

III 481307

FLORICA MAILAT, G. SZEGLI, ILINCA NICOLAE,
SORINA SCHIPOR

INTERLEUKINA – 12
(IL – 12)
CITOKINA CU CEL MAI ÎNALT
POTENTIAL ANTICANCERIGEN



Editura Universității din București

D. MIȘCALENCU, FLORICA MAILAT, G. SZEGLI, ILINCA NICOLAE,
SORINA SCHIPOR

**INTERLEUKINA – 12
(IL – 12)
CITOKINA CU CEL MAI ÎNALT
POTENȚIAL ANTICANCERIGEN**



Editura Universității din București
2005



© Editura Universității din București
Șos. Panduri, 90-92, București – 050663; Telefon/Fax: 410.23.84
E-mail: editura_unibuc@yahoo.com
Internet: www.editura.unibuc.ro

Tehnoredactare computerizată: *Victoria Iacob*

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României
Interleukina-12 (IL-12): Citokina cu cel mai înalt potențial anticancerigen / D. Mișcalencu, Florica Mailat, G. Szegli, ... – București: Editura Universității din București, 2005
68 p
Bibliogr.
ISBN 973-737-093-7

B.C.U. Bucuresti



C200511173

I. Mișcalencu, Dumitru
II. Mailat, Florica
III. Szegli, Geiza Adalbert

615
616-006.6

Cuprins

INTERLEUKINA-12	5
Activitatea antitumorală a IL-12.....	6
Receptorul IL-12 (IL-12R)	8
Producția de IL-12 și reglarea sa	10
Inducția genelor țintă	12
Activitatea biologică a interleukinei-12	14
IL-12 ÎN TERAPIA CANCERULUI	18
IL-12, IFN γ și TNF α în terapia cancerului	18
IL-12 și NK în terapia cancerului	22
Mecanisme de procesare a celulelor tumorale prin IL-12	25
Terapia combinată (IL-12 cu alte molecule)	29
Terapia genică	33
IL-12 și celulele dendritice	44
Tratamentul combinat IL-12 + IL-2	46
Tratamentul combinat IL-12 + IL-18	51
IL-12 în terapia cancerului combinată cu terapia electrogenică	54
Bibliografie	57

INTERLEUKINA-12 (IL-12)

IL-12 este un heterodimer compus din două lanțuri structurale legate printr-o punte disulfidică: p40 (40 kDa) și p35 (35 kDa). Se distinge de celelalte citokine prin maniera independentă de producere a celor două lanțuri, întrucât sunt codificate de gene diferite.

Structura p40 este omologă cu a receptorului IL-6, iar a p35 cu cea a IL-6, astfel că IL-12 amintește de un complex format de o interleukină și receptorul său. Inițial a fost descoperită ca factor inițiator al celulelor NK (natural killer cell stimulator factor, NKSF), iar ulterior alți cercetători au considerat-o factor de maturare a limfocitelor citotoxice (cytotoxic lymphocyte maturation factor, CLMF), distingându-se prin inducția producției de $\text{IFN}\gamma$ și creșterea citotoxicității limfocitelor (1).

p40

DNA-ul proteinei p40 umană se etalează pe 2-3 kb și conține în regiunea 3' un domeniu necodificant de 1,3 kb incluzând multe copii ale secvenței ATTA. Acest DNA codifică un polipeptid de 320 aminoacizi cuprinzând un peptid semnal de 22 resturi hidrofobe, a cărui masă moleculară este de 34.7 kDa. Proteina p40 are 3 situsuri de N-glicozilare și 10 cisteine, dintre care 8 formează 4 punți disulfidice intramoleculare, iar una rămâne liberă pentru o punte disulfidică ce leagă p35.

Gena pentru lanțul p40 este localizată pe cromozomul 5q31-q33, în apropierea genelor pentru receptorul lui M-CSF și IL-4.

p35

Gena care codifică p35 este situată pe cromozomul 3q12-13.2, se întinde pe 1,3 kb și cuprinde multe secvențe ATTA în regiunea necodificantă 3'. Proteina matură are 319 resturi de aminoacizi și o greutate moleculară de 27,5 kDa. Din cele 7 cisteine, 6 intră în punțile disulfidice intramoleculare, iar cea de-a 7-a participă la crearea punții disulfidice cu lanțul p40, în constituirea dimerului IL-12. Are două situsuri potențiale de inițiere a transcrierii, din care unul are

Administrarea timp de 7-19 zile a IL-12 duce la creșterea progresivă a nivelului oxidului nitric, care are un rol semnificativ în activitatea antitumorală.

Administrarea combinată a IL-12+IL-2 amplifică producerea de oxid nitric de către macrofage, amânând creșterea tumorilor mai eficient decât în tratamentele separate. Oxidul nitric este un mesager biochimic citotoxic cu viață scurtă, produs ca o consecință a oxidării enzimatică a L-argininei de către sintaza oxidului nitric (8).

Transducția celulelor tumorale cu genele care codifică citokinele ce mediază imunitatea antitumorală (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IFN γ , TNF α și G-CSF) inhibă formarea tumorilor la animalele singenice, dar numai IL-2, IL-4, IL-6, IL-7 și GM-CSF induc imunitate îndelungată contra celulelor tumorale netransduse.

Cele două gene care codifică subunitățile IL-12 murină, introduse în celulele carcinomului de colon C-26 printr-un vector retroviral la șoareci Balb/C, au determinat o întârziere a apariției tumorilor, comparativ cu celulele netransduse.

Întârzierea formării tumorii transplantate subcutan se datorează secreției locale de IL-12. În plus, creșterea și regresia tumorii se asociază ulterior cu infiltrarea ei cu celule T CD8+, iar această infiltrare este dependentă de prezența limfocitelor T CD4+ (9).

Receptorul IL-12 (IL-12R)

IL-12R este un complex multimolecular. Citometria în flux a relevat că este exprimat pe limfocitele CD4 și CD8, pe celulele NK activate, iar expresia sa este amplificată de IL-2 și IL-12.

IL-12R nu este detectabil pe celulele mononucleare sangvine în repaus, respectiv, pe celulele T, pe monocite și chiar pe limfocitele B în repaus.

Denumirea IL-12R α a fost rezervată pentru p40 datorită omologiei cu receptorul IL-6R α

IL-12R β 1 este un polipeptid de 662 resturi de aminoacizi cu masa moleculară de 73 kDa și aparentă de 100 kDa.

Domeniul extracelular este format din 516 reziduuri de aminoacizi cu 6 locuri potențiale de glicozilare N-linkate, domeniul transmembranar din 30 de reziduuri, iar regiunea intracitoplasmatică din 91 de reziduuri de aminoacizi. Este considerat un membru al superfamiliei receptorilor hematopoietici și omolog cu gp130 și cu receptorul pentru G-CSF și LIF.

O subunitate secundară a IL-12R, IL-12R β 2, este structural asemănătoare cu receptorii tip β . Coexpresia IL-12R β și IL-12R β 2 în celulele COS determină locuri de cuplare pentru IL-12 uman, atât cu afinitate înaltă, cât și joasă.

S-au izolat două forme de cDNA care codifică proteina cu masa moleculară de 100 kDa, forme ce dețin domeniile extracelulare identice, dar cele intracelulare diferite. Forma cu domeniul intracelular mai mic nu are domeniu transmembrantar.

Celulele cotransfectate cu lanțurile $\beta 1$ și $\beta 2$ au situsuri de legare puternice (40 pM) și de înaltă afinitate.

Gena IL-12R $\beta 2$ este exprimată în subseturile de limfocite B umane mature, dar nu în liniile B transformate. Inactivarea acestei gene poate fi avantajoasă pentru limfocitele B neoplazice.

Celulele tumorale purificate de la 41 de pacienți cu boli limfoproliferative cu celule B sunt partenerii subseturilor majore de limfocite B umane mature, reprezentând teste negative pentru expresia genei IL-12R $\beta 2$. Hipermetilarea unei „insule” CpG în exonul 1 necodificant se asociază cu inactivitatea acestei gene în celulele B maligne.

Tratamentul cu inhibitorul metiltransferazei 5-Azo-2'-deoxicitidină restaurează expresia mRNA al acestei gene în celulele B neoplazice primare, care suferă apoptoza după expunerea la rIL-12 (hrIL-12).

hrIL-12 inhibă proliferarea și creșterea ratei apoptotice a liniilor B transfectate cu IL-12R $\beta 2$ in vivo. De asemenea, reduce puternic tumorigenitatea celulelor RAJI de limfom Burkitt transfectate cu acest receptor la șoarecii SCID-NOD, prin efecte antiproliferative și proapoptotice cuplate cu inhibarea neoangiogenezei, legate de inducția independentă de IFN γ uman.

Gena IL-12R $\beta 2$ acționează ca supresor tumoral în malignitățile cronice ale celulelor B, iar IL-12 exercită efecte antitumorale directe asupra celulelor B neoplazice care exprimă această genă (10).

Cum s-a menționat, IL-12, citokină heterodimerică, induce producția de IFN γ de către celulele NK și T. De asemenea, activează celulele B umane prin complexul IL-12R cu componentele lanțurilor b1 și b2, care se exprimă cantitativ în celulele B din centrele germinale și tonsile; numai celulele B naive sunt activate după interacțiunea cu IL-12. Gena IL-12R b2 nu se exprimă în celulele B transformate cu EBV și în liniile B de limfom Burkitt. Transcriptele IL-12 p35 și p40 s-au detectat în toate subseturile de limfocite B din tonsile, dar numai celulele B naive și cele cu memorie produc IL-12. Greutatea moleculară a lui IL-12 heterodimeric matur este similară cu IL-12 derivat din monocite, cu diferențe minore legate, probabil, de glicozilare. Celulele B maligne din foliculi și din zona marginală a limfomului exprimă transcriptele IL-12 p35 și p40, pe când mRNA p35 s-a detectat numai în celulele limfomului mantalei.

Deci, limfocitele B umane în variante cu partenerul murin, pot produce IL-12 în urma legării CD40. Transcriptele IL-12 p35 și p40 se găsesc în celulele B din bolile limfoproliferative, dar citokina este la un nivel scăzut. IL-12R se exprimă în principalele subseturi de limfocite B umane, dar este funcțional numai

în celulele B naive. Insuficiența exprimată de mRNA IL-12Rb2 în liniile transformate, deschide noi perspective în investigarea celulelor B transformate malign (11).

Producția de IL-12 și reglarea sa

IL-12 este produsă de celulele prezentatoare de antigene și de celule care intervin în imunitatea naturală.

Limfocitele B normale produc foarte puțin IL-12, spre deosebire de cele transformate de EBV, care au o producție crescută. De asemenea, liniile celulare provenite de la bolnavii cu HIV produc in vitro mari cantități de IL-12.

Producția IL-12 este atribuită în principal, monocit/macrofagelor și celulelor dendritice. Monocitele produc IL-12 ca răspuns la un număr mare de agenți infecțioși sau toxinelor acestora. Bacteriile, virusurile și organismele parazitare au proprietatea de a induce activarea răspunsului imun primar. Astfel, *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii*, *Staphylococcus aureus*, lipopolizaharidele, determină direct producția de IL-12 de către monocite, pe când *Mycobacterium avies*, BCG, produc IL-12 numai în prezența IFN γ , care în acest caz este elaborat de celulele T NK+. Monocitele produc IL-12 și atunci când limfocitele Th1 sau Th0 prezintă antigene.

Producția IL-12 din interacțiunea celule T/monocite sau celule T/celule dendritice joacă un rol important în sinteza IFN γ ca răspuns la antigene neutre.

Celulele dendritice produc IL-12 nu numai în interacțiunea cu celulele T, dar și ca răspuns direct la acțiunea bacteriilor sau a toxinelor lor. De asemenea, celulele dendritice din piele (celulele Langerhans) produc IL-12 in vitro, ele jucând un rol important în sensibilitatea de contact la haptene.

IL-12 este în mod egal produsă de neutrofile, mastocitele din țesutul conjunctiv, ca și de celulele liniilor mieloide, ca răspuns la LPS, sau de liniile de carcinom epidermoid.

Producția IL-12 de către fagocite este inhibată de IL-10; aceleași celule stimulate să producă IL-12 produc și IL-10, dar cu întârziere. IL-12 induce producția IL-10 in vivo, în celulele non-T și non-B. IL-10 asigură, în schimb, inhibiția producției IL-12.

Prostaglandina E₂ (PGE₂) derivată din multe tipuri de tumori, reprezintă unul din factorii supresori majori ai imunității.

Administrarea sistematică a rIL-12 ar putea controla terapeutic creșterea cancerului mamar agresiv al șoarecilor TS/A și 4T1.

PGE₂ produs de tumori inhibă potențialul producției endogene de IL-12 la nivelul secreției proteinei, sintezei mRNA și transcripției genelor constitutive

pentru p40 și p35. Inhibiția poate fi reversată de NS-398, un inhibitor selectiv al activității enzimatică a ciclooxigenazei 2 în sinteza PGE₂.

Inhibiția mediată de PGE₂ a producției IL-12 reclamă cooperarea funcțională a AP-1, care supresează puternic transcripția IL-12 p40. Blocarea in vivo a producției de PGE₂ duce la o marcată reducere a metastazelor tumorilor pulmonare 4T1, însoțită de abilitatea crescută a macrofagelor peritoneale de a produce IL-12, și a limfocitelor splenice de a produce IFN γ .

Se stabilesc, astfel, mecanismele moleculare ce subliniază interacțiunea dintre o malignitate progresivă și mecanismele de apărare imunologică (12).

TGF β produs de fagocite ca răspuns la unii agenți infecțioși inhibă producția IL-12 in vitro. In vivo, însă, TGF β pare să favorizeze producția IL-12 la șoareci infectați cu *Candida albicans*.

IL-4 și IL-13 inhibă, de asemenea, producția IL-12 de către celulele mononucleare din sânge.

IFN γ , și mai puțin GM-CSF, mărește producția IL-12 a monocitelor și neutrofilelor.

După activare, toate celulele producătoare de IL-12 (fagocite, liniile B) exprimă de zece ori mai mult mRNA p40 decât mRNA p35, explicând, în parte, excesul de p40 liber. Expresia p40 și p35, ca și reglarea prin IL-10 și IFN γ , sunt controlate la nivel transcripțional; p35 este controlată direct de IFN γ , pe când p40, indirect.

Stimularea sau inhibiția, induse de anumite molecule sau anumiți agenți infecțioși sau parazitari, prezintă, în stadiul actual, un mare interes pentru dezvoltarea vaccinurilor destinate inducerii unui răspuns imun de tip celular sau combaterii unui răspuns imun secundar.

Preoperatoriu, dimensiunea carcinomului hepatic primar (16 pacienți), dar și albumina serică afectează considerabil nivelul seric al IL-12, ca și bilirubina serică totală și vârsta pacienților. Diferențe semnificative s-au găsit postoperatoriu din cauza cantității de sânge pierdut. Deci, factorii principali determinanți ai nivelului seric al IL-12 sunt: dimensiunea tumorii și funcția hepatică a pacienților. Trauma operatorie este factorul major care reduce nivelul IL-12 după operație (13).

Inducția apoptozei keratinocitelor de către razele UV este un fenomen protector relevant în limitarea supraviețuirii celulelor cu lezarea reparabilă a DNA. Schimbările în apoptoza indusă de UV pot avea un impact semnificativ în fotocarcinogeneză. IL-12 este o citokină imunomodulatoare și supresează apoptoza mediată de UV a keratinocitelor, in vivo și in vitro. Ea reduce remarcabil leziunile DNA specific induse de razele UV prin inițierea reparării DNA. De asemenea, induce expresia componentelor particulare ale complexului ce repară excizia nucleotidelor.

Deci, citokina IL-12 poate proteja celulele de apoptoza indusă de lezarea DNA de către razele UV, prin inducerea reparării DNA la locul exciziei nucleotidelor (14).

Inducția genelor țintă

Legarea IL-12 la receptorul său de pe celulele clonale Th1 induce rapid activarea tirozinkinazelor Jak2 și Tyk2 și fosforilarea a numeroase proteine, monomeri inactivi ai factorilor de transcriere STAT1 (signal transducers and activators of transcription), STAT3 și STAT4. Fosforilarea acestora antrenează formarea homodimerilor și heterodimerilor (STAT1/STAT1; STAT3/STAT4 și STAT4/STAT4) care migrează în nucleu unde transactivează gene țintă.

Semnalele induse de IL-12 pot diferi în funcție de tipul celulei țintă; astfel, p56^{lck} este preferențial activată în celulele NK, pe când kinaza MAP (mitogen activated protein) este preferențial fosforilată la nivelul limfocitelor T. IL-12 crește proliferarea limfocitelor T când sunt activate de IL-2, însă sistemul de transducție a semnalelor Jak-STAT pentru clonele de limfocite Th1 este nefuncțional în celulele Th2.

Densitatea și afinitatea IL-12R exprimate pe celulele Th2 sunt comparabile cu cele de pe Th1, dar nu se cunoaște starea de refractare a celulelor Th2 la IL-12. Aprofundarea elucidării semnalelor transduse de IL-12 permite dezvoltarea unei strategii pentru manipularea polarizării răspunsului imun Th1/Th2 (1).

IL-4 inhibă citotoxicitatea și proliferarea indusă de IL-2, dar crește proliferarea celulelor NK stimulate de IL-12, care, la rândul său, crește numărul granulelor din citoplasma celulelor NK și facilitează degranularea lor în răspunsul de angajare a CD16. De asemenea, crește acumularea de mRNA pentru serin proteaze asociate granulelor de granzime A și B, dar și pentru perforină.

Administrarea zilnică de IL-12 la șoareci determină activitatea citotoxică a celulelor NK hepatice și splenice.

IL-12 controlează producția celulelor NK, stabilizează contactele acestora cu ținta lor, măbind expresia moleculelor de adeziune la suprafața celulelor NK. În plus, induce un răspuns chimioterapeutic celulelor NK și astfel IL-12 controlează răspunsul celulelor NK la citokine. Efect deosebit de important este inducția producției de IFN γ . Astfel, IL-12 și IFN γ induc în mod egal producția altor citokine de către celulele mononucleare din sânge, cum sunt: TNF α , GM-CSF, M-CSF, IL-3 și IL-8, dar în cantități mici față de IFN γ elaborat de celulele T sau NK. IL-12 inhibă producția IL-5 via NK și crește expresia receptorilor citokinelor de la suprafața celulelor NK cu lanțurile p55 și p78 ale IL-2R, TNF α R (p75) și IL-12R.

IL-12 crește activitatea citotoxică, proliferarea limfocitelor T și producția IFN γ de către acestea. S-a demonstrat in vivo și in vitro că, administrarea IL-12

determină expresia activității citotoxice a limfocitelor T CD8+ prin proliferarea lor și prin creșterea sintezei proteinelor citolitice (granzime A și B și perforine).

Generarea limfocitelor T citotoxice allospecifice în cultură mixtă este parțial dependentă de IL-12 endogen. IL-12 permite maturarea unui precursor CD8+ în efector citotoxic, în absența limfocitelor T CD4+, proces verificat și în modelul de citotoxicitate antitumorală. Injecția cu IL-12 recrutează și activează nu numai celulele citotoxice specifice, ci și celulele NK și limfocitele T NK+, astfel încât activitatea nu se restrânge prin CMH clasa I. IL-12 nu este mitogenic pentru limfocitele T în repaus, dar mărește proliferarea limfocitelor T de tip TCD α / β CD4+, TCR α / β CD8+ sau TCR $\alpha\delta$ +. Proliferarea acestor limfoblaste indusă de IL-12 este mărită prin adăugarea de IL-2. Proliferarea maximă a acestor celule indusă de IL-12 este inferioară celei obținute cu IL-2.

Efectul mitogenic al IL-12 este puternic amplificat prin cosemnalizarea CD28/B7 și cu participarea cosemnalizării CD2/CD58. Cosemnalizarea CD28 poate să amplifice răspunsul la IL-12, fie mărinde expresia IL-12R, fie mărinde producția de IL-2.

Liniile și clonele de Th2 de șoarece sunt refractare la IL-12, chiar dacă densitatea și afinitatea receptorului său sunt compatibile cu cele ale clonelor de Th1.

IL-12 induce producția de IFN γ de către limfocitele T în repaus sau activate, efect care se observă pe toate subpopulațiile de celule T: TCD4+, TCD8 γ/δ celule naive sau efectoare Th0 și Th1. Clonele hTh2 produc IFN γ în cantitate mică, ca răspuns la IL-12. Producția de IFN γ de către celulele T purificate în repaus nu se observă decât după 4–5 zile de cultură și poate fi crescută și accelerată de IL-1, TNF α , IL-2 și într-o măsură mai mică, de IL-6 și cosemnalizarea CD28/B7. Această activare determinată de IL-12 poate fi inhibată de IL-4, complet suprimată de TGF β și neinfluențată de IL-10. Efectul sinergic al IL-1, IL-2 și TNF α asupra răspunsului celulelor T în repaus se explică, în parte, prin creșterea IL-12R. Efectul inhibitor al IL-10 asupra producției de IFN γ este indirect.

Pe de altă parte, efectul indus de IL-12 în producția IFN γ de către celulele T activate, este puternic amplificat de cosemnalizarea CD28/B7. Astfel că, producția rapidă de IFN γ observată în cazul invaziei organismului cu numeroși agenți patogeni este dependentă de IL-12. IFN γ este egal controlat de IL-12 eliberat prin interacțiunea celulelor prezentatoare de antigen cu celulele T. IL-12 joacă un rol esențial în șocul endotoxic experimental indus de LPS la șoarecii pretratați cu BCG.

STAT6 joacă un rol în carcinogeneză și în toleranța citokinelor Th1/Th2. S-au identificat 3 fenotipuri de STAT6: înalt, scăzut și null. Acesta din urmă apare dintr-un defect parțial în semnalizare. Liniile individuale cu acest fenotip produc niveluri semnificativ de înalte de IL-12, TNF α și IFN γ din ziua a 4-a de cultură, comparativ cu liniile cu fenotipuri STAT6 înalt sau scăzut.

Deci, calea de semnalizare prin STAT6 poate juca un rol direct sau indirect în producția de citokine proinflamatorii, proces reglator în bolile inflamatorii (15).

Activitatea biologică a interleukinei-12

La fel ca și alte citokine proinflamatorii (IL-1 și TNF α), IL-12 răspunde la un mare număr de agenți infecțioși cu rol cheie în imunitatea naturală și adaptativă.

Sinergică cu alte citokine, IL-12 induce producția de IFN γ și activează citotoxicitatea NK, a limfocitelor T γ/δ și NK+. IFN γ , sinergic cu TNF α și IL-1, activează mecanismul bactericid al fagocitelor. Prin fagogen, IL-12 maturează limfocitele antigen specifice CD4+ și CD8+, ca efectori citotoxici de tip 1 și inhibă dezvoltarea efectorilor de tip 2. Celulele T efectoare induse de IL-12 favorizează fagocitoza patogenă (inducând producția anticorpilor opsonizați și fixând complementul) și acțiunea bactericidă a macrofagelor. Efectele biologice ale IL-12 se exprimă prin limfocitele T care prezintă IL-12R de afinitate înaltă și prin celulele NK.

IL-12 crește citotoxicitatea, producția de IFN γ și proliferarea celulelor NK.

IL-12 stimulează producția de TNF α via celulele NK, iar TNF α , laolaltă cu IL-12, induc activitatea citotoxică. Celulele NK activate de IL-12 pot liza linii de celule tumorale NK sensibile. De asemenea, *IL-12 restaurează citotoxicitatea celulelor NK izolate de la bolnavi infectați cu HIV.* Laolaltă cu IL-2, IL-12 are un efect aditiv asupra activității citotoxice.

Rolul IL-12 în polarizarea răspunsului imunitar

Limfocitele T auxiliare sunt de 3 tipuri, în funcție de citokinele pe care le elaborează:

1. celule de tip 1 care produc IL-2, IFN γ și limfotoxine;
2. celule de tip 2 care produc IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 și IL-13;
3. celule de tip 0 care produc citokine de tip 1 și de tip 2.

Maturarea unui limfocit T naiv (producător principal de IL-2 și deposedat de activitate auxiliară) în efector Th1 și Th2 este controlată de 3 parametri:

- a) natura și intensitatea semnalului antigenelor la TCR;
- b) natura și intensitatea semnalelor costimulatoare (B71, B72, CD30L);
- c) citokinele elaborate prin activarea celulelor naive.

Prezența IL-12 ca activator primar favorizează dezvoltarea efectorilor de tip 1 și inhibă dezvoltarea celor de tip 2. Astfel, IL-4 exercită un efect opozant. Activitatea IL-12 este controlată de numeroși factori: (i) genetici, (ii) prezența altor citokine – cum este activitatea primară a IFN γ , IL-4, TGF α , (iii) cosemnalizarea descoperită în activitatea celulelor naive.

Pentru prima dată, s-a stabilit in vivo rolul IL-12 în inducerea răspunsului de tip Th1 și inhibiția răspunsului de tip 2, în leishmaniozele experimentale la șoareci Balb/c. Administrarea IL-12 la aceștia, care sunt sensibili la *Leishmania* major protejează animalele de această infecție, în mod normal fatală și conferă rezistență la toate infecțiile ulterioare. Tratamentul cu IL-12 reduce considerabil producerea de IL-4 de către limfocitele T imune izolate de la animalele tratate și crește moderat producția de IFN γ .

Injectarea anticorpilor anti-IL-12 inhibă răspunsul protector de tip 1 și permite dezvoltarea unui răspuns de tip 2, care conduce la diseminarea infecției și moartea animalelor. Rolul obligatoriu al IL-12 în inducția răspunsului tip 1 a fost confirmat în numeroase infecții și boli autoimune. IL-12 este astfel esențială pentru inducția unui răspuns de tip 1 care nu se menține întotdeauna în mod obligatoriu.

Mai mult chiar, aptitudinea unui tratament precoce cu IL-12 convertește un răspuns de tip 2 într-unul de tip 1 în cazul șoarecilor infectați cu helminți intestinali. În acest caz, este inhibată producția cantitativ ridicată de IL-4, de către limfocitele imune, a căror producție de IFN γ este, însă, uneori crescută.

Se concludă că, efectele tratamentului cu IL-12 sunt dependente de IFN γ , care, totuși, nu se poate substitui IL-12.

În unele modele experimentale (candidoză) IL-12 este reclamat nu numai de IFN γ , dar, în aceeași măsură, de TGF β pentru inducerea răspunsului funcțional de tip 1. TGF β poate, de asemenea, după sușa de șoareci examinată, să inhibe sau să faciliteze creșterea producției de IFN γ indusă de IL-12. Influența TGF β depinde de cantitatea de IL-2 produsă prin activarea primară a celulelor T. IL-12 sinergic cu TGF β poate induce maturarea celulelor naive CD4 umane, în efectori de tip 1.

Capacitatea IL-12 de a condiționa celulele T pentru o producție crescută de IFN γ rezultă dintr-un efect direct asupra celulelor naive, efect modelat de prezența IL-4, TGF β , IL-2 și, probabil, IFN γ . Nivelurile relative ale IL-12 și IL-4, chiar la activarea primară a unei celule naive, au o influență determinantă pentru maturarea acestora în efectori de tip 1 sau de tip 2. Prin urmare, IL-12 influențează maturarea limfocitelor T CD4+ și CD8+ în celule efectoare, condiționând profilul lor în citokine. Ea crește de o manieră stabilă producția de IFN γ , efect predominant, care parțial nu este inhibat de IL-4.

Rolul IL-12 în producția de anticorpi

Actualmente, IL-12 apare ca o citokină care crește preferențial producția de anticorpi opsonizanți și fixatori ai complementului (IgG2a). Inițial, s-a crezut că este numai un inhibitor al sintezei IgE, tratamentul cu citokina suprimând numai tranzitoriu producția de IgE și IgG1, dar crescând, pe o perioadă îndelungată, importanța producției de anticorpi IgG2a și, într-o mai mică măsură, IgG2 și IgG3. Se poate aprecia astfel că, IL-12 are un efect direct asupra limfocitelor B CD5+ și CD5-.

IL-12 costimulează proliferarea și diferențierea celulelor sușă multi- sau unipotente, induse prin factorii lor de creștere. Aceste rezultate au fost stabilite pe progenitori înalt purificați sau în culturi unicelulare, ceea ce implică prezența receptorului IL-12R pe celulele sușă hematopoietice (1).

IL-12 și bolile infecțioase

IL-12 este esențială și obligatorie în protecția organismului împotriva bacteriilor și paraziților care au un ciclu intracelular obligatoriu sau facultativ. Acționează la 3 nivele:

- a) stadiul preimun în care induce activitatea citotoxică a celulelor NK și producția lor de $IFN\gamma$,
- b) induce un răspuns adaptativ al celulelor T, favorizând dezvoltarea celulelor T auxiliare de tip 1, a limfocitelor CD8 citotoxice, cât și producția de anticorpi opsonizanți;
- c) creșterea proliferării și producției de $IFN\gamma$ de către limfocitele T.

IL-12 este mai puțin cunoscută în infecțiile virale. Majoritatea virusurilor nu induc producția de IL-12 endogenă. Totuși, MCMV (citomegalovirusul murin) o face, spre deosebire de LCMV (virusul meningitei coriolimfocitare).

În infecția cu MCMV urmată de injectarea cu IL-12 aceasta are un rol protector discret, în timp ce la animalele cu LCMV IL-12 este toxică, toxicitate însoțită, paradoxal, de reducerea drastică a limocitelor CD8+ citotoxice, rezultând astfel și producția excesivă de $TNF\alpha$ și hidrocortizon.

Producția timpurie de $IFN\beta$, urmată de dezvoltarea răspunsului limfocitelor T citotoxice viral-specifice, sunt factori critici în limitarea nivelului infecției cu herpes virus γ -68 murin (γ HV-68). Dezvoltarea unui răspuns de durată cu limfocite T citotoxice reclamă prezența celulelor T. Limfocitele T citotoxice limitează extinderea infecției după reactivări.

În urma infecției intranazale cu γ HV-68, expresia mRNA IL-12 și IL-23 este suprareglată în plămâni și splină. În ser și omogenatele din plămâni, nivelele de IL-12 p40 sunt crescute. Expunerea macrofagelor în cultură sau a celulelor dendritice la γ HV-68 crește secreția de IL-12 sugerând că aceste celule ar putea fi responsabile de producția IL-12 in vivo.

Infectarea șoarecilor cu HV-68 determină deficiența genetică în expresia IL-12 p40, ducând la leucocitoză și splenomegalie, care scad semnificativ față de cele observate la șoarecii singenici C57/Bl/6. Șoarecii IL-12 p40 (-/-) arată, la 9 zile de la infecție, niveluri crescute de virus infecțios în plămâni. De asemenea, se constată o reducere a producției de $IFN\gamma$ indusă de γ HV-68, sugerând că $IFN\gamma$ este dependent de IL-12.

Deci, IL-12 indus de γ HV-68 contribuie la patofiziologia infecției virale, acționând și pentru limitarea acesteia (16).

IL-12 în imunitatea antitumorală

IL-12 este o citokină cu un potențial rol în protecția contra tumorilor prin creșterea citotoxicității celulelor T și NK, creșterea producției de IFN γ , TNF α și TNF β , inducerea limfocitelor T auxiliare de tip 1, apariția unor clase de anticorpi, inhibiția angiogenezei. Administrată animalelor, inhibă metastazele spontane și prelungește supraviețuirea, uneori determinând regresia totală a tumorii. Efectul antitumoral al IL-12 se aseamănă relativ cu cel al IL-2 și IFN γ . În cele mai multe cazuri, acest efect antitumoral al lui IL-12 este inhibat prin neutralizarea cu IFN γ .

De reținut este faptul că nu toate tumorile au aceeași sensibilitate la efectele terapeutice ale IL-12 (1).

IL-12 ÎN TERAPIA CANCERULUI

IL-12, IFN γ și TNF α în terapia cancerului

Așa cum se arată în diferitele părți ale lucrării, prezența interferonului gamma (IFN γ) și a factorului necrozant tumoral (TNF α) este indispensabilă în reacția imunitară a organismului. Cele mai multe date susțin participarea directă sau indirectă a IFN γ în dezagregarea celulelor tumorale.

Terapia cu IL-12 recombinant (rIL-12) și terapia cu gena IL-12 adenovirală poate avea efect in vivo împotriva celulelor carcinomului tranzițional (TCC) murin al vezicii urinare.

IL-12 crește semnificativ la murine expresia IFN γ în ser, urină, ca și în culturile de splenocite ale acestora. Nu acționează direct asupra celulelor carcinomului tranzițional murin al vezicii urinare in vitro, dar IFN γ arată activitate antiproliferativă și proapoptotică prin suplimentare cu TNF α . Mai mult, IFN γ suprareglează substanțial expresia moleculelor de suprafață imune de pe celulele carcinomului, cum sunt CMH I, CMH II, ICAM-I, B7.1, B7.2 și Fas.

Citotoxicitatea maximă contra acestui carcinom, mediată de splenocite, este amplificată prin pretratarea celulelor canceroase cu IFN γ + TNF α , ceea ce face și IL-12 în combinație cu IL-2. In vivo, activitatea anti-cancer vezicală a IL-12 este eliminată prin tratament cu anticorpi anti-IFN γ .

IFN γ are un rol esențial în imunitatea contra tumorii vezicale amintite. Activarea celulelor imune efectoare ale gazdei de către IL-12 este necesară pentru inducerea distrucției optime a tumorii în terapia cu IL-12. (17)

Producția IFN γ de către celulele T sensibilizate din tumori este esențială pentru IL-12, care induce complet eradicarea tumorii. Transferul, fie al splenocitelor, fie al celulelor T CD90+ s-a făcut în TCR β K0 și IFN γ /TCR β la șoareci purtători de tumori subcutane MCA207, timp de 14 zile. Jumătate din ei au fost tratați cu IL-12.

Șoarecii TCR β K0 și IFN γ /TCR β s-au vindecat în proporție de 80% și, respectiv, 100% după ce au primit IL-12. Totuși, transferul de limfocite T imunizate de la cei IFN γ /TCR β la cei TCR β K0 a fost ineficient, cu sau fără IL-12. Răspunsul celulelor T la IL-12, și nu la IFN γ , este necesar pentru regresia tumorii.

Producția de IFN γ de către limfocitele T sensibilizate, care răspund la IL-12, este necesară și suficientă pentru completa eradicare a tumorii indusă de IL-12 (18).

Celulele dendritice sunt importante celule prezentatoare de antigen determinând răspunsul imun sistemic antitumoral.

O linie celulară de HCC derivată de la șoareci Balb/c a fost injectată la șoareci singenici în combinație cu administrarea sistemică a IL-12. Limfocitele de la acești șoareci arată activitate citolitică mai puternică și produc cantități mari de IFN γ , față de limfocitele de la cei tratați numai cu celulele dendritice de șoarece tratate cu lizat de BNL.

Deși imunizarea cu aceste celule nu duce la regresia completă a tumorii, ea le inhibă semnificativ creșterea tumorală comparativ cu injectarea vehiculantă.

Deci, administrarea IL-12 amplifică efectul terapeutic al imunizării celulelor dendritice împotriva HCC de la șoarece. Această combinație a IL-12 cu celulele dendritice poate fi utilă pentru supresia creșterii tumorilor reziduale, după terapia primară a HCC uman (19).

IL-12 și IFN α -2b sunt citokine pleiotrope cu activitate în carcinomul celulelor renale (Renca) și în melanomul uman, ca agenți singulari. Se sugerează că administrarea concurentă poate avea efecte antitumorale sinergice. S-a realizat administrarea subcutană a IL-12 și IFN α -2b la pacienți cu carcinom al celulelor renale sau melanom malign metastazic pentru a determina toxicitatea, doza maximă tolerată, eficacitatea preliminară și efectele asupra expresiei genelor chemokinelor/citokinelor în celulele mononucleare sangvine periferice. Toxicitatea limitată de doză a inclus gradele 3 și 4 de hepatotoxicitate și neutropenie/leucopenie.

Administrarea concurentă subcutan a IL-12 și IFN α -2b este posibilă la anumite doze. Dozele recomandate pentru trialurile de faza a II-a sunt 500 ng/kg IL-12 și 1.0 MU/m² IFN α -2b. În PBMCs s-a observat inducerea consistentă a IP-10 și Mig, ca și o inducere variabilă a expresiei B7.1, IL-5 și IFN γ (20).

S-a folosit un model himeric de imunodeficiență severă dobândită umană/de șoarece pentru a demonstra că, leucocitele periferice sangvine (PBL) de la un pacient cu cancer pulmonar supresează complet creșterea unei tumori autologe, într-o manieră dependentă de doză de PBL.

Supresia tumorii reclamă prezența celulelor T CD4+, NK CD56+ și monocite/macrofage CD14+, dar este complet independentă de CD8+. Celulele efectoare CD4+ induc indirect uciderea tumorii, deoarece recunoașterea directă a tumorii și uciderea ei sunt precedate de absența moleculelor CMH clasa I și II de pe celulele tumorale. Supresia tumorii reclamă hIL-12 și hIFN γ produse și eliberate de celulele T și monocitele pacienților.

Prin urmare, limfocitele T umane din sângele pacienților cu cancer pulmonar pot orchestra uciderea dependentă de citokine a tumorii autologe CMH negativă, indirect și fără codependența de limfocitele T CD8+.

Se concludă că, supresia tumorii umane se face in vivo chiar în absența moleculelor CMH de pe celulele tumorale, supresie mediată indirect de citokinele produse de PBL ale pacientului care, în final, inițiază uciderea tumorii pe calea câtorva mecanisme încă incomplet elucidate (21).

DNA complementar codifică două subunități ale IL-12 de la hamster, p35 și p40, care au fost clonate dintr-o bibliotecă cDNA din celulele dendritice de hamster. Clonarea a demonstrat că IL-12 de hamster constă dintr-o subunitate p35 cu 216 resturi de aminoacizi și o subunitate p40 cu 327 aminoacizi. Expresia genelor IL-12 p35 și p40 în celule medulare cultivate în prezența mGM-CSF și a IL-4 a fost suprareglată în timpul culturii. Analizele prin imunoblotting a celulelor 293 transfectate cu vectori de expresie a p35 și p40, sugerează prezența unui heterodimer p35/p40 constituit prin legături covalente.

Supernatantul din celulele 293 transfectate cu ambii vectori de expresie induce suprareglarea mRNA $IFN\gamma$ în splenocitele de hamster, indicând că acest heterodimer p35/p40 al proteinei IL-12 din supernatant este funcțional.

Se sugerează că, vectorii care conțin cDNA IL-12 de hamster ar putea fi utili în dezvoltarea imunoterapiei împotriva unui cancer experimental la un model de hamster (22).

Mediul condiționat, recuperat din culturi tranzitoriu infectate cu constructe care codifică subunitățile p35 și p40 ecvine sau un singur lanț IL-12, amplifică producția $IFN\gamma$ în celulele provenite din ganglionii limfatici ecvini. Preincubarea preparatelor inductoare de $IFN\gamma$ cu anticorpi monoclonali anti-p40 duce la scăderea semnificativă a capacității de inducere a $IFN\gamma$. Mediul recuperat din culturi de celule infectate cu baculovirus care codifică p35 și p40 amplifică producerea $IFN\gamma$ și proliferarea celulelor țintă.

Există o terapie benefică cu IL-12 în cancer, în bolile inflamatorii și infecțioase, și cu efect adjuvant în profilaxie (23).

Eliminarea nematodului gastrointestinal *Trichinella spiralis* este asociată cu mastocitoza pronunțată mediată de un răspuns de tip Th2 care implică IL-4, IL-10 și IL-13. Când se administrează rIL-12 exogen la șoareci NIH infectați cu *Trichinella spiralis* se constată supresia semnificativă a răspunsului mastocitelor intestinale, eliminarea întârziată a parazitului, creșterea larvelor în mușchi și scăderea tranzitorie, dar semnificativă a secreției citokinelor timpurii Th2. Tratamentul cu rIL-12 alterează, de asemenea, expresia chemokinelor în mucoasa jejunului. Efectele administrării IL-12 exogen sunt independente de $IFN\gamma$, așa cum arată tratamentul cu $IFN\gamma$ $-/-$. De asemenea, IL-12 poate juca un rol biologic semnificativ ca regulator negativ al răspunsului Th2 intestinal și poate acționa pentru supraviețuirea paraziților intestinali in vivo, de asemenea, în absența $IFN\gamma$ (24).

Celulele dendritice sunt eficiente ca celule prezentatoare de antigen, fiind astfel candidați ideali pentru imunoterapia cancerului. Cele mature captează eficient antigene din jur și numai cele mature aprovizionează limfocitele T naive.

Vaccinurile tumorale bazate pe celule dendritice sunt de perspectivă, dar cu succes limitat prin folosirea celulelor dendritice imature sau incomplet maturizate. Combinația $TNF\alpha$ + poly(L:C) sau amestecul $TNF\alpha$ + IL-1 β + IL-6 + prostaglandina E2 induce activarea completă a întregii populații de celule dendritice. Astfel, maturarea celulelor dendritice de către $TNF\alpha$ + poly(L:C) poate fi eficientă față de un răspuns Th1 (25).

S-au construit proteine de fuziune a IL-12 și $TNF\alpha$ cu L19, un fragment de anticorp specific pentru extradomeniul B al fibronectinei, care s-a arătat că acționează asupra tumorilor în modele animale și la pacienții cu cancer. Aceste fuziuni au o puternică activitate antitumorală în câteva modele murine imunocompetente de cancer, dar nu conduc la remisiunea completă a tumorilor agresive stabilizate. Combinația IL-12-L19 și L19- $TNF\alpha$ are puternică activitate sinergică anticanceroasă, ducând la eradicarea teratocarcinoamelor F9 grefate la șoareci imunocompetenți. Când șoarecii vindecați au fost inoculați din nou cu celule tumorale, se observă o întârziere a creșterii tumorale, indicând inducerea unui efect parțial de vaccinare antitumorală. Administrarea țintită a citokinelor în mediul tumoral inițiază activitatea lor antitumorală, iar tratamentul combinat cu IL-12-L19 și L19- $TNF\alpha$ pare să acționeze sinergic in vivo (26).

Monocit-macrofagele activate pot fi asociate cu activitatea antitumorală, iar activarea acestor celule de către anumite citokine, în principal $IFN\gamma$, poate fi indicată de modificări ale concentrațiilor neopterinei, nitrului sau triptofanului. A fost recoltat lichid peritoneal de la pacienți cu neoplazie intra-abdominală care au trecut printr-un tratament săptămânal de administrare intraperitoneală a IL-12 recombinant (rhIL-12), un inductor al $IFN\gamma$. Concentrațiile de neopterin, nitrat, triptofan, $IFN\gamma$ și $TNF\alpha$ au fost determinate în perioade diferite în primele 48 de ore la 11 pacienți care au primit rhIL-12 intraperitoneal în doze care merg de la 100 la 1.500 ng/kg. A fost observată o creștere a concentrației nitrului în lichidul peritoneal la 9 pacienți. Concentrații crescute de $TNF\alpha$ și $IFN\gamma$ au fost detectate la 3 din 9 și, respectiv, 8 din 11 pacienți. Concentrații crescute de neopterin au fost observate la 24 de ore după injectare, la toți pacienții. O creștere semnificativă a nivelului neopterinelui a putut fi detectată în lichidul ascitic la una sau două săptămâni de la tratament, ceea ce este în concordanță cu activarea monocit-macrofagelor. În schimb, concentrația triptofanului a scăzut la una sau două săptămâni de tratament. Există o corelație semnificativă între doza de rhIL-12 și concentrațiile posttratament de neopterin. Administrarea intraperitoneală de rhIL-12 pare să fie asociată cu o creștere imediată, susținută și dependentă de doză a neopterinei din lichidul peritoneal, însoțită de creșterea nitrului și scăderea concentrațiilor de triptofan (27).

După captarea antigenelor de către celulele dendritice sunt necesare și alte semnale de maturare. $TNF\alpha$ maturează din punct de vedere fenotipic celulele dendritice, dar este necesar tratament suplimentar cu $IFN\gamma$ pentru a se atinge

maturarea funcțională, producerea de cantități semnificative de IL-12. Deoarece producerea de IL-12 de către celulele dendritice crește în primele 24 de ore de la maturare și scade la 48 de ore, temporizarea adecvată a tratamentului cu celule dendritice ex-vivo este esențială pentru generarea de celule dendritice mature din punct de vedere funcțional încărcate cu antigene. Se sugerează că, după ce se permite timp de 4 h preluarea lizatului tumoral de către celulele dendritice imature, tratamentul ulterior cu TNF α și IFN γ timp de 24 de ore furnizează condițiile optime pentru obținerea de celule dendritice funcționale.

IL-12 și NK în terapia cancerului

IL-12, citokină proinflamatorie cu puternice efecte antitumorale, produce regresia neuroblastomului în urma vaccinării șoarecilor cu celule dendritice transduse cu aceasta. Deși regresia tumorii s-a asociat cu infiltrarea masivă cu celule T, rolul exact al limfocitelor T este necunoscut. 12 șoareci au fost inoculați subcutan cu 1×10^6 celule de neuroblastom murin (TBJ). Anticorpi anti-CD4 (limfocite T helper), anti-CD8 (limfocite T citotoxice) sau antisialo-GM1 (celule NK) au fost injectați intravenos la intervale de 3 zile pentru a elimina diverse celule imune efectoare. Șoarecii din fiecare grup și martorii au fost injectați intratumoral în ziua a 7-a cu 1×10^6 celule dendritice transduse cu IL-12. Tumorile au fost analizate morfometric și imunohistochimic la 21 de zile. Depleția CD4 nu are nici un efect asupra creșterii tumorii, nici la martori, nici la animalele vaccinate cu IL-12. În schimb, animalele cu depleția CD8 tratate cu aceste celule au parcurs inițial o regresie urmată de o creștere progresivă a tumorii. Aceste tumori au fost mai mici ca mărime la același moment de timp. Depleția celulelor NK (antisialo-GM1) a eliminat complet efectele antitumorale ale celulelor dendritice transduse cu IL-12, conducând la creșterea progresivă a tumorii, atât la martori cât și la animalele tratate. Celulele NK sunt esențiale pentru răspunsul antitumoral inițial al animalelor tratate astfel. Celulele T CD8+ par să fie celulele efectorii necesare pentru rejecția completă a tumorii și, probabil, pentru memorie. Celulele NK sunt responsabile pentru răspunsul imun timpuriu. În plus, celulele CD4+ (T helper) nu joacă nici un rol în regresia indusă de IL-12. Aceste rezultate arată că, pentru ca celulele dendritice să genereze un răspuns antitumoral eficient împotriva neuroblastomului, sunt necesare atât celulele imunității dobândite cât și ale imunității înnăscute (29).

NK pot liza o varietate de celule tumorale prin exocitoza perforinei, legarea ulterioară a acesteia la membrana celulei țintă și formarea de pori litici. Unele celule tumorale sunt, totuși, rezistente la citotoxicitatea celulară. Folosind liniile de celule tumorale rezistente la NK, ML-2, MONOMAC-1, RPMI și L540Cy, s-a demonstrat că activarea celulelor NK cu IL-2 și IL-12 duce la liza

semnificativă a acestor celule tumorale. S-au izolat granulele citotoxice din celule NK neactivate și activate de IL-2/IL-12 și a fost comparată uciderea celulelor leucemice K562 (sensibile la liza mediată de celulele NK) și a celulelor leucemice ML-2 (rezistente la liza mediată de celulele NK). Spre deosebire de celulele K562, care au fost ucise cu ușurință de granulele celulelor NK, celulele ML-2 au fost rezistente la granulele din celulele NK neactivate. Totuși, granulele din celulele NK activate cu IL-2 și IL-12 au fost capabile să inducă liză semnificativă a celulelor tumorale. Uciderea celulelor K562 și ML-2 de către granule din celulele NK activate a fost complet blocată de anticorpi anti-perforină, indicându-se astfel că, perforina este importantă pentru liza indusă de granulele NK. Comparând granulele din celulele NK activate și neactivate de IL-2/IL-12, creșterea morții celulelor ML-2 a fost cauzată de o legare îmbunătățită a perforinei la membrana celulelor țintă. Analizele funcționale, totuși, au indicat că, diferențele în ceea ce privește legarea perforinei nu au fost rezultatul unei producții amplificate de perforină de către celulele NK activate. Activarea celulelor NK conduce la creșterea legării perforinei și la liza ulterioară a celulelor tumorale (30).

Imunoterapia combinată cu ciclofosamidă și IL-12, dar nu cu IL-12 singură, stimulează eradicarea multor tumori solide mari (20 mm) cum este și sarcomul murin MCA207 indus de metilcolantren. Celulele NK1.1(+) și celulele T NK dependente de CD1d joacă roluri distincte în regresia tumorilor mari, ca răspuns la ciclofosamide și IL-12. A fost definit un nou subset celular NK crescut selectiv prin acest tratament. Șoarecii cu depleție a celulelor NK1.1(+) demonstrează o creștere inițială mai rapidă a tumorii, regresie tumorală prelungită după tratament, iar tumorile au fost eventual eradicate. În schimb, nu apare regresia tumorilor după terapia cu ciclofosamide și IL-12 la șoarecii CD1d (-/-), cu depleție a celulelor NK1.1(+). Ciclofosamida și IL-12 induc la șoareci creșterea selectivă în ficat și splină a limfocitelor dintr-o subpopulație T NK unică (DX5(+)NK1.1(-)CD3(+)). Aceste celule nu au fost induse de tratamentul aplicat la șoarecii CD1d (-/-). Deci, celulele NK și NKT contribuie la tratamentul antitumoral stimulat de ciclofosamidă și IL-12. Inducția selectivă a unui subset de celule NK T de către terapia cu ciclofosamidă și IL-12 nu se observă atunci când se aplică tratament numai cu IL-12, sugerându-se că ciclofosamidă și IL-12 pot contribui la activarea cu succes a răspunsului antitumoral indus de acest regim terapeutic (31).

IL-12 activează răspunsul imun dependent de celulele T, putând eradica tumori mai stabilizate în modele tumorale imunogenice. Mecanismul efector al rejecției induse de IL-12 a tumorilor stabilizate MCA207 este unic, deoarece nu depinde de perforină, de Fas/Fas ligand și nici de oxidul de azot. Studiul rejecției tumorale ascitice Sa1 indusă de ciclofosamidă + IL-12, arată că macrofagele sunt celulele imune predominante din infiltratul ascitic, celule care posedă activitate

tumoricidă nespecifică in vivo, deoarece celulele tumorale MCA207 inoculate i.p., dar nu s.c., la șoareci purtători de tumori ascitice regresante Sa1, după tratamentul cu ciclofosamidă + IL-12, sunt rejectate. În plus, celulele ascitice Sa1 tratate cu ciclofosamidă + IL-12 sau macrofagele, dar nu macrofagele splenice de la aceeași șoareci sau macrofagele inflamatorii induse de tioglicolat, sunt capabile să suprezeze dezvoltarea tumorilor s.c. irelevante din punct de vedere imun. Aceste macrofageucid diverse celule tumorale in vitro, iar citotoxicitatea este păstrată și după fixarea cu formaldehidă. Rezultatele demonstrează că macrofagele activate funcționează ca celule efectorii în eradicarea indusă de IL-12 și dependentă de celulele T a tumorilor stabilizate printr-un mecanism nou, dependent de contact, rezistent la fixarea cu formaldehidă și care induce apoptoza (32).

Funcția citotoxică a celulelor NK umane este modulată de o varietate de citokine ca IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, ca și $IFN\gamma$, care sunt stimulatori puternici ai citotoxicității celulelor NK. Butiltinele sunt folosite într-o varietate de produse de consum și aplicații industriale. Dibutiltin se găsește în produsele plastice, băuturile depozitate în recipiente din PVC în timpul prelucrării și în produsele obținute de la păsările de curte. Capacitatea celulelor NK de a ucide celulele tumorale este foarte mult diminuată după o expunere de o oră la dibutiltin, inhibiție ce continuă chiar și după îndepărtarea compusului și poate dura zile. Dar funcția citotoxică a NK se restabilește când în mediu se introduc IL-2, IL-12 sau combinația IL-2 + IL-12. IL-15, IL-18 și $IFN\gamma$ nu au capacitatea de a crește citotoxicitatea celulelor NK expuse la dibutiltin (33).

Rituximab este un anticorp monoclonal himeric murin/uman care cuplează CD20 de pe limfocitele B. Deși legarea domeniului Fab poate induce apoptoza, domeniul Fc activează funcțiile imune efectorii pentru a media liza celulelor. IL-12 facilitează răspunsul T-celular citolitic, amplifică activitatea litică a celulelor NK și induce secreția $IFN\gamma$ de către celulele T și NK. Se consideră că IL-12 combinat cu rituximab ar crește liza celulară mediată imun indusă de acest anticorp. Studiul acesta s-a desfășurat pe 43 de pacienți adulți cu limfom al celulelor B cărora li s-a administrat i.v. 4 săptămâni acest anticorp, iar IL-12 s.c. de două ori pe săptămână. Se constată o creștere de peste 20 de ori a nivelului seric al $IFN\gamma$ și de 2.5-5 ori a nivelului proteinei inductibile 10 (IP-10) – la doza de 100 mg/kg sau mai mare de IL-12. Se sugerează că IL-12 și rituximab este o combinație activă pentru limfomul non-Hodgkin cu celule B (34).

Transferul genei IL-12 în hepatocite folosind un vector adenoviral recombinant (AdIL-12) protejează împotriva tumorilor hepatice primare și metastazice la șoarece. Se crede că depleția NK poate deforma modelul experimental și poate afecta mecanismul antitumoral prin alterarea amplitudinii și duratei expresiei transgenei. Se demonstrează că la șoareci tratați cu AdIL-12, depleția NK crește nivelurile serice ale IL-12 de peste 250 de ori și prelungește expresia transgenică cu aproape două săptămâni, comparativ cu șoarecii fără

depleție. Celulele NK izolate de la animalele tratate sunt marcat activate în ceea ce privește activitatea lor litică și secreția $IFN\gamma$. Transferul adaptiv al celulelor NK de la șoareci care au fost tratați cu AdIL-12 la șoareci naivi este suficient pentru a conferi protecție împotriva metastazelor hepatice colorectale, protecție mediată parțial de producerea de $IFN\gamma$ de către NK. Se demonstrează că, depleția NK distorsionează modelul administrării sistemice de AdIL-12 prin alterarea marcată a expresiei transgenei, care apoi poate amplifica alte mecanisme antitumorale și că, supraexprimarea IL-12 endogen activează celulele NK, făcându-le eficiente pentru a proteja împotriva metastazelor hepatice (35).

Mecanisme de procesare a celulelor tumorale prin IL-12

IL-12 endogen este necesar pentru rezistența la mulți factori patogeni și la tumori transplantabile și induse chimic. Ea utilizează mecanismele efectorii, atât ale rezistenței înăscute, cât și ale imunității adaptative, pentru a media rezistența anti-tumorală. $IFN\gamma$ și o cascadă de alte citokine proinflamatorii secundare și terțiare induse de IL-12 au un efect toxic direct asupra celulelor tumorale sau pot activa puternice mecanisme anti-angiogenice. Activitatea stimulatorie a IL-12 asupra imunității antigen-specifice constă, în principal, în capacitatea ei de a determina sau amplifica răspunsul Th1 și al limfocitelor T citotoxice, capacitate care îi conferă o activitate adjuvantă puternică în cancer. Totuși, toxicitatea clinică excesivă și răspunsul clinic modest observat în trialurile clinice arată necesitatea elaborării unor protocoale care să-i minimizeze toxicitatea, fără să-i afecteze efectul antitumoral (36).

IL-12 poate acționa ca un puternic adjuvant pentru vaccinurile cu celule T, dar utilizarea sa clinică este limitată de toxicitate. Administrarea paracrină a IL-12 ar putea amplifica semnificativ răspunsul la astfel de vaccinuri fără toxicitate asociată cu administrare sistemică. A fost dezvoltat un nou sistem de administrare a vaccinurilor (numit F2 gel matrix) alcătuit din poli-N-acetilglucozamină care are proprietățile duale ale unui sistem de administrare susținută, ca și de puternic adjuvant. Pentru a testa eficacitatea IL-12 paracrină, a fost incorporată această citokină în F2 gel matrix și a fost monitorizat răspunsul celulelor T OT-1 într-un model de transfer adoptiv. Șoarecii au fost vaccinați cu F2 gel/SIINFEKL, F2 gel/SIINFEKL/IL-12 (IL-12 paracrină) sau F2 gel/SIINFEKL plus IL-12 sistemică. Nivelurile sistemice ale IL-12 au fost mai scăzute la șoarecii tratați cu IL-12 paracrină, sugerând că administrarea paracrină a ei poate fi asociată cu toxicitate redusă. Totuși, administrarea paracrină a IL-12 a fost asociată cu un răspuns T celular proliferativ funcțional și amplificat antigen-specific. În plus, IL-12 paracrină inițiază generarea unei populații stabile, funcționale de celule T de memorie și se asociază cu protecția față de provocarea tumorală. Pentru a studia

mecanismele care stau la baza răspunsului amplificat, au fost folosiți șoareci de tip sălbatic și deficitari în genă. Răspunsul imun amplificat a fost semnificativ redus la șoarecii $IFN\gamma$ (-/-) și $IL-12R\beta 2$ (-/-), sugerând că rolul IL-12 este mediat, cel puțin parțial, de celulele gazdei. Rezultatele susțin potențialul F2 gel matrix ca sistem de administrare a vaccinului și sugerează că eliberarea paracrină a IL-12 are potențială aplicare clinică (37).

În ideea determinării siguranței, a dozei maxime tolerate și a efectelor biologice ale IL-12 uman recombinant după transplantul celulelor stem autologe în cancer, 8 pacienți cu limfom non-Hodgkin, 2 cu boala Hodgkin și 2 cu mielom al celulelor plasmactice au început terapia cu IL-12 la 66 de zile după transplant. IL-12 uman recombinant a fost administrat i.v. în doze de 30, 100 sau 250 ng/kg. Efectele locale obișnuite au fost febra, frisoanele, oboseala, greața sau voma și creșterea asimptomatică a funcțiilor hepatice exprimate seric. Obișnuite au fost și neutropenia tranzitorie și trombocitopenia, dar nici un pacient nu a necesitat transfuzie plachetară și nici nu au avut febră neutropenică. Efectele biologice au inclus creșterea nivelurilor serice de $IFN\gamma$ și limfopenie tranzitorie care implică celulele T CD4, celulele T CD8, celulele B și celulele NK și au apărut la toate cele trei doze. Deci, dozele active biologice ale IL-12 pot fi administrate în siguranță pacienților după transplantul celulelor stem autologe pentru malignități hematologice de mare risc (38).

Tratamentul cu IL-12 în modelele tumorale CSA1M și OV-HM, dar nu și în modelul tumoral Meth A, induce regresia tumorilor care se asociază cu migrarea celulelor T la locul tumorii. Se cercetează rolul receptorului chemokinic CC 5 (CCR5) în migrarea celulelor T indusă după tratamentul cu IL-12. În cele două modele tumorale responsive la IL-12 (CSA1M și OV-HM), tratamentul cu IL-12 stimulează expresia mRNA pentru CCR5 în celulele T splenice ca și pentru liganzii CCR5, ca proteina inflamatorie macrofagică (MIP) 1α și MIP- 1β în masele tumorale. În schimb, expresia CCR5 în splină și MIP- 1α /MIP- 1β în masele tumorale este indusă slab, înainte și după tratamentul cu IL-12 în modelul Meth A, în care nu este observată migrarea celulelor T. Masele tumorale infiltrate cu celule T ale celor două modele tumorale responsive la IL-12 exprimă CCR5. Administrarea unui antagonist sintetic al CCR5, TAK-779, șoarecilor purtători de tumori în timpul imunoterapiei cu IL-12, împiedică migrarea celulelor T și regresia tumorală. În plus, s-a găsit că anticorpul anti-CCR5 inhibă migrarea celulelor T. Deși celulele T splenice preparate din CSA1M tratate cu IL-12 sau de la șoareci purtători de OV-HM migrează în masele tumorale corespunzătoare de la șoarecii tratați, migrarea este inhibată când celulele T donoare sunt tratate cu anticorpi anti-CCR5 înainte de injecție. Aceste rezultate indică un rol critic pentru CCR5 în inducerea migrării celulelor T la locurile tumorale după tratamentul cu IL-12 (39).

S-a obținut o linie celulară canină de hemangiosarcom derivată din celulele endoteliale maligne ce alcătuiesc o tumoră spontană la câine pentru a se obține o

sursă de celule endoteliale în studierea angiogenezei în malignități. Linia celulară SB-HSA a fost derivată din xenogrefe. Celulele SB-HSA exprimă VEGFR1 și 2, CD31, CD146 și integrina $\alpha\beta3$ și produc câțiva factori de creștere și citokine, printre care VEGF, bFGF și IL-8 ce sunt stimulatorii pentru creșterea celulelor endoteliale. In vivo, celulele SB-HSA stimulează puternice răspunsuri angiogenice la șoareci și formează mase tumorale compuse din structuri vasculare aberante la șoareci imunocompromiși, furnizând noi oportunități pentru investigarea eficienței agenților antiangiogenici. Folosind acest model, se determină că IL-12, o citokină cu efecte imunostimulatorii și antiangiogenice, supresează angiogeneza și creșterea tumorală a celulelor SB-HSA (40).

IL-12 este un activator major al celulelor NK și al limfocitelor T citotoxice. $IFN\gamma$ mediază majoritatea activităților imunologice ale IL-12. rIL-12 restrictează creșterea tumorilor și a metastazelor lor în carcinomul mamar murin 4T1. Șoarecii deficienți în $IFN\gamma$ cu tumori 4T1 nu arată defecte mari în privința numărului limfocitelor care infiltrază tumorile, dar au angiogeneza intratumorală exagerată. IL-12 poate determina constricția vaselor în tumori în absența $IFN\gamma$, având eficacitate terapeutică chiar când este aplicată târziu în timpul progresiei tumorii. Analiza expresiei globale a genei tumorilor primare relevă modele moleculare și schimbări induse de IL-12 care implică un număr de noi gene potențial importante pentru răspunsul imun împotriva tumorii, independent de $IFN\gamma$, pentru activitățile antiproliferative mediate de IL-12, antimetastazice și antiangiogenice (41).

Factorul reglator 1 al IFN (IRF-1) este o moleculă efectorie critică în semnalizarea IFN și acționează ca supresor tumoral și ca genă de susceptibilitate tumorală. IL-12 este un factor cheie în inducția rezistenței și generării moștenite a celulelor Th1 și a limfocitelor T citotoxice. Există o intimă relație între IRF-1 și IL-12 în sensul că IRF-1 reglează producerea IL-12 prin activarea transcripțională a genei IL-12 p35 controlată selectiv. Șoarecii deficienți în IRF-1 sunt foarte susceptibili la limfoamele T induse de compusul N-metil-N-nitrozuree. Această susceptibilitate este asociată cu defecte marcate ale expresiei IL-12, limfotoxină (LT) β și $IFN\gamma$. Prin urmare, șoarecii IL-12 p35 (-/-), $IFN\gamma$ (-/-) și $LT\beta$ (-/-) sunt, de asemenea, foarte vulnerabili la carcinogeneza indusă de acest compus. Administrarea rIL-12 la șoarecii IRF-1 (-/-) reface expresia normală a $LT\beta$ și $IFN\gamma$, și amplifică semnificativ capacitatea șoarecilor IRF-1 (-/-) de a rezista patogenezei induse de compus. Se subliniază rolul IRF-1 în apărarea gazdei împotriva malignităților limfoproliferative (42).

IL-12 are puternice activități antitumorale pe calea celulelor NK și limfocitelor T citotoxice. Se analizează expresia genică într-un model de carcinom mamar murin primar care este asemănător cu cancerul mamar uman, după aplicarea terapeutică a rIL-12, care restrictează creșterea tumorală și metastazarea. IL-12 este capabilă să oprească neovascularizația în tumoră și să crească numărul limfocitelor infiltrate în aceasta. Examinarea amplă a expresiei genice relevă

modificări moleculare induse de IL-12 asociate cu regresia tumorii și reducerea metastazelor pulmonare, astfel furnizând un răspuns al gazdei, de înaltă rezoluție, împotriva malignităților în dezvoltare și o bogată sursă de potențiale ținte pentru intervenția terapeutică în cancerul mamar (43).

S-a examinat capacitatea IL-12 recombinantă murină (rmIL-12) de a inhiba vasculatura și creșterea carcinoamelor mamare care apar in situ la șoareci femele C3H/HeN infectate cu MMTV. Deși este un puternic antiangiogenic și agent antitumoral în multe modele tumorale murine transplantate, rmIL-12 nu inhibă vascularizarea, nu reduce perfuzia și nici nu alterează creșterea acestor carcinoame autohtone. Factorii intrinseci ai acestor celule tumorale nu pot fi responsabili pentru eșecul terapiei, deoarece celulele primare derivate din aceste carcinoame răspund eficient la IFN γ și rmIL-12 împotriva tumorilor transplantate care iau naștere din celulele Mm5MT, o linie stabilită dintr-un carcinom mamar indus de MMTV la șoareci C3H. Factorii intrinseci ai șoarecilor care găzduiesc carcinoamele mamare autohtone nu sunt responsabili pentru eșec, deoarece produc efectele antitumorale și antiangiogenice ale rmIL-12 împotriva tumorilor de melanom murin transplantat, K1735. În schimb, pot fi responsabile natura autohtonă a carcinoamelor mamare și prezența unui procent crescut de vase mature, acoperite cu pericite, care sunt rezistente la regresia terapeutică. Dovada în acest sens este observația că, tumorile Mm5MT transplantate au o proporție mai scăzută de vase acoperite cu pericite și răspund la terapia cu rmIL-12. Aceste rezultate arată diferențele semnificative dintre vasculatura tumorilor murine transplantate și cele autohtone și indică faptul că susceptibilitatea lor la terapia antivasculară poate să difere în mod substanțial (44).

La 32 de pacienți cu limfom cutanat cu celule T, tratamentul cu IL-12 umană recombinantă (rhIL-12) relevă o rată generală de răspuns de 50%. Biopsia leziunilor care au suferit regresie arată o creștere a numărului celulelor CD8+ și/sau a celulelor TIA-1 + T. Aceste rezultate sugerează că rhIL-12 poate induce regresia leziunilor prin creșterea răspunsurilor antitumorale ale celulelor T citotoxice (45).

IL-12 are capacitatea de a activa limfocitele citotoxice, de a stimula celulele NK, de a induce producerea de IFN γ și de a acționa sinergic cu IL-2. După o lună de la transplantul s.c. al melanomului, șoarecii au fost tratați 4 săptămâni cu rmIL-12, în doze diferite (de la 0.05 la 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$). La 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ se constată inhibiția tumorilor primare la 40% dintre șoareci, iar diametrul tumorilor este semnificativ mai mic, comparativ cu controlul, ca de altfel și la cei tratați cu 0.5, 2.5 și 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Cele mai bune rezultate au fost obținute la tratamentul cu rIL-12 murin de 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (46).

IL-12 posedă o puternică activitate antitumorală și administrarea sa sistemică are efecte clare antitumorale în modelele cu metastaze hepatice. Administrarea locală intracutană a rIL-12 a confirmat efectul antitumoral asupra tumorilor MC-38. În modelul murin de metastază hepatică, 1×10^5 celule MC-38

au fost injectate în vena portă în ziua 0, iar splina a fost transpoziționată subcutan pentru administrarea rIL-12 continuu în sistemul portal. De asemenea, s-au injectat intrasplenic sau intraperitoneal $0.1 \mu\text{g}$ rIL-12 la grupul martor. Greutatea ficatului la grupul tratat intraperitoneal cu rIL-12 era semnificativ mai scăzută decât la martori. Regresia completă a tumorii a fost observată la 1 din 6 șoareci tratați intrasplenic. Efectul antitumoral al rIL-12 asupra metastazelor hepatice MC-38 nu se observă la șoarecii lipsiți de $\text{IFN}\gamma$. Administrarea intraportală a IL-12 transdusă în fibroblaste singenice la șoareci C57BL/6 are un efect antitumoral în modelul cu metastaze hepatice. Se sugerează că, administrarea locală a IL-12 prin sistemul port ar putea fi o strategie utilă pentru tratamentul metastazelor hepatice (47).

IL-12 încorporat în hidrogel biodegradabil s-a introdus în organismul șoarecilor C57BC/6N cu carcinom transplantat de colon, permițându-se eliberarea sa graduală. Pentru martor, IL-12 a fost administrată prin două injecții subcutane la un interval de 6 zile. Creșterea tumorilor a fost evaluată în termenii volumului. La 500 ng/animal , volumul tumorii a scăzut după 9 și 12 zile de la administrare. Efectul IL-12 s-a dovedit mai puternic la cei tratați cu hidrogel decât la cei tratați s.c. S-a stabilit că citokina nu afectează organele viscerele, iar parametrii serici referitori la ficat, inimă și rinichi nu au fost afectați de tratament. IL-12 este eficientă în supresia creșterii carcinomului de colon și administrarea acestui agent prin hidrogel biodegradabil este, de asemenea, eficientă în tratamentul carcinomului (48).

IL-12 a fost injectată peritumoral la șoareci Balb/c masculi RL1 purtători de tumori, în diferite stadii ale acestora. Inhibiția acută a metastazei hepatice, atât la șoarecii atimici cât și la cei eutimici, a fost indusă de IL-12 în fiecare stadiu al evoluției tumorii. Din contră, IL-12 nu are efecte antitumorale la cei atimici lipsiți de celulele T convenționale. Se sugerează că efectul antitumoral al ei este principalmente mediat de celulele T iar cel antimetastazic este mediat numai de NK și/sau NKT. Proliferarea indusă de IL-12 este remarcabil de mare în stadiul timpuriu și apoi scade dramatic în stadiul avansat, pe când activitatea citotoxică indusă de IL-12 și mediată de NK și NKT nu este atenuată nici în stadiile avansate. Disocierea responsabilității IL-12 este un motiv pentru efectul remarcabil antimetastazic, dar insuficient antitumoral al ei în stadiile avansate. Studiul indică folosirea clinică a IL-12 în imunoterapia anti-metastazelor hepatice oculute sau evidente (49).

Terapia combinată (IL-12 cu alte molecule)

IL-12 ancorat la un glicolipid (GPI-IL-12) induce proliferarea celulelor T activate de concanavalina A și secreția $\text{IFN}\gamma$ de către celulele T activate și

alogenice, indicând că citokina exprimată de membrană poate stimula celulele T. GPI-IL-12 exprimat pe membrana celulelor tumorale împiedică creșterea tumorilor la șoareci în modelul înalt tumorigenic de mastocitom murin. Se sugerează că GPI-IL-12 exprimată la suprafața celulei poate fi eficientă în inducerea răspunsului imun antitumoral. Citokinele ancorate la GPI exprimate pe suprafața celulelor tumorale pot constitui un nou sistem de folosire a acestora pentru imunizarea locală în timpul vaccinării anticanceroase. Citokinele ancorate la GPI purificate pot fi folosite pentru modificarea rapidă a membranelor tumorale prin metode de transfer proteic pentru a exprima citokinele dorite pentru prepararea vaccinului (50).

IL-12 posedă o puternică activitate imunocostimulatoare și proprietăți antiangiogenice. Aplicarea ei clinică este limitată din cauza efectelor adverse de la locul injectării. O proteină de fuziune alcătuită din IL-12 fuzionată cu un fragment de anticorp uman specific domeniului ED-B oncofetal al fibronectinei, amplifică marcat activitatea antitumorală a acestei citokine, fapt demonstrat într-un model de metastază pulmonară la șoarece și în două modele de șoareci purtători de diferite tumori murine agresive. Masele tumorale mici reziduale observate la șoarecii tratați au fost infiltrate cu limfocite, macrofage și celule NK și au avut nivel crescut de $IFN\gamma$. Aceste rezultate au relevanță terapeutică deoarece domeniul ED-B al fibronectinei, un marker natural al angiogenezei, identic la șoarece și la om, este exprimat în majoritatea tumorilor solide agresive, dar nu este detectabil în vasele normale și țesuturi (51).

Activarea constitutivă a kinazelor Janus (JAKs) și a transductorilor și activatorilor de semnal (STAT) are loc cu mare frecvență în diverse malignități hematopoietice și tumori solide. S-a demonstrat că inhibitorul tirozinkinazic, AG-490, blochează selectiv activitatea JAK și elimină complet celulele leucemice într-un model murin SCID. Deoarece multe citokine, inclusiv IL-12, s-a arătat că semnalizează pe căile JAK/STAT, AG-490 poate inhiba terapia anticanceroasă pe bază de citokine. In vivo, administrarea acestor inhibitori determină apoptoza tumorală, dar nu inhibă activitatea macrofagelor mediată de IL-12 și nici producția de $IFN\gamma$ de către limfocite.

Terapia combinată cu AG-490 și IL-12 induce efecte antitumorale mai marcate decât administrarea fiecăreia în parte, într-un model tumoral murin de mielom. Se sugerează că, inhibitorii JAK/STAT folosesc viitoarele investigații pentru terapia cu IL-12 în tratarea cancerelor umane cu activitate crescută JAK/STAT (52).

IL-12 este considerată una din cele mai importante citokine anticanceroase. Substanțe derivate din Bazidiomicete, precum compusul activ corelat cu hexoza (AHCC) și PSK induc producerea IL-12. S-a examinat dependența de CMH a producerii IL-12, indusă de diverse extracte micelare, PSK, AHCC și IL-X. Au fost observate în timpul dezvoltării tumorii niveluri mai mari ale IL-12

seric la șoarecii H-2a și H-2b, comparativ cu șoarecii H-2d. Administrarea AHCC amplifică nivelul seric al IL-12 la șoarecii H-2b, dar nu și la șoarecii H-2d, în timp ce administrarea PSK crește nivelul seric al IL-12 la șoarecii H-2d și nu la șoarecii H-2b. IL-X, componente derivate din același miceliu, amplifică, de asemenea, nivelul seric al IL-12 la șoarecii H-2b în stadiul timpuriu al tumorii, asemenea lui AHCC, și menține acest nivel mai ridicat decât valoarea normală ce însoțește creșterea tumorii, pe când AHCC nu restaurează nivelul seric mai scăzut ce însoțește creșterea tumorii.

Deci, AHCC sau IL-X sunt eficiente la pacienții cu cancer Th1-dominant din punct de vedere genetic, în timp ce PSK este eficient la pacienții cu cancer Th2-dominant din punct de vedere genetic. Folosirea de variate combinații ale extractelor miceliene poate fi eficientă pentru inducerea IL-12 endogen la cei cu cancer în toate stadiile, ceea ce este important într-o terapie anticanceră care este relativ lipsită de reacții adverse (53).

Imunoterapia cancerului bazată pe ciclofosfamidă și IL-12 poate fi foarte eficientă când celulele T sunt înalt sensibilizate de tumori, ceea ce constituie factorul esențial pentru terapie. În modelele experimentale se produce eradicarea completă a tumorilor subcutane, a metastazelor pulmonare și a tumorilor ascitice avansate. Totuși, această combinație nu induce regresia altor tipuri tumorale. Cele care răspund la acest tratament sunt imunogenice prin faptul că răspunsul imun antitumoral este detectabil la gazdele purtătoare de tumori, după stabilizarea tumorii. Din contră, nici o tumoră neimunogenică nu răspunde la tratamentele cu IL-12 și ciclofosfamidă+IL-12. Prezența celulelor T sensibilizate de tumoră, dar nu naive, este esențială pentru rejecția tumorii de către IL-12 și ciclofosfamidă + IL-12. Transferul acestor celule T trebuie să aibă loc înainte, și nu după tratamentul cu IL-12, pentru a avea loc rejecția tumorii. La șoareci purtători de tumori imunogenice, prezența celulelor T preexistente, sensibilizate de tumori, este demonstrată în experimentele de transfer celular folosind celule T splenice de la acești șoareci. Deci, imunoterapia canceră bazată pe ciclofosfamidă + IL-12 poate fi foarte eficientă și celulele T preexistente sensibilizate de tumori sunt esențiale pentru succesul terapiei (54).

Bleomicina singură sau gena IL-12 singură supresează semnificativ melanoamele subcutane, dar combinate sunt și mai eficiente. 37% din șoarecii care au primit combinația arată remisie completă a tumorilor prestabilite și ulterioara provocare cu celule tumorale a dus la rejecția acestora. Metastaze focale în plămâni s-au observat după inocularea i.v. a celulelor melanomului, dar acestea erau mai reduse, iar supraviețuirea era mai îndelungată la tratamentul combinat. Activitățile NK și citolitice ale limfocitelor T citotoxice au fost marcat crescute la șoareci care au primit terapie chimio-genică, în timp ce terapia numai cu gena IL-12 a crescut numai parțial citotoxicitatea NK. Se sugerează că, administrarea genei IL-12 cu bleomicină elimină în mod sinergic răspunsurile imune înăscute

și adaptative anti-melanom, ducând la supresia marcată a tumorilor tratate, ca și la regresia leziunilor metastazice (55).

Se crede că, IL-12 amplifică acțiunile antitumorale ale anticorpului monoclonal (trastuzumab) anti-receptorul – 2 al factorului de creștere epidermal uman (HER-2). Pacienți cu malignități metastazice HER-2 pozitive au primit în ziua 1 a fiecărui ciclu săptămânal, trastuzumab. Începând din a treia săptămână pacienții au fost injectați intravenos cu IL-12 în zilele 2 și 5. IL-12 a indus graț de gradul 1 și oboseală de gradul 2. Doza de 300 ng/kg a fost maximum tolerată.

Se declanșează o susținută producție de IFN γ de către NK numai la cei cu răspuns clinic sau boală stabilizată. De asemenea, sunt crescute nivelurile serice de proteină – 1 α elaborată de macrofage, TNF α , și factorii antiangiogenici (proteina 10 inductibilă de IFN γ și monokine induse de IFN γ). Adăugarea IL-12 la terapia cu trastuzumab nu amplifică eficient tratamentul cu acest anticorp (56).

Există interacțiuni între celulele NK și celulele dendritice. Numărul și activitatea funcțională a acestora în leucocitele infiltrate în tumori sunt sinergic crescute la șoarecii tratați cu IL-12 + anti-4-1BB, comparativ cu tratamentul cu fiecare reactiv în parte. Depleția NK in vivo duce la scăderea semnificativă a numărului celulelor dendritice în tumori, sugerându-se că celulele NK sunt implicate în activarea și expansiunea acestora. Mecanismul prin care celulele NK activate de IL-12 reglează funcțiile celulelor dendritice este parțial mediat de secreția IFN γ care conduce la stimularea 4-1BB de către celulele dendritice. În plus, activarea 4-1BB în conjuncție cu administrarea genei IL-12 crește infiltrarea tumorală a celulelor dendritice și amplifică expresia propriilor CMH clasa a II-a. Activarea celulelor dendritice de către celulele NK și dezvoltarea ulterioară a răspunsurilor limfocitelor T citotoxice antitumorale facilitate de celulele dendritice activate de 4-1BB pot avea importanță pentru efectele sinergice observate în terapia combinată, în comparație cu tratamentul numai cu vectori adenovirali care conțin IL-12 sau anti-4-1BB (57).

Molecula costimulatoare B7-2 este exprimată de variate limfoame, dar acest nivel de expresie nu este suficient pentru a genera imunitatea antitumorală eficientă in vivo. Celulele tumorale murine A20 de limfom B exprimă molecule CMH I și II și niveluri constitutive moderate de B7-2. B7-1 și B7-2 au fost introduse în celulele tumorale lipsite de aceste molecule, cu efecte relative antitumorale, dar transfectantele A20/B7-2 care exprimă niveluri mai mari de B7-2 au fost rejectate la șoarecii singenici și a fost generată imunitatea sistemică împotriva celulelor parentale A20. Tratamentul cu variantele celulare A20/B7-2 îmbunătățește semnificativ supraviețuirea șoarecilor purtători de tumori. Coinjectarea cu variante care secretă IL-12 nu a crescut imunitatea antitumorală observată în terapia numai cu B7-2. La șoarecii astfel tratați limfocitele T CD8+ și celulele NK mediază răspunsul imun antitumoral. La șoareci care dezvoltă tumori după imunizarea cu variantele celulare A20/B7-2, s-a arătat că celulele tumorale

rejectate exprimă niveluri mai scăzute ale B7-2 decât variantele transfectate. Deci, nivelul costimulării este important pentru generarea imunității antitumorale și pentru supraviețuirea gazdei (58).

Celule tumorale au fost injectate subcutan și au fost menținute până la apariția metastazelor pulmonare. Din acest stadiu, șoarecii au fost tratați cu o singură doză de citokine încapsulate în microsferi biodegradabile injectate în tumorile primare subcutane pentru a obține eliberarea locală susținută de IL-12, GM-CSF sau o combinație a acestor citokine în micromediul tumoral. Tratamentul cu IL-12 și GM-CSF s-a dovedit superior tumorilor primare, amplificând supraviețuirea postoperatorie și supresând boala metastazică stabilizată. Analiza supraviețuirii pe termen lung a demonstrat că, injectarea intratumorală a microsferelor încărcate cu IL-12 + GM-CSF duce la vindecarea completă a bolii diseminate la majoritatea animalelor. Adăugarea unei terapii sistemice în doze mici a IL-2 la protocolul de tratament duce la pierderea activității antitumorale indusă de tratamentul IL-12 + GM-CSF. In vivo, depleția subsetului de limfocite stabilește că, atât subsetul celular T, cât și cel NK sunt necesare pentru supresia tumorilor primare și metastazice. Activitatea celulelor T tumor-specifice, pe termen lung, a fost demonstrată prin analiza imunohistochimică a leziunilor metastazice. Imunoterapia tumorală in situ cu microsferi cu IL-12 + GM-CSF induce atât răspunsurile imune antitumorale înnăscute, cât și pe cele ale imunității adaptative, ceea ce duce la eradicarea tumorilor diseminate (59).

Alături de eficacitatea sa în tratamentul neutropeniei induse de chemoterapie, dovezi recente sugerează că GM-CSF poate avea efecte imunomodulatorii asupra imunității anticanceroase. S-a dovedit că GM-CSF inițiază maturarea celulelor dendritice, cu ulterioara posibilă stimulare a citokinei anticanceroase, IL-12. 20 de pacienți cu cancer avansat care au primit GM-CSF pentru neutropenia indusă de chemoterapie au fost testați pentru nivelul IL-12 prin ELISA. Niveluri serice bazale crescute au fost observate la 8 din 20 pacienți. La pacienții cu niveluri anormal crescute ale IL-12 în pretratament, nu s-au înregistrat modificări semnificative ale concentrației serice medii după administrarea GM-CSF. În schimb, pacienții cu niveluri normale ale IL-12 în pretratament prezintă o creștere semnificativă a concentrațiilor medii de IL-12 ca răspuns la GM-CSF, cu un vârf după 12 ore. Deci, GM-CSF poate stimula acut secreția IL-12 la pacienții cu cancer (60).

Terapia genică

Întrucât citokina IL-12 incită un interes deosebit datorită proprietăților ei antitumorale, în această idee s-au efectuat numeroase experimente. Terapiei genice i se acordă întâietate având în vedere avantajele acesteia, printre care

eliminarea toxicității. Unele încercări de transmitere a DNA IL-12 în diferite plasmide virale vor fi prezentate în continuare.

IL-12 are o remarcabilă activitate antitumorală când este folosită direct ca proteină recombinantă, sau când diferiți vectori virali sau nonvirali îi transferă gena. Ca amplificator al imunității tumorale acționează ca o punte între răspunsurile imune adaptative și cele înnăscute datorită capacității ei de a induce proliferarea și activarea celulelor NK, NKT și T. De asemenea, inhibă angiogeneza tumorală în principal prin producția dependentă de IFN γ a chemokinei IP10.

Toxicitatea inacceptabilă rezultată din supraproducția de IFN γ s-a stabilit la pacienți cu carcinom renal aflați în faza clinică II cărora li s-a administrat sistemic, rIL-12. Metodele transferului de gene sunt indicate pentru a se limita producția de IL-12 în mediul tumoral, prevenind toxicitatea sistemică. Celulele tumorale, celulele dendritice sau fibroblastele autologe au fost transfectate cu adenovirusuri recombinante pentru a secreta rIL-12 local, arătând bună eficiență și profiluri de siguranță. Combinația IL-12 sinergizează cu alte scheme imunoterapeutice pentru a se obține rezultate mai bune. Rezultatele promițătoare ale unui studiu clinic au fost recent obținute din prima fază, prin transferul genic al IL-12 mediat in vivo de adenovirus, în leziunile pacienților cu cancer avansat. Îmbunătățirea rezultatelor este ca urmare a: creșterii eficacității transducției genelor, dezvoltării de promotori tumorali specifici și de vectori de expresie pe termen-lung reglabili și combinația cu alte terapii anticanceroase imunologice și neimunologice (61).

S-a urmărit eficacitatea injecției intratumorale cu macrofage transduse cu vectorul adenoviral recombinant murin IL-12 (AdmIL-12), folosind un model de cancer de prostată de șoarece 178-2 BMA. Macrofagele transduse cu AdmIL-12 secretă IL-12 in vitro și demonstrează creșterea expresiei la suprafață a CMH I și II, ca și a antigenului F4/80, comparativ cu macrofagele neinfectate sau cu cele infectate cu un vector adenoviral care conține beta-galactozidază (Adbetagal) la macrofagele martor. Macrofagele transduse cu AdmIL-12 injectate în tumori 178-2 BMA ortotopice in vivo induc supresie semnificativă a creșterii tumorii primare și metastazelor pulmonare spontane, comparativ cu martorii. Aceste efecte antitumorale și antimetastazice au fost comparabile cu cele care apar după administrarea directă a vectorului AdmIL-12. Șoarecii cu tumori ortotopice tratați cu macrofage transduse cu AdmIL-12 supraviețuiesc semnificativ mai mult decât martorii. Tumorile au infiltrat crescut cu celule T CD4+ și CD8+ la cei injectați cu macrofage transduse cu AdmIL-12, comparativ cu martorii. Activitatea celulelor NK citotoxice derivate din splenocite este amplificată la două zile de la injecția cu macrofage transduse cu AdmIL-12, iar în ziua 14, activitatea limfocitelor T specific-tumorale a fost crescută comparativ cu a martorilor. Studiile de trafic au confirmat că macrofagele transduse cu AdmIL-12 injectate intratumoral ar putea

migra în ganglionii limfatici. Deci, această nouă abordare în terapia cancerului de prostată demonstrează răspuns imun antitumoral care implică și activitate antimetastazică eficientă în studiile preclinice (62).

Într-un model de cancer de prostată, terapia cu AdmIL-12 duce la inhibiția semnificativă a creșterii, atât a tumorii primare, cât și a metastazelor sincrone. În două zile de la injecția vectorului au fost detectate două modele distincte de apoptoză în cadrul tumorii primare, iar inhibiția acestuia cu un inhibitor al caspazei, anulează substanțial supresia creșterii. Modelul dominant prezintă straturi localizate de celule apoptotice în strânsă asocieră cu necroză cu PMNs. Depleția PMNs duce la pierderea acestui model de apoptoză și reduce creșterea supresiei. Un al doilea val major de supresie a creșterii în cadrul tumorii primare a fost mediat de un răspuns imun. Activitatea celulelor NK s-a detectat în limfocitele infiltrate în tumori, din a 8-a zi după injecția vectorului a cărei depleție a dus la pierderea semnificativă a supraviețuirii. Un rol mai modest pentru celulele T a fost identificat, iar absența activității limfocitelor T citotoxice poate fi legată de reducerea semnificativă a nivelurilor $IFN\gamma$ la șoarecii depletați de celulele T, astfel reducându-se influențele secundare ale $IFN\gamma$. Totuși, depleția celulelor NK sau a celulelor T nu are efect negativ detectabil asupra activității antimetastazice a IL-12 (63).

Adenovirusul replicant cu inserția genei IL-12 de la șoarece (CNHK200-mIL-12) a fost construit pentru a transfecta liniile de carcinom nazofaringian CNE3 și 915. Hexonul adenovirusului a fost detectat prin marcarea imunohistochimică și citometrie în flux, iar expresia mIL-12 a fost examinată prin ELISA. Replicarea CNHK200-mIL-12 crește de 1000 de ori, iar nivelul de expresie al mIL-12 atinge 84.5 ± 4.6 ng în celulele CNE3 și 75.6 ± 3.4 ng în celulele 915, așa cum s-a determinat la 72 ore de la transfecție. Se apreciază că, CNHK200-mIL-12 se poate replica in vitro în celulele de carcinom nazofaringian cu înaltă expresie a mIL-12, ceea ce sugerează că CNHK200-mIL-12 poate fi folosit în tratamentul carcinomului nazofaringean (64).

S-a administrat Ad.IL-12 la 21 de pacienți cu cancer primar pancreatic (7), colorectal (5) și hepatic (9). Injecțiile Ad.IL-12 au fost bine tolerate și nu s-a atins doza de citotoxicitate, dar tranzitoriu s-a observat febră, transpirație, limfopenie, legate mai degrabă de vectorul injectat decât de expresia transgenei. Nu s-a constatat toxicitate cumulativă. La 4 din 10 pacienți a crescut semnificativ infiltrarea tumorilor cu celule efectoare imune și s-a înregistrat o remisie parțială a masei tumorale la un pacient cu carcinom hepatocelular. Boală stabilă prezintă 29% din pacienți, în special cei cu carcinom hepatic primar. Deci, injecțiile intratumorale cu particule virale 3×10^{12} de Ad.IL-12 la cei cu malignități digestive avansate sunt bine tolerate, nefiind atinsă toxicitatea limitată de doză (65).

Adenocarcinomul pancreatic ductal este unul din cele mai obișnuite și letale cancere din țările vestice. Coexpresia mediată de adenovirus (Ad) a IL-12 și

molecula costimulatorie B7.1 este extrem de eficientă în inducerea regresiei tumorilor transplantate și netransplantate înalt imunogene. Comparativ cu tratamentul numai cu AdIL-12, o singură injecție intratumorală cu AdIL-12/B7.1 conduce la un răspuns imun prelungit și mediază regresia completă la 80% din animalele tratate. După reprovocarea cu celule tumorale parentale, 70% din șoarecii vindecați rămân fără tumori, sugerându-se că a fost indusă imunitatea protectoare. Răspunsul antitumoral a fost asociat cu stimularea expresiei H-2K(b) și Abcb2, în timp ce alte componente ale proteasomului (Abcb3, Psmb9 și Psmb8) nu au fost afectate. Aceste date indică faptul că, stimularea mașinării de prezentare antigenică de către AdIL-12/B7.1 poate fi rațională din punct de vedere terapeutic pentru cancerul pancreatic neimunogenic, rezistent la terapie (66).

Celulele dendritice modificate genetic aduc strategii terapeutice unice pentru cancerul de prostată; totuși, evaluarea comparativă a opțiunilor de administrare specifice folosind modele preclinice adecvate nu au fost descrise. Celule dendritice derivate din măduva osoasă au fost modificate genetic pentru a exprima niveluri înalte de IL-12, cu sau fără molecula costimulatorie B7.1, prin infecția ex vivo cu vectori adenovirali recombinanți. S-a folosit un model preclinic (178-2BMA) de cancer prostatic metastazant de șoarece pentru a compara două protocoale terapeutice pentru furnizarea de celule dendritice, in situ și subcutan. Celulele dendritice au fost generate de măduva osoasă a șoarecilor singenici 129/Sv prin cultivarea în prezența GM-CSF și IL-4. In vitro, celulele dendritice/IL-12 sau celulele dendritice/IL-12/B7 au produs niveluri crescute de IL-12 biologic activă. Administrarea in situ a celulelor dendritice/IL-12 sau a celulelor dendritice/IL-12/B7 a indus o supresie semnificativă a creșterii tumorii primare, comparativ cu martorii celule dendritice/beta gal, ca și un număr redus de noduli metastazici pulmonari spontani. Injecția in situ a celulelor dendritice/IL-12 scade semnificativ mărimea tumorii și crește supraviețuirea comparativ martorii, dar scăderea numărului metastazelor pulmonare spontane nu atinge semnificație statistică. Atât tratamentul in situ, cât și cel subcutan, amplifică activitatea citolitică a celulelor NK și limfocitelor T citotoxice. Imunoterapia intratumorală bazată pe celulele dendritice s-a arătat că este o strategie terapeutică eficientă pentru cancerul prostatic avansat local, având în vedere supresia creșterii tumorale, inhibiția metastazării și îmbunătățirea supraviețuirii (67).

Administrarea intralezională a celulelor dendritice cultivate pentru a produce IL-12 prin infecție in vitro cu adenovirus recombinant, are frecvent eficacitate de eradicare a tumorilor subcutane derivate din linia celulară de carcinom murin de colon CT26. Răspunsul de eradicare este mediat în principal de limfocitele T citolitice. Injecții repetate cu asemenea celule dendritice, comparativ cu o singură injecție, ating o mai bună eficacitate atât împotriva tumorilor injectate, cât și împotriva tumorilor implantate la distanță. Răspunsul sistemic de eradicare duce la eradicarea concomitentă și a leziunilor netratate în

majoritatea cazurilor. Eficiența tratamentului a fost observată și în cazul unor tumori stabilizate de două săptămâni când aceste strategii au fost folosite în combinație (68).

Blastele din leucemia acută mieloidă au fost modificate pentru a exprima moleculele costimulatorii esențiale pentru stimularea eficientă a celulelor T. O astfel de tactică a fost modificarea celulelor din leucemia acută mieloidă pentru a exprima molecula costimulatorie B7/CD80 care leagă CD28, cu scopul inițierii evenimentelor care culminează cu creșterea producerii de citokine, proliferarea și dezvoltarea funcțiilor efectorii ale celulelor T. Legătura sinergică dintre calea CD80/CD28 și citokina IL-12, materializată în generarea de limfocite T citotoxice pentru tumorile solide, se aplică, de asemenea, pentru leucemia acută mieloidă. Sinergia CD28/IL-12 facilitează proliferarea celulelor T allogenice ca răspuns la stimularea cu blaste din leucemia acută mieloidă primară. Sinergia favorizează și generarea unui răspuns imun de tip Th1, evidențiat prin secreția de IFN γ și facilitează proliferarea celulelor T naive și de memorie (69).

Genele care codifică subunitățile p35 și p40 ale IL-12 umană și aminoglicozid fosfotransferaza bacteriană au fost clonate într-un plasmid mamalian de expresie, rezultând plasmidul pCMVIL-12neo, folosit pentru transfecția liniilor celulare tumorale pulmonare umane in vitro. Au fost generate subclone stabil transfectate și s-a observat că secretă IL-12 umană cel puțin 10 zile după doza letală de radiație gamma. Capacitatea celulelor tumorale producătoare de IL-12 de a iniția un răspuns antitumoral in vivo a fost evaluată la șoarecii SCID co-grefați subcutan cu limfocite sangvine periferice umane (PBLs) și celule tumorale pulmonare umane viabile (analiza SCID-Winn). S-a stabilit că, IL-12, eliberat local în tumori de către celulele transfectate cu IL-12 iradiate, activează limfocitele periferice umane și inițiază capacitatea lor de a supresa dezvoltarea tumorală, în funcție de doză. Studiile cu depleția subsetului de limfocite periferice umane relevă că, efectul antitumoral inițiat de celulele modificate de IL-12, este dependent de prezența celulelor T umane CD8+ și, într-o mai mică măsură, de celulele NK CD56+ din cadrul xenogrefei.

Celulele tumorale pulmonare umane iradiate, modificate genetic cu pCMVIL-12neo secretă IL-12 umană bioactivă în concentrații suficiente pentru inițierea unui răspuns antitumoral mediat de limfocitele umane în micromediul xenogrefei. Analiza SCID-Winn oferă un model util pentru evaluarea preclinică a protocoalelor de imunoterapie umană bazată pe citokine (70).

Terapia genică este o metodă nouă, promițătoare pentru tratarea locală a tumorilor. Transducția celulelor de osteosarcom cu plasmidul pCMV-IL-12-neo induce creșterea semnificativă a expresiei IFN γ de către celulele mononucleare și are efecte antitumorale mediate de sistemul imun. În combinație cu rIL-18, creșterea IFN γ a fost multiplicată în funcție de doză. Deci, celulele de osteosarcom pot fi țintite eficient in vitro de plasmide care conțin gena IL-12.

Având în vedere căile sinergice este rezonabilă combinarea transferului genic local, bazat pe IL-12 cu administrarea rIL-18 pentru a atinge imunoefectele potențial promițătoare pentru tratamentul adjuvant al osteosarcoamelor (71).

Activitatea antitumorală a IL-12 implică inducerea apoptozei. Fas (APO-1/CD95) este o proteină membranară de tip I care este capabilă să inițieze o cale de semnalizare a apoptozei când cupleză ligandul său, FasL. Se apreciază că, apoptoza mediată de Fas-FasL joacă un rol în regresia tumorii indusă de IL-12. S-a folosit un vector care exprimă mIL-12 condus de promotorul citomegalovirusului pentru a exprima cDNA IL-12 murin în linia celulară de carcinom prostatic murin RM-9. Celulele RM-9 martor și celulele RM-9 infectate stabil cu gena IL-12 (RM-9-IL-12) au fost inoculate subcutan la șoareci masculi C57BL/J6 în vârstă de 4-6 săptămâni. Periodic (la interval de 3 zile) s-a măsurat dimensiunea tumorii. Celulele de carcinom de prostată RM-9 care exprimă IL-12, transplantate la șoareci C57BL/J6 au crescut mai încet decât celulele martor RM-9 și celulele RM-9-Luc martor pentru vector. Timpul mediu de supraviețuire al șoarecilor RM-9-IL-12 a fost de peste 53 de zile, în timp ce supraviețuirea medie pentru șoarecii transplantați cu celule RM-9 martor a fost de numai 16 zile. Celulele apoptotice au fost mai numeroase în tumorile RM-9-IL-12, respectiv 10.3%, față de 1.5% la martori. Proteinele Fas și FasL au crescut de aproximativ două ori în tumorile RM-9-IL-12 comparativ cu tumorile martor RM-9. În concluzie, calea apoptotică mediată de Fas-FasL poate contribui la rejecția indusă de IL-12 a carcinomului de prostată (72).

În tratamentul cancerului de colon s-a folosit strategia combinării terapiei cu virusul herpes simplex oncolitic cu terapia imunomodulatoare, ca tratament pentru cancerul de colon experimental. Recombinantul HSV oncolitic NV1023 și virusul oncolitic NV1042, care secretă IL-12, au fost evaluate in vitro și in vivo referitor la eficacitatea antitumorală. A fost inserată gena murină IL-12 într-un HSV competent pentru replicare. Ambele virusuri se pot replica în cadrul și pot omorî celulele CT26 in vitro, cu citotoxicitate de 100% atinsă după infecția cu oricare din virusuri. Numai NV1042 poate produce mIL-12. In vivo, ambele virusuri arată eficacitate egală la doze înalte. La doze mici, numai virusul NV-1042 producător de citokine a determinat vindecarea animalelor. În concluzie, ambele virusuri au potențial oncolitic asupra celulelor de cancer de colon, dar la doze înalte. Producerea de citokine de către virusul NV1042 poate permite folosirea de doze mici de virus în terapia virală, fără să se piardă eficacitatea antitumorală (73).

S-a obținut un adenovirus recombinant care exprimă timidinkinaza HSV (HSVtk), condus de promotorul modificat CALC-I, TCP (AdTCPtk). Infecția cu acest virus prezintă efect citotoxic eficient asupra liniilor celulare MTC (celulele rMTC și TT) după tratamentul cu ganciclovir in vitro. În modelul de șobolani WAG/Rij, combinația tratamentului AdTCPtk/ganciclovir cu administrarea

adenovirusului care exprimă IL-12 murină sub controlul TCP (AdTCPmIL-12) duce la supresia eficientă a creșterii tumorii la locul tratat și, de asemenea, în locuri aflate la distanță, netratate, comparativ cu tratamentul cu AdTCPtk/ganciclovir sau AdTCPmIL-12 singure. Acest tratament combinat poate oferi o terapie eficientă pentru MTC metastazic cu toxicitate minimă (74).

Producția sistemică de mIL-12 în funcție de doză, cu un nivel seric de peste 20 $\mu\text{g/ml}$, a fost observată la 24 de ore de la administrarea sistemică a genei. Timpul de înjumătățire în circulație a fost de aproximativ 5 ore. Produsul genei la șoareci a fost la fel de activ ca și proteina murină IL-12 recombinantă purificată (mIL-12). mIL-12 circulantă activează celulele NK și stimulează producerea IFN γ in vivo. O singură administrare a genei mIL-12 duce la regresia marcată a tumorilor subcutane stabilizate într-un model tumoral DNA HPV-pozitiv (TC-1) la șoareci C57BL/6J. Efectul antitumoral al acestei doze unice de gene a fost comparabil cu administrarea intraperitoneală repetată a rmIL-12 (0.5 $\mu\text{g/zi}$ timp de 5 zile consecutiv). Administrarea sistemică a genei este simplă, economică și foarte eficientă pentru producerea de cantități mari de citokine in vivo. Astfel, se arată potențialul terapeutic al IL-12 pentru tratamentul tumorilor DNA HPV-pozitive și utilitatea administrării sistemice a genei pentru evaluarea efectului terapeutic al genei candidate (75).

IL-12 constă din subunitățile p40 și p35 care produc heterodimerul p70 și proteina liberă p40. p70 este esențială pentru inducerea imunității Th1 și a celulelor T citotoxice, în timp ce p40 inhibă funcția mediată de p70. Mutații introduse în situsurile de N-glicozilare (N220 al p40 murin și N222 al p40 uman) reduc secreția p40, dar nu și a p70. Coimunizarea genei mIL-12 cu mutant N220 cu DNA pentru E2 din HCV (hepatitis C virus) amplifică semnificativ răspunsul T celular CD8+ E2-specific și protecția împotriva provocării tumorale comparativ cu cea a tipului sălbatic. Raportul p70/p40 este important pentru generarea imunității mediate celular susținută pe termen lung. Astfel, mutanta IL-12 ar putea fi folosită pentru dezvoltarea de vaccinuri DNA ca adjuvant pentru generarea răspunsurilor cu celule T de memorie pe termen lung (76).

Injecțiile intravenoase cu IL-12 umană recombinantă (rhIL-12) sunt eficiente în inducerea răspunsului imun antitumoral, în regresia tumorii și în supraviețuirea, pe termen lung, a șoarecilor cu cancer hepatic metastazic. După injecția eficientă nu s-a observat inflamația ficatului și a plămânului, și nici creșterea semnificativă a creatininei și aminotransferazelor serice. Creșterile serice ale IL-12 și IFN γ erau de 17 și, respectiv, 19 ori mai scăzute decât nivelurile vârf după administrarea rIL-12 la doze maxime tolerate clinic. Până în două săptămâni după injecție nu au crescut citokinele serice proinflamatorii (IL-6 și TNF- α) și nici diseminarea vectorului la doza eficientă terapeutic. La doze mai mari supratrapeutice ale vectorului Adv.RSV-mIL-12 a fost observată, totuși, inflamația ficatului și plămânilor cu creșteri ale aminotransferazelor serice, dar nu la martorii injectați cu un număr echivalent de particule de vector adenoviral gol (77).

Vectorii plasmidiali convenționali pe bază de EBV care codifică gena murină IL-12 (pGEG.mIL-12 și, respectiv, pG.mIL-12) au fost transfectate intravenos la șoareci care au fost inoculați subcutan cu celule de sarcom M5076. Transfecția pGEG.mIL-12 a supresat drastic tumorile subcutane, ca și metastazele hepatice, ceea ce conduce la prelungirea semnificativă a perioadei de supraviețuire a animalelor. Transfecția repetată cu pGEG.mIL-12 sau pG.mIL-12 a supresat, de asemenea, carcinomatoza peritoneală la șoareci care au fost injectați cu celule M5076 în cavitatea peritoneală. Se sugerează că, un nivel crescut de producere a IL-12 determinat de terapia genică a citokinei administrată intravenos, poate fi destul de eficient în inhibiția neoplaziilor metastazice nesusceptibile la limfocitele T citotoxice (78).

Au fost izolate celule dendritice din măduva osoasă și au fost tratate cu cDNA din gliomul 203 mediat de Semliki forest virus (SFV) însoțit sau nu de administrarea sistemică a IL-12 și IL-18 pentru a trata șoarecii purtători de gliom 203. Administrarea combinată a SFV-cDNA, IL-12 și IL-18 produce efecte antitumorale semnificative împotriva creșterii celulelor de gliom murin in vivo și, de asemenea, poate induce imunitate antitumorală specifică. Efectele sinergice ale combinării SFV-cDNA, IL-12 și IL-18 in vivo coincid cu creșterea marcată a producerii IFN γ , efecte mediate de limfocitele CD4+ și CD8+, ca și de celulele NK.

Deci, folosirea IL-12 și IL-18 în imunoterapia bazată pe celule dendritice derivate din măduva osoasă a șoarecilor cu gliom 203 este benefică, iar această terapie poate fi un candidat excelent pentru dezvoltarea unui nou protocol de tratament al acestui cancer (79).

Terapia genică a dat rezultate neașteptate și în tratamentul melanomului malign, unul dintre cele mai rebele și agresive cancere.

DNA care codifică IL-12 murin previne formarea metastazelor de melanom B16, când este administrat intramuscular. În modelul de melanom uman această terapie induce regresia tumorilor și, în unele cazuri, chiar dispariția completă a tumorilor. Tratamentul cu DNA nu induce efecte adverse sistemice. Efectul terapeutic al injecției DNA este mediat, parțial, de celulele NK. Un efect antivascular al tratamentului cu IL-12 a fost evident în examinarea histologică, observându-se subțierea endoteliului și modificări bruște ale diametrelor vaselor. Plasmidul DNA intratumoral care codifică IL-12 apare ca un nou instrument terapeutic pentru leziunile de melanom accesibile (80).

Injecția intramusculară a plasmidului DNA care codifică IL-12 elimină stabilizarea metastazelor pulmonare ale celulelor de melanom B16F10 într-un model murin singenic. Injecția intramusculară a plasmidului DNA care codifică IL-12 duce la o reducere pronunțată a creșterii tumorii atunci când se face testarea pe șoareci C57/BL6 cu tumori prestabilite manifestate ele însele la niveluri crescute de IL-12 în ser la 12 zile de la tratamentul cu DNA. Absența unui efect toxic advers ar putea reprezenta un semnificativ avantaj al terapiei DNA IL-12 (81).

Acidul poli[D,L-2,4-diaminobutiric] (PDBA) este un nou purtător de genă, descris recent ca vector pentru administrarea genei IL-12, folosit în tratarea tumorilor solide, printre care și melanomul.

Șoarecii C57BL/6 cu melanom B16F10 au fost tratați prin injecții intratumorale cu complexul PDBA/plasmid luciferaza (pLuc) în doze optime. După o singură injecție apar niveluri crescute ale proteinei IL-12 în tumoră, în timp ce nivelurile serice scad sub limitele de detectare. Terapia genică IL-12 cu sistemul PDBA inhibă semnificativ creșterea tumorală comparativ cu martorii. În plus, atât activitatea celulelor NK, cât și a limfocitelor T citotoxice din ganglionii limfatici ai șoarecilor tratați cu PDBA/pmIL-12, a fost crescută substanțial comparativ cu martorii. Aceste rezultate sugerează că terapia genică IL-12 mediată de PDBA este o potențială strategie pentru tratamentul pacienților cu tumori solide. De asemenea, răspunsul la imunoterapia IFN α poate fi amplificat semnificativ de pretratamentul cu IL-12, iar acest efect este dependent de producția de IFN γ și de acțiunile sale pe celulele de melanom (82).

Se descrie un nou model animal folosind cai cenușii, în terapia contra melanomului. Caii dezvoltă spontan melanom metastazic care este asemănător cu cel uman. Injecția plasmidelor DNA, care codifică IL-12 umană, în metastazele stabilizate, induce regresia marcată a leziunilor. Dispariția completă a fost observată într-o singură leziune tratată, cu nici o revenire timp de 6 luni (83).

În ultimii ani s-a practicat, cu rezultate promițătoare, administrarea de plasmide cu alte gene retrovirale sau non-virale, ca și administrarea simplă intratumorală, intravenoasă sau subcutană a genei IL-12 la animale purtătoare de tumori. De asemenea, combinarea genei IL-12 cu substanțe anticancerigene este eficientă în combaterea diverselor tipuri de cancer.

IL-12 este una dintre cele mai puternice citokine antitumorale. Au fost modificate genetic in vitro fibroblastele singenice sau celulele tumorale MM45T-Li HCC să exprime IL-12, folosind un vector retroviral murin IL-12 TFG policistronic (TFGmIL-12) care codifică ambele subunități ale IL-12 murină, p35 și p40. Carcinomul hepatocelular a fost generat folosind inocularea intrahepatică directă a liniei de celule tumorale în lobul hepatic stâng al șoarecilor BALB/c. Expresia hepatică directă a IL-12 de către celulele tumorale modificate genetic injectate, induce o inhibiție accentuată a creșterii tumorilor. Acest efect se asociază cu infiltrarea timpurie a macrofagelor și limfocitelor care formează numeroase focare intralobulare. Expresia intrahepatică a IL-12 nu a modificat limfocitele B circulante sau splenice, sau celulele NK. Inhibiția creșterii tumorii a fost menținută la șoarecii nuzi chiar și în cazul depleției celulelor NK. Tratamentul tumorilor hepatice stabilizate la șoareci BALB/c folosind injecția direct intratumorală a fibroblastelor singenice care exprimă IL-12 reduce semnificativ dimensiunile tumorii (84).

Injectarea directă in vivo a liniei celulare care poartă gena mL-12 pe calea vectorului retroviral, inhibă creșterea hepatomului la șobolani. Efectul terapeutic al administrării timpurii este superior celei târzii. Injectarea directă în splină este o terapie nouă, sigură și eficientă în tratamentul hepatomului (85).

Șoarecilor BALB/c li s-au inoculat intradermic celule singenice de cancer renal murin, după ce li s-a injectat un plasmid care exprimă gena IL-12. 40% din șoareci au rejectat tumora după tratament și, în plus, au rezistat unei noi provocări cu aceste celule. Inocularea acestor celule de data aceasta iradiate induce numai parțial imunitatea antitumorală, pe când tratamentul combinat (celule iradiate + transfecția genei IL-12) intensifică remarcabil efectul și, în plus, amplifică supraviețuirea șoarecilor cu tumori infiltrate cu celule T CD4+ și CD8+, chiar și atunci când tratamentul a început după implantarea tumorii, la distanță (86).

Adenocarcinomul murin CT26 și carcinomul celulelor renale de la șoareci BALB/c au fost tratate prin injectare directă intratumorală a vectorului plasmidial DNA nonviral care codifică gena IL-12 murină, fie singură, fie în complex cu un lipid cationic. Ambele tratamente au determinat completa regresie tumorală a CT26 la 87% dintre șoareci. Pentru tumorile celulelor renale, regresia completă a tumorilor a fost observată la 67 și, respectiv, 75% din animale tratate numai cu DNA mL-12 și DNA mL-12+lipidul cationic. Reducerea marcată a creșterii tumorilor la șoarecii purtători de tumori tratate cu DNA mL-12 s-a asociat cu creșterea citotoxicității celulelor T specific tumorale, însoțită de amplificarea producerii de IFN γ în splină și ganglionii limfatici și cu creșterea splenomegaliei și limfadenopatiei. Rata infiltrării tumorilor cu limfocite T CD8+ și CD4+ a crescut la purtătorii tumorilor tratate cu DNA mL-12, ca și la cei cu tumori tratate combinat. Deci, transferul direct intratumoral al genei DNA IL-12 (nonviral) este o metodă simplă și eficientă pentru tratarea tumorilor murine, sugerând o eventuală aplicare clinică (87).

IL-12 este esențială pentru a genera răspunsul Th1 și pentru a stimula celulele NK și limfocitele T citotoxice. CD154 țintește CD40 de pe celulele prezentatoare de antigen, astfel inducând prezentarea antigenului sistemului imun și producerea IL-12. Deoarece IL-12 și CD154 au câteva căi comune de mediere a răspunsului imun, a fost investigat un model murin agresiv de leucemie acută. Aceste celule leucemice au fost transduse cu IL-12, CD154 și IL-12+CD154 prin transfer genic și au prezentat leucemogenitate scăzută, dar efectul protector al CD154 a fost redus când 10^6 celule leucemice au fost injectate. Vaccinurile cu celule transduse cu IL-12 și iradiate letal au vindecat șoareci injectați anterior cu 10^4 celule leucemice, iar transferul adaptativ al imunității antileucemice indusă de IL-12 a protejat șoarecii. Citotoxicitatea celulelor NK a fost amplificată la șoarecii vaccinați cu celule leucemice transduse cu IL-12, CD154 și CD154 + IL-12. Celulele transduse cu IL-12 induc mRNA IFN γ în celulele T CD4+ și CD8+ izolate din splina animalelor vaccinate, însă experimentele de depleție in vivo au

arătat că efectul vaccinului IL-12 este dependent de celulele CD4+ și nu de celulele CD8+. Se concluzionează că, gena IL-12 este un candidat mai puternic decât CD154 pentru terapia genică a leucemiei acute (88).

Terapia genică combinată (endostatin și IL-12) utilizată antitumoral s-a aplicat pe hepatomul de șoarece transplantat cu polivinilpirolidonă (PVP). Plasmidul eucariot cu endostatin de șoarece (pSecES) cu o secvență semnal I κ gappa în interior și plasmidul eucariot cu IL-12 de șoarece (pmIL-12) au fost transfectate în celulele BHK-21. Endostatinul și IL-12 au fost analizate prin ELISA din supernatant și au fost folosite individual pentru cultivarea celulelor endoteliale și a limfocitelor splenice. Celulele H22 injectate intratumoral cu pSecES/PVP, pmIL-12/PVP sau pSecES + pmIL-12/PVP au fost inoculate în mușchii piciorului stâng al șoarecilor, în mod repetat. Endostatinul și IL-12 au fost secretate după transfecție, ceea ce ar putea inhiba proliferarea celulelor endoteliale sau ar iniția proliferarea limfocitelor splenice. Creșterea tumorală a fost puternic inhibată cu 91.8% după injectarea pSecES + pmIL-12/PVP, însoțită de niveluri serice crescute de endostatin și IL-12, mai multe limfocite infiltrante, celule apoptotice și câteva vase tumorale comparativ cu injecția pSecES/PVP, pmIL-12/PVP sau vector/ PVP. Deci, genele endostatinului și IL-12 de șoarece pot fi exprimate după injectarea intratumorală cu PVP. Angiogeneza hepatomului poate fi inhibată în mod sinergic, limfocitele pot fi activate să se infiltreze, iar celulele tumorale sunt induse să sufere apoptoza. Hepatomul este, astfel, puternic inhibat sau eradicat (89).

Șoarecilor li s-a transplantat subcutan 10^6 celule de hepatom BNL și plasmide ce codifică diverse citokine (pXX-GM-CSF + pXX-IL-12, pXX-IL-12, pXX-GM-CSF, pXX-Neo). Plasmidele au fost administrate prin vena cozii. Coadministrarea IL-12 și GM-CSF a avut efecte antitumorale mai puternice, expresie pe termen lung amplificată a IL-12 și nivel mai scăzut al IFN γ decât IL-12 administrată singură. În concluzie, IL-12 combinat cu GM-CSF pot determina un puternic efect antitumoral, ca și efecte adverse locale mai reduse (90).

Administrarea anticorpului anti-VEGFR-2, la șoarecii BALB/c purtători de tumori mamare (adenocarcinom) 4T1, induce semnificativ supresia creșterii acestora. Tratamentul combinat cu acest anticorp și DNAIL-12 duce la inhibarea semnificativă a creșterii tumorii, comparativ cu tratamentul cu fiecare în parte. Această combinație este eficientă și contra metastazelor pulmonare spontane. La șoarecii nuzi deficienți în celule T, combinația este eficientă în supresarea creșterii tumorii. La șoarecii deficienți în celule T și NK scid/beige, numai anticorpul anti-VEGFR-2 a fost eficient, sugerând că celulele NK sunt implicate în efectele antitumorale induse de DNA IL-12. La ambele tipuri de șoareci imunodeficientari, combinația anticorp anti-VEGFR-2 și DNA IL-12, a fost eficientă în supresia creșterii tumorii 4T, ca și în cazul administrării exclusiv a anticorpului. Efectele antitumorale ale anticorpului anti-VEGFR-2 au fost asociate cu inhibiția angiogenezei în cadrul tumorii (91).

Terapia genică s-a aplicat la pacienții cu cancer diseminat (melanom), prin injectare peritumorală de fibroblaste dermice autologe transduse cu un vector retroviral purtător al genelor hIL-12 (p35 și p40) ca și cu gena neomicin fosfotransferazei (TGF-hIL-12-Neo). S-au observat și efecte locoregionale mediate de TNF α și celulele CD8+ în regresia tumorii. Reducerea dimensiunilor tumorilor la locul injectării s-a observat tranzitoriu, dar clar la 4 din cele 9 cazuri luate în studiu și la locurile neinjectate la distanță la un singur pacient cu melanom. La doi pacienți cu melanom s-a observat necroza hemoragică a tumorii (92).

IL-12 și celulele dendritice

Transducția celulelor dendritice purtătoare de gena IL-12 introduse în organismele cu tumori sau direct în tumori, poate fi considerată, de asemenea, o terapie genică. Unele experimente au fost efectuate și cu celule dendritice cu gena IL-12 activată sau amplificată, ceea ce a condus la creșterea eficienței combaterii cancerului.

Celulele dendritice sunt inițiatoare ale imunității mediate de celulele T. IL-12 este un activator al celulelor dendritice și al celulelor NK, iar secreția ei de către celulele dendritice ar contribui la capacitatea de a activa celulele NK. Celulele dendritice derivate din măduva osoasă propagate numai în GM-CSF nu activează celulele NK. Din contră, celulele dendritice prelucrate genetic pentru a exprima IL-12 le stimulează marcat. Activarea depinde atât de interacțiunea celulelor dendritice cu celulele NK, cât și de secreția IL-12. Transferul celulelor dendritice care exprimă IL-12 la șoareci, crește accentuat producerea IFN γ de către celulele NK și activitatea litică in vivo. Șoarecii astfel tratați sunt protejați împotriva metastazelor hepatice de melanom B16. Efectele in vivo asupra celulelor NK sunt specifice celulelor dendritice. Deci, expresia IL-12 de către celulele dendritice le permite acestora să activeze celulele NK (93).

Cancerul colorectal este cea mai frecventă malignitate fatală în SUA, după cancerul pulmonar. Ficatul este locul cel mai comun de metastazare a celulelor cancerului colorectal și, frecvent, unicul organ afectat odată ce tumora a fost extirpată. S-a evaluat eficacitatea terapeutică a celulelor dendritice prelucrate genetic să exprime IL-12 într-un model de ficat metastazic. Administrarea directă a celulelor dendritice în vena portă inhibă semnificativ creșterea carcinomului de colon MC38 în ficatul șoarecilor C57BL/6, efect însoțit de acumularea intratumorală a CD4+, CD8+ și celule efectoare NL DC-145+ imunitare, ducând și la producția crescută a IFN γ de către celulele T izolate din splină și ganglionii limfatici.

Eliberarea locală a celulelor dendritice transduse cu gena IL-12 nu numai că inhibă creșterea tumorii colorectale in vivo, dar, de asemenea, determină și

răspunsuri sistemice imune antitumorale. Numărul crescut de celule dendritice asociate tumorii se corelează pozitiv cu un prognostic mai favorabil. Terapia genică locală simultană cu IL-12 oferă o eficiență clinică fără a expune pacientul la un risc de toxicitate sistemică (94).

Celulele dendritice de la pacienții cu cancer, ca și cele care se infiltrează în tumori, au capacitate imunostimulatorie supresată. Una din problemele majore ale folosirii clinice a celulelor dendritice pentru tratarea tumorilor este că, trebuie să fie unele autologe obținute de la pacienți. Celulele dendritice normale transduse cu gena IL-12 inhibă creșterea tumorii datorită inducerii celulelor Th1 specific tumorale și a celulelor T citotoxice într-un model de tumoră subcutană stabilizată murină. Injecția intraperitoneală a celulelor dendritice de la șoareci purtători de tumori, transduse cu gena IL-12, conduce la prelungirea supraviețuirii unor șoareci astfel tratați și la activitatea Th1 specific-tumorală și a limfocitelor T citotoxice. Injecțiile intraperitoneale ale celulelor dendritice normale transduse cu gena IL-12 prelungesc supraviețuirea la toți șoarecii tratați și arată imunitate specific-tumorală mai bună decât cele de la șoarecii purtători de tumori, transduse cu gena IL-12. Deci, modificarea transducerii genei IL-12 este o abordare promițătoare pentru terapia cancerului, chiar și atunci când sunt folosite celule dendritice de la șoareci purtători de tumori imunosupresive (95).

IL-12 este o citokină proinflamatorie ce amplifică activitatea limfocitelor T citotoxice și NK. Șoarecilor A/J singenici li s-au inoculat subcutan celule dintr-o linie celulară derivată din neuroblastomul murin. Celulele dendritice murine au fost transduse in vitro cu adCMV-mIL-12, iar 10^6 celule au fost injectate intratumoral. Tumorile șoarecilor injectați cu celule dendritice transduse cu adIL-12 au suferit regresie completă după 3 săptămâni. Splenocitele izolate de la șoareci de 7 zile după injecția intratumorală a adIL-12 au arătat creșterea activității citolitice, comparativ cu animalele martor in vitro. Tumorile și țesuturile limfatice prezintă cantități crescute de infiltrat cu celule dendritice și limfocite T și o ușoară scădere a apoptozei, comparativ cu martorii. Deci, producția crescută de IL-12 de către celulele dendritice induce un răspuns semnificativ antitumoral într-un model de neuroblastom murin slab imunogenic. Aceste rezultate arată rolul vital al celulelor dendritice în imunobiologia bolii, și că protecția acestor celule de apoptoza indusă de tumoră este un aspect critic pentru imunoterapiile care tratează această tumoră agresivă (96).

Fuziunea celulelor carcinomatoase cu cele dendritice este eficientă în tratarea animalelor cu tumori, dar și la pacienți cu carcinom renal metastazic. S-au fuzionat celule dendritice cu celulele 4TOO de plasmocitom și s-a constatat că vaccinarea șoarecilor cu aceste celule de fuziune (FC/4TOO) se asociază cu inducerea răspunsului umoral antitumoral și cu răspunsul limfocitelor T citotoxice. Imunizarea protejează șoarecii contra unui nou adaus de celule tumorale. În plus, tratarea mielomului multiplu cu FC/4TOO determină prelungirea supraviețuirii, dar nu eradicarea cancerului.

Administrarea rIL-12 de șoarece odată cu vaccinul FC/4TOO crește activitatea limfocitelor T citotoxice și răspunsul proliferativ al celulelor T și conduce la eradicarea bolii. Deci, imunizarea cu celule de fuziune FC/4TOO și IL-12 potențează imunitatea antitumorală și tratamentul mielomului multiplu murin (97).

Un important tratament pentru tumorile solide, inclusiv cele pulmonare, este chimioterapia cu doze mari de celule stem din sânge, transplantate la pacienți. La 3 săptămâni de la tratament, nivelurile IL-12 erau semnificativ crescute, comparativ nivelurile IL-12 la o săptămână după tratament. În schimb, nivelurile serice ale IL-12 nu s-au modificat semnificativ la pacienții cu limfom malign. Nu au fost observate diferențe marcate ale nivelurilor altor citokine după o săptămână sau după 3 săptămâni de la transplantul efectuat la pacienții cu cancer pulmonar. Frecvența celulelor T helper/inducer a fost crescută în sângele periferic la o săptămână după tratament, atât la pacienții cu cancer pulmonar, cât și la cei cu melanom. S-a observat o creștere apreciabilă a numărului celulelor T activate după transplantul cu celule stem. Există, de asemenea, o puternică corelație între nivelurile serice ale IL-12 și numărul celulelor NK și nivelurile IFN γ la pacienții cu cancer pulmonar, dar nu la cei cu limfom malign. Analiza celulelor stem transfuzate a arătat că numărul unităților formatoare de colonii granulocit/macrofagice sunt similare la pacienții cu cancer pulmonar și limfom malign. Totuși, numărul celulelor CD34+ este semnificativ mai mare la cei cu cancer pulmonar, comparativ cu pacienții cu limfom malign. Toate subpopulațiile CD34+ au avut un procent mai scăzut la pacienții cu cancer pulmonar, comparativ cu pacienții cu limfom malign. În special subpopulația CD34+CD33- a fost semnificativ scăzută procentual la pacienții cu cancer pulmonar. Se sugerează că, celulele stem sangvine în cancerul pulmonar sunt puternici mediatori ai activității anticanceroase și pot juca un rol imunoterapeutic împotriva celulelor maligne autologe (98).

Tratamentul combinat IL-12 + IL-2

Tratamentul combinat este mai eficient decât cel aplicat cu fiecare interleukină în parte. IL-2 se implică în expresia celulelor T, pe când IL-12 activează răspunsul celulelor Th1.

S-a evaluat eficacitatea terapiei combinate cu genele IL-2 și IL-12 într-un model murin de carcinom spinocelular de cap și gât. Modelul s-a stabilit în planșeul bucal al șoarecilor C3H/HeJ cu linia SCCVII. Complexe plasmidice lipid-IL-2 și lipid-IL-12 au fost introduse în tumoră fie singure, fie în combinație, prin injecție genică directă intratumorală. Mărimea tumorii a fost evaluată înainte și după tratament pentru a se evalua răspunsul diferitelor tratamente. Analiza

lactic-dehidrogenazei a fost folosită pentru a se aprecia activitatea celulelor NK și limfocitelor T citotoxice. Creșterea celulelor carcinomului spinocelular de cap și gât a fost semnificativ inhibată în terapia genică de combinare a IL-2 și IL-12, comparativ cu alte grupuri. Nivelul de expresie crescut al proteinelor IL-2 și IL-12 a fost observat atât la grupul cu tratament combinat, cât și la cel cu tratament singular. Terapia cu genele IL-2 și IL-12 poate inhiba creșterea tumorilor și induce răspuns eficient imunologic al gazdei contra tumorilor în modelul murin. Combinația celor două gene are efect aditiv sau sinergic antitumoral (99).

Tratamentul cancerului cu IL-2 și IL-12 acționează pe calea amplificării proliferării și activității celulelor T și NK. Incubația limfocitelor T citotoxice și a celulelor NK cu IL-2 și/sau IL-12 duce la propagarea unui tip celular distinct, numit killers activate de limfokine (LAK) caracterizate prin activitate litică crescută împotriva multor tipuri tumorale. La șoarecii DBA/2, care poartă limfoame metastazate SL2, tratați cu IL-2 și/sau IL-12 aplicate local se arată că, tratamentul cu IL-12 amplifică sinergic eficiența tratamentului local cu IL-2. Efectul terapeutic mediat de IL-2/IL-12 este cel mai mare când este administrat după stabilirea unui răspuns imun față de tumoră. Se demonstrează existența unei populații unice la locul de creștere a tumorii, de celule limfoide, și anume B220 + CD3 + CD4-CD8-. Aceste celule devin înalt citotoxice pentru cele SL2 de la șoarecii tratați târziu cu citokine (zilele 10–14) în cursul răspunsului imun, dar nu la cei tratați timpuriu (zilele 3–7), iar citotoxicitatea acestei populații unice se corelează cu succesul terapiei (100).

Tratamentul combinat cu IL-2 murină și IL-12 murină produce activare consistentă a celulelor T citolitice și NK față de tratamentele cu fiecare în parte. Răspunsul imun crescut s-a corelat cu efecte antitumorale clinice. Deci, sistemul de administrare genică nonvirală este bine tolerat, iar transferul combinat al genelor mLIL-2 și mLIL-12 generează puternice răspunsuri imune antitumorale împotriva carcinomului spinocelular de cap și gât într-un model murin. Terapia genică nonvirală combinată (IL-2 și IL-12) poate fi un tratament primar sau adjuvant pentru această tumoră la om (101).

La șoarecii H-22 cu tumori ascitice, moxibustionul determină creșterea nivelurilor IL-2, IL-12 și a activității celulelor NK. Toate acestea conduc la inhibiția creșterii tumorilor (102).

rhIL-12 s-a dovedit un puternic agent terapeutic în limfomul cutanat T celular, malignitate invazivă a pielii ce induce răspuns citotoxic al acestora. Adăugarea IL-12 la acești pacienți face ca celulele sangvine să producă IFN γ mai mult decât dacă ar acționa IL-12 singură. În combinație, IL-2 și IL-12 cresc nivelurile IFN γ . De asemenea, adăugarea IL-2 la IL-12 amplifică activitatea NK, ca și expresia R-IL-12 de la suprafața celulelor T, comparativ cu efectele celor două citokine, luate separat. Astfel, IL-2 + IL-12 produc amplificarea sinergică a parametrilor multipli ai imunității mediate celular, ca și supramodularea expresiei

IL-12, indicând că un protocol combinat al acestora, care amplifică răspunsul imun, poate avea un efect benefic în limfomul T celular cutanat (103).

La cei cu carcinom hepatocelular, activitatea celulelor NK scade semnificativ, iar reducerea activității poate fi asociată cu progresia tumorii. Limfocitele din sângele periferic de la 9 pacienți cu carcinom hepatocelular, 4 pacienți cu ciroză hepatică și 9 subiecți normali au fost cultivate în prezența IL-2 și/sau IL-12. După 24 de ore de incubație, producția de IFN γ și TNF α de către limfocitele sangvine periferice este mult mai mare decât cea a limfocitelor sangvine periferice stimulate de IL-2 și de IL-12 separat. mRNA pentru perforină, granzimă B, IFN γ și TNF α din aceste limfocitele sunt marcat amplificate de către IL-2 + IL-12.

Deci, terapia cu IL-2 și IL-12 pe calea limfocitelor sangvine periferice poate fi o strategie promițătoare în tratarea carcinomului hepatocelular (104).

Tratamentul intratumoral la șoarecii nuzi cu un vaccin viral vaccinia care exprimă IL-2 sau IL-12 induce inhibiția semnificativă a creșterii tumorilor asociată cu semne clare de toxicitate. La doze scăzute de virus, numai unele animale arată toxicitate. S-a urmărit activitatea celulelor NK, a celulelor B și a factorilor proinflamatori (IFN γ , TNF α) la animalele tratate cu/fără toxicitate. După o săptămână de tratament, animalele care prezintă simptome de toxicitate legată de citokine, prezintă creșteri dramatice ale câtorva parametri. Numărul mare de leucocite și limfocite în sânge și creșteri marcate ale celulelor NK și CD25+ atât în sânge cât și în splină, s-au asociat cu toxicitatea indusă de IL-2, în timp ce toxicitatea indusă de IL-12 s-a asociat cu o mai mare creștere a celulelor CD25+ în sânge și a celulelor CD71+ în splină. În schimb, activarea imună a animalelor fără toxicitate a fost observată la două zile de la tratament, iar aceasta scade dramatic la 7 zile. Astfel, răspunsurile imune induse de terapia cu IL-2 și IL-12 ar putea fi critice pentru lupta antitumorală care prelungește supraviețuirea și protejează de efecte adverse (105).

IL-12 stimulează răspunsul celular Th1 și crește imunitatea antitumorală. Într-un model experimental de glioblastom, s-au urmărit posibilele efecte antitumorale ale IL-12 secretată intracerebral și/sau subcutan, și au fost comparate cu cele ale IL-2. Celulele de gliosarcom Rat 9L transduse retroviral cu gena IL-12 sau cu gena IL-2 (9L/IL-12 și, respectiv, 9L/IL-2) au fost rejectate complet când au fost inoculate subcutan. Celulele transduse implantate intracerebral au dezvoltat tumori cerebrale progresive în rate reduse comparativ cu tumorile cerebrale 9L, iar întârzierea creșterii tumorilor 9L/IL-2 a fost mai mare decât cea a tumorilor 9L/IL-12. Când șobolanii au fost imunizați subcutan cu celule 9L/IL-12 sau 9L/IL-2, creșterea tumorilor cerebrale 9L apărute la șobolani a fost supresată, comparativ cu cea a tumorilor 9L la șobolanii naivi. Printre diversele combinații de inoculări simultane de producători de citokine subcutanat și intracerebral, celulele 9L/IL-2, dar nu 9L/IL-12 inoculate intracerebral au fost rejectate când șobolanii au fost imunizați, fie cu celule 9L/IL-12, fie cu celule 9L/IL-2. Efectele

antitumorale sinergice induse s-au corelat cu nivelurile de infiltrare a celulelor T CD8+ și CD4+ în tumorile cerebrale. Activitatea citotoxică specific tumorală a fost indusă la șobolani imunizați subcutan cu 9L/IL-2, dar nu în întregime la șobolanii cu celule 9L/IL-12. Se sugerează că, activitatea antitumorală cu IL-2 este superioară celei cu IL-12, atât în inducerea celulelor T citotoxice, cât și în recrutarea celulelor T activate în tumorile cerebrale (106).

GM-CSF este util pentru imunoterapia împotriva gliomului, deoarece poate stimula celulele dendritice să prezinte antigene tumorale. IL-2 este implicată în expansiunea celulelor T, iar IL-12 dirijează răspunsul tip Th1. Fiecare dintre aceste citokine poate induce singură regresia celulelor tumorale. Infuzia periferică cu GM-CSF alături fie de IL-2, fie de IL-12 și iradierea celulelor tumorale poate conduce la creșterea supraviețuirii șobolanilor cu tumori cerebrale 9L, comparativ cu martorii. Celule de gliosarcom 9L au fost implantate în creierul șobolanilor Fisher 344 singenici. Tratamentul cu GM-CSF și iradierea celulelor tumorale au condus la o creștere a ratei de supraviețuire la șobolani cu tumori intracerebrale 9L, comparativ cu animalele netratate. Adăugarea IL-2 sau IL-12 la terapia celulelor tumorale cu GM-CSF crește ulterior rata de supraviețuire la peste 90%. Răspunsul antitumoral s-a asociat cu hipersensibilitate de tip întârziat împotriva celulelor 9L și infiltrare crescută a limfocitelor CD4+ și CD8+ în tumoră. Se sugerează, deci, că infuzia combinată de GM-CSF și alte citokine poate fi un adjuvant eficient pentru tratarea tumorilor cerebrale (107).

Inserția genelor care codifică antigene specifice asociate tumorilor în virusul vaccinia, este o posibilitate de vaccinare, deoarece cantități mari de DNA străin pot fi stabil integrate în genomul poxvirusului, iar studiile recente au arătat creșterea eficienței terapeutice a vaccinurilor bazate pe poxvirus când au fost folosite tratamente suplimentare cu citokine ca IL-2 sau IL-12, dar combinarea acestor citokine ca adjuvanți pentru un virus vaccinia recombinant care codifică antigenul asociat tumorii nu a fost raportat. Combinația IL-2 și IL-12 în doze sistemice este toxică și uneori fatală, manifestându-se, de cele mai multe ori, sub formă de apoptoză epitelială. S-au inserat genele care codifică IL-2 și IL-12 în virusul vaccinia, alături de o genă a antigenului tumoral. Acest construct conține 5 gene heterologe: LacZ (antigenul), gpt (gena reporter), IL-2 și cele două subunități ale IL-12 (p35 și p40). Tratamentul cu acest virus recombinat duce la scăderea numărului de metastaze pulmonare, îmbunătățirea supraviețuirii și toxicitate minimă într-un model tumoral murin. Acest tip de vaccinare poate reprezenta o nouă strategie în tratamentul și prevenirea cancerului (108).

S-a testat eficacitatea terapiei genice în tumorile hepatice de șobolan pentru care s-a construit un vector retroviral GCIL12EIL2PN care codifică genele de fuziune hIL-2 și mLIL-12. Liniile celulare care conțin aceste două gene au fost injectate direct în splină pentru a transfecta splenocitele la diferite intervale de timp. Genele IL-2 și/sau IL-12 injectate direct în splină cresc nivelurile serice ale

celor două citokine și amplifică activitatea celulelor NK, ceea ce poate inhiba creșterea tumorilor. Terapia genică cu IL-2/IL-12 are toxicitate scăzută și activitate relativ crescută a celulelor NK. Datele sugerează, deci, că gena fuzionată IL-2/IL-12 poate fi folosită ca terapie sigură și eficientă contra tumorilor hepatice (109).

Administrarea sistemică a IL-12 și doze intermitente de IL-2 induc regresia completă a carcinomului renal murin metastazic, regresie precedată de recrutarea celulelor T CD8+, injurie vasculară, neovascularizație tumorală afectată și apoptoza, atât pentru celulele epiteliale, cât și pentru celulele tumorale. Combinația IL-12/IL-2 amplifică sinergic expresia FasL la suprafața celulelor T CD8+ in vitro și induce expresia Fas și FasL în cadrul tumorilor printr-un mecanism dependent de IFN γ in vivo. Capacitatea IL-12/IL-2 de a induce distrucția rapidă a celulelor endoteliale asociate tumorii și regresia metastazelor este absentă la șoarecii cu calea Fas/FasL afectată. Rolul critic al IFN γ endogen și al căii Fas/FasL asupra unor efecte timpurii ale antiangiogenezei și asupra unor răspunsuri antitumorale sugerează că, mecanismele imunității innăscute dirijate de citokine și răspunsurile mediate de celulele T CD8+ sunt interdependente. Definirea evenimentelor moleculare timpurii critice angajate de IL-12/IL-2 pot aduce noi perspective în angajarea terapeutică optimă a răspunsurilor imune productive antitumorale ale gazdei (110).

Celulele adenocarcinomului ovarian uman exprimă subunitățile IL-12R β 1 și IL-12R β 2. Cross-linking-ul IL-12R duce la fosforilarea kinazelor Tyk2, p44 (ERK1) și Akt și la activarea STATs 2, 3, 4 și 5. IL-12 induce stimularea substanțială a expresiei la suprafață a ligandului Fas în celulele de carcinom ovarian însoțită de creșterea capacității de a induce apoptoza în celulele Jurkat și în limfocitele activate de PHA. Inducerea expresiei la suprafață a FasL de către IL-12 nu se datorează stimulării expresiei genei FasL, ci dereglării MMPs-3 și -7 și, ulterior, reducerii clivării FasL de la suprafața celulei. Aceste efecte mediate de IL-12 în celulele canceroase nelimfoide ar putea servi în terapia cancerului ovarian bazată pe IL-12 (111).

S-a evaluat imunocitochimic expresia celulară a IL-2 și IL-12 în 10 cazuri de cancer pulmonar, după demonstrarea a doi markeri ai tumorilor endocrine (cromogranina A și enolaza specific-neuronală). În 9 din cele 10 cazuri s-a observat în tumori o reacție intensă pentru ambii markeri neuroendocrini. În citoplasmă s-au coexprimat intens ambele citokine. Se sugerează un posibil rol al acestora în proliferarea carcinomului neuroendocrin pulmonar (112).

Funcția citotoxică a celulelor NK umane este modulată de o varietate de citokine, printre care IL-2 și IL-12. Tributiltin este folosit într-o gamă largă de produse alimentare și industriale, cum sunt cele lactate, carnea și peștele. În sângele uman sunt niveluri măsurabile de tributiltin. Butiltinele cresc riscul cancerizării și infecțiilor virale la subiecții expuși. Capacitatea celulelor NK de a

ucide celulele tumorale este extrem de diminuată după o oră de expunere la tributiltin și persistă chiar după îndepărtarea acestuia. Celulele NK înalt purificate (peste 95% CD16+) sau un preparat limfocitar care conține atât limfocitele T cât și celulele NK, au fost tratate cu 300 nM tributiltin, iar apoi, pentru revenirea funcției lor, au fost expuse în mediu fără TBT și fără interleukine, cu 1000 U/ml IL-2, 20 ng/ml IL-12, sau cu combinația IL-2+IL-12 pentru 24 h, 48 h, 4 zile și 6 zile, dar funcția citotoxică a NK nu a revenit nici după 6 zile, când interleukinele n-au fost prezente în mediu. Totuși, o semnificativă revenire a funcției citotoxice a NK s-a produs când s-au introdus în mediu, în timpul perioadei de refacere a funcției lor citotoxice, IL-2, IL-12 sau IL-2+IL-12 (113).

Tratamentul combinat IL-12 + IL-18

Ca și în cazul tratamentului IL-2 + IL-12, eficiența tratamentului IL-12 + IL-18 este mai pronunțată în stoparea sau eradicarea cancerului, decât tratamentul separat cu aceste citokine.

IL-12 în combinație cu IL-18 are un efect sinergic în creșterea secreției $IFN\gamma$ și GM-CSF, în timp ce IL-18 singur are efect minim. IL-18 împiedică celulele ganglionilor limfatici care drenează tumorile (TDLN) stimulate cu IL-12, să producă IL-10. Celulele TDLN au fost activate cu anticorpi monoclonali anti-CD3/anti-CD28, și apoi stimulate cu IL-12 și/sau IL-18. Combinația lor are efect sinergic privind creșterea secreției $IFN\gamma$ și GM-CSF, ceea ce IL-18 singur nu poate face. Celulele TDLN cultivate cu IL-12/IL-18 manifestă deci răspunsuri citokinice față de un model Th1/Tc1. IL-12 și IL-18 stimulează celulele TDLN CD4(+) și producerea amplificată de $IFN\gamma$ de către celulele CD4(+) într-o măsură mai mare decât celulele CD8(+). Un inhibitor al NF- κ B supresează semnificativ secreția $IFN\gamma$ indusă de IL-12/IL-18, ceea ce confirmă necesitatea activării NF- κ B în semnalizarea IL-12/IL-18. În imunoterapia adoptivă, celule TDLN cultivate cu IL-12 și IL-18, infiltrate în nodulii pulmonari tumorali și eradicate, stabilesc metastaze mai eficiente decât o fac celulele T generate numai cu IL-12 sau numai cu IL-18. Depleția anticorpilor relevă că, atât celulele CD4+, cât și celulele CD8+ sunt implicate în rejecția tumorală indusă de celulele TDLN cultivate cu IL-12/IL-18. Deci, IL-12 și IL-18 pot fi folosite pentru generarea celulelor efectorii antitumorale puternice CD4+ și CD8+ prin polarizarea sinergică a celulelor TDLN activate de anticorpi față de un fenotip Th1 și Tc1 (114).

IL-12 și IL-18 mediază sinergic răspunsul antitumoral prin producția de $IFN\gamma$ de către celulele T și NK. Macrofagele stimulate cu aceste citokine produc, de asemenea, $IFN\gamma$. Linii celulare de gliom murin VM-gliom și 203G au fost marcate cu timidină tritiată pentru stabilirea citotoxicității macrofagelor. Ca răspuns la stimularea combinată de către IL-12 și IL-18, macrofagele exprimă

puternică activitate citotoxică împotriva celulelor de gliom în asociere cu creșterea producerii de IFN γ și oxid de azot. Inhibitorii oxidului de azot anulează activitatea citotoxică a macrofagelor, indusă de IL-12 și IL-18, în ciuda creșterii producției IFN γ . Neutralizarea IFN γ sau folosirea macrofagelor obținute de la șoareci fără gena IFN γ reduc marcat nu numai activitatea citotoxică, ci și producția NO. Depleția celulelor T și NK din populația de macrofage, prin tratamentul cu anticorpi plus complement, reduce ușor activitățile macrofagelor, sugerând că acestea sunt celulele efectorii principale, celulele T și NK participă numai parțial la citotoxicitate. Macrofagele stimulate cu IL-12 și IL-18 produc IFN γ și NO, care, în schimb, mediază răspunsul antigliom. Deci, macrofagele, ca și celulele T și NK joacă un rol important în răspunsurile antitumorale stimulate de IL-12 și IL-18 (115).

Terapia electro-genică cu IL-12 induce semnificativă imunitate antitumorală. IL-18 acționează sinergic cu IL-12 pentru amplificarea răspunsurilor Th1 și IFN γ . Plasmidele care exprimă gena pentru IL-12 sau pentru IL-18 au fost cotransfectate în tumorile subcutane murine CT26. Terapia electrogenică cu IL-12 + IL-18 inhibă creșterea tumorii mai eficient decât terapia electrogenică cu EGT, ceea ce explică nivelul semnificativ mai înalt de IFN γ din tumori. Infiltrarea marcată a țesutului tumoral cu limfocitele T CD8+ a fost confirmată atât prin terapia electro-genică cu IL-12, cât și cu IL-12 + IL-18. Terapia electrogenică cu IL-12 + IL-18, dar nu terapia electrogenică cu IL-12 supresează marcat tumorile contralaterale netratate. În concluzie, terapia electrogenică cu cele două citokine este o terapie genică antitumorală eficientă (116).

Au fost transfectate genele IL-12 și/sau IL-18 în celulele de cancer vezical de șoarece MBT2 prin transferul genei mediat de lipozomi. Celulele MBT2 parentale, MBT2 transfectate cu IL-12, MBT2 transfectate cu IL-18 sau MBT2 transfectate cu ambele (IL-12 și IL-18) au fost injectate subcutan sau intravenos la șoarecii C3H singeneici. MBT2/IL-12, MBT2/IL-18 și MBT-2/Both au fost complet rejectate după injectarea subcutană sau intravenoasă la șoarecii singenici. Pentru a se analiza mecanismul rejecției tumorale, aceste clone au fost injectate subcutan la șoareci nuzi naivi și la cei depletați de celulele NK prin tratament cu anticorpi. Efectul antitumoral al celulelor MBT2/IL-18 este parțial eliminat când sunt injectate la șoareci nuzi depletați de celulele NK prin tratament cu anticorpi. MBT2/Both au fost complet rejectate la ambii șoareci nuzi, cu sau fără celulele NK. Deci, celulele T și NK par să joace roluri importante în efectele antitumorale exercitate prin secreția IL-12 și, respectiv, IL-18, iar MBT2/Both posedă ambele mecanisme (117).

IL-18 este o citokină care induce activitatea IFN γ , astfel favorizând calea Th1. Limfocite obținute din efuzii pleurale maligne au fost inoculate cu IL-2, IL-12 sau IL-18 cu/fără anticorpi CD3 α . S-a arătat că IL-18 singur nu are nici un efect semnificativ asupra limfocitelor asociate efuziilor pleurale în ceea ce

privește producția de citokine, proliferarea limfocitelor sau citotoxicitatea țintelor tumorale. IL-18 nu are nici un efect aditiv sau sinergic asupra limfocitelor asociate efuziilor pleurale co-cultivate cu IL-2, IL-12 sau CD3 α . Însă, când IL-18 este folosit împreună cu IL-12, a fost obținut cel mai mare raport IFN γ /IL-10, sugerând că aceste două citokine au un efect aditiv în conducerea limfocitelor derivate din efuziile pleurale de pe calea Th2 pe calea Th1 (118).

Enzima indolamin 2,3-dioxigenaza a cărei creștere este stimulată de IFN γ are rol adjuvant în terapia osteosarcomului. Activarea crescută a enzimei induce degradarea intracelulară a aminoacidului esențial triptofan și astfel activează apoptoza celulelor osteosarcomului uman. Combinația IL-12 + IL-18 amplifică activitatea enzimei în liniile de osteosarcom HOS și MG63 în prezența limfocitelor activate. Creșterea ei este numai parțial inhibată prin blocarea expresiei IFN γ . Deci, IL-12 și IL-18 sau chiar combinația lor induc exprimarea acestei enzime pe lângă calea deja cunoscută a IFN γ (119).

IL-12 și IL-18 potențează imunitatea înăscută în diverse modele tumorale experimentale. Celulele NK transferate adoptiv cu IL-12/IL-18 sunt esențiale și colaborează cu celulele NK proprii gazdei, în imunitatea naturală împotriva creșterii tumorilor singenice ALC și MC57X. Aceasta s-a văzut la injectarea șoarecilor C57BL/6 cu anticorpi anti-asialo GM1 care elimină selectiv celulele NK. Prin injectarea șoarecilor normali B6 cu anticorpi anti-IL-2 și/sau anti-IFN γ , s-a putut demonstra că imunitatea înăscută eficientă împotriva ambelor tipuri de tumori singenice este dependentă de producerea de IL-2 și IFN γ de către celulele NKT transferate. În studiile in vitro se confirmă atât secreția IL-2 și IFN γ de către celulele NKT activate de IL-12/IL-18, cât și rolul lor în colaborare cu celulele NK pentru liza țintelor tumorale ALC și MC57X singenice. Se discută, în premieră, de o funcție antitumorală a celulelor NKT IL-12/IL-18 transferate la gazde singenice care oferă bazele unei noi modalități de imunoterapie celulară a cancerului (120).

IL-12 și IL-18 participă la imunologia tumorală. Nivelurile lor serice s-au determinat la 70 de pacienți cu carcinom esofagian și la 15 martori. La primii, nivelurile serice erau mai crescute față de martori. La cei cu tumori, nivelurile se corelează cu creșterea și progresia tumorii. S-ar putea, de asemenea, corela cu profunzimea invaziei, putând fi utile ca markeri tumorali pentru acest tip de cancer (121).

Citokinele joacă roluri importante în expresia moleculelor de adeziune și în funcția celulelor efectorii antitumorale în sistemul imun. Expresia ICAM-1 asupra celulelor de osteosarcom uman este semnificativ amplificată de IL-12, dar numai când sunt cocultivate, și deci, în contact cu limfocite periferice. Anticorpi anti-IFN γ elimină acest efect. Dacă celulele de osteosarcom uman și limfocitele periferice sunt separate în coculturi, IL-18 ar putea substitui contactul intercelular, facilitând amplificarea ICAM-1 mediată de IL-12. Adăugarea IL-18 amplifică, de asemenea, activitatea antitumorală a NK. Imunomodularea pe calea terapiei cu

citokine conduce la îmbunătățirea eradicării osteosarcoamelor rezistente la chemoterapie (122).

IL-18 este o citokină de tip Th1 care sinergizează cu IL-12 și IL-2 în stimularea producerii de IFN γ de către limfocite. Proteina de legare a IL-18 (IL-18BP) este un inhibitor recent descoperit, distinct de familiile de receptori IL-1 și IL-18. IL-18Bpa, izoforma IL-18BP cu cea mai mare afinitate pentru IL-18, este puternic indusă de IL-12 în PBMC umane. Alte citokine Th1 ca IFN γ , IL-2, IL-15 și IL-18 pot, de asemenea, să crească expresia IL-18BP. Dimpotrivă, IL-1 α , IL-1 β , TNF α și proteina 10 de inducere a IFN γ , dar nu citokinele Th2, ca IL-4 și IL-10, nu induc IL-18BP. Deși monocitele sunt sursa primară a IL-18BP, inducerea acesteia de către IL-12 este mediată prin IFN γ produs predominant de NK. Producția de IL-18BP s-a observat la cei cu cancer tratați cu rIL-12 uman și corelat cu magnitudinea producerii de IFN γ . Feed-back-ul negativ IFN γ /IL-18BP poate controla activitatea imună de către citokine care sinergizează cu IL-18 pentru a induce IFN γ , și joacă un rol cheie în modularea imunității înnăscute și dobândite (123).

IL-12 în terapia cancerului combinată cu terapia electrogenică

Terapia antitumorală care implică terapia electrogenică este o nouă metodă de transfer genic in vivo folosind electroporarea. S-a structurat un model de terapie electrogenică in vivo de celule CT26 de carcinom de colon, care au fost introduse subcutan folosind plasmidele DNA care codifică subunitățile interleukinei IL-12. Astfel, s-au dezvoltat două sisteme de expresie a IL-12. Un prim sistem de cotransfer folosind un plasmid care exprimă subunitatea p40 IL-12 și un plasmid care codifică subunitatea p35 IL-12, ca și un sistem cu un singur vector ce folosește un plasmid care exprimă proteina de fuziune p40-p35. Ambele sisteme de transfer inhibă semnificativ creșterea tumorii CT26. Tumorile tratate prin terapia electrogenică IL-12 arată o infiltrare marcată de celule CD8+ și se confirmă expresia crescută a IFN γ în tumori. Terapia electrogenă cu IL-12 poate stabili parțial imunitate antitumorală sistemică. De asemenea, creșterea tumorilor Renca tratate prin terapie electrogenă, un carcinom al celulelor renale, este, de asemenea, semnificativ inhibată. Deci, terapia electrogenică cu gena IL-12 are potențialul de a fi o terapie genică anticanceroasă eficientă (124).

IL-12 este o citokină proinflamatorie cu activitate antitumorală. Plasmide cu sau fără gena IL-12 de șoarece au fost injectate în tumori SCCVII de la șoareci C3H/HeJ, după care s-au aplicat pulsuri electrice, proces numit terapie electrogenică. Primul tratament s-a aplicat când tumora era de 4-6 mm ϕ , iar al doilea după alte 7 zile. Electroporarea a 20 μ g sau 40 μ g de plasmide DNA IL-12 a eradicat tumora la 40% din șoareci.

Terapia electrogenică s-a asociat cu expresia crescută a IL-12, IFN γ , a monokinelor induse de IFN γ și a proteinei 10 inductibilă de către interferon, ca și cu scăderea densității vaselor și creșterea infiltrării celulelor T CD8+ după a doua administrare.

Această metodă pare să fie eficientă în reducerea creșterii tumorii prin declanșarea unor efecte antiangiogenice și a unui răspuns imun. Memoria antitumorală s-a observat că durează mai mult de 11 luni. Deoarece terapia electrogenică cu IL-12 este eficientă și ușor de administrat, ar putea fi aplicabilă în tratamentul malignităților accesibile electrozilor, cum ar fi carcinoamele spinocelulare de cap și gât (125).

Electroporarea in vivo a genei murine pentru IL-12 într-un plasmid de expresie, a fost evaluată pentru activitatea antitumorală. Transferul electroporării pIL-12 în mușchiul cvadriiceps al șoarecilor scade semnificativ nivelurile serice ale IL-12 și ale IFN γ . Electroporarea pIL-12 intramuscular duce la regresia completă sau inhibiția substanțială a limfomului B-celular 38C13, iar fără electroporare gena IL-12 are efecte slabe terapeutice. Electroporarea in vivo a genei IL-12 a fost eficientă și în supresia tumorilor subcutane și a metastazelor pulmonare de adenocarcinom de colon CT-26, ca și în melanomul B16F1. Deci, electrotransferul intramuscular al genei IL-12 poate reprezenta o strategie simplă și eficientă în tratamentul cancerului (126).

Șoarecii cu melanom murin B16F10 au fost tratați intratumoral sau cu injecții intramusculare cu plasmide care codifică IL-12, tratament urmat de electroporarea in vivo. Tratamentul intratumoral duce la vindecarea cu 47% a șoarecilor cu tumori, iar 70% dintre aceștia au fost rezistenți la o nouă introducere a celulelor B16F10. Tratamentul intramuscular nu regresează tumora. Tratamentul intratumoral duce la creșterea nivelului intratumoral al IL-12 și IFN γ , la influxul de limfocite T și la scăderea vascularității. La șoarecii nuzi nici unul dintre aceste tratamente nu a avut succes (127).

Administrarea IL-12 sub formă de proteină recombinantă poate duce la toxicitate severă, iar terapia genică are succes limitat împotriva melanomului murin B16F10. Trei injecții intratumorale cu plasmide care codifică IL-12 au oprit apariția, la 80% din șoareci, a tumorii, timp de 100 de zile. Aceste animale erau rezistente la o reprovocare cu celule B16. Șoarecii care au primit intravenos celule B16F10, au fost apoi tratați cu injecții intramusculare cu plasmide cu/fără electroporare. Numai 37% din șoarecii astfel tratați au dezvoltat noduli pulmonari și 87.5% din cei netratați. Deci, administrarea unor plasmide care codifică IL-12 cu electroporare are un efect terapeutic pe tumorile primare, pe cele la distanță, ca și pe cele metastazice (128).

Tratamentul in vivo cu DNA recombinant al bacilului Calmette-Guerin (BCG) (multi-rBCG) este eficient antitumoral, atingând maximum la 7 zile după electroporare, în cazul tumorilor de vezică, xenogrefate, murine MBT-2.

Tratamentul cu acest vaccin plus mL-12 inhibă semnificativ creșterea tumorilor de șoarece C3H/heN cu producerea de citokine tip Th1, respectiv IFN γ și IL-12.

Tratarea cu multi-rBCG și sau mL-12 induce infiltrarea cu celule T CD4+/CD8+ și expresia NK în tumori. Dimpotrivă, șoarecii nuzi atimici tratați la fel, nu arată celule imune semnificative în tumori și mor din cauza creșterii rapide a acestora.

În concluzie, folosirea multi-rBCG + IL-12 prin electroporare ar putea fi o imunoterapie eficientă pentru cancerul vezical, efecte antitumorale corelate atât cu apariția limfocitelor tip Th1, cât și cu imunitatea citotoxică mediată de NK (129).

Bibliografie

1. Delespesse G., IL-12, cap. 19, Les cytokines sous la direction de J. M. Cavaillon – Hasson S. A., 120 bd. Saint Germain 75280, Cedex 06, 1996
2. Hendrzak J., Brunda M., IL-12, Laboratory Investigation, vol. 72, no. 6, p. 619, 1995, USA
3. Brunda M., Luistro L., Warriar R., Wright R., Hubard B., Murphy M., Wolf S., Gotely M., antitumor and antimetastatic activity of interleukin-12 against murine tumors, J. Exp. Med., 1223–1230, 1993
4. Brunda M., Gately M., Antitumor activity of interleukin-12, Clinical immunology and immunopathology, vol. 71, no. 3, 253–255, 1994
5. Brunda M., Luistro L., Hendrzak J., Fountoulakis M., Garotta G., Gately M., Role of interferon γ in mediating the antitumor efficacy of interleukin 12, J. of Immunotherapy 17:71–77, 1995
6. Wigginton J., Komschlies K., Back T., Franco J., Brunda M., Wiltrout R., J. Nat. Cancer Inst., vol. 88, no. 1, 1996
7. Brunda M. Et al., Antitumor activity of interleukin-12 in preclinical models. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 38, suppl., 16–21, 1996,
8. Wigginton J. Et al., Interleukin-12 primes macrophages for nitric oxide production in vivo and restores depressed nitric oxid production by macrophages from tumor-bearing mice: implications for the antitumor activity of interleukin-12 and/or interleukin-2, Cancer Res, 56, 1131–1136, 1996
9. Martinotti Alessia et al., CD4 T cells inhibit in vivo the CD8-mediated immune response against murine colon carcinoma cells transduced with interleukin-12, Eur. J. Immunol., 25, 137–146, 1995
10. Airoidi I., Di Carlo E., Banelli B., Moserle L., Cocco C., Pezzolo A., Sorrentino C., Rossi E., Romani M., Amadori A., Pistoia V., The IL-12Rbeta2 gene functions as a tumor suppressor in human B cell malignancies, J Clin Invest 2004 Jun; 113(11):1651–9
11. Airoidi I., Guglielmino R., Carra G., Corcione A., Gerosa F., Taborelli G., trinchieri G., Pistoia V., The interleukin-12 and interleukin-12 receptor system in normal and transformed human B lymphocytes, Haematologica 2002 Apr; 87(4):434–42
12. Mitsuhashi M., Liu J., Cao S., Shi X., Ma X., Regulation of interleukin-12 gene expression and its anti-tumor activities by prostaglandin E2 derived from mammary carcinomas, J Leukoc Biol 2004 Aug; 76(2):322–32
13. Qiao S., Chen X., Clinicopathological factors influencing the serum of interleukin-12 level of patient with PHC: multivariate statistical analysis, Zhonghua Wai Ke Za Zhi, 1998 Sep; 36(9):528–30
14. Schwarz A., Stander S., Berneburg M., Bohm M., Kulms D., van Steeg H., Grosse Heitmeyer K., Krutmann J., Schwarz T., Interleukin-12 supresses ultraviolet radiation-induced apoptosis by inducing DNA repair, Nat Cell Biol, 2002 Jan; 4(1):26–31

15. Zhang W. J., Koltun W. A., Thompson J. L., Tilberg A. F., Galka E., Poritz L. S., Chorney M. J., Human B Lymphoblast cell lines defective of Stat6 signaling produce high levels of proinflammatory cytokines IL-12, TNFalpha and IFNgamma, *Int j Oncol* 2004 Feb; 24(2):447–53
16. Elsawa S. F., Bost K. L., Murine gamma-herpesvirus-68-induced IL-12 contributes to the control of latent viral burden, but also contributes to viral-mediated leukocytosis, *J Immunol* 2004 Jan 1; 172(1):516–24
17. O'Donnell M. A., Luo Y., Hunter S. E., Chen X., Hayes L. L., Clinton S. K., The essential role of interferon-gamma during interleukin-12 therapy for murine transitional cell carcinoma of the bladder, *J Urol.* 2004 Mar; 171(3):1336–42
18. Lee N. C., Tsung K., Norton J. A., Production of interferon-gamma by tumor-sensitized T cells is essential for interleukin-12-induced complete tumor eradication, *Surgery*, 2002, aug;132(2):365–8
19. Tatsumi T., Takehara T., Kanto T., Miyagi T., Kuzushita N., Sugimoto Y., Jinushi M., Kasahara A., Sasaki Y., Hori M., Hayashi N., Administration of interleukin-12 enhances the therapeutic efficacy of dendritic cell-based tumor vaccines in mouse hepatocellular carcinoma, *Cancer Res.* 2001 Oct 15; 61(20):7563–7
20. Alatrash G., Hutson T .E., Molto L., Richmond A., Nemeč C., Mekhail T., Elson P., Tannenbaum C., Olencki T., Finke J., Bukowski R. M., Clinical and immunologic effects of subcutaneously administered interleukin-12 and interferon-alfa2b: phase I trial of patients with metastatic renal cancer cell carcinoma or malignant melanoma, *J Clin Oncol.* 2004 Joule 15; 22(14):2891–900
21. Egilmez N. K., Hess S. D., Chen F. A., Takita H., Conway T. F., Bankert R. B., Human CD4+ effector T cells mediate indirect interleukin-12 – and interferon-gamma-dependent suppression of autologous HLA-negative lung tumor xenografts in severe combined immunodeficient mice, *Cancer Res.* 2002 May 1; 62(9):2611–7
22. Maruyama K., Takigawa Y., Akiyama Y., Hojo T., Nara-Ashizawa N., Cheng J. Y., Watanabe M., Yamaguchi K., Structure and characterization of hamster IL-12 p35 and p40., *Mol Immunol.* 2003 Oct; 40(6):319–26
23. McMonagle E. L., Taylor S., van Zulekom H., Sanders L., Scholtes N., Keanie L. J., Hopkins C. A., Logan N. A., Bain D., Argyle D. J., Onions D. E., Schijns V. E., Nicolson L., Production of biologically active equine interleukin 12 through expression of p35, p40 and single chain IL-12 in mammalian and baculovirus expression system, *Equine Vet J.*, 2001 Nov; 33(7):693–8
24. Helmbj H., Grecnis R. K., IFN-gamma-independent effects of IL-12 during intestinal nematode infection, *J Immunol* 2003 Oct 1; 171(7):3691–6
25. Spisek R., Bretaudeau L., Barbieux I., Meflah K., Gregoire M., Standardized generation of fully mature p70 IL-12 secreting monocyte-derived dendritic cells for clinical use, *Cancer Immunol Immunother*, 2001 Oct; 50(8):417–27
26. Halin C., Gafner V., Villani M. E., Borsi L., Berndt A., Kosmehl H., Zardi L., Neri D., Synergistic therapeutic effects of a tumor targeting antibody fragment, fused to interleukin 12 and to tumor necrosis factor alpha, *cancer Res.* 2003 Jun 15; 63(12):3202–10
27. Melichar B., Lenzi R., Rosenblum M., Kudelka A. P., Kavanagh J. J., Melicharova K., Templin S., Garcia M. E., Abbruzzese J. L., Freedman R. S., Intraperitoneal fluid neopterin, nitrate, and tryptophan after regional administration of interleukin-12, *J Immunother.* 2003 May-Jun; 26(3):270–6
28. Vegh Z., Mazumder A., Generation of tumor cell lysate-loaded dendritic cells preprogrammed for IL-12 production and augmented T cell response, *Cancer Immunol Immunother.* 2003 Feb; 52(2):67–79

29. Redlinger E. R. Jr., Shimizu T., Remy T., Alber S., Watkins S. C., Barksdale E. M. Jr., Cellular mechanisms of interleukin-12-mediated neuroblastoma regression, *J Pediatr Surg.* 2003 Feb; 38(2):199–204
30. Lehmann C., Zeis M., Uharek L., Activation of natural killer cells with interleukin 2 (IL-2) and IL-12 increases perforin binding and subsequent lysis of tumour cells, *Br J Haematol.* 2001 Sep; 114(3):660–5
31. Karnbach C., Daws M. R., Niemi E. C., Nakamura M. C., Immune rejection of a large sarcoma following cyclophosphamide and IL-12 treatment requires both NK and NK T cells and is associated with the induction of a novel NK T cell population, *J Immunol.* 2001 Sep 1; 167(5):2569–76
32. Tsung K., Dolan J. P., Tsung Y. L., Norton J. A., Macrophages as effector cells in interleukin 12-induced T cell-dependent tumor rejection, *Cancer Res.* 2002 Sep 1; 62(17):5069–75
33. Whalen M. M., Walker L., Loganathan B. G., Interleukins 2 and 12 produce significant recovery of cytotoxic function in dibutyltin-exposed human natural killer cells, *Environ Res.* 2002 Feb; 88(2):103–15
34. Ansell S. M., Witzig T. E., Kurtin P. J., Sloan J. A., Jelinek D. F., Howell K. G., Markovic S. N., Habermann T. M., Klee G. G., Atherton P. J., Erlichman C., Phase I study of interleukin-12 in combination with rituximab in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma, *Blood.* 2002 Jan 1; 99(1):67–74
35. Miller G., Bleier J. I., antonescu C., Pillarisetty V. G., Shah A. B., Lahrs S., DeMatteo R. O., Natural killer cell depletion confounds the antitumor mechanism of endogenous IL-12 overexpression, *Int J Cancer.* 2004 Jun 20; 110(3):395–402
36. Colombo M. P., Trinchieri G., Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2002, Apr; 13(2):155–68
37. Salem M. L., Kadima A. N., Zhou Y., Nguyen C. L., Rubinstein M. P., Demcheva M., Vournakis J. N., Cole D. J., Gillanders W. E., Paracrine release of IL-12 stimulates IFN-gamma production and dramatically enhances the antigen-specific T cell response after vaccination with a novel peptide-based cancer vaccine, *J Immunol.* 2004 May 1; 172(9):5159–67
38. Robertson M. J., Pelloso D., Abonour R., Hromas R. A., Nelson R. P. Jr., Wood L., Cornetta K., Interleukin 12 immunotherapy after autologous stem cell transplantation for hematological malignancies, *Clin Cancer Res.* 2002 Nov; 8(11):3383–93
39. Uekusa Y., Yu Wg, Mukai T., Gao P., Yamaguchi N., Murai M., Matsushima K., Obika S., Imanishi T., Higashibata Y., Nomura S., Kitamura Y., Fujiwara H., Hamaoka T., A pivotal role for CC chemokine receptor 5 in T-cell migration to tumor sites induced by interleukin 12 treatment in tumor-bearing mice, *Cancer Res.* 2002 Joule 1; 62(13):3751–8
40. Akhtar N., Padilla M. L., Dickerson E. B., Steinberg H., Breen M., Auerbach R., Helfand S. C., Interleukin-12 inhibits tumor growth in a novel angiogenesis canine hemangiosarcoma xenograft model, *Neoplasia* 2004 Mar–Apr; 6(2):106–16
41. Shi X., Cao S., Mitsuhashi M., Xiang Z., Ma X., Genome-wide analysis of molecular changes in IL-12-induced control of mammary carcinoma via IFN-gamma-independent mechanisms, *J Immunol.* 2004 Apr 1; 172(7):4111–22
42. Liu J., Xiang Z., Ma X., Role of IFN regulatory factor-1 and IL-12 in immunologica; resistance to pathogenesis of N-methyl-N-nitrosourea-induced T lymphoma, *J Immunol* 2004 Joule 15; 173(2):1184–93
43. Shi X., Liu J., Xiang Z., Mitsuhashi M., Wu R. S., Ma X., Gene Expression analysis in interleukin-12-induced upression of mouse mammary carcinoma, *Int J Cancer.* 2004 joule 1; 110(4):570–8

44. Lee J. C., Kim D. C., Gee M. S., Saunders H. M., Sehgal C. M., Feldman M. D., Ross S. R., Lee W. M., Interleukin-12 inhibits angiogenesis and growth of transplanted but not in situ mouse mammary tumor virus-induced mammary carcinomas, *Cancer Res.* 2002 Feb 1; 62(3):747–55
45. Rook A. H., Zaki M. H., Wysocka M., Wood G. S., Duvic M., Showe L. C., Foss F., Shapiro M., Kuzel T. M., Olsen E. A., Vonderheid E. C., Laliberte R., Sherman M. L., The role for interleukin-12 therapy of cutaneous T cell lymphoma, *Ann N Y Acad Sci.* 2001 Sep; 941:177–84
46. Shraye D. P., Bogaars H., Cole B., Wolf S. F., Wanebo H. J., Capacity of murine IL-12 to inhibit the development of primary melanoma tumors and to prevent lung metastases in the melanoma-challenged mice, *J Exp Ther Oncol.* 2002 Mar–Apr; 2(2):93–9
47. Su W., Kitagawa T., Ito T., Oyama T., Lee C. M., Kim Y. K., Matsuda H., Antitumor effect to IL-12 administration into the portal vein on murine liver metastasis, *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2002; 9(4):503–10
48. Liu L., Sakaguchi T., Kanda T., Hitomi J., Tabata Y., Hatakeyama K., Delivery of interleukin-12 in gelatin hydrogels effectively suppresses development of transplanted colonic carcinoma in mice, *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003 Jan; 51(1):53–7
49. Kobayashi T., Shiiba K., Satoh M., Hashimoto W., Mizoi T., Matsuno S., Takeda K., Interleukin-12 administration is more effective for preventing metastasis than for inhibiting primary established tumors in a murine model of spontaneous hepatic metastasis, *Surg Today.* 2002; 32(3):236–42
50. Nagarajan S., Selvaraj P., Glycolipid-anchored IL-12 expressed on tumor cell surface induces antitumor immune response, *Cancer Res.* 2002 May 15; 62(10):2869–74
51. Halin C., Rondini S., Nilsson F., Berndt A., Kosmehl H., Zardi L., Neri D., Enhancement of the antitumor activity of interleukin-12 by targeted delivery to neovasculature, *Nat Biotechnol.* 2002 Mar; 20(3):264–9
52. Burdelya L., Catlett-Falcone R., Levitzki A., Cheng F., Mora L. B., Sotomayor E., Coppola D., Sun J., Sebt S., Dalton W. S., Jove R., Yu H., Combination therapy with AG-490 and interleukin 12 achieves greater antitumor effects than either agent alone, *Mol Cancer Ther.* 2002 Sep; 1(11):893–9
53. Yagita A., Maruyama S., Wakasugi S., Sukegawa Y., H-2 haplotype-dependent serum IL-12 production in tumor-bearing mice treated with various mycelial extracts, *In Vivo.* 2002 Jan–Feb; 16(1):49–54
54. Le H. N., Lee N. C., Tsung K., Norton J. A., Pre-existing tumor-sensitized T cells are essential for eradication of established tumors by IL-12 and cyclophosphamide plus IL-12, *J Immunol.* 2001 Dec 15; 167(12):6765–72
55. Kishida T., Asada H., Itokawa Y., Yasutomi K., Shin-Ya M., Gojo S., Cui F. D., Ueda Y., Yamagishi H., Imanishi J., Mazda O., Electrochemo-gene therapy of cancer: intratumoral delivery of interleukin-12 gene and bleomycin synergistically induced therapeutic immunity and suppressed subcutaneous and metastatic melanomas in mice, *Mol. Ther.* 2003 Nov; 8(5):738–45
56. Parihar R., Nadella P., Lewis A., Jensen R., De Hoff C., Dierksheide JE, VanBuskirk AM, Magro CM, Young DC, Shapiro CL, Carson WE 3rd., a phase I study of interleukin 12 with trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor-2-overexpressing malignancies: analysis of sustained interferon gamma production in a subset of patients, *Clin Cancer Res.* 2004 Aug 1; 10(15):5027–37
57. Pan P. Y., Gu P., Li Q., Xu D., Weber K., Chen S. H., Regulation of dendritic cell function by NK cells: mechanisms underlying the synergism in the combination therapy of IL-12 and 4-1BB activation, *J Immunol.* 2004 Apr 15; 172(8):4779–89

58. Pizzoferrato E., B7-2 expression above a threshold elicits anti-tumor immunity as effective as interleukin-12 and prolongs survival in murine B-cell lymphoma, *Int J Cancer*. 2004 May 20; 110(1):61–9
59. Hill H. C., Conway T. F. Jr., Sabel M. S., Jong Y. S., Mathiowitz E., Bankert R. B., Egilmez N. K., Cancer immunotherapy with interleukin 12 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encapsulated microspheres: coinduction of innate and adaptative antitumor immunity and cure of disseminated disease, *Cancer Res*. 2002 dec 15; 62(24):7254–63
60. Lissoni P., Fumagalli E., Malugani F., Ardizzoia A., Bucovec R., Tancini G., Gardani G. S., Stimulation of IL-12 secretion by GM-CSF in advanced cancer patients, *J Biol Regul Homeost Agents*. 2001 Apr–Jun; 15(2):163–5
61. Mazzolini G., Prieto J., Melero L., Gene therapy of cancer with interleukin-12, *Curr Pharm Des.*, 2003; 9(24):1981–91
62. Satoh T., Saika T., Ebara S., Kusaka N., Timme T. L., Yang G., Wang J., Mouraviev V., Cao G., Fattah el M. A., Thompson T. C., Macrophages transduced with an adenoviral vector expressing interleukin 12 suppress tumor growth and metastasis in a preclinical metastatic prostate cancer model, *Cancer Res.*, 2003 Nov 15; 63(22):7853–60
63. Sanford M. A., Yan Y., Canfield S. E., Hassan W., Selleck W. A., Atkinson G., Chen S. H., Hall S. J., Independent contributions of GR-1 + leukocytes and Fas/FasL interactions to induce apoptosis following interleukin-12 gene therapy in a metastatic model of prostate cancer., *Hum Gene Ther*. 2001 Aug 10; 12(12):1485–98
64. Nie B., Qian Q. J., Che X. Y., Xue H. B., Sham J., High-level mIL-12 expression and replication of replicating adenovirus carrying mIL12 gene in naso-pharyngeal carcinoma cells, *Di Yi Da Xue Xue Bao*. 2002 apr; 22(4):296–8
65. Sangro B., Mazzolini G., Ruiz J., Herraiz M., Quiroga J., Herrero I., Benitor A., Larrache J., Pueyo J., Subtil J. C., Olague C., Sola J., Sadaba B., Lacasa C., Melero I., Qian C., Prieto J., Phase I trial of intratumoral injection of an adenovirus encoding interleukin-12 for advanced digestive tumors, *J Clin Oncol* 2004 Apr 15; 22(8):1389–97
66. Putzer B. M., Rodicker F., Hitt M. M., Stiewe T., Esche H., Improved treatment of pancreatic cancer by IL-12 and B7.1 costimulation: antitumor efficacy and immunoregulation in a nonimmunogenic tumor model, *Mol Ther* 2002 apr; 5(4):405–12
67. Saika T., Satoh T., Kusaka N., Ebara S., Mouraviev V. B., Timme T. L., Thompson T. C., Route of administration influences the antitumor effects of bone marrow-derived dendritic cells engineered to produce interleukin-12 in a metastatic mouse prostate cancer model, *Cancer Gene Ther.*, 2004 May; 11(5):317–24
68. Tirapu I., Arina A., Mazzolini G., Duarte M., Alfaro C., Feijoo E., Qian C., Chen L., Prieto J., Melero I., Improved efficacy of interleukin-12-transfected dendritic cells injected into murine colon cancer with anti-CD137 monoclonal antibodies and alloantigens, *Int J Cancer*. 2004 May 20; 110(1):51–60
69. Orleans-Lindsay J. K., Deru A., Craig J. I., Prentice H. G., Lowdell M. W., In vitro co-stimulation with anti-CD28 synergizes with IL-12 in the generation of T cell immune responses to leukaemic cells: a strategy for ex-vivo generation of CTL for immunotherapy, *clin Exp Immunol* 2003 Sep; 133(3):467–75;
70. Hess S. D., Egilmez N. K., Shiroko J., Bankert R. B., Antitumor efficacy of a human interleukin-12 expression plasmid demonstrated in a human peripheral blood leukocyte/human lung tumor xenograft SCID mouse model., *Cancer Gene Ther*. 2001 May; 8(5):371–7
71. Liebau C., Merk H., Rosel C., Schmidt S., Karreman C., Prisack J. B., Bojar H., Baltzer A. W., rIL-18 triggered gene therapy based on a transduction with the IL-12 plasmid: a new option as immuno-therapy for osteosarcom?, *Anticancer Res*. 2002 Sep–Oct; 22(5):2559–65

72. Zhang S., Zeng G., Kao C., Gardner T., Sweeney C., Yang N. S., Eble J. N., Cheng L., Fas-Fas ligand signaling pathway mediates an interleukin-12-induced rejection of a murine prostate tumor system, *Prostate*. 2002 Sep 15; 53(1):69–76
73. Bennett J. J., Malhotra S., Wong R. J., Delman K., Zager J., St-Louis M., Johnson P., Fong Y., Interleukin 12 secretion enhances antitumor efficacy of oncolytic herpes simplex viral therapy for colorectal cancer, *Ann Surg*. 2001 Jun; 233(6):819–26
74. Yamazaki M., Straus F. H., Messina M., Robinson B. G., Takeda T., Hashizume K., DeGroot L. J., Adenovirus-mediated tumor-specific combined gene therapy using Herpes simplex virus thymidine/ganciclovir system and murine interleukine-12 induces effective antitumor activity against medullary thyroid carcinoma, *Cancer Gene Ther*. 2004 Jan; 11(1):8–15
75. Lui V. W., he Y., Falo L., Huang L., Systemic administration of naked DNA encoding interleukin 12 for the treatment of human papillomavirus DNA-positive tumor., *Hum Gene Ther*. 2002 Jan 20; 13(2):177–85
76. Ha S. J., Chang J., Song M. K., Suh Y. S., Jin H. T., Lee C. H., Nam G. H., Choi G., Choi K. Y., Lee S. H., Kim W. B., Sung Y. C., Engineering N-glycosylation mutations in IL-12 enhances sustained cytotoxic T lymphocyte responses for DNA immunization, *Nat Biotechnol*. 2002 Apr; 20(4):381–6
77. Sung M. W., Chen S. H., Thung S. N., Zhang D. Y., Huang T. G., Mandeli J. P., Woo S. L., Intratumoral delivery of adenovirus-mediated interleukin-12 gene in mice with metastatic cancer in the liver, *hum Gene Ther*. 2002 apr 10; 13(6):731–43
78. Itokawa Y., Mazda O., Ueda Y., Kishida T., Asada H., Cui F. D., Fuji N., Fujiwara H., Shin-Ya M., Yasutomi K., Imanishi J., Yamagishi H., Interleukin-12 genetic administration suppressed metastatic liver tumor unsusceptible to CTL, *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Feb 20; 314(4):1072–9
79. Yamanaka R., Yajima N., Tsuchiya N., Honma J., Tanaka R., Ramsey J., Blaese M., Xanthopoulos K. G., Administration of interleukin-12 and -18 enhancing the antitumor immunity of genetically modified dendritic cells that had been pulsed with Semliki forest virus-mediated tumor complementary DNA, *J Neurosurg*. 2002 Nov; 97(5):1184–90
80. Heinzerling L., Dummer R., Pavlovic J., Schultz J., Burg G., Moelling K., Tumor regression of human and murine melanoma after intratumoral injection of IL-12-encoding plasmid DNA in mice, *Exp Dermatol*. 2002 Jun; 11(3):232–40
81. Schultz J., Pavlovic J., Moelling K., Immune modulation in cancer using DNA inoculation-antitumour effect of interleukin-12., *Dev Biol (Basel)*. 2000; 104:109–14
82. Iwashita Y., Ogawa T., Goto S., Nakanishi M., Goto T., Kitano S., Effective transfer of interleukin-12 gene to solid tumors using a novel gene delivery system, poly [D,L-2,4-diaminobutyric acid], *Cancer Gene Ther*. 2004 Feb; 11(2):103–8
83. Heinzerling L. M., Feige K., Rieder S., Akens M. K., Dummer R., Stranzinger G., Moelling K., Tumor regression induced by intratumoral injection of DNA coding for human interleukin 12 melanoma metastases in gray horses., *J Mol Med*. 2001; 78(12):692–702
84. Peron J. M., Couderc B., Rochaix P., Douin-Echinard V., Asnacios A., Souque A., Voigt J. J., Buscail L., Vinel J. P., Favre G., Treatment of murine hepatocellular carcinoma using genetically modified cells to express interleukin-12, *J Gastroenterol Hepatol*. 2004 Apr; 19(4):388–96
85. Yang J., Qian Q., Xue H., Experimental study of the anti-tumor effects of directly administered packaging cell line of retroviral vector carrying IL-12 gene on hepatoma, *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 1999 Oct; 79(10):761–3
86. Nishitani M. A., Sakai T., Ishii K., Zhang M., Nakano Y., Nitta Y., Miyazaki J., Kanayama H. O., Kagawa S., Himeno K., A convenient cancer vaccine therapy with in vivo transfer of

interleukin 12 expression plasmid using gene gun technology after priming with irradiated carcinoma cells, *Cancer Gene Ther.* 2002 Feb; 9(2):156–63

87. Shi F., Rakhmievich A. L., Heise C. P., Oshikawa K., Sondel P. M., Yang N. S., Mahvi D. M., Intratumoral injection of interleukin-12 plasmid DNA, either naked or in complex with cationic lipid, results in similar tumor regression in a murine model, *Mol Cancer Ther.* 2002 Sep; 1(11):949–57
88. Saudemont A., Buffenoir G., Denys A., Desreumaux P., Jouy N., Hetuin D., Bauters F., Fenaux P., Quesnel B., Gene transfer of CD154 and IL12 cDNA induces an anti-leukemic immunity in a murine model of acute leukemia, *Leukemia.* 2002 Sep; 16(9):1637–44
89. Li P. Y., Lin J. S., Feng Z. H., He Y. F., Zhou H. J., Ma X., Cai X. K., Tian D. A., Combined gene therapy of endostatin and interleukin 12 with polyvinylpyrrolidone induces a potent antitumor effects on hepatoma., *World J Gastroenterol.* 2004 aug 1; 10(15):2195–200
90. Qiu S., Ye S., Wang Z., Tang Z., Lu L., Xiao X., Study on the effects of combined IL-12 and GM-CSF gene therapy for murine liver cancer, *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* 2002 Dec; 10(6):413–6
91. Rakhmievich A. L., Hooper A. T., Hicklin D. J., Sondel P. M., Treatment of experimental breast cancer using interleukin-12 gene therapy combined with anti-vascular endothelial growth factor receptor-2 antibody., *Mol Cancer Ther.* 2004 aug; 3(8):969–76
92. Kang W. K., Park C., Yoon H. L., Kim W. S., Yoon S. S., Lee M. H., Park K., Kim K., Jeong H. S., Kim J. A., Nam S. J., Yang J. H., Son Y. I., Baek C. H., Han J., Ree H. J., Lee E. S., Kim S. H., Kim D. W., Ahn Y. C., Huh S. J., Choe Y. H., Lee J. H., Park M. H., Kong G. S., Park E. Y., Kang Y. K., Bang Y. J., Paik N. S., Lee S. N., Kim S. H., Kim S., Robbins P. D., Tahara H., Lotze M. T., Park C. H., Interleukin 12 gene therapy of cancer by peritumoral injection of transduced autologous fibroblasts: outcome of a phase I study., *Hum Gene Ther.*, 2001 Apr. 10;1 2(6):671–84
93. Miller G., Lahrs S., Dematteo R. P., Overexpression of interleukin-12 enables dendritic cells to activate NK cells and confer systemic antitumor immunity, *FASEB J.* 2003 Apr; 17(6):728–30
94. Satoh Y., Esche C., Gambotto A., Shurin G. V., Yurkovetsky Z. R., Robbins P. D., Watkins S. C., Todo S., Herberman R. B., Lotze M. T., Shurin M. R., Local administration of adenocarcinoma in the liver in mice., *J Exp Ther Oncol.* 2002 Nov–Dec; 2(6):337–49
95. Furumoto K., Mori A., Yamasaki S., Inoue N., Yang W., Nakau M., Yasuda S., Arai S., Imamura M., Interleukin-12-gene transduction makes DCs from tumor-bearing mice an effective inducer of tumor – specific immunity in a peritoneal dissemination model, *Immunol Lett.* 2002 Aug 1; 83(1):13–20
96. Shimiu T., Berhanu A., Redlinger R. E. Jr., Watkins S., Lotze M. T., Barksdale E. M. Jr., Interleukin-12 transduced dendritic cells induce regression of established murine neuroblastoma., *J Pediatr Surg.* 2001 Aug; 36(8):1285–92
97. Gong J., Koido S., Chen D., Tanaka Y., Huang L., Avigan D., Anderson K., Ohno T., Kufe D., Immunization against murine multiple myeloma with fusions of dendritic and plasmocytoma cells is potentiated by interleukin 12., *Blood.* 2002 apr 1; 99(7):2512–7
98. Yoshimura C., Nomura S., Kanazawa S., Kuwana M., Yamaguchi K., Fukuhara S., Comparison of interleukin-12 with lung cancer and malignant lymphoma undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation, *J Cancer Res Clin Oncol.* 2002 Jan; 128(1):29–36
99. Liu S., Yang H., Liang C., Combined IL-2 and IL-12 gene therapy for murine head and neck squamous cell carcinoma., *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2002 Joule; 24(4):323–6

100. Masztalerz A., everse L. A., Otter W. D., Presence of cytotoxic B220 + CD3 + CD4-CD8-cells correlates with the therapeutic efficacy of lymphoma treatment with IL-2 and/or IL-12, *J Immunother.* 2004 Mar-Apr; 27(2):107-15
101. Li D., Shugert E., Guo M., Bishop J. S., O'Malley B. W. Jr., Combination nonviral interleukin 2 and interleukin 12 gene therapy for head and neck squamous cell carcinoma., *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001 Nov; 127(11):1319-24
102. Qiu X., Chen K., Tong L., Shu X., Lu X., Wen H., Deng C., Effects of moxibustion at shenque (CV8) on serum IL-12 level and NK cell activities in mice with transplanted tumor, *J Tradit Chin Med.* 2004 Mar; 24(1):56-8
103. Zaki M. H., Wysocka M., Everetts S. E., Wang K. S., French L. E., Ritz J., Rook A. H., Synergistic enhancement of cell-mediated immunity by interleukin-12 plus interleukin-2: basis for therapy of cutaneous T cell lymphoma, *J Invest Dermatol.* 2002 Feb; 118(2):366-71
104. Sawayama T., Sakaguchi K., Senoh T., Ohta T., Nishimura M., Takaki A., Tsuji T., Shiratori Y., Effects of pulsing procedure of interleukin-12 in combination with interleukin-2 on the activation of peripheral bloo lymphocytes derived from patients with hepatocellular carcinoma, *Acta Med Okayama.* 2003 Dec; 57(6):285-92
105. Chen B., Timiryasova T. M., Gridley D. S., Andres M. L., Dutta-Roy R., Fodor I., Evaluation of cytokine toxicity induced by vaccinia virus-mediated IL-2 and IL-12 antitumour immunotherapy., *Cytokine.* 2001 Sep 21; 15(6):305-14
106. Iwadate Y., Namba H., Sakiyama S., Yamaura A., Tagawa M., Interleukin-12-mediated induction of systemic immunity in the periphery and recruitment of activated T cells into the brain produce limited antitumor effects compared with interleukin-2., *Int J Mol Med.* 2002 Dec; 10(6):741-7
107. Jean W. C., Spellman S. R., Wallenfriedman M. A., Flores C. T., Kurtz B. P., Hall W. A., Low W. C., effects of combined granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interleukin-2, and interleukin-12 based immunotherapy against intracranial glioma in the rat, *J Neurooncol.* 2004 Jan; 66(1-2):39-49
108. Kaufman H. L., Flanagan K., Lee C. S., Perretta D. J., Horig H., Insertion of interleukin-2 (IL-2) and interleukin-12 (IL-12) genes into vaccinia virus results in effective anti-tumor responses without toxicity, *Vaccine.* 2002 Mar 15; 20(13-14):1862-9
109. You T. G., Wang H. S., Yang J. H., Qian Q. J., Fan R. F., Wu M. C., Transfection of IL-2 and/or IL-12 genes into splin in treatment of rat liver cancer., *World J Gastroenterol.* 2004 Aug 1; 10(15):2190-4
110. Wigginton J. M., Gruys E., Geiselhart L., Subleski J., Komschlies K. L., Park J. W., Wiltout T. A., Nagashima K., Back T. C., Wiltout R. H., IFN-gamma and Fas/FasL are required for the antitumor and antiangiogenic effects of IL-12/pulse IL-2 therapy., *J Clin Invest.* 2001 Joule; 108(1):51-62
111. Gorelik E., Edwards R. P., Feng X., Marrangoni A. M., Grandis J. R., Drenning S. D., Velikokhatnaya L., Kwon J. A., Lokshin A. E., IL-12 receptor-mediated upregulation of FasL in human ovarian carcinoma cells., *Int J Cancer.* 2004 Nov 20; 112(4):620
112. Kasprzak A., Przewozna M., Zabel M., Pankowski J., Surdyk-Zasada J., Immunocytochemical analysis of the tissue location of cytokines (IL-2 and IL-12) in neuroendocrine lung cancer, *Folia Morphol (Warsz).* 2003; 62(3):301-3
113. Whalen M. M., Williams T. B., Green S. A., Loganathan B. G., Interleukins 2 and 12 produce recovery of cytotoxic function in tributyltin-exposed human natural killer cells, *environ res.* 2002 Mar; 88(3):199-209

114. Li Q., Carr A. L., Donald E. J., Skitzki J. J., Okuyama R., Stoolman L. M., Chang A. E., Synergistic effects of IL-12 and IL-18 in skewing tumor-reactive T-cell responses towards a type 1 pattern, *Cancer Res.* 2005 Feb 1; 65(3):1063–70
115. Kito T., Kuroda E., Yokota A., Yamashita U., Cytotoxicity in glioma cells due to interleukin-12 and interleukin-18-stimulated macrophages mediated by interferon-gamma-regulated nitric oxide, *J Neurosurg.* 2003 Feb; 98(2):385–92
116. Tamura T., Nishi T., Goto T., Takeshima H., Ushio Y., Sakata T., Combination of IL-12 and IL-18 of electro-gene therapy synergistically inhibits tumor growth, *Anticancer Res.* 2003 Mar–Apr; 23(2B):1173–9
117. Hikosaka S., Hara I., Miyake H., Hara S., Kamidono S., Antitumor effect of simultaneous transfer of interleukin-12 and interleukin-18 genes and its mechanism in a mouse bladder cancer model., *Int J Urol.* 2004 Aug; 11(8):647–52
118. Yao N. S., Chen Y. M., Perng R. P., Whang-Peng J., Additive effect of interleukin-12 and interleukin-18 on T-helper cell pathway of malignant pleural effusion, *Lung* 2002; 180(1):15–24
119. Liebau C., Baltzer A. W., Schmidt S., Roesel C., Karreman C., Prisack J. B., Bojar H., Merk H., Interleukin-12 and interleukin-18 induce indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity in human osteosarcoma cell lines independently from interferon-gamma, *Anticancer Res.* 2002 Mar–Apr; 22(2A):931–6
120. Baxevasis C. N., Gritzapis A. D., Papamichail M., In vivo antitumor activity of NKT cells activated by the combination of IL-12 and IL-18., *J Immunol* 2003 Sep 15; 171(6):2953–9
121. Tsuboi K., Miyazaki T., Nakajima M., Fukai Y., Masuda N., Manda R., Fkuchi M., Kato H., Kuwano H., Serum interleukin-12 and interleukin-18 levels as a tumor marker in patients with esophageal carcinoma, *Cancer Lett.* 2004 Mar 18; 205(2):207–14
122. Liebau C., Merk H., Schmidt S., Roesel C., Karreman C., Prisack J. B., Bojar H., Baltzer A. W., Interleukin-12 and interleukin-18 change ICAM-1 expression, and enhance natural killer cell mediated cytotoxicity of human osteosarcoma cells, *Cytokines Cell Mol ther.* 2002; 7(4):135–42
123. Veenstra K. G., Jonak Z. L., Trulli S., Gollob J. A., IL-12 induces monocyte IL-18 binding protein expression via IFN-gamma., *J Immunol.* 2002 Mar 1; 168(5):2282–7
124. Tamura T., Nishi T., Goto T., Takeshima H., Dev S. B., Ushio Y., Sakata T., Intratumoral delivery of interleukin 12 expression plasmids with in vivo electroporation is effective for colon and renal cancer., *Hum Gene Ther.* 2001 Jul 1; 12(10):1265–76
125. Li S., Zhang X., Xia X., Regression of tumor growth and induction of long-term antitumor memory by interleukin 12 electro-gene therapy, *J Natl Cancer Inst.* 2002 May 15; 94(10):762–8
126. Lee S. C., Wu C. J., Wu P. Y., Huang Y. L., Wu C. W., Tao M. H., Inhibition of established subcutaneous and metastatic murine tumors by intramuscular electroporation of the interleukin-12 gene, *J Biomed Sci.* 2003 Jan–Feb; 10(1):73–86
127. Lucas M. L., Heller L., Coppola D., Heller R., IL-12 plasmid delivery by in vivo electroporation for the successful treatment of established subcutaneous B16.F10 melanoma, *Mol Ther.* 2002 Jun; 5(6):668–75
128. Lucas M. L., Heller L., IL-12 gene therapy using an electrically mediated nonviral approach reduces metastatic growth of melanoma, *DNA Cell Biol.* 2003 Dec; 22(12):755–63
129. Yu D. S., Lee C. F., Hsieh D. S., Chang S. Y., antitumor effects of recombinant BCG and interleukin-12 DNA vaccines on xenografted murine bladder cancer, *Urology.* 2004 Mar; 63(3):596–601



DETERMINAT
2007

VERIFICAT
2017

**Tiparul s-a executat sub c-da nr. 1466/2005, la
Tipografia Editurii Universității din București**

ISBN 973737093-7



9 789737 370938

70000 Lei
7 Ron