

جَامِعَة
الْمَنَارَة
MANARA UNIVERSITY

الجمهورية العربية السورية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة المنارة - كلية الصيدلة

IL-12 & The Treatment of Cancer

مشروع تخرج أُنِيل درجة الإجازة في الصيدلة والكيمياء الصيدلية

إعداد الطالب: سامي حلوبي

إشراف: د. أسامة العنان

إهداءات

إلى أكبر نعم الله على..

لا الكلمات تكفي ولا الإهداءات توفي بضعاً مما قدمته لي..

كل الحب و الاحترام

أمي و أبي

إلى أخوتي و رفاق دربي..

لا فرق الله بيننا يوماً..

امنيتي أن اراكم سعداء، أصحاء و أصحاب بصمة في الحياة..

د.جود ، م.سارية، م.سراج

إلى زملاء مشوار الدراسة..

شكراً لكم جميعاً على هذه التجربة الرائعة..

إلى اساتذتي الذين قدموا أفضل ما لديهم والذين لم يبخلوا يوماً في تقديم
المعلومات..

عميد كلية الصيدلة. أ.د. كنده درويش

أ.د. محمد هارون

أ.د. نعمى حسن

الشكر الكبير لمن ساهم في إنجاح هذا المشروع..

د. أسامة العنان

وفي الختام..

إلى احبائي

الأهل والأصدقاء الذين دعموني وساندوني.. كُثرأنتم..

لكم مني كل الحب..

الملخص

تمثل عائلة سيتوكينات IL-12 مجموعة من السيتوكينات غير المتجانسة الفريدة التي تشمل IL-12 و IL-23 و IL-27 و IL-35 ومؤخراً IL-39؛ وقد أثبتت الدراسات الحديثة أهمية سيتوكينات IL-12 في تشكيل الاستجابات المناعية الفطرية والتكيفية في السرطان وحددت الأدوار متعددة الجوانب لأفراد عائلة IL-12 المتميزين، بدءاً من الوظائف المستجيبة إلى وظائف المناعة التنظيمية. يمكن أن تكون هذه السيتوكينات بمثابة مرشحين واعدن لتطوير الأساليب العلاجية المعدلة للمناعة، وبشكل عام يعتبر IL-12 أحد أهم السيتوكينات المستجيبة ويشارك في العلاجات المضادة للأورام والعديد من العلاجات المناعية مثل الخلايا المساعدة Th1، والخلايا القاتلة الطبيعية؛ ويحفز IL-12 اصطناع الانترفيرون غاما $INF-\gamma$ عن طريق تنشيط STAT4 الذي يساهم في تمايز الخلايا المساعدة Th1 مع نسخ T-bet، ويؤدي دوراً مهماً في علاج السرطان.

Abstract

The IL-12 family cytokines are a group of unique heterodimeric cytokines that include IL-12, IL-23, IL-27, IL-35 and, most recently, IL-39. Recent studies have solidified the importance of IL-12 cytokines in shaping innate and adaptive immune responses in cancer and identified multipronged roles for distinct IL-12 family members, ranging from effector to regulatory immune functions. These cytokines could serve as promising candidates for the development of immunomodulatory therapeutic approaches. Overall, IL-12 is one of the most important effector cytokines and is involved in antitumor therapies and many immunotherapies such as Th1 helper cells, natural killer cells; IL-12 stimulates the synthesis of interferon- γ (INF- γ) by activating STAT4, which contributes to the differentiation of Th1 helper cells with T-bet transcription and plays an important role in cancer therapy.

الفهرس

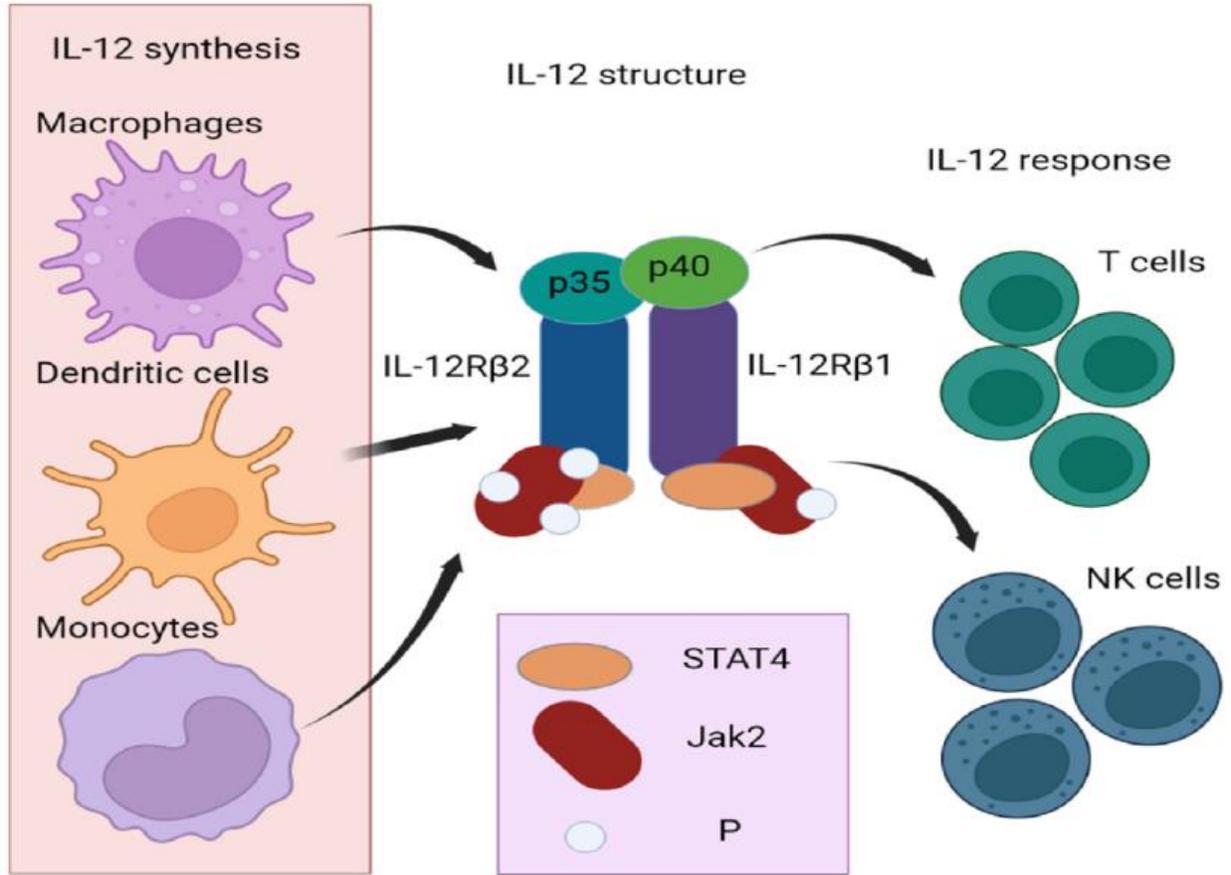
- 1 مقدمة..... 1
- 2 لمحة تاريخية للسيتوكين والعلاجات المناعية بـ IL-12..... 4
- 3 عائلات IL-12..... 6
- 3.1 IL-23..... 7
- 3.1.1 L-23 كمنشط للمناعة المضادة للورم..... 8
- 3.1.2 IL-23 كمنشط للمناعة المضادة للورم..... 9
- 3.2 IL-27..... 10
- 3.3 IL-27 كمنشط للمناعة المضادة للورم..... 10
- 3.3.1 IL-27 كمنشط للمناعة المضادة للورم..... 11
- 3.4 IL-35..... 12
- 3.4.1 IL-35 في تثبيط نمو الورم..... 13
- 3.4.2 IL-35 في تعزيز نمو الورم..... 14
- 3.5 IL-39..... 15
- 4 IL-12..... 16
- 4.1 آلية تأثير IL-12 في السرطان..... 18
- 4.2 الخلايا التائية المساعدة Th-1..... 20
- 4.3 الخلايا القاتلة الطبيعية NK..... 20
- 4.4 IL-12 في العلاج المناعي للسرطان..... 21
- 4.5 التأثيرات المساعدة لـ IL-12..... 26
- 4.6 التجارب قبل السريرية لـ IL-12 مثل السيتوكينات المضادة للورم..... 27

29.....	4.7 مبرر الإيتاء الموضوعي ل IL-12
32.....	4.8 استراتيجيات إيتاء IL-12
32.....	4.8.1 السيتوكينات المناعية
33.....	4.8.2 الإيتاء القائم على DNA
36.....	4.8.3 منصات التحرر المستدام للحقن الموضوعي
37.....	5 الاستنتاجات
38.....	6 المراجع

1 مقدمة

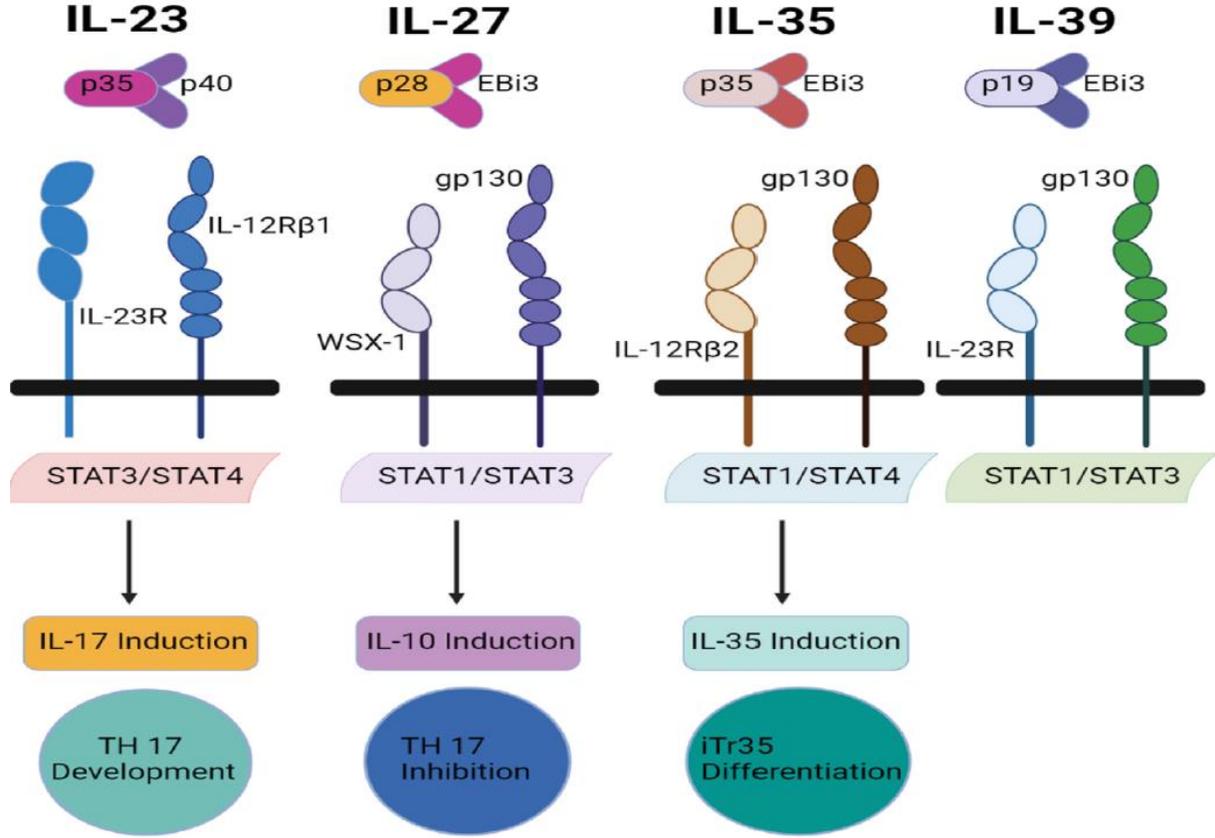
يعد السرطان أحد أهم القضايا في الوقت الحاضر، وقد أحرز تقدم هائل في الماضي لتشخيص وعلاج السرطان حيث اكتشفت العديد من العلاجات المعدلة للمناعة وخاصة التي تفرز السيتوكينات لعلاج السرطان. تعرف السيتوكينات بأنها بروتينات اتصال للخلايا الصغيرة، تنسق بإشارات خاصة بطريقة نظيرة صماوية (paracrine). على العموم توجد العديد من عائلات السيتوكينات التي تكون فيها الإنترلوكينات (ILs) (interleukins) العناصر الأكثر تنوعاً وأهمية للاستجابات المناعية، التي من بينها العامل المضاد للأورام IL-12 الذي يعتبر مهم جداً في العلاج المناعي للورم.

يعمل IL-12 كوسيط رئيسي بين أنظمة المناعة الفطرية والتكيفية من خلال التحكم في التطور المناسب للخلايا التائية CD4 غير المتميزة إلى وحدات فرعية متنوعة من الخلايا التائية المساعدة (Th (T helper)). يعتبر IL-12 بروتين غير متجانس مكون من وحدتين فرعيتين مرتبطتين تساهمياً (p35 و p40) تم تصنيعهما بواسطة البالعات، الخلايا التغصنية والخلايا البائية كما هو موضح في الشكل 1، ومن الجدير بالذكر أنه يتم تنظيم التعبير عن هاتين الوحدتين الفرعيتين بدرجة عالية، على العموم يرتبط p40 تساهمياً بـ p35 مما يسمح لـ IL-12 بالعمل. تقع الوحدة الفرعية لـ p35 في الجينوم البشري على الكروموسوم 3p12-3q13.2، بينما يقع p40 على 5q31-33.



الشكل 1. صيغة IL-12، الخلايا المستجيبة وكيف تتشكل.

تحتوي عائلة IL-12 على وحدتين فرعيتين ألفا وبيتا، حيث تكون الوحدة الفرعية ألفا عبارة عن هيكل رباعي الحلزون مع مجال مستقبلات الهيماتوبويتين الذي يحتوي على p19، p28 و p35، بينما تحتوي سلسلة بيتا على p40 و Ebi3 وهي متماثلة مع السيتوكينات من سلسلة مستقبلات الفئة الأولى. عندما تصنع سلسلة p40 زوجاً مع p35 فإنها تشكل IL-12 وعندما تكون أزواج p40 مع p19 تشكل IL-23. يقترن EBi3 مع p28 ويشكل IL-27 وعندما يقترن مع p35 يشكل IL-35 (الشكل 2). تشمل السيتوكينات المحرزة للالتهاب IL-12 و IL-23 وبينما تتضمن السيتوكينات المضادة للالتهاب IL-27 و IL-35.



الشكل 2. عائلة IL-12 التي تشمل IL-23، IL-27، IL-35 و IL-39.

إن جهاز المناعة قادر على اكتشاف وجود و/أو تطور الخلايا السرطانية أي ما يعرف بالترصد المناعي، وقد أظهرت دراسات مختلفة زيادة في المراقبة المناعية عن طريق التداخل بواسطة IL-12. يعد IL-12 وسيطاً رئيسياً للاستجابة المناعية من خلال تعزيز الخلايا التائية، وعلى عكس السيتوكينات الأخرى فإن IL-12 قادر على أداء وظائف التكاثر والوظيفة السمية للخلايا بشكل فردي، مما يؤدي إلى تحفيز السيتوكينات المضادة للورم.

2 لمحة تاريخية للسيتوكين والعلاجات المناعية ب IL-12

توقع العلماء منذ اكتشاف "البيروجين الداخلي" المعروف حالياً باسم IL-1 عام 1953، استخدام السيتوكينات الخارجية للتحكم بالجهاز المناعي للمريض في محاولة للسيطرة على الأورام الخبيثة، وقد تركزت العوائق المبكرة للمعالجة المناعية القائمة على السيتوكينات على الصعوبات التي تحقق التصنيع القابل للتكاثر لإمداد كافٍ ونقي من السيتوكينات للتجارب السريرية.

تم في أوائل الثمانينيات مشاركة تقنية تآشيب DNA والتقدم في التوصيف الكيميائي الحيوي للبروتينات للتغلب على هذه العقبة، وأخيراً عام 1986 حقق IFN- α (Interferons) خرقاً باعتباره أول سيتوكين يفوز بموافقة إدارة الأغذية والأدوية كعلاج سيتوكيني وحيد للسرطان، ومنذ ذلك الحين قيمت مئات إن لم يكن الآلاف من الدراسات أكثر من 40 من السيتوكينات مقابل مجموعة من نماذج الأورام قبل السريرية. ثم دخل عدد من السيتوكينات الواعدة مثل GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)، IL-1، TNF α (Tumor necrosis factor)، وIL-12 لاحقاً في التجارب السريرية كعوامل مفردة لكنها فشلت في تقديم فائدة سريرية. حالياً تمت الموافقة على 2 فقط من أكثر من 40 السيتوكينات المحددة كعلاجات مناعية مفردة لعدد محدود من الاستطبابات (الجدول 1).

الجدول 1. العلاجات السيتوكينية المفردة والمعززة للسيتوكينات التي تمت الموافقة عليها.

السيتوكين	الاستطبابات التي تمت الموافقة عليها	طريق الإعطاء
IFN- α (2a or 2b)	ابيضاض الدم مشعر الخلايا، ابيضاض الدم النقوي المزمن، ساركوما كابوسي المرتبطة بالإيدز	حقنة وريدي حقن تحت الجلد حقن عضلي
IL-2	سرطان الخلايا الكلوية النقيلي، الورم الميلانيني النقيلي	حقن وريدي
Talimogene laherparepvec (T-VEC)	الميلانوما المتقدمة غير القابلة للاستئصال	حقن في الورم

ربما يعتبر IL-12 من أهم الاكتشافات التي أعطت أملاً كبيراً في تطوير العلاج المناعي بالسيتوكينات حتى الآن، وكما ذكرنا يعتبر IL-12 سيتوكين قوي محرض للداخل ينتج عن طريق الخلايا العارضة للمستضد عادة استجابة لمسببات الأمراض الميكروبية، ويتألف من وحدتين فرعيتين ترتبطان بثلاثة جسور منفصلة لتشكل متغاير p70. يعد IL-12 مسؤولاً عن تحريض وتعزيز المناعة الخلوية، ومن بين وظائفه المتنوعة ثبت أن IL-12:

(1) يحفز تمايز خلايا TH1؛

(2) زيادة التنشيط والقدرات السامة للخلايا للخلايا التائية والخلايا القاتلة الطبيعية؛

و(3) تثبيط أو إعادة برمجة الخلايا المثبطة للمناعة مثل الخلايا الضامة المرتبطة بالورم (TAMs tumor-associated macrophages) والخلايا الكابتة المشتقة من نقي العظم (MDSCs myeloid-derived suppressor cells).

كذلك يحرض IL-12 أيضاً على إنتاج كميات كبيرة من $IFN\gamma$ الذي هو في حد ذاته مثبط للخلايا / سام للخلايا ومضاد لتولد الأوعية ويمكن أن ينظم تعبير MHC III (major histocompatibility complex) على الخلايا السرطانية لتعزيز التعرف والتحلل، لذلك ليس من المستغرب إذن أن يظهر IL-12 تأثيرات ملحوظة ضد الأورام ضد مجموعة من الأورام الخبيثة في الدراسات قبل السريرية، حيث تعتمد هذه التأثيرات إلى حد كبير على خلايا CD8 + T والخلايا القاتلة الطبيعية.

3 عائلات IL-12

تتضمن عائلة IL-12 4 أفراد IL-23، IL-27، IL-35 و IL-39 (الشكل 2) (الجدول 2)؛ تنتج جميع ILs بواسطة البلاعم والخلايا التغصنية DCs (dendritic cells) ضد الممرضات. يعتبر IL-12 و IL-23 العضوان البارزان في عائلة السيتوكينات، ويعد IL-12R β 1 و IL-12R β 2 مستقبلان لـ IL-12 بينما تشمل مستقبلات IL-23 على IL-12R β 1 ولكن ليس 2 β و IL-23R. تم في الفئران الكشف عن معقد IL-23R من البالعات، Th1- والخلايا التغصنية المشتقة من نقي العظم؛ وعلى غرار IL-12 ينشط IL-23 أيضاً جزيئات الإشارة لـ JAK-STAT تماماً مثل IL-12 والتي تشمل JAK2 و STAT1/2/4/5 و TYK2. يكون تنشيط STAT4 أضعف من IL-23 مقارنة بـ IL-12 بسبب المركبات المختلفة المرتبطة بالحمض النووي، وقد كشفت العديد من الدراسات التي أجريت على الفئران أن IL-23 يؤدي دوراً مهماً مقارنة بـ IL-12 ضد التهاب الدماغ والنخاع المناعي EAE (autoimmune encephalomyelitis).

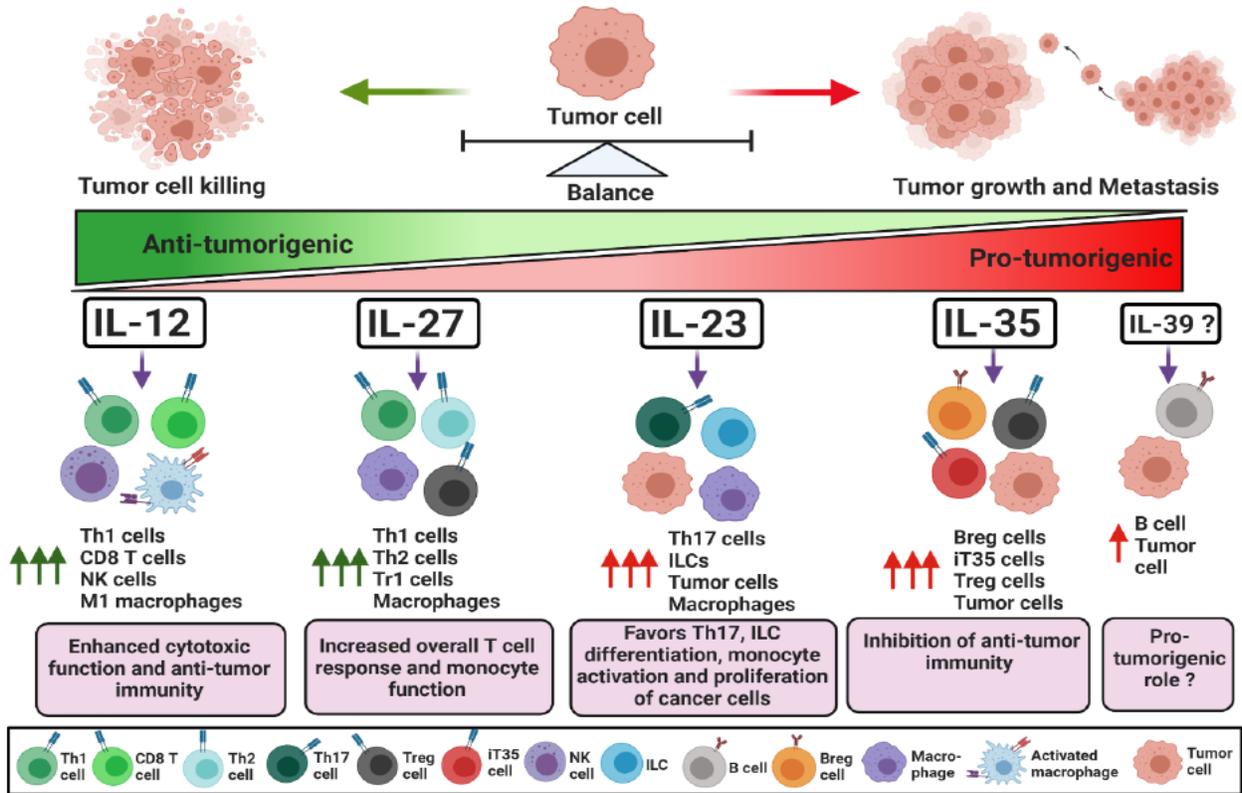
الجدول 2. عائلة سيتوكين الانترلوكين IL-12 وخصائصها البيولوجية

IL-39	IL-35	IL-27	IL-23	IL-12	
Ebi3,IL-23p19	EB13, p35	P28, EB13	P19, p40	P35,p40	السيتوكينات
gp130, IL-23R	gp130 IL-12R β 2	WSX, gp130	IL12R, IL12R β 1	IL12R β 1, IL12R β 2	المستقبلات
JAK?	JAK1 & JAK2	JAK1 & JAK2	JAK2, TYK2	JAK2, TYK2	الكينازات
STAT 1 STAT 3	STAT 1 STAT 4	STAT 1 STAT 3	STAT 3 STAT 4	STAT4	VITAL STATs
الخلايا البائية للفئران	Foxp3	التغصنية، الوحدات والخلايا البائية	التغصنية، الوحدات والخلايا البائية	التغصنية، الوحدات والخلايا البائية	الخلايا المنتجة
العدلات	خلايا Th أخرى	الخلايا القاتلة الطبيعية وخلايا Th1	الخلايا القاتلة الطبيعية وخلايا Th1 و Th17	الخلايا القاتلة الطبيعية وخلايا Th1	الخلايا التي تستجيب

دور محرض للورم؟	تنشيط تكاثر الخلايا التائية	تنشيط Th1 وحجب Th17	تنشيط Th1 واستقطاب وتكاثر Th17	تنشيط Th1 وحجب Th2	الوظيفة
-----------------	-----------------------------	---------------------	--------------------------------	--------------------	---------

IL-23 3.1

إن IL-23 عبارة عن سيتوكين غير متجانس يتكون من وحدات فرعية p40 و p19، وقد ثبت أن لـ IL-23 في السرطان دور محرض ومضاد للأورام (الشكل 3).



الشكل 3. دور سيتوكينات عائلة IL-12 في الحفاظ على التوازن بين الآليات المستجيبة والاستجابات المناعية التنظيمية في تكوين الأورام. ينشط IL-12 استجابة مناعية فاعلة ضد الخلايا السرطانية عن طريق تعزيز استقطاب البلاعم M1 وإنتاج IFN من قبل خلايا Th1 التي بدورها تحفز خلايا CD8+ السامة للخلايا وخلايا NK المضادة للورم. لكل من IL-23 و IL-27 تأثيرات مزدوجة على الخلايا المناعية في السرطان، حيث يمكن أن يؤدي IL-27 و IL-23 إلى استجابة مناعية شاملة متواسطة بالخلايا التائية وإلى تعديل البالعات المثبطة للمناعة، وعلاوة على ذلك يمكن أن يحفز IL-23 تكاثر ونمو الخلايا السرطانية. على العكس من ذلك فإن IL-35 يعتبر سيتوكين قوي مثبط للمناعة، حيث يحث على تنشيط خلايا B و T وانتشارها الذي يفسد المناعة المضادة للورم ويحفز نمو الورم والنقائل. ظهر مؤخراً أن IL-39 يفرز من الخلايا البائية وقد يزيد من تكاثر الخلايا السرطانية.

3.1.1 L-23 كمثبط للمناعة المضادة للورم

أبلغ عن الدور المحرض للأورام لـ IL-23 لأول مرة من قبل Langowski، حيث لوحظ أن الحذف الجيني أو إحصار IL-23 في الفئران أدى إلى زيادة ارتشاح الخلايا التائية السامة للخلايا مع تأثيرات وقائية ضد السرطان. يمكن لـ IL-23 أن يفرز من قبل الخلايا التغصنية، الوحيدات، العدلات والخلايا المفاوية البدئية (ILCs innate lymphoid cells)؛ فقد تبين أن كل من البالعات والخلايا التغصنية والعدلات تفرز الإنترلوكين 23. على سبيل المثال تقوم IL-6 و VEGF (vascular endothelial growth factor) و CCL22 و/أو PGE2 (Prostaglandin E2) التي تنتجها الخلايا السرطانية بتجنيد البالعات المرتبطة بالورم التي بدورها تنتج IL-23 وتحافظ على الفعالية التثبيطية لـ Treg على البيئة الدقيقة للورم (TME tumor microenvironment).

تنشط IL-23 التي تنتجها العدلات المرتبطة بالورم مسارات AKT و p38 في الخلايا الجذعية المتعلقة باللحمة المتوسطة وتحولها إلى أرومات ليفية مرتبطة بالسرطان. كذلك يمكن أن يحفز CXCL5 أيضاً التعبير عن IL-23 في العدلات لتمكين الهجرة المعززة وغزو خلايا سرطان المعدة، ويمكن للمنتجات الميكروبية أيضاً تنشيط الخلايا النخاعية داخل الورم، التي تنتج بدورها IL-23 وتعزز أورام القولون والمستقيم في الفئران. أوضحت دراسات مماثلة بواسطة Jin وزملاؤه أن الجراثيم تحفز الخلايا النخاعية للحث على إنتاج IL-23 في نماذج الفئران لسرطان الرئة.

درس دور IL-23 في تنظيم تمايز خلايا Th17 على نطاق واسع، وقد ثبت أنه يؤدي دوراً مهماً في تزايد خلايا Th17 والحفاظ على النمط الظاهري Th17. يعتبر IL-23 ضرورياً لتثبيت ROR γ t الذي يمثل عامل نسخ لتوليد خلايا Th17، ويسهل إفراز السيتوكينات المستجيبة IL-17 و IL-21 من قبل خلايا Th17. يحفز IL-23 أيضاً إنتاج IL-17 من الخلايا التائية $\gamma\delta$ ، والتي يمكن أن تدعم نمو الورم. يرسل IL-23 إشارات من خلال IL-

12Rβ1 و IL-23R في الخلايا المستهدفة وينشط Jak2 و Tyk2، مما يؤدي إلى فسفرة STAT3 و STAT4. تعمل إشارات IL-23R في خلايا CD4 + T على تنشيط STAT3 الذي يعمل بدوره على تثبيت تعبير RORγt ويعزز نسخ الجين IL-17، كما تعمل إشارات IL-17 المحرصة بـ IL-23 أو IL-23 أيضاً على تنشيط NFκB الذي ينظم الجينات المسؤولة عن تجنيد البالعات المرتبطة بالورم (TAMs tumor-associated macrophages) و MDSCs في TME.

3.1.2 IL-23 كمنشط للمناعة المضادة للورم

من المعروف أن IL-23 ينشط ويحافظ على التعبير عن عوامل النسخ الخاصة بـ Th17، ويمكن أن تتظم عوامل النسخ هذه بشكل سلبي استجابة لخلايا Treg المثبطة للمناعة، حيث يمكن لإشارات IL-23 تثبيط تمايز Treg وتحافظ على النسخ النشط لـ IL-17 و IL-21 و IL-22 و IL-23R. يمكن أن ينظم IL-23 أيضاً وظيفة مجموعات فرعية متنوعة من الخلايا المناعية في TME، فعلى سبيل المثال يقوم IL-23 بتنظيم تعبير IL-23R على الخلايا الليمفاوية الفطرية من النوع 3 ILC3 (innate lymphoid cells) والمحبات وخلايا NK، الأمر الذي يؤدي بدوره إلى إنتاج السيتوكينات المحرصة للالتهاب والوظيفة السامة للخلايا.

بوجود IL-23 تفرز الخلايا داخل الظهارة IL-22 مما يزيد من الوظيفة الحاجزية ويحافظ على النمط الظاهري لخلايا CD4 + T. من ناحية أخرى تفرز الخلايا الليفية المنشطة CCL5 و MCP-1 التي تجند البالعات المنتجة لـ IL-23. توسع البالعات إيجابية IL-23 خلايا Th17 المضادة للأورام التي لها نمط ظاهري مميز يعرف باسم خلايا Th17 الشبيهة بـ Th1 وتعزز الاستجابات المناعية الخاصة بالورم عن طريق إفراز IFN-γ و CXCL9 و CXCL10؛ وهكذا فقد ثبت أن IL-23 و IL-17 تؤدي أدوار متعددة الجوانب في تكوين الأورام عن طريق

تنشيط أو تثبيط المناعة المضادة للورم، وتوضح هذه النتائج أنه يمكن لـ IL-23 أن تعدل الاستجابات المناعية المحرصة وكذلك المضادة للورم (الشكل 3).

بشكل عام يستخدم IL-23 مسارات مختلفة للإشارات في الخلايا السرطانية والمناعة التي تنظم المسارات المحرصة والمضادة للالتهابات، كما يمكن أن تؤدي الوظائف المعتمدة على السياق لـ IL-23 في السرطان إلى تطوير محاور العلاج المثبط أو المعزز على التوالي.

IL-27 3.2

إن IL-27 عبارة عن سيتوكين غير متجانس يتكون من وحدات فرعية EBi3 و p28، ويشارك بشكل عام في تمايز وتفعيل مجموعات فرعية من خلايا CD4 + T المختلفة (الشكل 3). على العموم يمكن للخلايا العارضة للمستضد التي تحفزها مستضدات الورم و CD40 أن تفرز IL-27، الذي له وظيفة مزدوجة في تنظيم الاستجابات المناعية ضد السرطان.

IL-27 3.3 كمثبط للمناعة المضادة للورم

لقد ثبت أن لـ IL-27 خصائص مضادة للالتهاب، فعلى سبيل المثال يقوم IL-27 بتنشيط STAT3 وتثبيت تعبير Foxp3 ونسخ IL-10 في الخلايا التائية مما يؤدي إلى تثبيط مناعي مستمر. تُعرف هذه الخلايا التائية المنتجة لـ IL-10 بخلايا Tr1، وتتمثل أدوار خلايا Tr1 بتثبيط المناعة وتقليل تنظيم الفعالية السام للخلايا لخلايا CD8 وخلايا NK، بالإضافة إلى تثبيط إنتاج TNF- α و IL-6 من الوحيدات، وتعتبر هذه الأدوار مهمة لمناعة ضد الورم.

يمكن لإشارات IL-27 من خلال STAT1 و STAT3 تنشيط عامل النسخ c-Maf والحث على توليد خلايا Tr1 وإنتاج IL-10 من الخلايا التائية، وقد ثبت أيضاً أن IL-27 يعمل كمضاد للالتهاب عن طريق تثبيط الاستجابات

المناعية الخاصة بالخلايا Th2 و Th17 وتعزيز تنشيط خلايا Treg وتكاثرها. بالإضافة إلى ذلك يمكن أن يؤدي تنشيط STAT1 و STAT3 بواسطة IL-27 إلى التعبير عن IL-1 β و TNF- α و IL-18 التي تعتبر مهمة لاستقطاب النمط الظاهري M2 المثبط للمناعة. تبين لدى مرضى سرطان الرئة المتقدم غير صغير الخلايا NSCLC (advanced non-small cell lung cancer) أيضاً أن IL-27 يؤدي دور محرض للأورام، حيث يتسبب IL-27 في تحفيز الخلايا التغصنية التحملية التي تساعد الخلايا السرطانية على الهروب من المراقبة المناعية.

3.3.1 IL-27 كمنشط للمناعة المضادة للورم

من ناحية أخرى قد ينظم IL-27 الذي تنتجه الخلايا التغصنية والوحيدات والبالعات بعد تنشيط TLR بشكل إيجابي تمايز Th1 من خلال ديمرة STAT1، ويؤدي هذا لاحقاً إلى تنشيط T-bet والتعبير الجيني الخاص بـ Th1. كذلك يمكن أن يعزز IL-27 أيضاً التعبير السطحي لـ MHC I و MHC II في الوحيدات بالإضافة إلى التحفيز المشترك لـ CD80 و CD86 وجزء الالتصاق CD54، مما يعزز بشكل عام الفعالية المحرصة للالتهابات للخلايا التائية. يرسل IL-27 إشارات من خلال مستقبلات (WSX-1) IL-27R و gp130 إلى الخلايا المستهدفة، وتقوم مستقبلات IL-27R gp130 بتجنيد Jak1 و Jak2 التي تنشط بدورها STAT1 و STAT3. بالإضافة لما سبق يؤدي IL-27 دوراً مهماً في تطوير الخلايا التائية المنتجة لـ Th1 و IL-10. تعبر خلايا Th1 عن T-bet والسيتوكين المستجيب IFN من خلال ديمرة STAT1 الناجمة عن إشارات IL-27. في سيناريوهات معينة يمكن لمستقبل IL-27 أيضاً تنشيط STAT4 و STAT5، وعلى سبيل المثال يرسل IL-27 إشارات من خلال STAT1 و STAT4 للحث على تعبير T-bet في خلايا CD4 + T، مما يؤدي إلى تنظيم بالزيادة لـ IFN- γ داخل الخلايا.

في الوقت نفسه يعزز تنشيط STAT5 تكاثر خلايا Th1 في TME، فعلى سبيل المثال أدت الإشارة من خلال Granzyme و WSX-1 و gp130 على خلايا CD8 + T إلى تنشيط STAT1 و STAT4 وأدت إلى زيادة التعبير عن perforin و IFN بطريقة تعتمد على T-bet. في خلايا NK يحفز تنشيط STAT1/STAT4 بواسطة IL-27 إنتاج IFN المعتمد على T-bet وتعبير IL-27R، ويمكن لهذه التأثيرات الشاملة المحرصة للالتهابات لـ IL-27 أن تحفز المناعة المضادة للأورام وتساهم في إزالة الخلايا السرطانية، بالإضافة إلى ذلك قد يحصر IL-27 إنتاج IL-2 المطلوب لتنشيط الخلايا التائية-وينظم شدة ومدة استجابة خلايا CD4 + T.

IL-35 3.4

يعتبر IL-35 إضافة حديثة لعائلة IL-12 من السيتوكينات ويتكون من الوحدتين الفرعيتين p35 و EBi3، وهو عبارة عن سيتوكين مثبط قوي للمناعة ينتج في الغالب من قبل خلايا B التنظيمية (regulatory B) Breg وخلايا iT35 وخلايا Treg ويمكن أن يؤدي دوراً مهماً في تثبيط الاستجابات المناعية للمستجيب.

اكتشف IL-35 مؤخراً في البالعات والخلايا التغصنية والخلايا السرطانية، وقد أصبح دور IL-35 في نمو الورم أكثر بروزاً بسبب قدرته على تثبيط الاستجابات المناعية للمستجيب (الشكل 1)، حيث ينظم IL-35 تمايز خلايا CD4 + T ويفضل بشدة مصير الخلايا التائية التنظيمية. يُعتقد أيضاً أن IL-35 ينظم عوامل النسخ الخاصة بنسب Th1 و T-bet و Th17 و ROR γ t بالإضافة إلى السيتوكينات IFN- γ و IL-17، فعلى سبيل المثال يقوم IL-35 بتنشيط وظائف المستجيب لخلايا CD4+ ويفضل نمو الورم من خلال تسهيل استنفاد خلايا CD8 + T. بالإضافة إلى ذلك يقوم IL-35 بتقييد تنشيط خلايا CD8 + T عن طريق تثبيط التعبير عن جزيء السطح التحفيزي المشترك CD28، وإنتاج السيتوكين Th1، وتقليل الوظائف الحالة الخلوية عن طريق تثبيط التعبير

عن perforins. علاوة على ذلك يحول IL-35 خلايا T المستجيبة إلى خلايا T المنتجة لـ IL-35 والمعروفة باسم خلايا iT35 وينشط إنتاج IL-35 وانتشار خلايا Treg.

يمكن أن تكون مجموعة فرعية من الفئران والخلايا البائية التنظيمية البشرية مصدراً رئيسياً لـ IL-35 في بعض أنواع الأورام الخبيثة، بالإضافة إلى ذلك يمكن لـ IL-35 تعزيز تعبيره الخاص في الخلايا البائية من خلال IL-12R β 2 و IL-27R α وتفعيل STAT1 و STAT3 مما يؤدي إلى التكوين المعزز لخلايا Breg.

يؤدي فقدان IL-35 إلى إعاقة نمو ورم البنكرياس من خلال الزيادات في خلايا CD4 + T وخلايا CD8 + T داخل TME، وقد تم تحديد مجموعة فرعية متخصصة من الخلايا البائية المميزة باسم CD5+CD1dhiCD21hi باعتبارها المصدر الرئيسي لـ IL-35 في سرطان البنكرياس، وقد شجع الإنتاج الخاص بالخلايا البائية لـ IL-35 على توسع خلايا Treg وحظر الفعالية المضادة للورم لخلايا CD4 + T المستجيبة. علاوة على ذلك يؤثر IL-35 بشكل مباشر على خلايا CD8 + T ويثبط ارتشاحها ووظيفة المستجيب عن طريق تقليل تنظيم التعبير عن IFN- γ و CXCR3 بطريقة تعتمد على STAT3. لوحظ أيضاً ارتفاع الخلايا البائية المنتجة لـ IL-35 في الدم المحيطي لمرضى سرطان المعدة (gastric cancer) GC وكانت مسؤولة عن تراكم خلايا Treg المثبطة للمناعة، MDSCs، وخلايا B المنتجة لـ IL-10 والوحدات + CD14.

3.4.1 IL-35 في تثبيط نمو الورم

على الرغم من أن IL-35 يؤدي دور محرض للأورام في العديد من نماذج السرطان مثل الورم الميلانيني وسرطان البنكرياس و NSCLCC وسرطان الثدي وسرطان الغدد الليمفاوية وسرطان المعدة، من بين سرطانات أخرى، فقد أبلغ Zhang أن IL-35 يثبط هجرة الخلايا، التكاثر، تشكيل المستعمرات وغزو خلايا سرطان القولون البشرية عن طريق تثبيط β -catenin؛ وفي هذه الحالة قام IL-35 بتثبيط نمو السرطان في الجسم الحي وحسب

خلايا سرطان القولون للعلاج الكيميائي، وبالتالي يمكن أن يكون IL-35 مع العلاج الكيميائي مفيداً لسرطان القولون. أظهرت دراسات مماثلة أن IL-35 يؤدي دوراً مثبطاً لخلايا سرطان القولون والخلايا السرطانية البشرية NSCLC عن طريق قمع هجرة الخلايا وتكوين المستعمرات. أما بالنسبة لمرضى سرطان الخلايا الكبدية HCC (hepatocellular carcinoma) ينخفض تعبير IL-35 بشكل ملحوظ في المرضى المصابين بالسرطان المتقدم مقارنة بالمرحلة المبكرة، وبالنسبة لمرضى سرطان الكبد الذين يعانون من انخفاض IL-35 فقد زاد لديهم حجم الورم، النقائل البعيدة والغزو الإيجابي للأوعية الدموية الدقيقة؛ علاوة على ذلك فإن الإفراط في التعبير عن MHC1 و CD95 المنتظم من IL-35 في الخلايا السرطانية HepG2 وتقليل هجرة الخلايا وتشكيل المستعمرة والغزو. تشير هذه البيانات إلى أن IL-35 يؤدي دوراً مضاداً للأورام السرطانية في سرطان الكبد عن طريق تعزيز المناعة المضادة للورم الخاصة بـ MHC1 وتقليل هجرة الخلايا السرطانية.

3.4.2 IL-35 في تعزيز نمو الورم

بخلاف ما سبق أفادت معظم الدراسات البحثية أن المستويات المتزايدة من IL-35 يمكن أن ترتبط بأمراضية وتطور السرطان، فقد كانت مستويات IL-35 في عينات مصل مرضى سرطان البروستاتا مرتفعة للغاية مقارنة بالضوابط الصحية وارتبطت بتطور المرض، وقد أفادت دراسات مماثلة عن مستويات مرتفعة من IL-35 في مرضى سرطان الثدي والتي ارتبطت بشكل إيجابي بتعبير Ki67 و p53 و EGFR على خلايا سرطان الثدي. علاوة على ذلك تبين أن المستويات العالية من IL-35 ترتبط بضعف بقاء مرضى الليمفوما البائية الكبيرة المنتشرة DLBCL (diffuse-large B-cell lymphoma) المعالجين بالعلاج الكيميائي.

بالإضافة إلى ذلك لوحظ ارتفاع مستويات IL-35 في نقي العظام لمرضى ابيضاض الدم النقوي الحاد AML (acute myeloid leukemia) وارتبطت بشكل إيجابي بالمرحلة السريرية. يمكن أيضاً للخلايا السرطانية أن

تفرز IL-35 وقد ثبت أن لها تأثير محرض للأورام خاصة في سرطان البنكرياس، ويرتبط IL-35 بسوء الإنذار لدى مرضى سرطان البنكرياس ويعتقد أيضاً أنه يعزز نمو خلايا سرطان البنكرياس من خلال تمكين النقائل والارتشاح. في هذه الحالة أدت إشارات IL-35 في الخلايا السرطانية إلى تنشيط STAT1 عبر مستقبل gp130 مما أدى إلى التعبير عن ICAM1، وزيادة الالتصاق البطاني والنقائل. كما ساعد إنتاج خلايا سرطان البنكرياس البشرية لـ IL-35 على تكاثر الخلايا السرطانية من خلال تعزيز التعبير عن cyclin B، cyclin D، Cdk2 و Cdk4، كما أدى إلى تثبيط موت الخلايا المبرمج عن طريق زيادة مستويات Bcl2 وخفض مستويات TRAILR1. أظهر Jin وزملاؤه أن المستويات المرتفعة من IL-35 في مرضى سرطان البنكرياس مرتبطة بزيادة في حجم الورم ومراحل TNM ورم خبيث في العقدة الليمفاوية. علاوة على ذلك عزز IL-35 الناتج عن سرطان البلعوم البشري وسرطان الغدد الليمفاوية للخلايا B وخلايا الورم الميلانيني ارتشاح الخلايا النقوية CD11b + Gr1+ وعزز تكوين الأوعية. على العموم تشير هذه النتائج إلى أن IL-35 قد يكون له دور مميز في السرطان عندما يتم إنتاجه بواسطة الخلايا المناعية أو الخلايا السرطانية.

IL-39 3.5

يعتبر IL-39 عضو مقترح حديث لعائلة IL-12، وهو سيتوكين غير متجانس يتكون من الوحدات الفرعية p19 وEBi3، وقد ركزت معظم الدراسات حتى الآن فقط على سلالات الخلايا السرطانية، ولا تتوفر حتى الآن تقارير نوعية عن نماذج حيوانية أو حالات بشرية، وبالتالي فمن السابق لأوانه تعيين IL-39 باعتباره سيتوكيناً التهابياً أو تنظيمياً في هذا الوقت من الزمن.

أظهر Wang وزملاؤه أنه يمكن إفراز IL-39 من قبل الخلايا البائية المحفزة بـ LPS ويمكن أن يسبب الالتهاب عن طريق تنشيط STAT1/STAT3 في نماذج الفئران لمرض الذئبة، وقد ازدادت الخلايا البائية المنتجة لـ IL-

39 في الفئران المصابة بالذئبة، وأدى تثبيط IL-39 إلى تقليل شدة المرض، وفي هذه الدراسة تسبب IL-39 في تمايز وتوسيع العدلات CD11b + Gr1+ في الجسم الحي. علاوة على ذلك يمكن أن تزيد العدلات المنشطة من زيادة التعبير عن عامل تنشيط الخلايا البائية BAFF (f B cell activation factor) في خلايا GL7 + B، مما يخلق حلقة تغذية راجع إيجابية تؤدي إلى زيادة إنتاج IL-39. أظهر IL-39 أيضاً أن له وظيفة محرضة للأورام في سرطان البنكرياس ففي ظل وجود IL-39، زادت مستعمرات خلايا سرطان البنكرياس البشرية بشكل كبير من معدل تكاثرها، وقد كان هذا مصحوباً بتعبير منخفض عن p21 و TRAILR1. يُعتقد أن IL-39 يرسل إشارات عبر IL-23R و gp130 في الخلايا المستهدفة ولتنشيط إشارات STAT1 و STAT3.

IL-12 4

إن IL-12 عبارة عن سيتوكين غير متجانس يتكون من وحدات فرعية p40 و p35 ويعتبر السيتوكين المحرض للالتهابات إلى حد كبير (الشكل 3)، وينتج من قبل الخلايا العارضة للمستضد مثل الخلايا التغصنية والبلاعم ويعتبر هاماً بشكل كبير لتجنيد والوظائف المستفعدة لخلايا CD8 + T و NK، ولذلك يعتبر IL-12 مساهماً رئيسياً في الاستجابات المناعية الفعالة المضادة للورم.

يرسل IL-12 إشارات عبر مستقبلات IL-12Rβ1 و IL-12Rβ2 المعبر عنها في الخلايا المستهدفة، والتي تسمح لـ Jak2 و Tyk2 بتعزيز فسفرة والديمر المتجانسة لـ STAT4، ومن ثم يرتبط الليمير المتجانس لـ pSTAT4 بالجينات المستهدفة وينظم التعبير الجيني. يعتبر تنشيط STAT4 بواسطة IL-12 في خلايا CD4 + T ضرورياً لنسخ T-bet الذي يعتبر منظم إيجابي لتمايز خلايا Th1، حيث يعزز T-bet التعبير عن السيتوكينات الخاصة بـ Th1 والكيموكينات والمستقبلات المرتبطة بـ Th1؛ كذلك يمكن أن ينظم T-bet وحده بشكل إيجابي التعبير

عن IFN- γ ، بينما بالاشتراك مع STAT4 يعزز نسخ CXCR3 و IL-12R β 1 و CCL3 و CCL4، حيث يعد CCL3 و CCL4 ضروريين لتجنيد الخلايا القاتلة الطبيعية السامة للخلايا وخلايا CD8 + T وذلك ضمن الورم. يتم بوجود IL-12 تنشيط الخلايا القاتلة الطبيعية، والتعبير عن CD69 و CD25، ويمكن أن تتكاثر في مكان الورم، حيث تتكاثر خلايا NK و Th1 المنشطة وترتشف إلى الورم، حيث تدعم خلايا Th1 وظائف المستجيب للخلايا التائية السامة للخلايا النوعية للورم؛ ويمكن لـ IFN- γ و Granzyme و perforin التي تفرزها الخلايا السامة للخلايا NK و CD8 + T أن تحفز الموت الخلوي المبرمج للخلايا السرطانية وتسيطر على نمو الورم. علاوة على ذلك يُسهل IL-12 عرض المستضد عن طريق تنظيم MHC I على الخلايا السرطانية، ويفضل الاستقطاب إلى بالعات M1 وجذب الخلايا المناعية المستجيبة عن طريق تعزيز إنتاج كيموكينات CXCL9 و CXCL10 و CXCL11؛ بالإضافة إلى ذلك يعمل T-bet و STAT4 كمنظمين سلبيين لـ ROR γ t و Foxp3، وعوامل النسخ المسؤولة عن توليد Th17 و Treg على التوالي، ويحدان من انتشارهما في البيئة الدقيقة للورم TME.

بالإضافة لما سبق يمكن لـ IL-12 أيضاً تحييد الإشارة بواسطة المستقبلات التنظيمية السلبية على خلايا CD8 + T، فعلى سبيل المثال يعمل IL-12 على تقليل تنظيم PD-1 و IFN γ R2 على خلايا CD8 + T، مما يحمي خلايا CD8 + T التي ترتشف إلى الورم من موت الخلايا الناجم عن IFN- γ . يتطلب تنشيط المناعة المضادة للورم بواسطة مضاد PD1 تداخل إشارات متواسط بـ IL-12 بين الخلايا التائية والخلايا التغصنية التي تمكن من قتل الخلايا السرطانية المتواسط بخلايا CD8 + T.

إلى جانب وظيفة IL-12 في الخلايا المناعية المستجيبة، يغير IL-12 مرونة plasticity خلايا Treg المتميزة نهائياً عن طريق تحويل خلايا Foxp3 + Treg إلى خلايا Foxp3 + T المنتجة لـ IFN- γ ، ويقلل العلاج بـ IL-

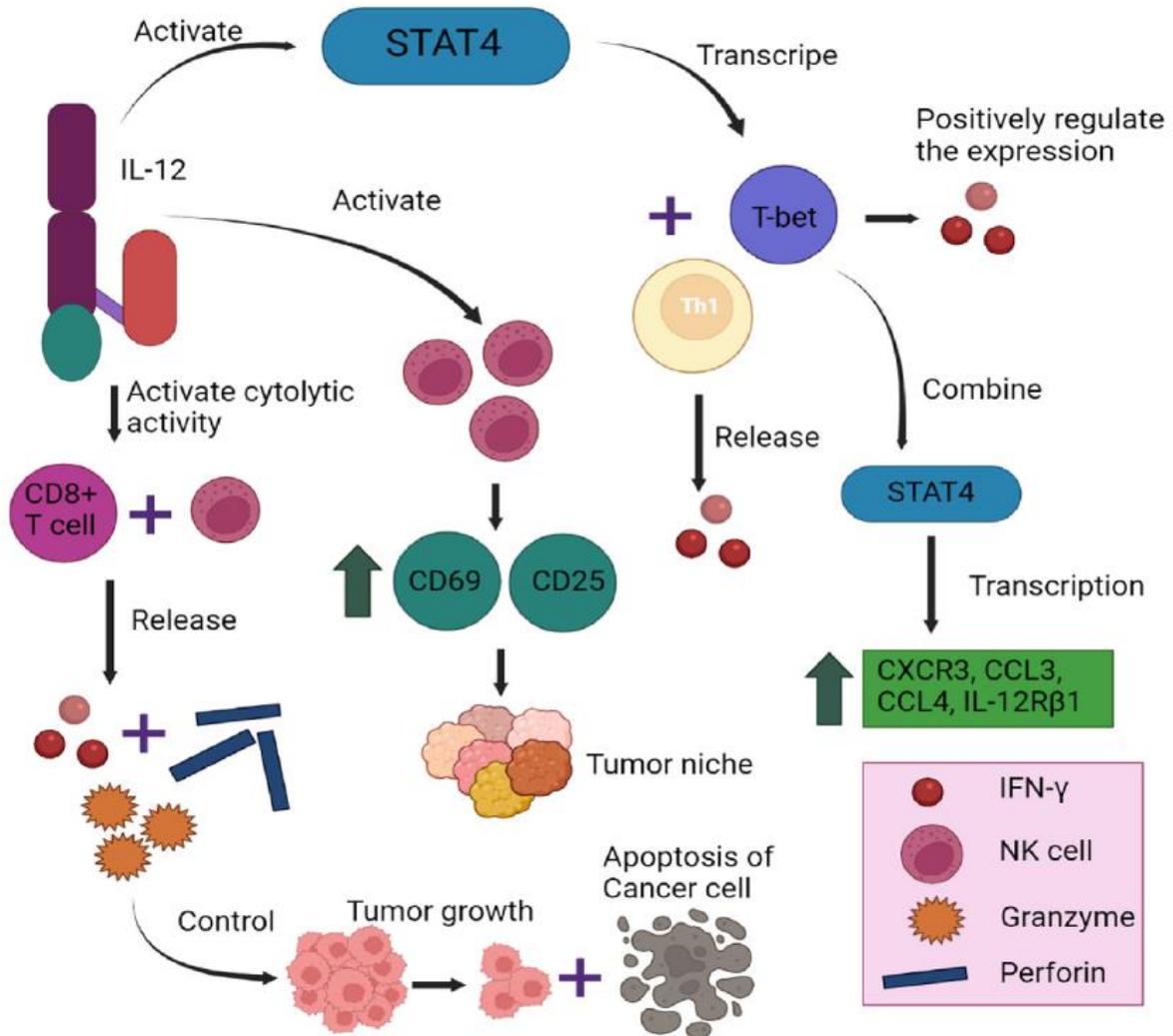
12 من مستوى IL-2 المطلوب لبقاء خلايا Treg وتكاثرها، وقد ثبت كذلك أن IL-12 يحفز التثبيط المتواسط بـ IFN- γ لتوسع خلايا Treg للفئران.

تتسبب إشارات IFN- γ المحرّضة بـ IL-12 في توقف دورة الخلية في خلايا Treg وتثبط تكاثر خلايا Treg المحرض بالورم، على العموم تُظهر هذه الدراسات أن IL-12 ليس مطلوباً فقط لتفعيل الاستجابات المناعية الفعالة المضادة للورم، ولكن يمكنه أيضاً تثبيط التثبيط المناعي بشكل مباشر، وبالتالي يمكن لاستخدام IL-12 كعلاج مناعي للسرطان أن يكون مفيداً في التحكم في نمو الورم عن طريق تنشيط الاستجابات المناعية السامة للخلايا المضادة للورم. بشكل عام يستهدف IL-12 ويعدل الخلايا التائية والخلايا القاتلة الطبيعية والخلايا العارضة للمستضد (antigen-presenting cells) APCs التي تنظم مصير الاستجابة المناعية المضادة للورم ضد الخلايا السرطانية.

4.1 آلية تأثير IL-12 في السرطان

يقوم IL-12 في خلايا CD4 + T بتنشيط STAT4، الذي يقوم بدوره بنسخ T-bet وتمايز خلايا Th1؛ ويتم تنظيم مصير التعبير عن السيتوكينات النوعية، الكيموكينات Th1، والمستقبلات النوعية بواسطة T-bet (المنظم الرئيسي). يتم أيضاً تنظيم تعبير IFN- γ بشكل إيجابي بواسطة T-bet وحده وعندما يتحد مع STAT4 فإنه يزيد من نسخ CXCR3 وCCL3-4 وIL-12R β 1. ينشط IL-12 الخلايا القاتلة الطبيعية التي تزيد من تعبير CD69 وCD25 في مكان الورم، وتفرز الخلايا القاتلة الطبيعية السامة للخلايا وخلايا CD8+ T كلا من IFN- γ وperforin وgranzyme التي تتحكم في نمو الورم وتسبب الموت الخلوي المبرمج للخلايا السرطانية. على العموم يعد IL-12 ذو المسار المعتمد على IFN فعالاً لعلاج سرطان الرئة، ويظهر في الميلاнома B16 أ، التعبير عن IL-12 يتحكم في الأوعية الدموية للورم من خلال المسار المعتمد على IFN. يتم التحكم في نمو

الورم عن طريق IL-12 المستحث IFN- γ . ينظم IL-12 أيضاً بالزيادة تنظيم معقد التوافق النسيجي الرئيسي -
 MHC I على الخلايا السرطانية، ويفضل أيضاً استقطاب البالعات M1 ويعزز إنتاج الكيموكينات CXCL9
 وCXCL10 وCXCL11 للخلية المناعية المستجيبة.



الشكل 4. آلية IL-12 ضد السرطان.

4.2 الخلايا التائية المساعدة Th-1

يسبب IL-12 تمايز الخلايا T غير المتميزة إلى النوع الأول من الخلايا التائية المساعدة Th-1 التي تفرز أيضاً IFN- γ و IL-2 و TNF- α ؛ وإن المستقبلين ذوي الحساسية العالية لـ IL-12 مهمين للخلايا اللمفاوية التائية لإعطاء استجابة لخلايا IL-12 وخلايا Th1 للتعبير عن كلا المستقبلين، وهكذا يؤدي Th1 دوراً مهماً في التعبير عن مستقبلات IL-12. علاوة على ذلك يتحكم IL-12 في العديد من الجينات التي تحافظ على مسار وخلايا Th1 ويزيد أيضاً من التعبير عن إنزيم (glucosyltransferase) لتنظيم روابط P و E-selectin من قبل Th1، حيث سيساعد تنظيم هذه selectins خلايا Th1 على الانتقال إلى موقع الالتهاب.

4.3 الخلايا القاتلة الطبيعية NK

ينشط IL-12 أيضاً الخلايا اللمفاوية المحببة الكبيرة أو الخلايا القاتلة الطبيعية NK، وفي الواقع تم اكتشاف دوره لأول مرة كعامل تحفيز للخلايا القاتلة الطبيعية عام 1989، وفي ظل غياب هذه العوامل فإن الخلايا القاتلة الطبيعية غير قادرة على تدمير الخلايا السرطانية لأن IL-12 في البشر عبارة عن سيتوكين فعال لتنشيط الخلايا القاتلة الطبيعية في الزجاج والحث على فعالية مضادة لسرطان الخلايا الكبدية (مضاد للسرطان). في السرطان يزيد IL-12 من تعبير تلك الجزيئات أو الخلايا التي تبدأ فعالية التحلل الخلوي لخلايا NK مثل CD2 و LFA-1، وتساعد الخلايا القاتلة الطبيعية على اكتشاف الأورام الخبيثة والقضاء عليها من خلال تنشيط مستقبلاتها المنشطة والمثبثة المختلفة التي تسمح لها بالتفريق بين الخلايا الطبيعية والخطيرة، بالإضافة إلى ذلك فإن مستقبلات الخلايا القاتلة الشبيهة بالجلوبيولين المناعي (المستقبلات المثبثة) للخلايا القاتلة الطبيعية تراقب فعالية MHC-1 حيث يمكن لغيابها تنشيط إنتاج الخلايا القاتلة الطبيعية لمنع فعاليتها التلقائية.

4.4 IL-12 في العلاج المناعي للسرطان

يمكن أن يكون العلاج المناعي القائم على السيتوكين فعالاً في علاج العديد من الأورام الخبيثة، ويمكن اعتبار IL-12 مرشحاً قوياً للتدخلات القائمة على العلاج المناعي، حيث إنه يقوي خلايا NK و CD8 + T السامة الخلوية النوعية للورم والمسؤولة إلى حد كبير عن قتل الخلايا السرطانية، لكن الإعطاء الجهازى لـ IL-12 سام للغاية؛ لذلك لا بد من طرق بديلة لإيتاء IL-12 و/أو تنشيط الخلايا التائية بواسطة IL-12. إلى هذا الحد صدر تقرير حديث من Nguyen وزملاؤه حيث قدموا تحديثات شاملة حول تطوير وتطبيق إستراتيجية إيتاء موضعية للعلاج المناعي القائم على IL-12؛ بالإضافة لما سبق ذكره Wang وزملاؤه أن الإيتاء الجهازى عبر فيروس غدي حال للأورام يشفر IL-12 يفقر إلى الببتيد المشير قلة من الآثار الجانبية السامة وعزز البقاء على قيد الحياة في نماذج الفئران لسرطان البنكرياس؛ كذلك عزز إيتاء IL-12 بواسطة الجسيمات النانوية الفعالية السامة للخلايا ضد خلايا سرطان الكبد البشرية، حيث أدى إيتاء IL-12 بواسطة الجسيمات النانوية في الزجاج إلى خلايا CD8 + T غير متميزة على وجه التحديد إلى توسيعها وتفعيل النمط الظاهري للمستجيب.

أظهرت العديد من الدراسات أن IL-12 يفضل البقاء على قيد الحياة وتمايز خلايا CD8 + T غير المتميزة تجاه النمط الظاهري للمستجيب، حيث يعمل IL-12 كعامل مضاد لاستماتة خلايا CD8 + T من خلال إعاقة موت الخلايا الناجم عن التنشيط لخلايا CD8 + CD62L^{hi} غير البالغة، وزيادة توجيه الخلايا التائية، وأظهر فعالية مستدامة مضادة للورم ضد نماذج الفئران لسرطان الجلد. تشير هذه النتائج إلى أن تحضير خلايا CD8 + T غير بالغة مع IL-12 قبل العلاج بالخلايا بالتبني يمكن أن يزيد من فعاليتها ونشاطها المضاد للورم. أبلغت دراسات ما قبل سريرية مماثلة عن الاستخدام التآزري لـ IL-12 مع العلاجات المناعية القائمة على الخلايا التائية بالتبني، ففي نموذج الفأر التخليقي أدى إعطاء مستقبلات المستضد الكيمري المضاد لـ VEGFR-

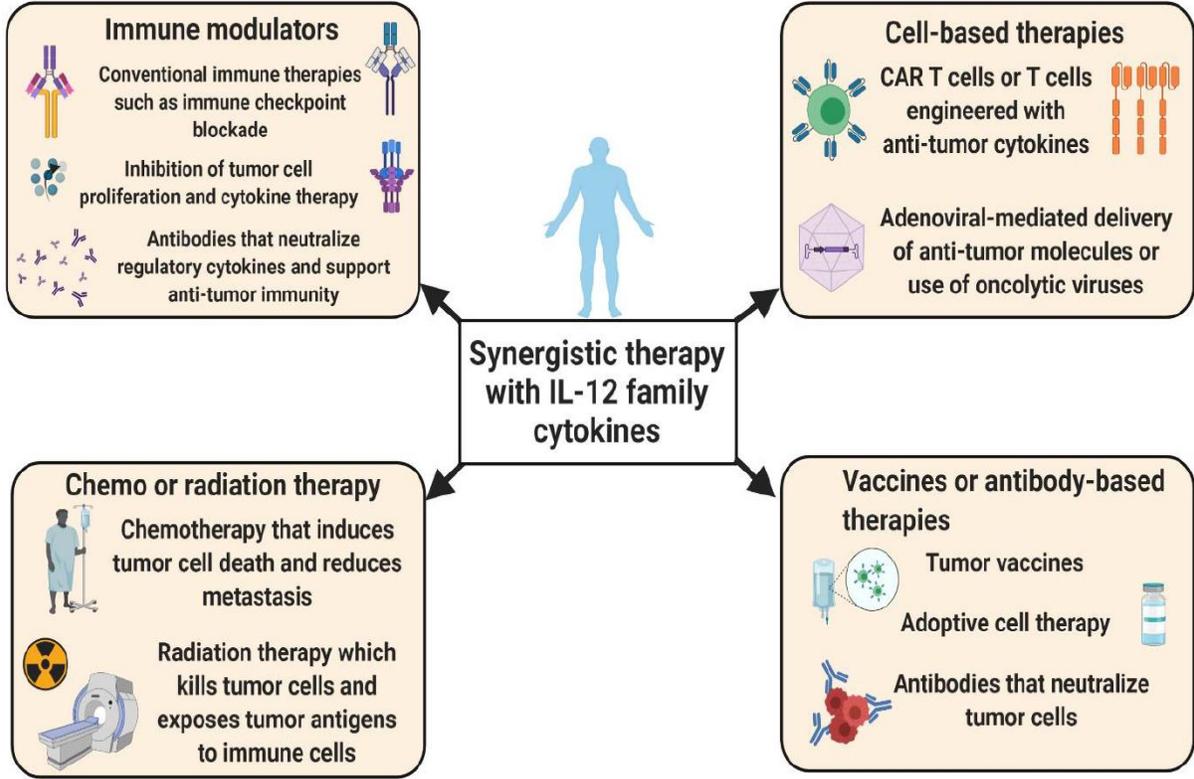
CAR 2 (chimeric antigen receptor) وخلايا T المعالجة بـ IL-12 مباشرة إلى موقع الورم إلى تعديل البيئة المثبطة للمناعة عن طريق استنفاد الخلايا الكابتة المشتقة من النقي MDSCs إيجابية VEGFR-2 الجهازية وداخل الورم. علاوة على ذلك كانت الخلايا التائية المهندسة وراثياً التي تعبر عن مستويات عالية من IL-12، فعالة علاجياً ضد أورام سرطان الجلد من فئران B16 حتى في حالة عدم وجود لقاح للورم وIL-2.

على الرغم من أن بقاء الخلايا المهندسة IL-12 كان منخفضاً مقارنة بالخلايا التائية الذاتية إلا أنها ذات وظائف محسنة، وقد تم اكتشافها بتردد أعلى في الورم الميلانيني، وحافظت على فعالية خلايا NK و CD8+ T الذاتية. تبين في التجارب السريرية أن لـ IL-12 فعالية مضادة للسرطان ضد الورم الدبقي البشري، حيث تم في هذه الحالة علاج 31 مريضاً من مرضى الورم الدبقي عالي الدرجة بناقل IL-12 البشري (Ad-RTS-hIL-) (12) في تجربة تصعيد جرعة متعددة المراكز من المرحلة الأولى (NCT02026271)، وأظهروا دليلاً على زيادة IFN- γ والخلايا الليمفاوية PD-1+ المرتبطة إلى الورم. تشير هذه النتائج إلى أن الزيادات في تركيز IL-12 داخل الورم حسن فعالية علاجات الخلايا التائية بالتبني.

لوحظ تقدم آخر مؤخراً في تعزيز الفعالية المضادة للأورام القائمة على الخلايا التائية وهو زيادة حمل IL-12 في خلايا CAR T، وفي دراسة حديثة على الفئران قبل السريرية استخدم Kueberuwa وزملاؤه خلايا CAR T التي تعبر عن IL-12 وأظهروا أن خلايا CAR T المعدلة كانت قادرة على علاج الليمفوما بائية الخلايا وتحسين معدل البقاء على قيد الحياة على المدى الطويل، حيث جندت خلايا CAR T المهندسة بـ IL-12 في هذه الحالة الخلايا المناعية المضيفة لاستنباط استجابة مناعية مضادة للورم، بالإضافة إلى ذلك أظهرت خلايا CAR T المنتجة لـ IL-12 والموجهة ضد خلايا سرطان المبيض انتشاراً قوياً وإفرازاً لـ IFN- γ ، مما أدى إلى زيادة البقاء على قيد الحياة في نموذج الفئران. أشارت دراسات ما قبل السريرية مماثلة في نموذج سرطان الخلايا الكبدية

إلى أن خلايا CAR T المعبرة عن IL-12 أنتجت مستويات عالية من السيتوكينات المستجيبة، مصحوبة بارتشاح خلايا Treg الموهنة وتحلل الخلايا السرطانية. باختصار تكشف هذه الملاحظات أن التعبير المحرض لـ IL-12 يحسن الوظائف المضادة للورم لخلايا CAR T وقد يوفر استراتيجية علاجية واعدة لمرضى السرطان (الشكل 5). على أية حال أدت خلايا CAR T أو TCR T التي تعبر عن IL-12 إلى سمية شديدة تشبه الونمة وزيادة المستويات المصلية من $IFN-\gamma$ و $TNF-\alpha$ في الفئران المصابة بسرطان الجلد، بالإضافة إلى ذلك يمكن أن يؤدي الإفراط في التعبير عن خلايا CAR T من IL-12 إلى متلازمة إطلاق السيتوكين (CRS cytokine) (release syndrome) والتسبب في استجابات التهابية جهازية عند المرضى المعالجين بخلايا CAR T، ويجب مراعاة هذه التفاعلات الشديدة قبل استخدام الخلايا التائية المعدلة وراثياً وخاصة الخلايا التائية المنتجة لـ IL-

.12



الشكل 5. قد يؤدي التعديل العلاجي للسيتوكينات لعائلة IL-12 إلى تعزيز فعالية العلاج التقليدي، حيث تشير الدراسات الحديثة إلى أن العلاجات التي تستهدف (إما زيادة أو تقليل التنظيم) لعائلة السيتوكينات IL-12 بالاشتراك مع العلاجات القياسية الأخرى قد تزيد من فعالية العلاج. يمكن أن تؤدي الوظائف المعتمدة على السياق لسيتوكينات IL-12 في السرطان إلى تطوير محاور العلاج المثبط أو المعزز على التوالي. قد تساعد الأدوية أو الأجسام المضادة التي تستهدف السيتوكينات من عائلة IL-12 في كبح تثبيط المناعة داخل البيئة الدقيقة للورم TME وتسمح بالارتشاح وانتشار الخلايا المناعية المضادة للورم. بالإضافة إلى ذلك فإن الإيتاء المستهدف لهذه السيتوكينات بمساعدة الخلايا التائية من الفيروسات الغدية أو مستقبلات المستضد الخيمري CAR قد يعزز السمية الخلوية وإزالة الخلايا السرطانية، ويمكن لمثل هذه الأساليب أن تجعل الخلايا السرطانية أكثر حساسية للإشعاع والعلاج الكيميائي وعلاج الحصار المناعي.

في حين أن الإحصار التقليدي لنقاط التفتيش المناعي مثل مضادات PD-L1 (Programmed death-ligand) يُستخدم بشكل شائع لعلاج العديد من السرطانات، إلا أن فعاليته ليست عالية، وهناك حاجة إلى العلاجات المشاركة التي تزيد من استجابات الخلايا التائية. أظهر Hewitt وزملاؤه أن العلاج داخل الورم بـ IL-12 (MEDI1191) mRNA كان قادراً على تحفيز إنتاج IL-12 داخل بيئة الورم دون آثار سامة، ويتم حالياً تقييم MEDI1191 في المرحلة الأولى من تجربة المرضى المصابين بأورام صلبة (NCT03946800). أدت المشاركة

بين هذا النهج مع anti-PD-L1 إلى تعزيز المناعة المضادة للورم من خلال تعزيز تمايز خلايا $IFN-\gamma + Th1$. هندس Fallon وزملاؤه اندماج جزيئين من IL-12 للفئران (NHS-muIL12) بعمر نصف أطول من IL-12 الفأرية المؤشبة. عززت المشاركة بين NHS-muIL12 ومضاد PD-L1 تنشيط الخلايا التائية ووظيفة المستجيب داخل TME والتراجع المعزز للورم في نماذج أورام الفئران. يمكن أيضاً استخدام مشاركات العلاج المناعي الأخرى، فعلى سبيل المثال زاد العلاج المناعي المشارك مع IL-12 والربطة المحرصة للموت الخلوي المبرمج المرتبطة بعامل نخر الورم TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) في نماذج الفئران المؤسنة من سرطان الخلايا الكبدية من ارتشاح الخلايا القاتلة الطبيعية المنتجة لـ IFN وعزز موت الخلايا المبرمج للخلايا السرطانية. بالإضافة إلى ذلك بوجود IL-12، عزز TRAIL تعبير MHC1 على الخلايا المقدمة للمستضد وقلل من تنظيم التعبير عن عامل النمو البطاني الوعائي داخل الورم (VEGF vascular endothelial growth factor) وCD31 و أظهرت دراسة أخرى أن مشاركة تجمع البروتين المعدل للمناعة P-MAPA (protein aggregate magnesium–ammonium phospholipid–palmitoleate anhydride) وIL-12 البشري قلل بشكل كبير من إمكانات الهجرة وقدرة الغزو عن طريق تحفيز موت الخلايا المبرمج لخلايا سرطان المبيض. تكشف هذه النتائج أن استخدام IL-12 يمكن أن يزيد بشكل كبير من فعالية العلاج المناعي للسرطان.

قد يكون لـ IL-12 أيضاً دور مفيد في التآزر مع العلاجات الكيميائية، فبالنسبة للمرضى الذين يعانون من سرطانات نقيلية إيجابية HER2+، حفز العلاج التآزري لـ IL-12 مع العلاج الكيميائي مثل تراستوزوماب فعالية الخلايا القاتلة الطبيعية، ومن الجدير بالذكر إمكانية استخدام نهج تآزري مماثل مع العلاج الإشعاعي، فقد أظهر Deplanque وزملاؤه أن تثبيط المناعة الناجم عن الإشعاع في الأورام الراسخة يمكن التغلب عليه من

خلال الزيادات في استجابات Th1 المعتمدة على IL-12 في نماذج الفئران لسرطان القولون. أظهرت التقارير الأخيرة أن العلاج الإشعاعي بالمشاركة مع IL-12 حرض تزايد وارتشاح الخلايا التائية النوعية للحاتمة، ومنع نمو الورم وتحسين بقاء الحيوانات المصابة بالساركوما العضلية المخططة البشرية. كما تبين أن IL-12 البشري المؤشب دور وقائي في مرضى السرطان المعالجين بالعلاج الإشعاعي، ففي هذه الحالة قلل من المضاعفات التي يمكن أن تنشأ من العلاج الإشعاعي مثل التثبيط الشديد لنقي العظم أو قلة الكريات الشاملة. أدى العلاج المناعي في سرطان البنكرياس في الفئران باستخدام ميكروسفيرات IL-12 بالمشاركة مع العلاج الإشعاعي التجسيمي للجسم إلى إنتاج IFN داخل الورم، وتعزيز تنشيط الخلايا التائية القوية والقضاء على النقائل الكبدية بكفاءة. بشكل عام تكشف هذه الملاحظات عن أهمية العلاجات القائمة على IL12 في بدء وتحفيز الاستجابات المناعية المضادة للورم.

4.5 التأثيرات المساعدة لـ IL-12

كسيتوكين محرض محتمل للالتهاب، أظهر IL-12 العديد من الخصائص المساعدة التي يمكن أن تمنع السرطان، حيث يبدأ إنتاج سيتوكينات عديدة محرضة للالتهاب استجابة له، ويعتبر تنشيط العدلات الخاصة الأكثر أهمية لـ IL-12. كذلك يؤدي IL-12 دوره من خلال بدء إنتاج العديد من الكيموكينات والسيتوكينات التي بدورها تنشط الاستجابة المناعية الفطرية وكذلك التكييفية إلى موقع مستضدات الورم، ويقوم IL-12 بإصدار إشارات خطر تحريضية لتنشيط الخلايا التغصنية DC بواسطة مستضدات الورم، مما يقلل تحريض تحمل الورم تجاه الخلايا المناعية. في البشر تُظهر النتيجة الأولى أن الإنترلوكين 12 يعزز الاستجابات المناعية الخاصة بالورم، وقد خلصت دراسة لاحقة إلى أن مستحضر IL-12 كان قادراً على تعزيز فعالية الخلايا التائية الخاصة بالورم.

4.6 التجارب قبل السريرية لـ IL-12 مثل السيتوكينات المضادة للورم

كعامل مفرد يطبق IL-12 تأثيراً قوياً مضاداً للورم في معظم نماذج أورام القوارض قبل السريرية، ففي نماذج أورام الفئران أوقف تنظيم IL-12 تطور الورم بشكل كامل مما يشير إلى نتائج واعدة؛ وفي العديد من الأورام الصلبة جنباً إلى جنب مع اللوكيميا الدموية والأورام اللمفاوية كشفت علاجات IL-12 عن أهميتها، وقد توقع العلماء استخدام السيتوكينات الخارجية للسيطرة على الأورام الخبيثة عن طريق زيادة إنتاج الخلايا اللمفاوية التائية الخاصة بالورم.

يتضمن الحاجز المبكر للعلاج المناعي القائم على السيتوكين إنتاج وتوريد السيتوكينات الخارجية للتجارب السريرية، لكن في أواخر القرن العشرين سيطرت التحسينات في تقنية تآشيب DNA والتوصيف الكيميائي الحيوي على هذه العقبة، ثم أخيراً في عام 1900 شق أول سيتوكين IFN- α طريقاً للعلاج المناعي لعلاج سرطان الجلد IIB/III، ومنذ ذلك الحين وبالنسبة لنماذج الورم قدرت ألف دراسة أكثر من 40 سيتوكينات. تتضمن السيتوكينات الواعدة كل من IL-1 و TNF α و INF- γ و GM-CSF و IL-12، فيما بعد اعتبر أن البيانات الطبية هي أحد العوامل لكن أظهرت النتيجة أنها غير مجدية للقسم السريري، حالياً تم قبول أكثر من 40 من السيتوكينات معروفة كعلاج مناعي وحيد العامل، حيث تم قبول علاج السرطان باستخدام فيروس الهربس البسيط الذي يحمل GM-CSF من قبل إدارة الغذاء والدواء الأمريكية كعلاج مناعي للسرطان.

من المحتمل أن تتمثل الكارثة الكبرى باصطناع IL-12 في العلاج المناعي للسيتوكين، على العموم تنتج الخلايا العارضة للمستضد IL-12 الذي يمثل السيتوكين السائد المحرض للالتهاب استجابة لمسببات الأمراض الميكروبية؛ ويؤدي IL-12 وظائف مختلفة مثل إقناع تمايز خلايا TH1، وتنظيم القدرة على البدء والقدرة السامة للخلايا T و NK، وإبطاء الخلايا المثبطة للمناعة (مثل البالعات المرتبطة بالورم TAMs والخلايا الكابحة

المشتقة من النقي (MDSCs)، وتحريض وزيادة المناعة الخلوية؛ كذلك يمكن لـ IL-12 الإفراط في التعبير عن MHC I و II عن طريق تحفيز إنتاج $IFN\gamma$ لزيادة تدمير الخلايا السرطانية والتعرف عليها، حيث تعتمد خلايا CD8 + T وخلايا NK وخلايا NKT بشكل أساسي على هذه التأثيرات المضادة للورم. بالنسبة للأورام الخبيثة المتعددة تم الحكم على IL-12 كدواء في الدراسات السريرية، ففي التجارب السريرية تم اكتشاف أول علاج مناعي لـ IL-12 بواسطة Atkins وزملائه، حيث في المرحلة الأولى للبحث عن الإعطاء الوريدي لدواء hIL-12 المأشب، أجريت التجربة على 40 مريضاً، بحيث كان 20 من أصل 12 مريضاً مصابين بسرطان الجلد وكان المرضى الباقين مصابين بسرطان الكلى.

علاوة على ذلك تعرض بعض المرضى أيضاً لسميات تحد من الجرعة كالحُمى والغثيان والإقياء والصداع، وأبدى واحد من مرضى سرطان الجلد من بين 12 مريضاً استجابة كاملة بينما أظهر مريض من مرضى سرطان الكلى استجابة جزئية. تم في دراسة أخرى تقييم ملف سلامة rhIL-12 تحت الجلد عند 10 مرضى مصابين بسرطان الجلد الحديث، وقد أظهرت نتيجة هذه الدراسة التجريبية أنه تم الإبلاغ عن انخفاض حجم الورم في النقائل تحت الجلد والنقائل الكبدية.

يُنظر إلى إعطاء جرعات متعددة من IL-12 على أنه شديد السمية، حيث توفي اثنان من مرضى سرطان الكلى استجابةً لعلاج IL-12 بينما أظهر الـ 15 الآخرون آثاراً جانبية شديدة، ومن المثير للاهتمام أن نفس الجرعة البالغة 500 نانوغرام/كغ في اليوم أخذها المرضى في المرحلة الأولى من الدراسة وكانت هذه الجرعة محتملة. كان الاختلاف في تجارب المرحلتين الأولى والثانية في السمية، فخلال المرحلة الأولى أي قبل أسبوع واحد من قائمة الجرعات المتعددة، تم إعطاء الجرعة المفردة المستخدمة لاختبار IL-12 للمرضى، وقد تم التغلب

على السمية بالجرعة الرئيسية، وبشكل عام كانت التأثيرات السمية الحادة استجابة لـ IL-12 في التجربة قبل السريرية والتي تضمنت حالتها وفاة خلال المرحلة الثانية من الدراسة بسبب تكرار الحقن الجهازى IL-12. في الدراسات السريرية أوضح اختفاء التفاعل المضاد للأورام لـ IL-12 أن فعالية IL-12 تكون أقصر لدى الرجال، على الرغم من أنها أظهرت أن للسمية الحادة لـ IL-12 فعالية بيولوجية قوية لدى الرجال. هناك احتمال آخر للفعالية السريرية المنخفضة لـ IL-12 في الإنسان وهو عدم كفاية إيتاؤه إلى البيئة الدقيقة للورم، وإن النقطة الرئيسية للعلاج المناعي IL-12 ليست الخلايا الليمفاوية الجائلة، ولكن الخلايا المناعية الأخرى في الورم وحول العقد الليمفاوية.

أثارت الاستجابات المخيبة للأمال المضادة للأورام في التجارب السريرية احتمال أن يكون IL-12 أقل فعالية في البشر، لكن تشير السمية الشديدة إلى أن لـ IL-12 فعالية حيوية قوية لدى البشر، ويتمثل الاحتمال الآخر للفعالية السريرية المحدودة بالإيتاء غير الكافي لـ IL-12 إلى البيئة الدقيقة للورم في البشر. يؤثر IL-12 مثل معظم السيتوكينات موضعياً من خلال آليات paracrine و autocrine، ومن الجدير بالذكر أن الأهداف المثالية للعلاج المناعي لـ IL-12 ليست الخلايا الليمفاوية في الدورة الدموية، ولكن الخلايا المناعية داخل الورم والعقد الليمفاوية القريبة كـ الخلايا التائية المنشطة ولكن المستنفدة، الخلايا القاتلة الطبيعية، TAMs و MDSCs، لذلك يبدو أن تعظيم كمية IL-12 التي تصل إلى الورم أمر بالغ الأهمية لاستجابة قوية ضد الأورام.

4.7 مبرر الإيتاء الموضعي لـ IL-12

لوحظ أن العلاجات المناعية بـ IL-12 ستكون أكثر فعالية وأقل سمية إذا تم إيتاؤها والحفاظ عليها في الورم من خلال استخدام تقنيات إيتاء جديدة، وبشكل عام توجد خمس فوائد من الإيتاء الموضعي والمستمر للإنترلوكين 12 بحيث يتمثل الأول بالتوزيع الزمني المكاني المعزز لـ IL-12 مقارنة بالإيتاء الجهازى فقد يُعزى فشل

المعالجات المناعية القائمة على IL-12 في تحقيق نجاح سريري واسع النطاق جزئياً على الأقل إلى عدم قدرة الجرعة المسموح بها من IL-12 التي يتم إيتاؤها جهازياً بالوصول إلى التراكيز العلاجية داخل الأورام البشرية. من ناحية أخرى تعتبر استراتيجيات الإيتاء الموضعي قادرة على تعزيز تراكيز IL-12 في البيئة الدقيقة للورم بواحد أو أكثر من وحدات الحجم.

تتمثل الفائدة الثانية للإيتاء الموضعي لـ IL-12 بالقدرة على توليد مناعة جهازية مضادة للأورام من استجابة مناعية تبدأ موضعياً، ونظراً لأن السرطان ينتشر ويصبح مرض "جهازي" فقد اقترحت الحكمة التقليدية أنه يجب معالجة النقائل بعلاجات جهازية مثل العلاجات الجهازية المعطاة وريدياً IV أو مثبطات نقاط التفتيش المناعية، ويزيد هذا الإيتاء الجهازي من تواتر الآثار الجانبية من خلال تفاعلات بعيدة عن الهدف off-target فعلى سبيل المثال فللعلاج الجهازي بـ IL-12 القدرة على التسبب في تنشيط و/أو تمييز جميع الخلايا التائية الجائلة في حين يُفضل تنشيط/تمييز الخلايا التائية الخاصة بالورم فقط أو الخلايا التائية الخبيرة بمستضد الورم antigen-experienced. لحسن الحظ توجد مجموعة متزايدة من الأدلة التي تثبت أن IL-12 الموضعي يمكن أن يولد ذاكرة مناعية تكيفية جهازية قادرة على تثبيط النقائل ومنع تكرار الورم. على وجه الخصوص تبين أن الإيتاء الموضعي لـ IL-12 ينشط أو يعيد تنشيط الورم في خلايا CD8 + T، ويحسن آلية تقديم المستضد وبالتالي يسبب في توسع الخلايا التائية الخاصة بالورم، وغالباً ما يؤدي هذا إلى زيادة التداخل في الأورام غير المعالجة المقابلة.

ثالثاً وكما ذكر سابقاً فإن IL-12 عبارة عن سيتوكين متعدد الاتجاهات له عواقب تعتمد على السياق، فعندما يتم إعطاء IL-12 بشكل جهازي يؤدي إلى زيادات سريعة في السيتوكينات المحرصة للالتهاب مثل IFN- γ و TNF- α و IL-6، ويمكن أن تكون هذه "العاصفة الخلوية" مقترنة بالانخفاض السريع في الخلايا الليمفاوية في

الدم المحيطي والوحدات والعدلات مميتة؛ لكن عندما يتم التحكم فيها موضعياً يكون للسيتوكينات متعددة الاتجاهات القدرة على إشراك آليات متعددة مضادة للأورام، على سبيل المثال يزيد IL-12 من التنشيط والقدرة على التحلل الخلوي لخلايا CD8 + T وخلايا NK ويحث على إنتاج IFN- γ الذي بدوره قد يقتل الخلايا السرطانية مباشرة، ويمنع تكوين الأوعية، ويحفز الخلايا القاتلة الطبيعية، وCTLs، وبالبعات أثناء تنظيم جزيئات MHC I وII على أسطح الخلايا السرطانية.

رابعاً يمكن للمستويات العالية من IL-12 المُعطى موضعياً عكس التنشيط المناعي الداعم للورم، حيث تُعد البيئة الدقيقة للورم المثبّطة للمناعة عائقاً رئيسياً أمام الفعالية السريرية لجميع العلاجات المناعية للسرطان. في الواقع تُعلم الأدبيات الخاصة بلقاح السرطان أن غالبية المرضى في الدراسات السريرية قادرون على زيادة استجابات الخلايا التائية الخاصة بمستضد معين، إلا أن القليل من المرضى يحصلون على فائدة سريرية، وبالمثل فإن النشاط الاستثنائي للخلايا التائية CART ضد الأورام الخبيثة الدموية يصبح أقل من المعتاد في مواجهة الأورام الصلبة، حيث تفتقر العديد من الأورام الصلبة إلى الكيموكينات والالتهاب اللازمين لتجنيد الخلايا التائية السامة للخلايا.

أخيراً وربما الأهم أن تنشيط الخلايا التائية في وجود IL-12 لا يمكن أن يعزز وظيفة CTL فحسب بل يقلل أيضاً من الآليات التنظيمية السلبية مثل إشارات الموت الخلوي PD-1/PD-L1 والموت الخلوي المبرمج التي تحرضها IFN γ ، وقد لوحظ هذا التأثير "الوقائي" في الغالب في أدبيات العلاج المناعي الخلوي. تستخدم البروتوكولات القياسية للزيادة خارج الجسم الحي لليمفاويات المرشحة إلى الورم للعلاج الخلوية بالتبني تقليدياً جرعة عالية من IL-2 لتسهيل تكاثر الخلايا التائية. تم استكشاف تضمين IL-12 في أوساط التكيف/التوسيع مؤخراً لأنه ثبت سابقاً أنه يؤدي إلى تهيئة مثلى للخلايا التائية، وفي الواقع أدى النقل بالتبني لخلايا CD8 +

T الخاصة بالورم التي تم تحضيرها خارج الجسم الحي بوجود IL-12 إلى استجابات محسنة ضد الأورام، وزيادة ثبات الخلايا التائية المسربة، بالإضافة إلى زيادة التعبير عن (IL-2R α (CD25، ICO، OX40، الغرانزيم B، وIFN γ ؛ والأهم من ذلك أن الخلايا الليمفاوية التائية السامة للخلايا CTLs المحفزة بـ IL-12 كانت أكثر فعالية في السيطرة على الأورام بعد النقل بالتبني من CTLs المحفزة مع IFN α . أظهرت الخلايا التائية المحفزة IL-12 مستويات أقل من PD-1 و مستويات أعلى من IFN γ و IL-2 مقارنة بالخلايا التائية المحفزة بـ IFN α .

4.8 استراتيجيات إيتاء IL-12

يمكن تقسيم استراتيجيات إيتاء IL-12 إلى ثلاثة مناهج عامة، يتضمن المنهج الأول اندماج جزء مستهدف مع IL-12 من أجل تسهيل التراكم في الورم بعد الحقن الجهازى وبشكل عام تشمل أكثر فئات جزيئات الاندماج شيوعاً الخلايا المناعية التي تتضمن ربط جزء من الجسم المضاد المرتبط بالورم بالسيطوكين؛ بينما يتضمن المنهج الثاني إيتاء مادة وراثية ترمز لـ IL-12 مباشرة إلى الورم أو الأنسجة ذات الأهمية، ويمكن تقسيم هذه الفئة بشكل أكبر بناءً على نوع أو طريقة توصيل الجينات، وفي هذا الصدد تعد البلازميدات، mRNA، الفيروسات والخلايا المحورة transduced قادرة على التعبير عن IL-12 وإيتاؤه بعد الحقن الموضعي. أما بالنسبة للنهج الرئيسي الثالث فيتمثل بالإطلاق المضبوط لبروتين IL-12 المؤشب من نظام إيتاء مطول، وهنا يتم حقن أو زرع نظام إيتاء السيطوكين مباشرة في الورم أو الأنسجة موضع الاهتمام.

4.8.1 السيطوكينات المناعية

كما أسلفنا تعتبر السيطوكينات المناعية جزءاً أو كامل السيطوكينات التي تم تصميمها لاحتواء أجزاء الأجسام المضادة أو جزيئات استهداف أخرى، وتعطى هذه السيطوكينات "المستهدفة" بشكل جهازى ولكن من المتوقع

أن تتراكم داخل الأورام عند مستويات أعلى مقارنة بالسيتوكينات غير الموجهة، وقد تم استهداف العديد من الخصائص المتعلقة بالورم بواسطة الخلايا المناعية مثل:

(1) مستضدات الورم التي يتم التعبير عنها بشكل مفرط أو يتم التعبير عنها بشكل فريد بواسطة الخلايا السرطانية؛

(2) حواتم المصفوفة خارج الخلية المشفرة التي توجد فقط في الأورام؛

و(3) واسمات الأوعية الدموية الجديدة حيث تتطلب الأورام تكوين الأوعية للنمو.

4.8.2 الإيتاء القائم على DNA

إن للحقن داخل الورم (Intratumoral) i.t. للمادة النووية DNA و RNA التي تشفر IL-12 القدرة على توطین إنتاج IL-12 والحفاظ عليه في البيئة الدقيقة للورم، وتعد الأحماض النووية أسهل بكثير في الإنتاج والتنقية والتغيير من السيتوكينات المؤشبة، إلا أن الخلايا المضيفة للثدييات ليست سهلة العدوى وتتطلب عادةً مساعدة كيميائية أو فيزيائية أو كهربائية لتحقيق معدلات تعداء معقولة.

4.8.2.1 البلازميدات العارية

في نفس الوقت تقريباً الذي فشل فيه IL-12 المؤشبة في التجارب السريرية، قام عدد محدود من الدراسات قبل السريرية والسريرية باكتشاف الحقن i.t. للبلازميد المرمز لـ IL-12 المسماة pIL-12 (plasmid DNA encoding IL-12) كنهج يحتمل أن يكون أقل سمية، وقد أظهرت الدراسات قبل السريرية أن الحقن داخل الورم لـ pIL-12 ثبط لكنه لم يقضي على الورم الميلانيني B16، ولم يتم في هذه الدراسة اكتشاف IL-12 في المصل بعد الحقن في الورم. في دراسة أخرى شملت الخيول الرمادية المصابة بسرطان الجلد النقيلي، نتج عن الحقن داخل الورم لـ pIL-12 مستويات يمكن اكتشافها من pIL-12 في المصل لمدة تصل إلى 36 ساعة، لكن ليس

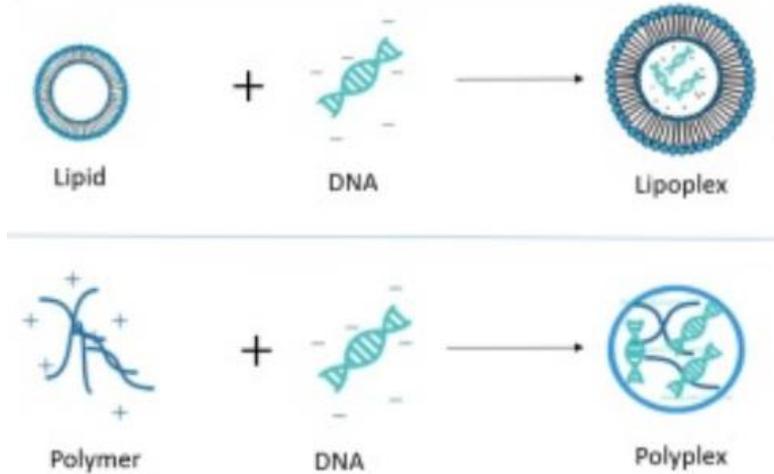
من الواضح ما إذا كان الانتشار الجهازي لـ pIL-12 قد أدى إلى زيادات جهازية كبيرة في IL-12 أو $IFN\gamma$ حيث لم يتم قياسها.

4.8.2.2 الإيتاء الجيني المتواسط بالمجال الكهربائي

كان تطبيق الحقول الكهربائية النبضية العالية لتسهيل امتصاص الخلايا والتعبير عن الجينات جزءاً من مجموعة أدوات علم الأحياء الجزيئية لعقود، وقد تم استكشاف الحقن داخل الورم لـ pIL-12 متبوعاً مباشرة بالتنقيب الكهربائي والذي يشار إليه باسم pIL-12 + EP في العديد من نماذج أورام الفئران، وكما هو متوقع كانت الفائدة من إضافة التنقيب الكهربائي واضحة على الفور حيث أظهرت إحدى الدراسات المبكرة أن pIL-12 وحده لم يكن له أي تأثير على نمو ورم B16F10 بينما قام pIL-12 + EP بتنشيط الأورام بشكل كبير وسبب بقاء طويل الأمد على قيد الحياة، والأهم من ذلك أن الزيادة في الفعالية المضادة للأورام لم تكن مرتبطة بزيادة في مستويات IL-12 الجهازية.

4.8.2.3 معقدات الحمض النووي

إن الليبوبليكسات Lipoplexes، البوليبيليكسس polyplexes، والبوليوليبيليكسس lipopolyplexes عبارة عن معقدات من الليبيدات والبوليمرات وليبيدات + بوليمرات على التوالي، مع DNA؛ وإن هذه المعقدات قيد التحقيق لتعزيز كفاءة الإيتاء والتعداء للبلازميدات التي تشفر الجينات ذات الأهمية مثل pIL-12. لقد استكشفت العديد من الدراسات مجموعة من المواد المختلفة لإنشاء معقدات pIL-12 جديدة.



الشكل 6. الـ lipoplex و polyplex.

استخدام البولي إيثيلين أمين (Polyethyleneimine) PEI الذي يعتبر بوليمر عالي الشحنة الموجبة يتعقد بسهولة مع الحمض النووي سالب الشحنة، على نطاق واسع لتعزيز توصيل الجينات، حيث يحمي الحمض النووي من التخرب في الجسم الحي، ويشجع التفاعل مع أغشية الخلايا سالبة الشحنة، ويعزز التحرر من الجسيمات الحالة من خلال العمل كإسفنجة بروتون. لوحظ أن معقدات PEI:IL-12 تستعدي أنسجة الرئة بعد الإبتاء عن طريق الإرداذ، وقد أدى هذا النهج إلى إنتاج IL-12 في الرئتين ولم يكن قابلاً للاكتشاف في بلازما الفئران المعالجة. لوحظ أن الإعطاء الأسبوع أو مرتين أسبوعياً لرداذ PEI:IL-12 ينشط أو يقضي على النقاثل الرئوية التجريبية من الساركوما العظمية البشرية SAOS-2 في الفئران العارية، وقد ركزت المحاولات الأخيرة لتعزيز الامتصاص وإنتاج IL-12 على تعديل PEI بحمض رباعي الثيروكسيتيك tetrac (tetraiodothyroacetic) الذي يرتبط بمستقبل $\alpha\beta 3$ للإنتغرين المفرط التعبير في بعض الأورام أو حمض ثنائي إيثيلين ثلاثي أمين الخليك (diethylene triamine penta-acetic acid) DPTA الذي يمكن أن يقلل من شحنة السطح لمعقدات PEI:IL-12.

4.8.3 منصات التحرر المستدام للحقن الموضعي

يعتبر الإعطاء الموضعي لبروتين IL-12 المؤشب الإستراتيجية الأكثر مباشرة والأكثر قدرة من حيث ضمان الدقة والتكاثر للجرعة التي تم تسليمها، لكن تنتشر السيتوكينات المؤشبة بسرعة من مواقع الحقن الموضعية إلى الدوران الجهازى، وبالتالي من أجل الحفاظ على مستويات عالية من IL-12 المؤشب في البيئة الدقيقة للورم مع تقليل التعرض الجهازى، فإن تقنيات الإيتاء المستدامة القادرة على إطلاق البروتينات والسيتوكينات موضعياً على مدى فترات طويلة من الوقت بعد الحقن المباشر قيد التطوير.

4.8.3.1 الميكروسفيرات البوليمرية

تم استكشاف تغليف المستحضرات الصيدلانية في كريات بوليمرية دقيقة للإيتاء المطول لعدة عقود، ويعد استخدام الكريات المجهرية لإيتاء السيتوكينات اتجاهاً أكثر حداثة؛ ويتم تعديل البوليمرات الصناعية مثل حمض الغليكوليك متعدد اللاكتيك (poly-lactic co-glycolic acid) PLGA، والبولي كابرولاكتون PCL (poly-caprolactone)، وحمض اللاكتيك (poly-lactic acid) PLA التي تم استكشافها على نطاق واسع لإيتاء الدواء، لمحفظه وتقديم السيتوكينات المختلفة مثل IL-12. أظهرت الكريات المجهرية لـ PCL:PLA المحملة بـ IL-12 البشرية عندما يتم إيتاؤها بشكل مشترك مع الخلايا الليمفاوية في الدم المحيطى البشرى (PBLs peripheral blood lymphocytes) تمنع تطعيم الأورام البشرية في فئران SCID. قامت PEG-IL-2 أيضاً بكبح نمو الورم ونموه، ولكن ليس بشكل فعال مثل الكريات المجهرية المحملة بـ IL-12، وعلى الرغم من وجود مستويات عالية من IL-12 وIFN في المصل بعد إعطاء الكريات الدقيقة المحملة بـ IL-12 إلا أن استراتيجية الإيتاء الموضعي هذه كانت أكثر فعالية في منع نمو الورم أكثر من الحقن داخل الورم لـ IL-12.

5 الاستنتاجات

تؤدي عائلة IL-12 تأثيراً قوياً على الاستجابات المناعية الفطرية والتكيفية ضد السرطان، وهي عبارة عن سيتوكينات غير متجانسة تحتوي على أعضاء آخرين مثل IL-23 و IL-27 و IL-35 واكتشف مؤخراً IL-39. تفرز هذه السيتوكينات من قبل الخلايا التغصنية DCs والبالعات ... إلخ. يعطي IL-12 استجابة فعالة للغاية ضد السرطان لأنه ينشط بشكل مباشر أو غير مباشر الاستجابة المناعية الفطرية ويعزز إفراز العديد من الخلايا المستجيبة، ويؤدي IL-12 إلى إحداث السيتوكينات الأخرى المحرصة للالتهاب، ويسبب تشكل الوسائط الالتهابية، إزالة تحبب العدلات، وينشط نظام التحلل والتخثر، وتوفر هذه مجتمعة بيئة قوية لإشارات الخطر ضد مستضد الورم.

في العديد من التجارب بالنسبة للاستراتيجيات العلاجية تم أيضاً فحص IL-12 الذي يعبر عن DNA، وثبت في العديد من نماذج الفئران أن IL 12 عامل مضاد للأورام ضد العديد من أمراض السرطان، حيث يتقلص الورم بأكمله ويثبط نمو النقائل عندما تم تطبيق حقن IL 12 على نماذج حيوانية مختلفة. لا يتوسط IL-12 في التركيب فحسب بل إنه مسؤول أيضاً عن تقوية المناعة الخلوية. بالإضافة لما سبق لـ IL-12 وظائف مختلفة، وإقناع تمايز خلايا TH1، تعزيز التحفيز والقدرة السامة للخلايا للخلايا T وNK؛ وإبطاء الخلايا المثبطة للمناعة مثل TAMs و MDSCs. لعلاج السرطان بنجاح يتم استخدام العلاج المناعي IL-12 لأنه ينشط الفعالية الحالة الخلوية لخلايا NK و CD8 + T المسؤولة عن موت الخلايا السرطانية.

- [1]. e Habiba, U., Rafiq, M., Khawar, M. B., Nazir, B., Haider, G., & Nazir, N. (2022). The multifaceted role of IL-12 in cancer. *Advances in Cancer Biology-Metastasis*, .100053
- [2]. Mirlekar, B., & Pylayeva-Gupta, Y. (2021). IL-12 family cytokines in cancer and immunotherapy. *Cancers*, .167 ,)2(13
- [3]. Cheng, E. M., Tsarovsky, N. W., Sondel, P. M., & Rakhmilevich, A. L. (2022). Interleukin-12 as an in situ cancer vaccine component: a review. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 71(9), .2057-2065.
- [4]. Nguyen, K. G., Vrabel, M. R., Mantooth, S. M., Hopkins, J. J., Wagner, E. S., Gabaldon, T. A., & Zaharoff, D. A. (2020). Localized interleukin-12 for cancer immunotherapy. *Frontiers in immunology*, 11, 575597.
- [5]. Weiner, D. M., Durgin, J. S., Wysocka, M., & Rook, A. H. (2021). The immunopathogenesis and immunotherapy of cutaneous T cell lymphoma: Current and future approaches. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 84(3), 597-604.
- [6]. Wojno, E.D.T.; Hunter, C.A.; Stumhofer, J.S. The immunobiology of the interleukin-12 family: Room for discovery. *Immunity* 2019, 50, 851–870. [CrossRef] [PubMed]
- [7]. Mal, X.; Trinchieri, G. Regulation of interleukin- 12 production in antigen- presenting cells. *Dev. Funct.* 2001, 79, 55–92. Myeloid الأخرى المحرصة للالتهاب، ويسبب تشكل الوسائط الليدية. Subsets
- [8]. Vignali, D.A.; Kuchroo, V.K. Il-12 family cytokines: Immunological playmakers. *Nat. Immunol.* .728–722 ,13 ,2012