стратегии таргетированных атак на солидные опухоли и преодоление иммунометаболических барьеров

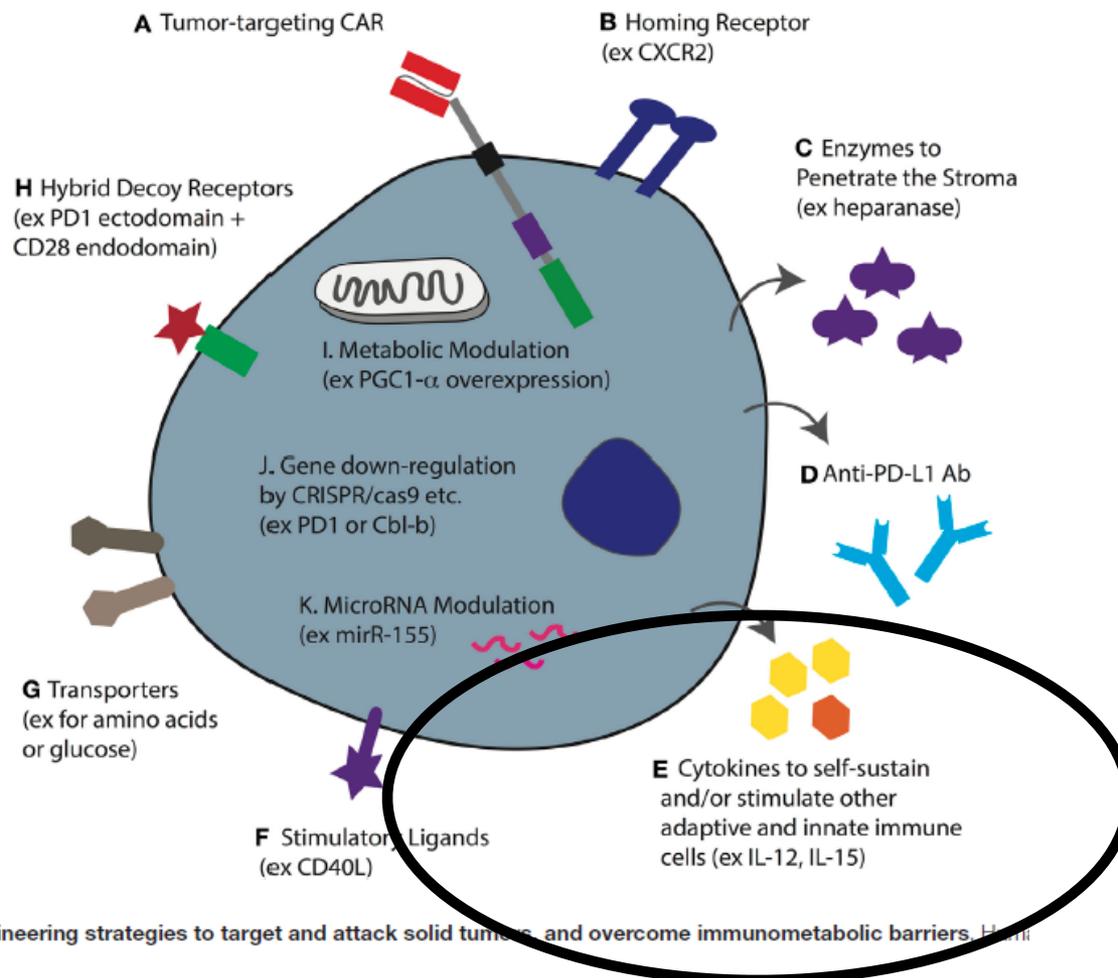
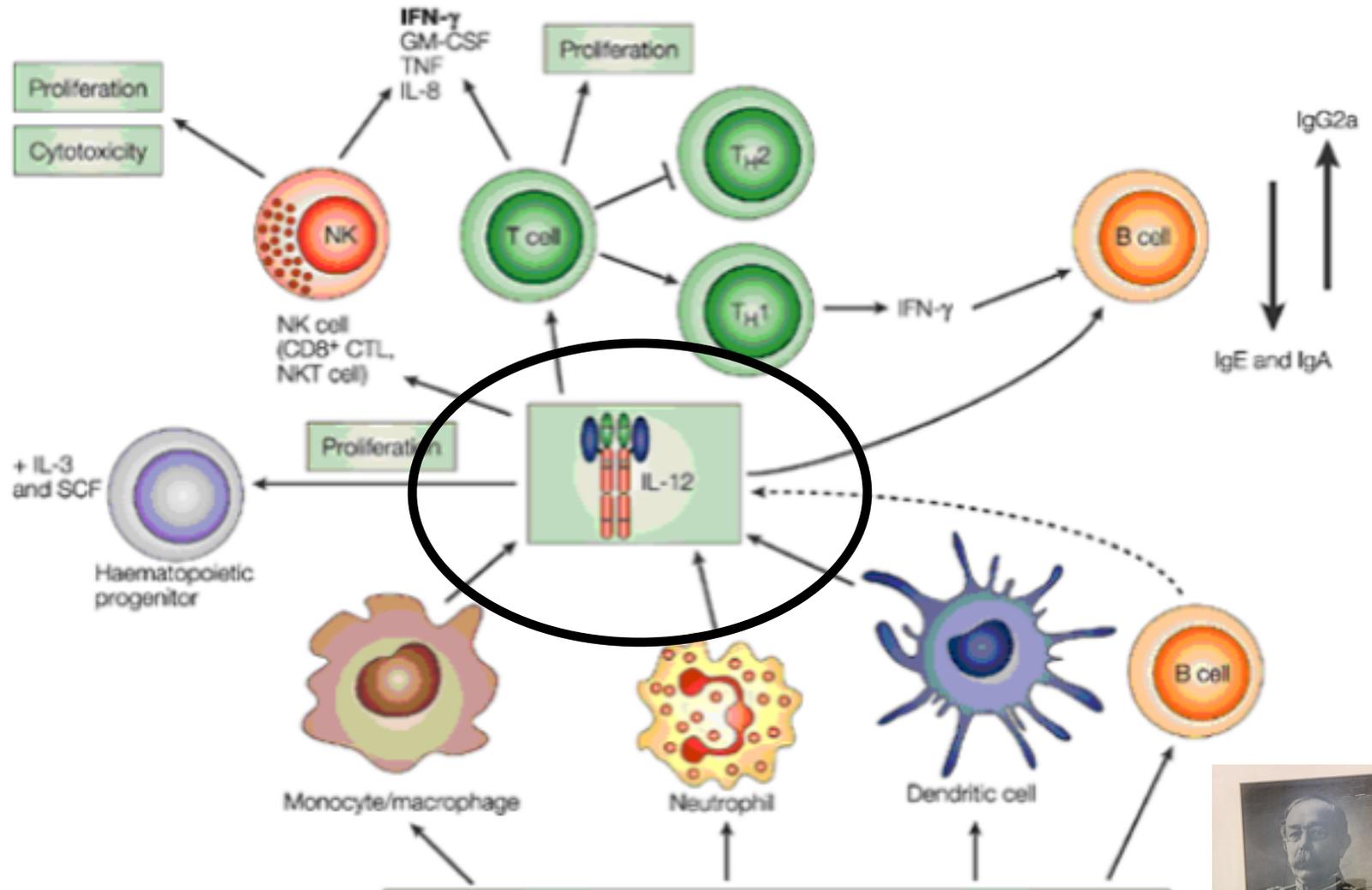


FIGURE 5 | T-cell coengineering strategies to target and attack solid tumors and overcome immunometabolic barriers. [Frontiers in Immunology](#)

Адоптивная иммунная система

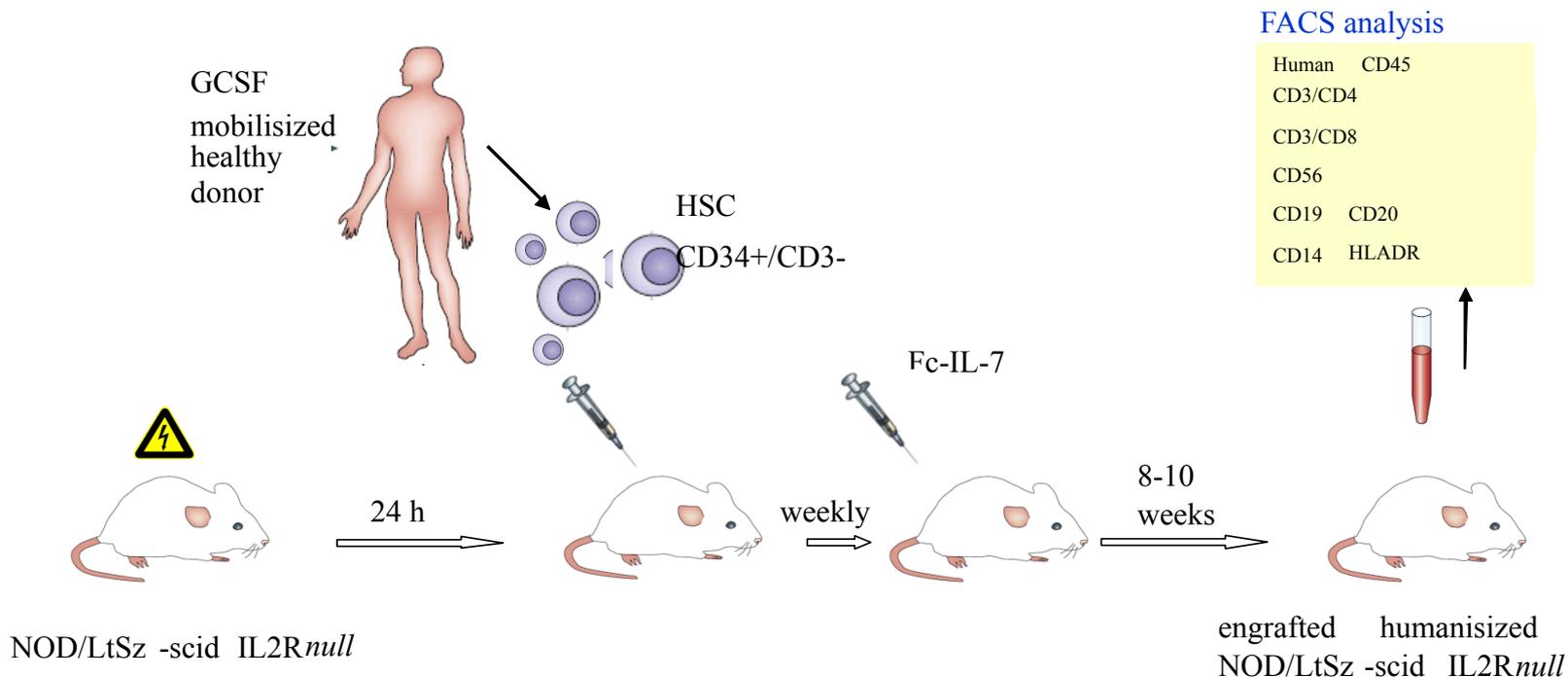


Бактерия
Опухолевая клетка?



Как протестировать человеческий IL-12 in vivo?

Гуманизация мыши NSG



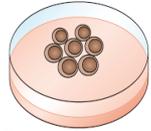
Подпись к рисунку:

Мобилизация здорового донора; 24 часа - неделя – 8-10 недель; привитая гуманизированная мышь NOD/LtLz – scidIL2Rnull

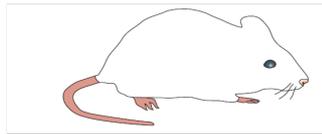
Модель рабдомиосаркомы

Schilbach k., ... Handgretinger R. Рак-таргетированный IL-12 контролирует рабдомиосаркому человека по индукции старения и миогенной дифференциации. *Oncoimmunology* 2015; 4: e1014760

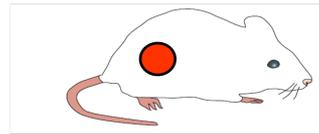
Мы привили рабдомиосаркому, пересадив 1×10^6 на правую заднюю ногу, дали 3 недели для того, чтобы опухоль выросла до 120 мкл Tvol
Разделили когорту на 3 группы, FP получали мыши одной группы, вторая группа получала FP и IL-2 (системно).
Третья группа была контрольной. Сняли показания через 7 недель
Одним из параметров противоракового препарата является его влияние на выживание



A204
Клетки рабдомиосаркомы
(Недифференцированные)



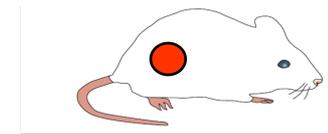
21d



RMS

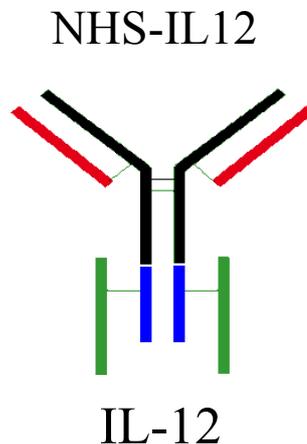
Fc-IL-7
NHS-IL12 + Fc- IL-7
NHS-IL12 + IL-2/mAb602

5 weeks



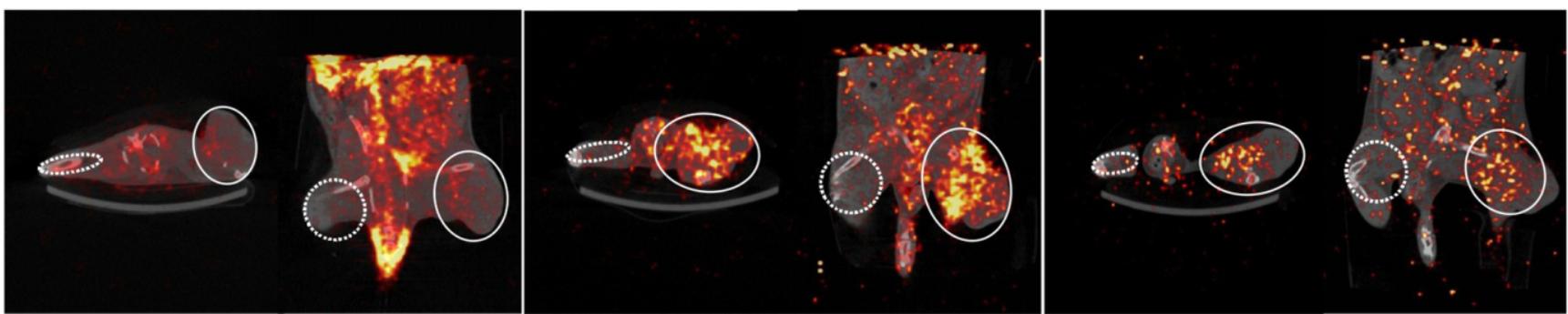
Гуманизированная мышь
NSG

ИССЛЕДОВАНИЕ



Антигистон (анти-ДНК)

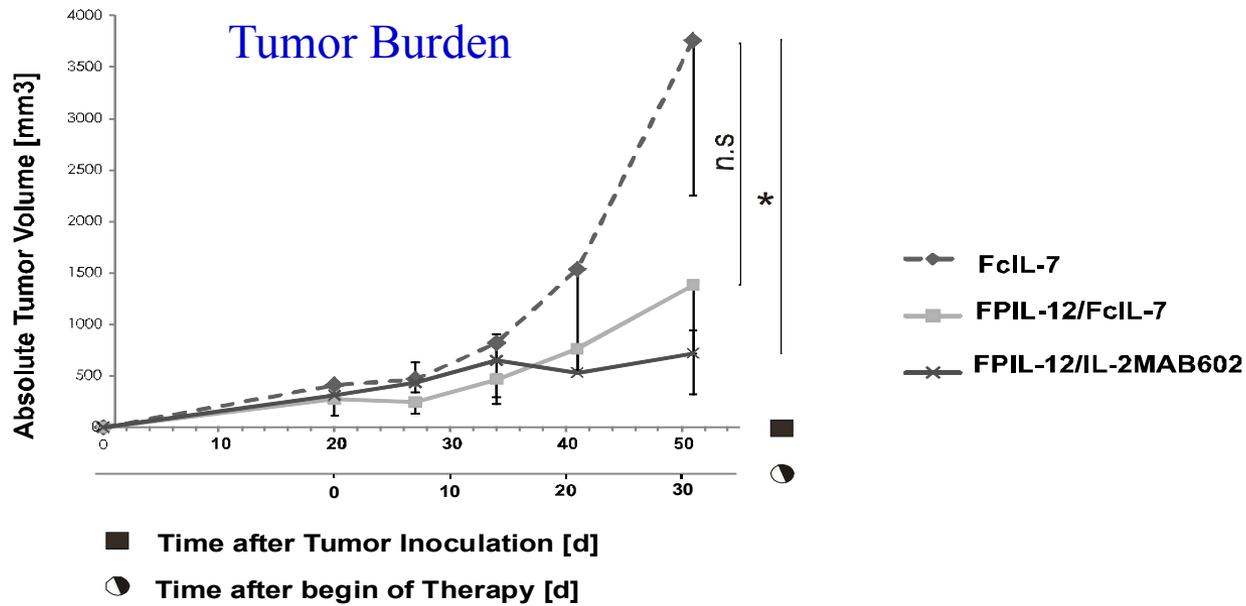
Разработан и предоставлен
Д-р Стивен Гиллис и
EMD Serono, Merck Darmstadt



2h post injection

26h post injection

46h post injection



Картинки:

2 часа после инъекции – 26 часов после инъекции – 46 часов после инъекции

График

По вертикали: абсолютные размеры опухоли

По горизонтали:

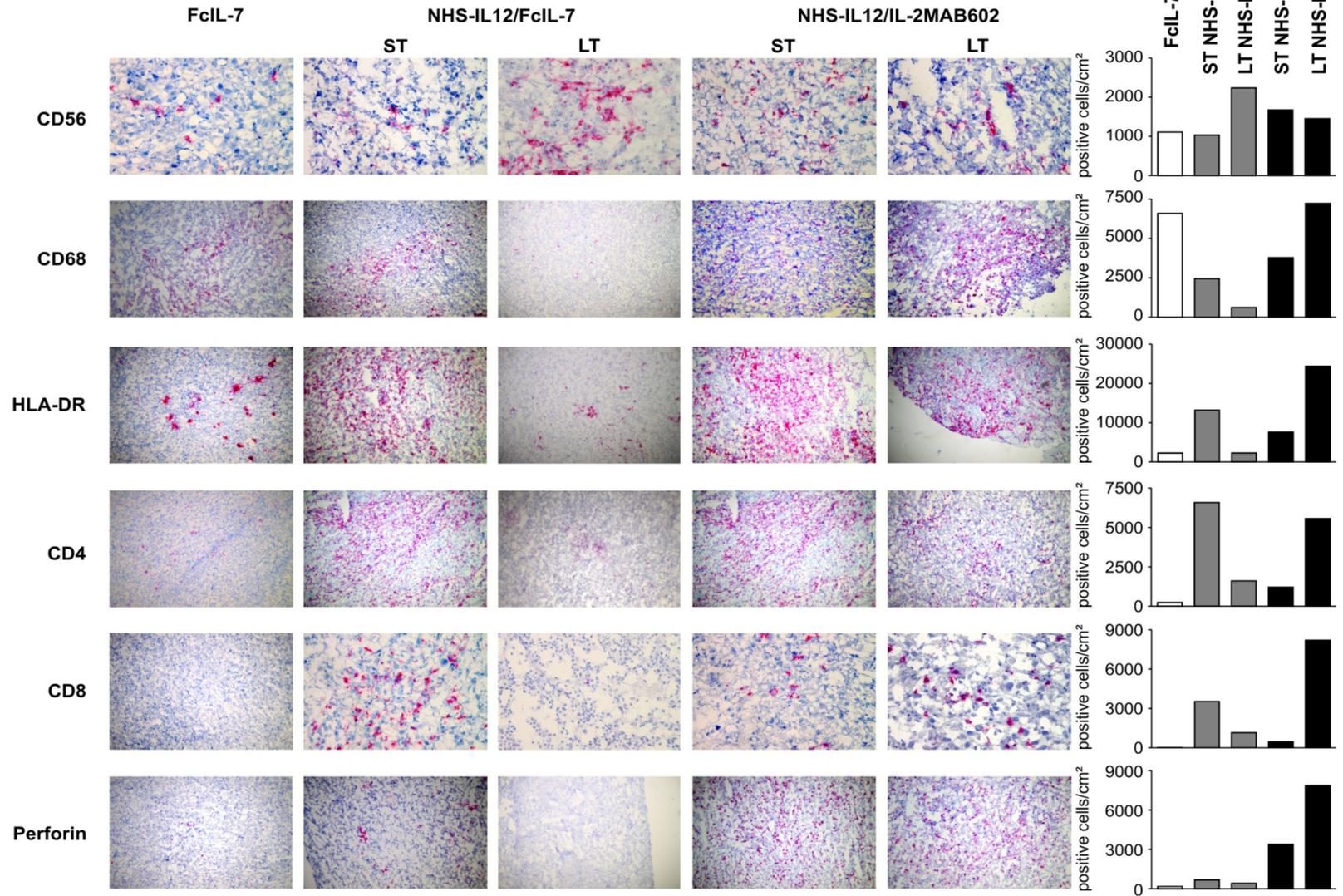
Время после внедрения опухолевых клеток

Время после начала терапии

Усиленное связывание иммуноцитокина NHS-IL12 с некрозом при локальном облучении опухоли в моделях ксенотрансплантатов.

Eckert F, Schmitt J, Zips D, Krueger MA, Pichler BJ, Gillies SD, Strittmatter W, Handgretinger R, Schilbach K. . Cancer Immunol Immunother. 2016 Aug;65(8):1003-13.

Инфильтрация лимфоцитарной опухоли

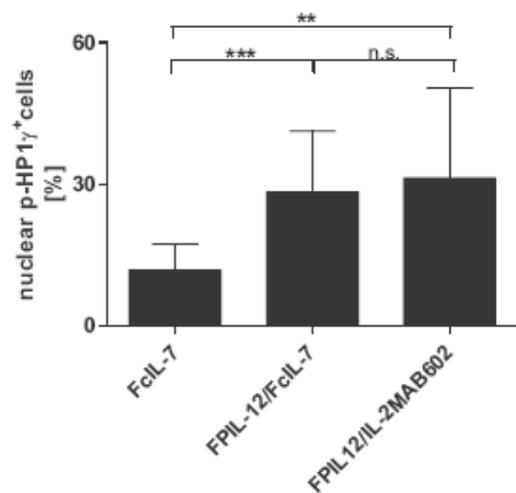


Schilbach k., ... Handgretinger R. Рак-таргетированный IL-12 контролирует рабдомиосаркому человека по индукции старения и миогенной дифференциации. Онкоиммунология 2015; 4: e1014760

Schilbach k., ... Handgretinger R. Cancer-targeted IL-12 controls human rhabdomyosarcoma By senescence induction and myogenic differentiation. Oncoimmunology 2015; 4: e1014760

Индукция старения

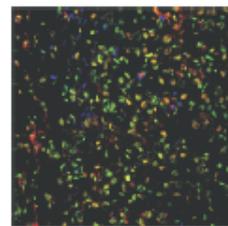
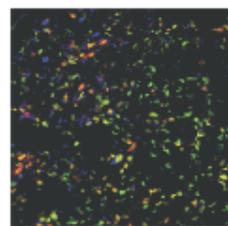
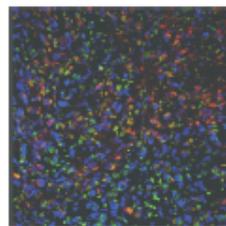
a



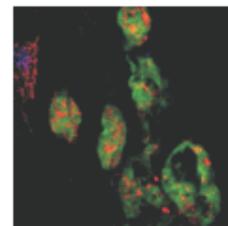
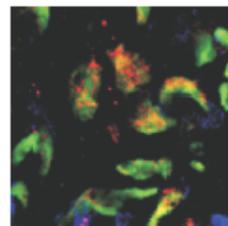
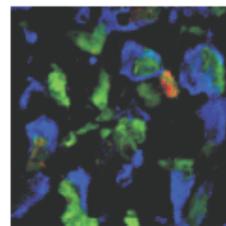
FcIL-7

FPIL-12/
FcIL-7

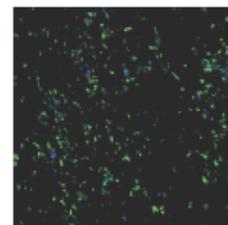
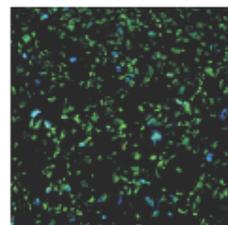
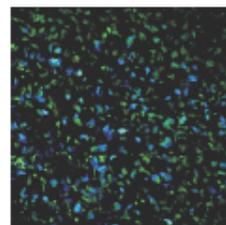
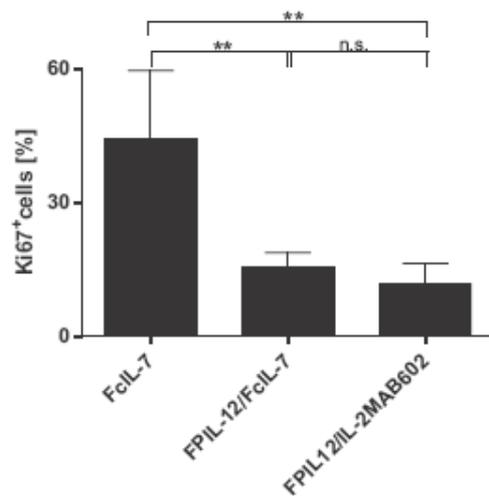
FPIL-12/
IL-2MAB602



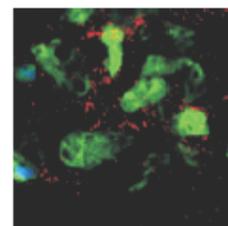
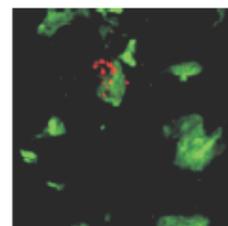
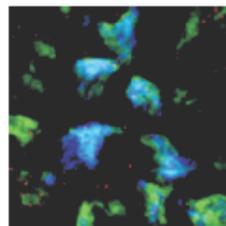
nuclear p-HP1 γ : red
PCNA: blue



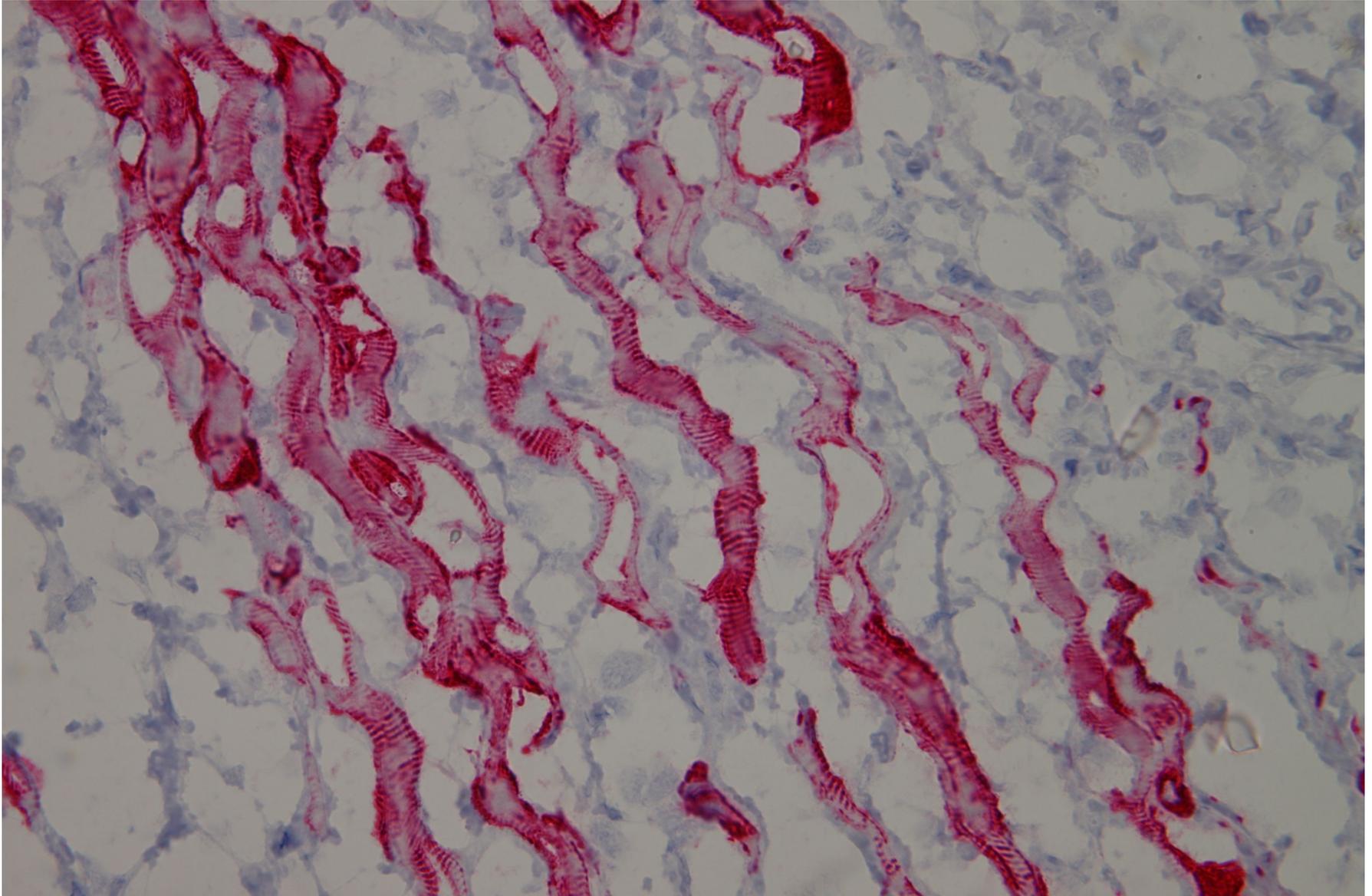
b



P16: red
Ki67: blue

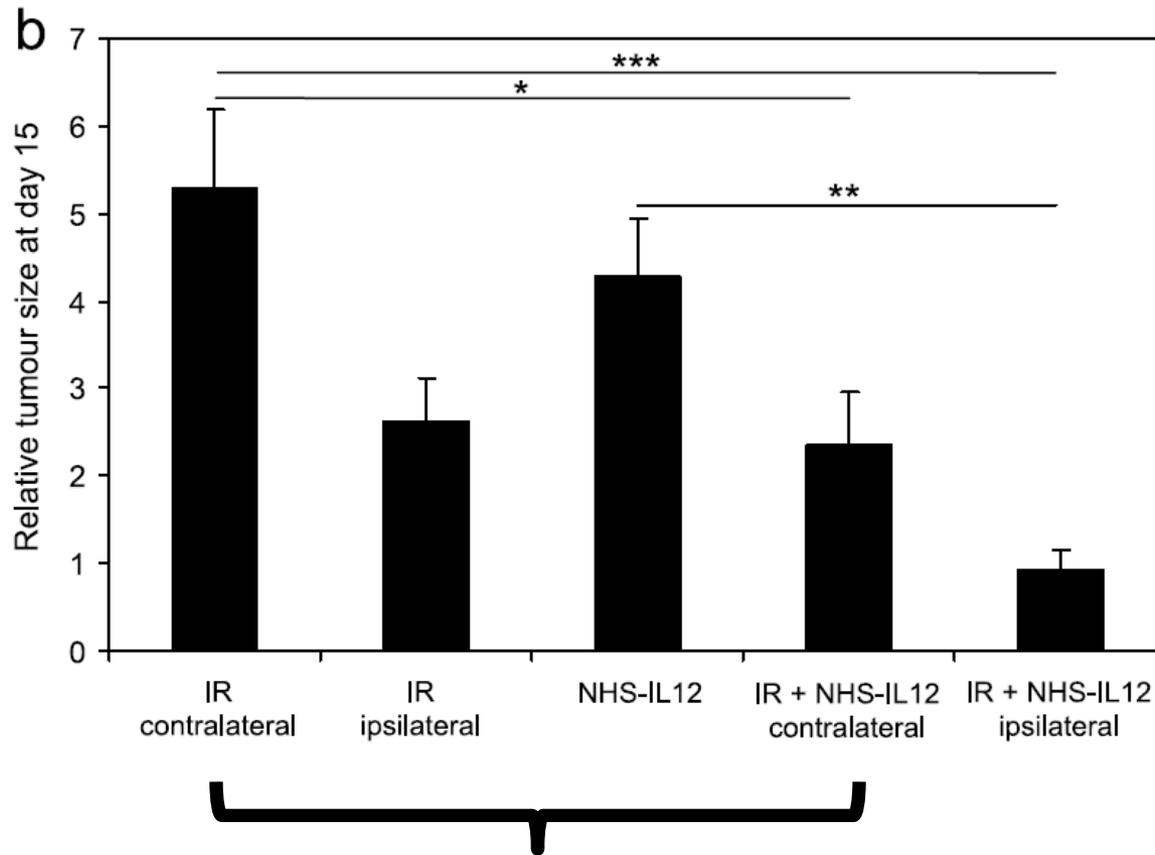
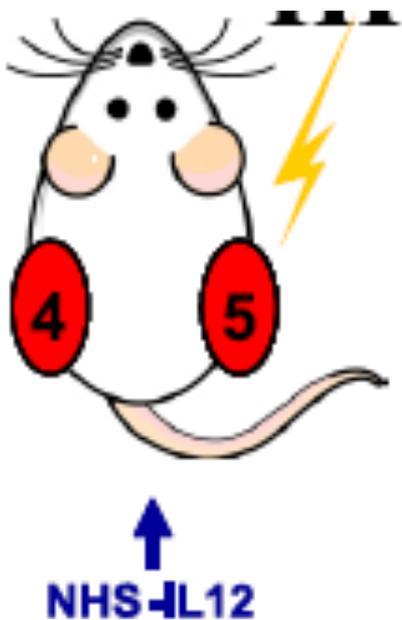


Дифференциация клеток рабдомиосаркомы



Eckert F., ... Handgretinger R., Schilbach K. Опухоль-таргетированный IL-12 в сочетании с местными облучением приводит к системному противотуберкулезному контролю через абсопальные эффекты in vivo. Oncoimmunology, 2017 in press.

Eckert F., Handgretinger R., Schilbach K. Tumour targeted IL-12 combined with local Irradiation leads to a systemic tumour control via abscopal effects in vivo. Oncoimmunology, 2017 in press.



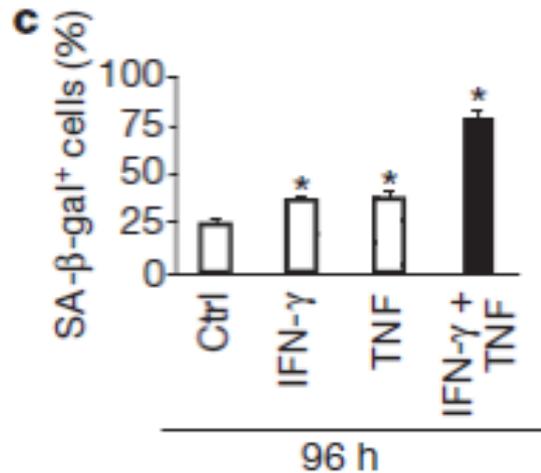
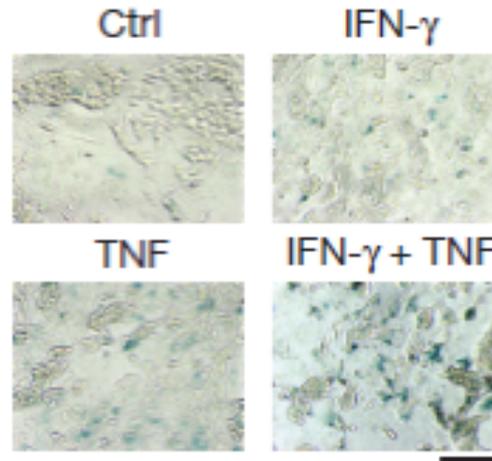
Абсопальный эффект

Роль цитокинов

T-хелпер-1-клеточные цитокины приводят к старению раковых клеток

Braumüller H с соавт.
Природа 2013; 494: 361

IFN- γ и TNF
индуцируют
физиологическое
старение и
дифференцировку



Ghoneum M, Jewett A.

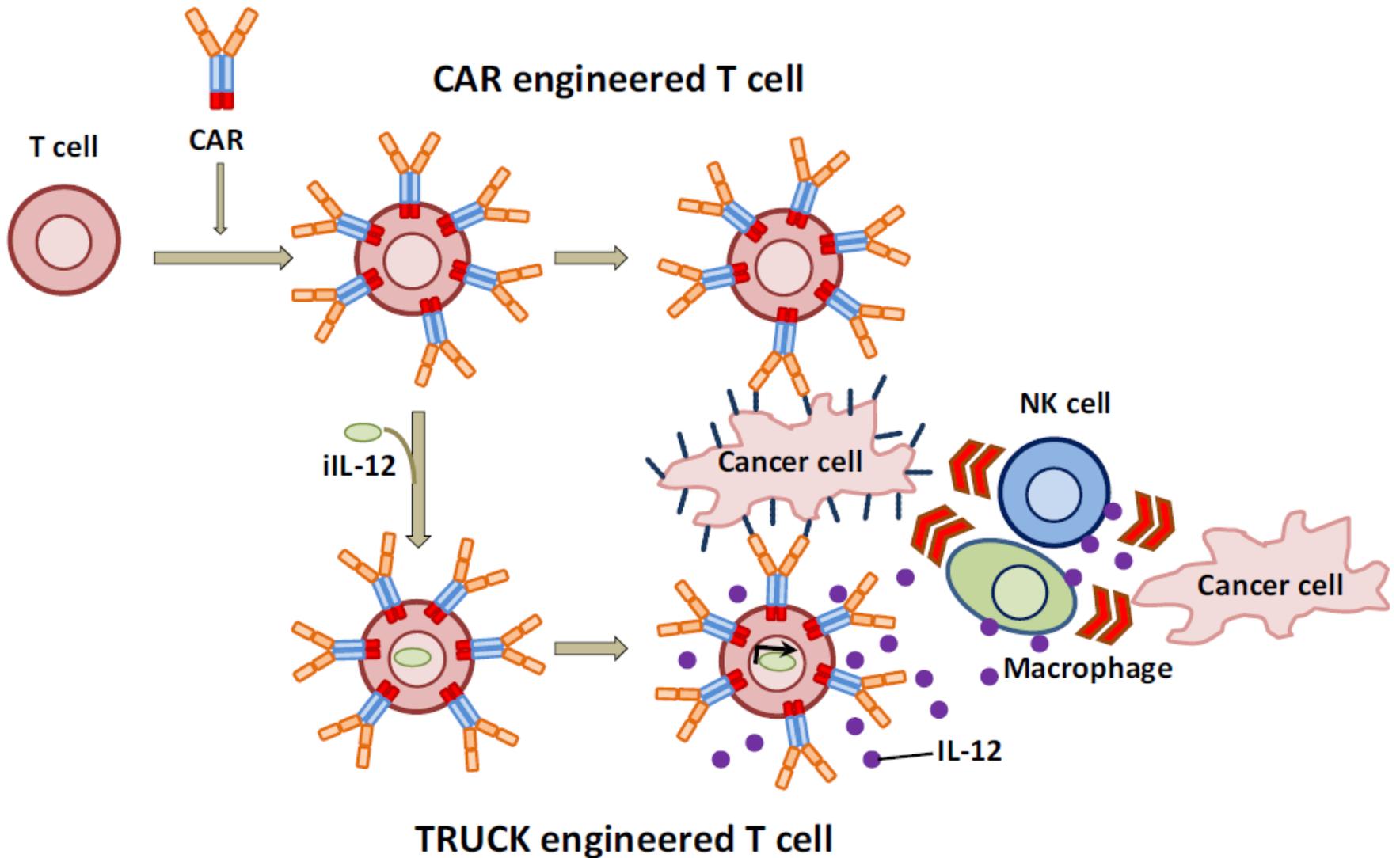
Получение фактора некроза опухоли-альфа и интерферона-гамма из лимфоцитов периферической крови человека с помощью MGN-3, модифицированного арабиноксилана из рисовых отрубей и его синергия с интерлейкином-2 in vitro.

Cancer Detect Prev. 2000;24(4):314-24.

Ghoneum M, Jewett A.

Production of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma from human peripheral blood lymphocytes by MGN-3, a modified arabinoxylan from rice bran, and its synergy with interleukin-2 in vitro.

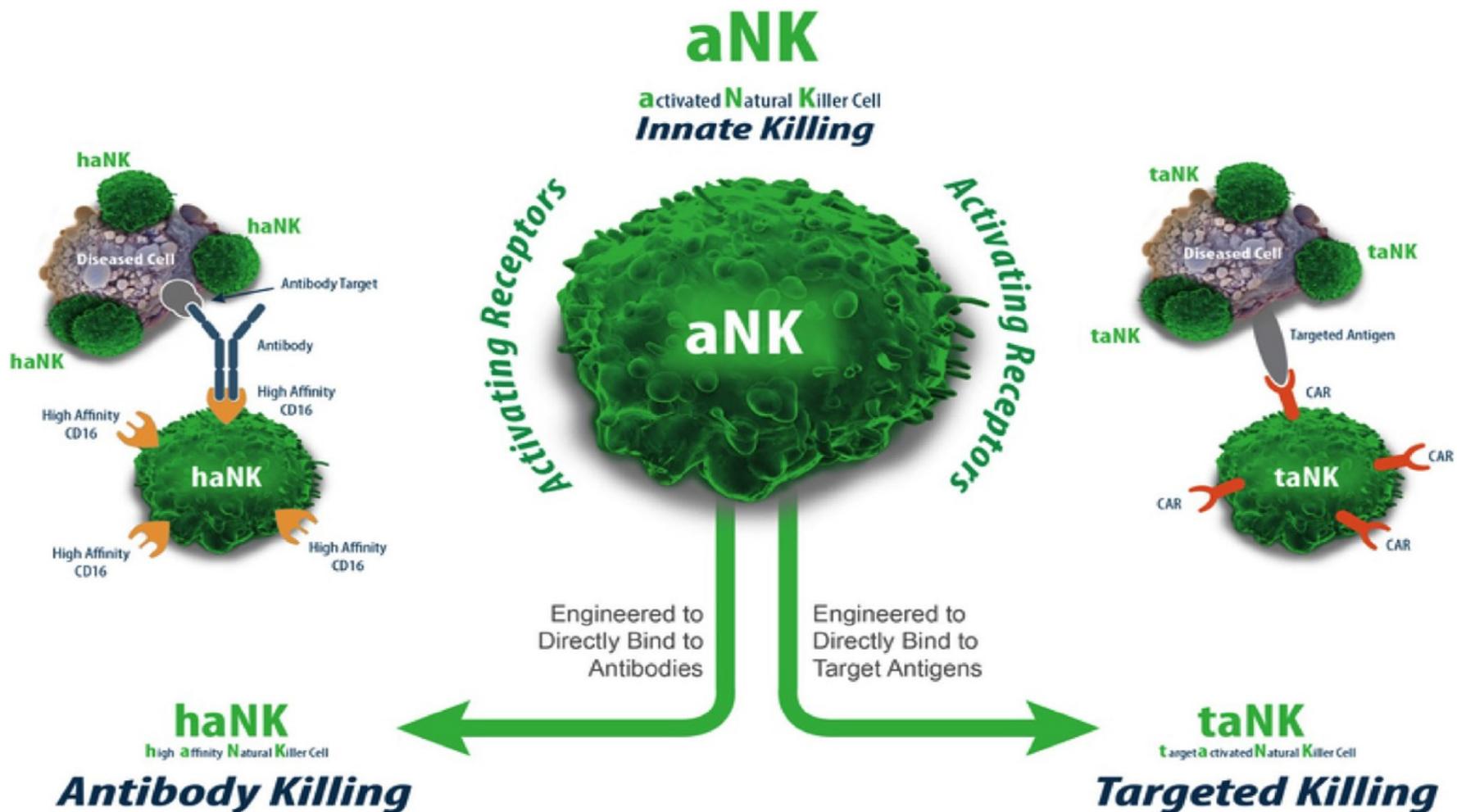
Cancer Detect Prev. 2000;24(4):314-24.



Т-клетка перенаправлена для универсального цитокин-опосредованного цитолиза

Chmielewski M., et al., Of CARs and TRUCKS: chimeric antigen receptor (CAR) T cells engineered with an inducible cytokine to modulate the tumor stroma. Immunological Reviews 2014; 257 83-90.

Klingeman H. с соавт. Клетки «натуральные киллеры» для иммунотерапии - преимущества NK-92
 Клеточная линия на основе NK-клеток крови. Горизонты иммунологии 2016; 7: Статья 91



В центре сверху вниз: aNK Активированные клетки «натуральные киллеры» врожденный цитотоксический – активирующие рецепторы – инжиниринг для прямого связывания с антителами – инжиниринг для прямого связывания с целевыми антигенами

Справа сверху вниз: больная клетка, taNK, антиген-мишень, CAR taNK – Таргетинговые активированные клетки «натуральные киллеры» Таргетинговый цитотоксический

Слева сверху вниз: haNK, больная клетка, антитело-мишень, антитело, высокое сродство CD-16, haNK – клетки «натуральные киллеры» с высоким сродством цитотоксический через антитела

NK-клетки: стандартизированные

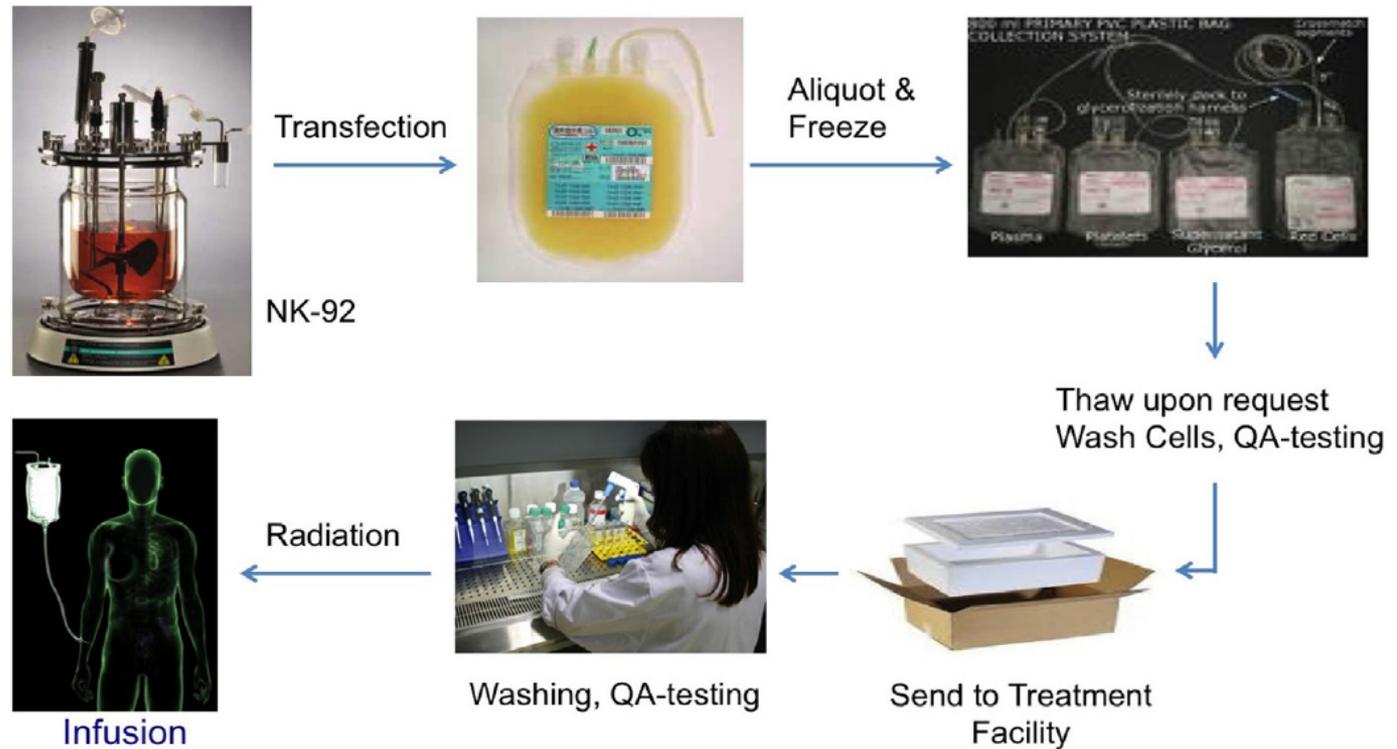
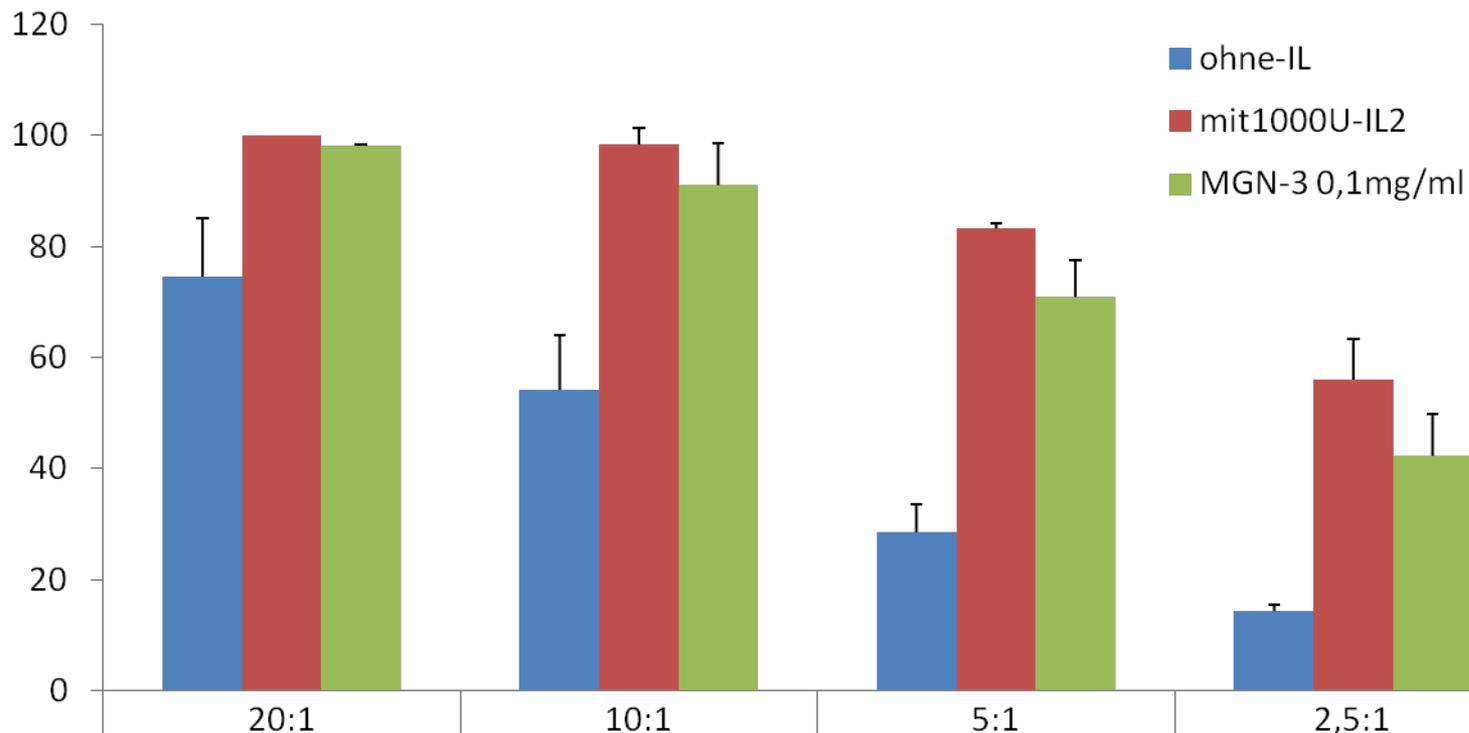


FIGURE 3 | Biologistics of NK-92 as an “off-the-shelf” cellular therapeutic.

Klingeman H., et al. Natural Killer Cells for Immunotherapy- Advantages of the NK-92 Cell Line over Blood NK Cells. *Frontiers in Immunology* 2016; 7: Article 91

Биобран активирует НК-клетки либо самостоятельно, либо синергично с интерлейкином-2.

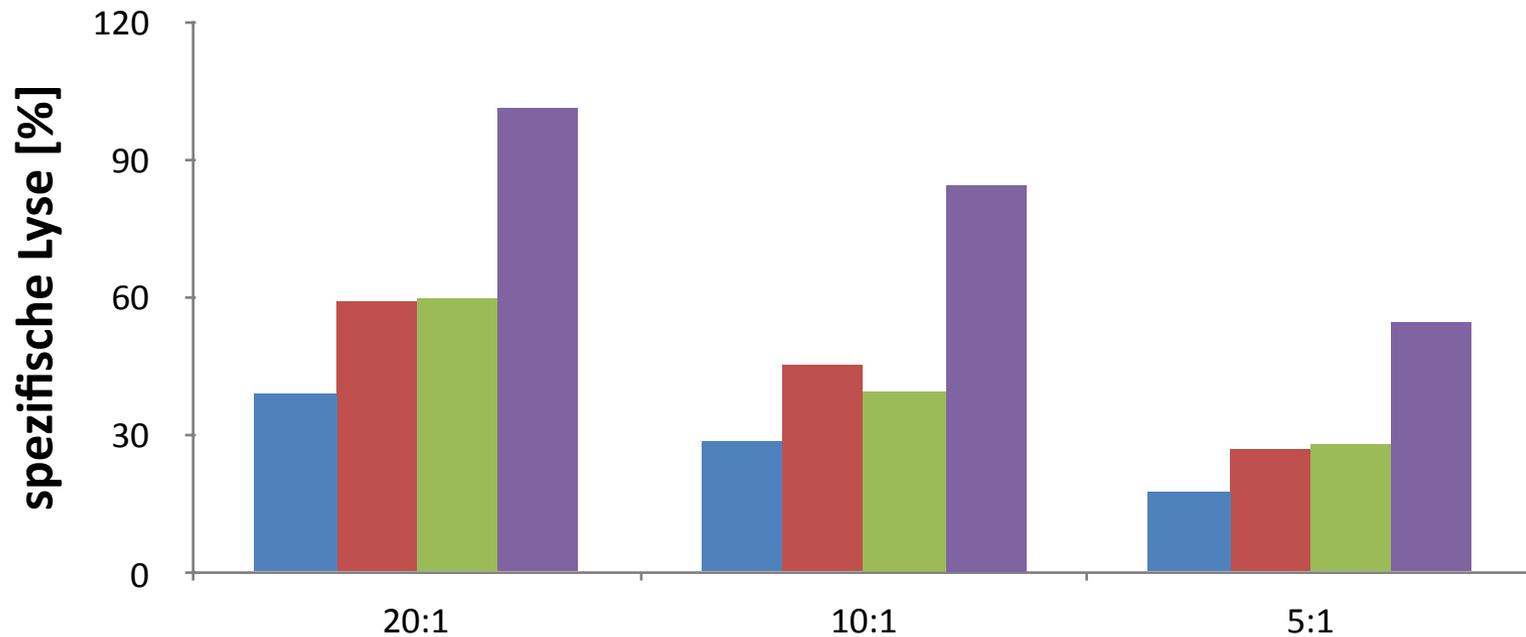
Активность клеток «натуральных киллеров» против клеток К 562



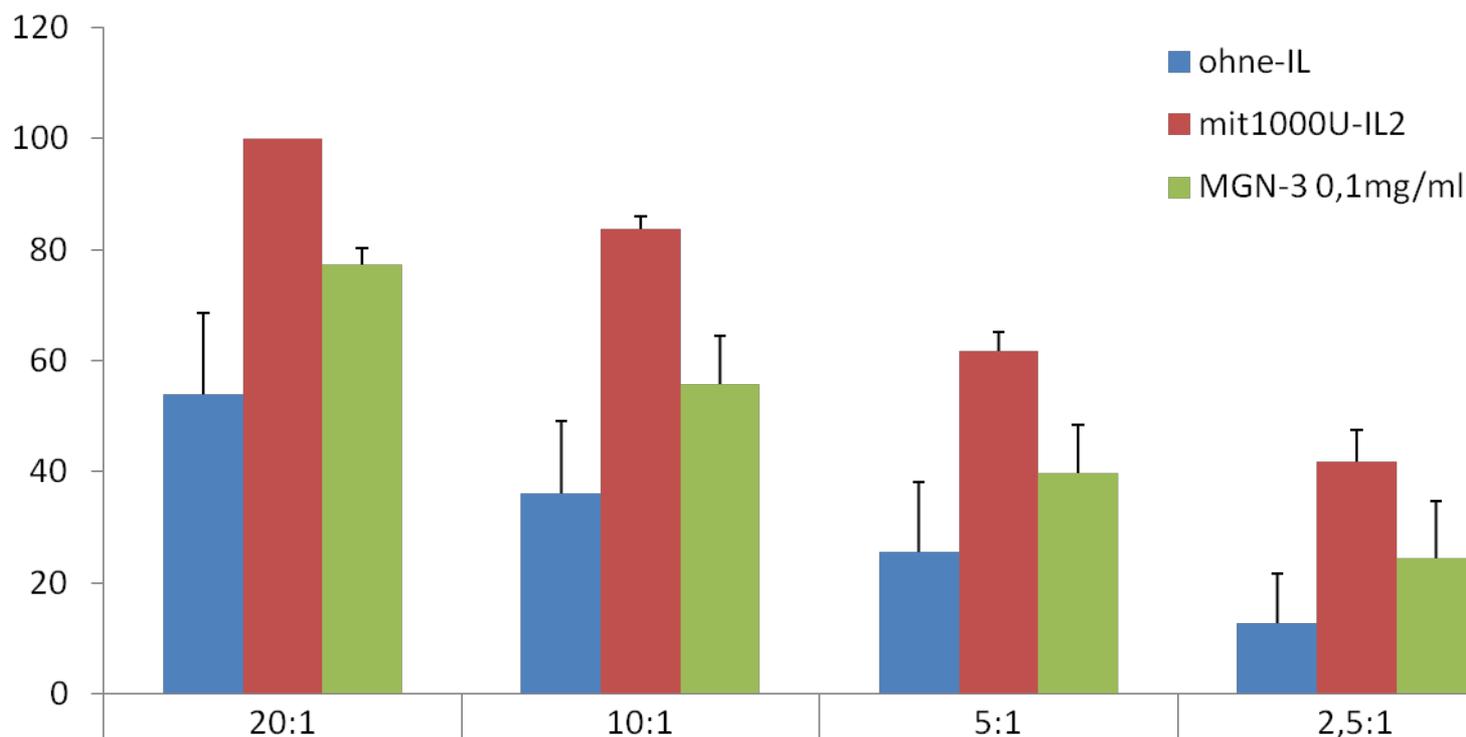
■ ohne-IL	75	54	28	14
■ mit1000U-IL2	100	98	83	56
■ MGN-3 0,1mg/ml	98	91	71	42

Активность NK-клеток против клеток К 562

NK-Zellen gesunder Spender vs K562

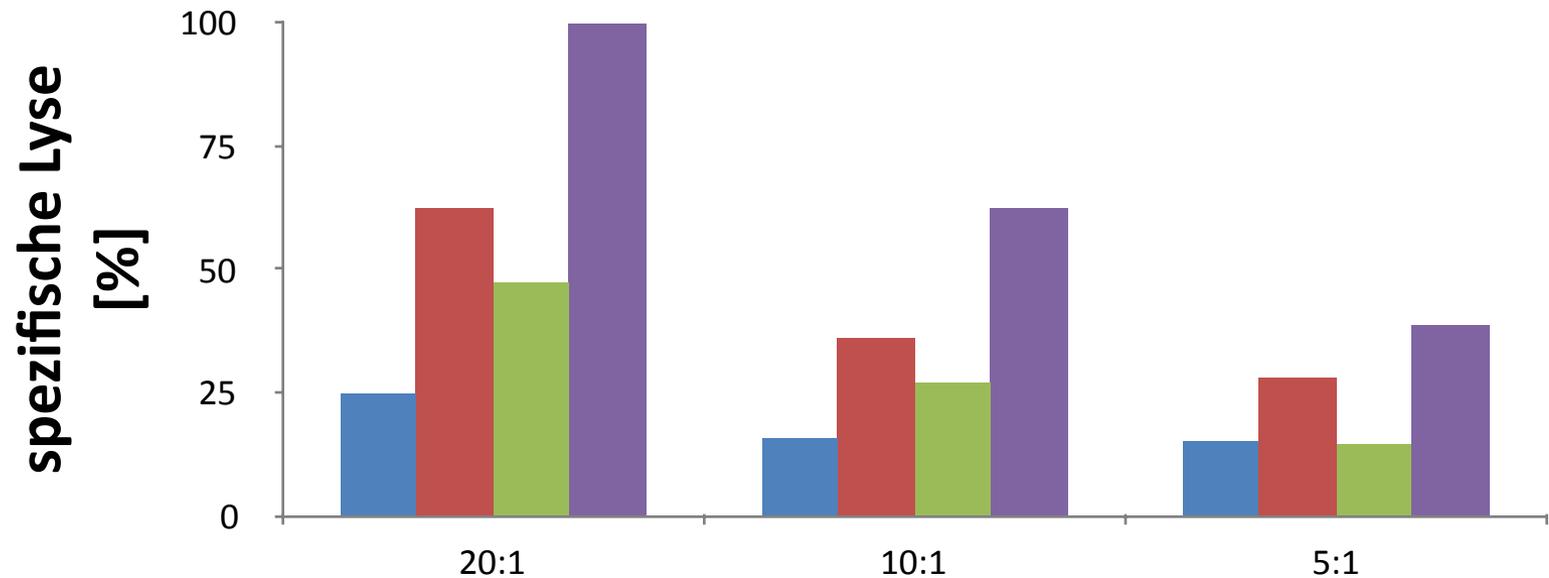


Активность клеток НК против гепатобластомы



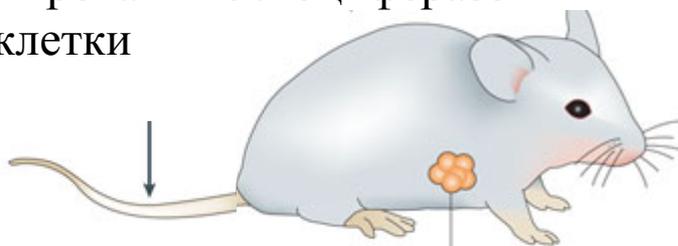
ohne-IL	54	36	26	13
mit1000U-IL2	100	84	62	42
MGN-3 0,1mg/ml	77	56	40	24

Активность клеток НК против рабдомиосаркомы NK-Zellen gesunder Spender vs. Rhabdomyosarkoma



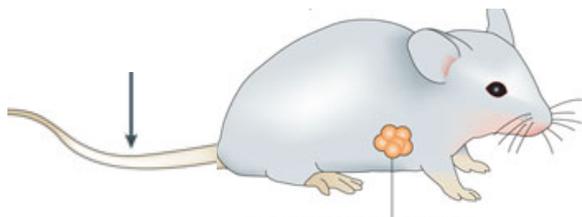
Хенографтmodel Нейробластомы

Маркированные люциферазой
NB-клетки

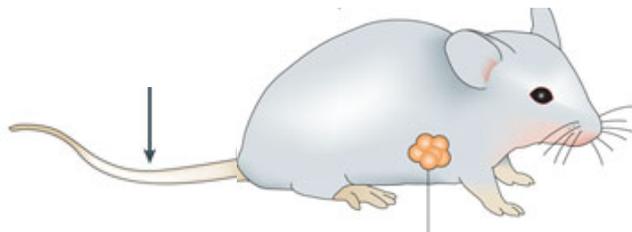


7 days

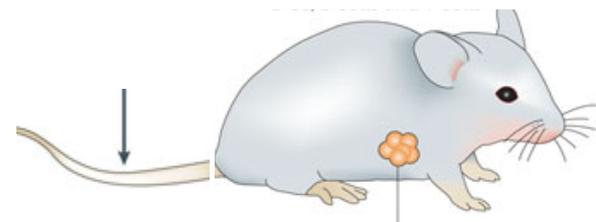
Солевой раствор



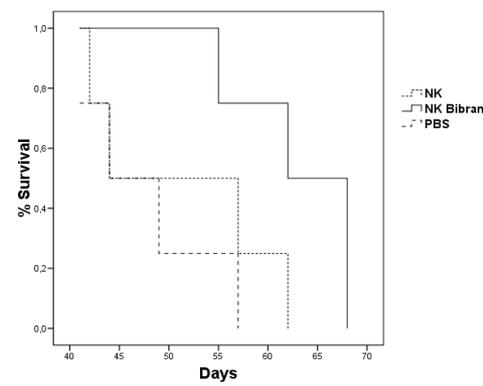
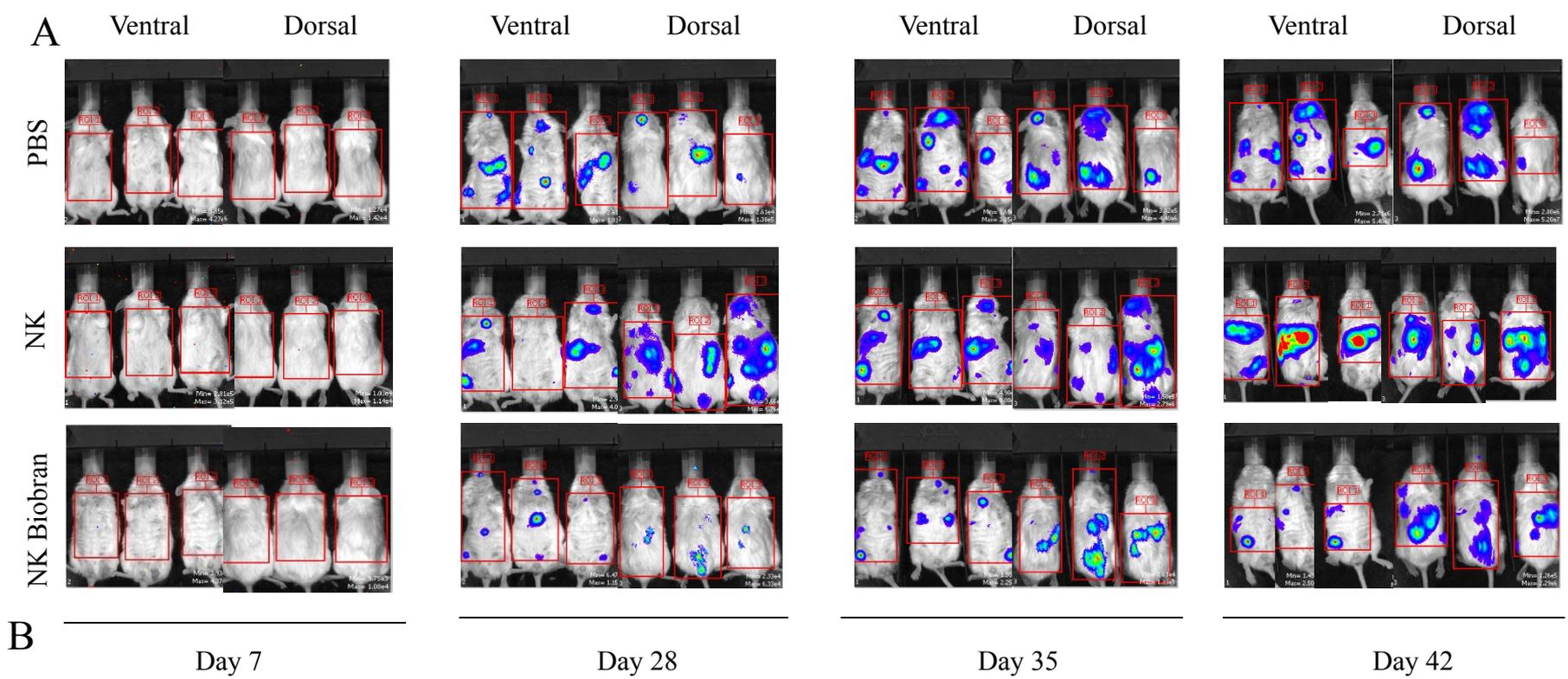
НК-клетки
средние



НК-клетки, активированные
в течение ночи биобраном



Лечение: 2 раза в неделю / 4 недели



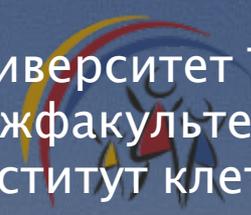
(A). Изображения опухолей NB1691, экспрессирующих люциферазу, иллюстрируют инфильтрацию нейробластомой у мышей, получающих PBS (контроль), 1×10^6 свежих изолированных нестимулированных NK-клеток и 1×10^6 MGN3-стимулированных NK-клеток (мыши получали 8 внутривенных инъекций, дважды в неделю, последовательно в течение 4 недель). Показаны по три особи мыши, вентральные и дорзальные, из каждой группы. (B) Объем опухоли относительно исходных значений был значительно ниже в группе мышей, которые получали MGN-стимулированные NK-клетки, чем в контрольной группе или в группе, которая получала простимулированные NK-клетки. Кривые Каплана-Мейера указывают на выживаемость каждой группы мышей.

Выводы

- NK-клетки играют важную роль в иммунотерапии рака
- Цитокины или другие реагенты, такие как MGN-3 или их комбинации, способны активировать NK-клетки
- Таргетированные NK-клетки (CAR-NK) обладают мощными противоопухолевыми эффектами
- Опухолевая среда является препятствием для иммунотерапии, и ее необходимо преодолеть

Детская
Университетская
Клиника, Тюбинген

Урсула Зейдель
Патрик Шлегель
Тобиас Фойхтингер
Джудит Фейхт
Урсула Зейдель
Хейко-Мануэль Телтчик
Rouwen Teltschik
Кристина Кызыракос
Анника Хоррер
Матиас Пфайффер
Мартин Эбингер
Майкл Шумм
Питер Ланг
Карин Шильбах



Университет Тюбингена,
Межфакультетский
Институт клеточной
Биологии

Гундрам Юнг
Лютгер Гросс-Хорвест
Steffen Aulwurm
Ханс-Георг Рамэнзее
Ханс-Йорг Бюринг
Лотар Канж
Медицинский клиник Тю
H. Wendel, Tü
Prof. Суес, Шуберт
Freiburg
Стив Джиллис, Бостон
М. Чемелевски,
Х. Абкен, Кёльн



joséCARRERAS
LEUKÄMIE-STIFTUNG

“Leukämie muss heilbar werden.
Immer und bei jedem.” José Carreras



Förderverein
für krebskranke Kinder Tübingen e.V.

Aktion Erna

Aktion Nils

Deutsche Krebshilfe, DFG