

Исследования в области ИММУНООНКОЛОГИИ

Смена парадигмы: поддержка научных исследований в области терапевтических методов борьбы с раком

Исследования в области ИММУНООНКОЛОГИИ

Недавние открытия в иммуноонкологии сформировали новый тип представления о канцерогенезе. Считается, что иммуноонкологическая терапия осуществит наиболее существенный сдвиг парадигмы лечения метастазов в ближайшие десятилетия. Результатом такой терапии является долгосрочная регрессия опухоли, в ситуациях когда удаление, радиотерапия, химиотерапия и таргетная терапия оказались менее эффективными [1,2,4].

Thermo Fisher Scientific предлагает широкий спектр научно-исследовательских платформ и продуктов, способных помочь исследовать иммуноонкологию детально и системно, для большего понимания ее потенциала в борьбе с раком.

Иммуноонкологическая терапия Т-клетками

В иммуноонкологической терапии используются генетически модифицированные Т-клетки, чтобы атаковать и убивать клетки опухоли. Т-клетки не способны нормально распознавать опухолевые клетки в качестве чужеродных, что препятствует их маркировке и разрушению. При иммунотерапии, чтобы заставить Т-клетки работать, с ними проводят генетические манипуляции, придавая им способность распознавать раковые клетки как чужие и убивать их так же, как и другие чужеродные тела. Наиболее популярные методы иммуноонкологической терапии можно разделить на два подхода. Первый — это использование цитотоксических Т-лимфоцитов. С его помощью происходит воздействие как на внутриклеточные, так и на поверхностные антигены. Другой наиболее обсуждаемый метод — это Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR), нацеленным на антигены, экспрессирующиеся на клеточной поверхности. Оба метода более подробно описаны ниже.

Терапия цитотоксическими Т-лимфоцитами

Терапия цитотоксическими Т-лимфоцитами включает использование генетически модифицированных Т-клеточных рецепторов (TCRs) цитотоксических Т-лимфоцитов для распознавания опухолевого антигена в комплексе с лейкоцитарным антигеном человека (HLAs). Именно способность распознавания как внутриклеточных, так и поверхностных белков позволяет данному методу задействовать более широкий спектр мишеней, ассоциированных с опухолью. Это очень важный разграничительный момент, требующий внимания, так как многие другие методы иммуноонкологии не могут быть направлены против внутриклеточных мишеней [1]. Отсутствие антигенов, присущих только опухоли, делает данный метод очень трудным.

Терапия Т-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR)

Терапия CAR Т-клетками — это другой метод иммуноонкологии, который в настоящее время усиленно изучается. Эти клетки генетически модифицированы и содержат CARs с распознающими доменами на базе антител (scFv), направленными против антигенов клеточной поверхности, эти домены сшиты с внутриклеточными сигнальными последовательностями, необходимыми для преодоления толерантности CAR Т-клеток к опухоли [4]. Это позволяет CAR Т-клеткам обойти ограничения, связанные с распознаванием антигенов Т-клеточным рецептором через MHC-рестрикцию, а также позволяет избавиться от вероятности того, что опухоль окажется нераспознанной за счет нарушений, связанных с презентированием антигена или с экспрессией HLA. Возможность модифицировать Т-клеточные сигнальные фрагменты CAR Т-клеток способствует большему функциональному эффекту от CAR, чем от эндогенных TCRs (Рисунок 1).

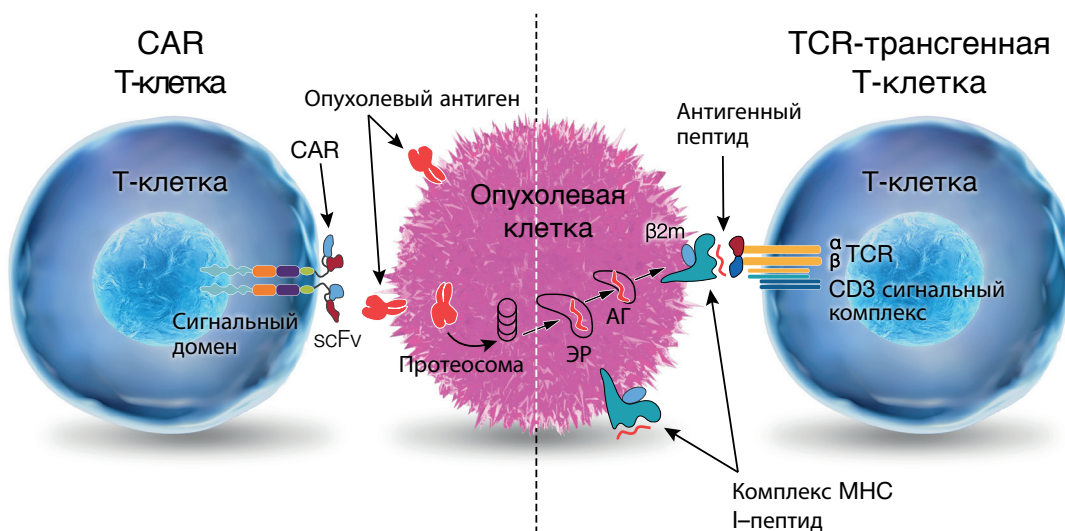


Рисунок 1. Схематическая иллюстрация двух популярных методов, терапия с помощью CAR Т-клеток (слева) и терапия с помощью цитотоксических Т-лимфоцитов (справа), в настоящее время разрабатываемые для иммуноонкологического лечения.

До сих пор остается открытым вопрос, можно ли использовать CAR T-клетки для лечения широкого спектра различных типов солидных опухолей. В настоящее время, примерно 50% клинических испытаний, проводимых с помощью CAR T-клеток, сфокусировано на гематологических злокачественных новообразованиях, задействуя прежде всего В-клеточный маркер CD19, участвующий в развитии В-клеточных лейкозов и лимфом [1]. CD19 является превосходной терапевтической мишенью, так как он присутствует только на здоровых В-клетках, но отсутствует в тканях и не попадает в циркулирующую кровь. Проводить лечение солидных опухолей гораздо труднее, чем лейкозов по многим причинам. На поверхности клеток солидных опухолей присутствует множество белков, которые также обнаруживаются и на нормальных клетках. Атакуя такие мишени, можно полностью разрушить конкретные органы [1].

Исследователи находятся в поисках нового «CD19», который бы позволил им применять CAR T-клетки в отношении солидных опухолей. Последние достижения традиционных платформ для клеточного анализа, таких как проточная цитофлуориметрия, позволили осуществлять высокопроизводительный многопараметрический анализ единичных клеток. Это создало массу возможностей для обнаружения новых потенциальных мишеней для терапии CAR T-клетками.

Для создания CAR T-клеток, направленных на интересующую мишень и содержащих соответствующую внутриклеточную сигнальную часть рецептора, Т-лимфоциты изолируют и генетически модифицируют. Трудность состоит в выборе подходящих субпопуляций Т-клеток для их размножения и модификации [1]. В дополнение к доступности Т-клеток необходимо минимизировать присутствие регуляторных Т-клеток (Tregs), поскольку высокий уровень Tregs является прогнозом потенциального блокирования противоопухолевого ответа CAR T-клетками [1,4]. Инжиниринг CAR T-клеток в направлении устойчивости к иммуносупрессии мог бы быть полезным для улучшения результатов терапии [1]. Другие проблемы связаны с плотными опухолями, эти опухоли насыщают свое окружение сигнальными молекулами, такими как PD-L1, которые выключают Т-клетки. Это процесс защиты, в котором задействованы ингибиторы иммунных контрольных точек. Не исключено, что однажды терапия CAR T-клетками будет сочетать в себе субпопуляции Т-клеток, модифицированных для формирования наиболее благоприятного окружения, для достижения противоопухолевого эффекта.

Генная инженерия CAR T-клеток

Современная терапия CAR T-клетками использует то, что относится к третьему поколению CAR T-клеток. Терапия CAR T-клетками первого поколения была безопасным, но мало-эффективным подходом. Второе и третье поколение CAR T-клеток — это новая модель, усовершенствованная путем добавления костимулирующего сигнального домена из представителей суперсемейства TNFα и добавления

таких доменов, как CD28, 4-1BB (CD137) или OX40 (CD134) к цитоплазматической части CAR [1,4]. Такие CAR T-клетки демонстрировали существенное усиление активации и пролиферации, увеличение выживаемости, усиление секреции цитокинов, противоопухолевой цитолитической активности и реактивации при вторичной стимуляции [1,4].

Активность этих новых CAR T-клеточных моделей может быть определена как с помощью клеточного профилирования, так и профилирования по биомаркерам. Количество CAR T-клеток у пациента можно легко и быстро отслеживать с помощью цитофлуориметрии, тогда как количественный цитокиновый профиль может быть измерен с помощью мультиплексных иммунологических тестов. Используя эти инструменты, исследователи могут продолжать усовершенствовать CAR T-клетки для получения достаточного положительного противоопухолевого эффекта, уменьшая при этом серьезные негативные побочные эффекты.

Токсичность и серьезные побочные эффекты (СПЭ)

Иммуноонкологическая терапия иногда рассматривается как терапия с ограниченными побочными эффектами. Хотя это и справедливо, если сравнивать с традиционной химиотерапией, но вовсе не говорит об их полном отсутствии. Вид и интенсивность СПЭ зависят от множества факторов, включая дизайн CAR T-клеток и таргетные молекулы данных клеток [1]. Наиболее распространенным не связанным с мишенью негативным побочным эффектом является синдром выброса цитокинов (СВЦ). При этом у пациента происходит «штормовой» выброс цитокинов, генерирующих каскад очень серьезных последствий. Трудно определить происхождение этих цитокинов и те их количества, которые относятся непосредственно к CAR T-клеткам. Другие типы клеток, такие как клетки острого лейкоза и макрофаги, привлеченные в данную область и являющиеся частью иммунного ответа, также высвобождают огромное количество цитокинов [1]. Кроме того, пока не совсем понятно, может ли терапия, направленная на сдерживание «цитокинового шторма», каким либо негативным образом повлиять на противоопухолевый эффект CAR T-клеток. Такие методы, как мультиплексные иммунологические тесты, которые позволяют определять профиль этих цитокинов одновременно в различных типах образцов, дают исследователю лучшее понимание систем, имеющих отношение к этому процессу.

Список литературы:

1. Corrigan-Curay J, Kiem HP, Baltimore D et al. (2014) T-cell immunotherapy: Looking forward. *Mol Ther* 22:1564–1574.
2. Grupp SA, Kalos M, Barrett D et al. (2013) Chimeric antigen receptor–modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Eng J Med* 368:1506–1518.
3. Seton-Rogers S (2016) Immunotherapy: Two antigens are better than one. *Nat Rev Cancer* 16:128–129.
4. Batlevi CL, Matsuki E, Brentjens RJ et al. (2016) Novel immunotherapies in lymphoid malignancies. *Nat Rev Clin Oncol* 13:25–40.
5. CAR T-Cell Therapy: Engineering Patients' Immune Cells to Treat Their Cancers. (2014) *National Cancer Institute*.

Проточная цитометрия

Проточная цитометрия — это чрезвычайно полезный инструмент, используемый на всем континууме исследований CAR T-клеток. Быстрый, параллельный многопараметрический анализ единичных клеток с помощью проточной цитометрии позволяет проводить анализ миллионов клеток с высокой производительностью для более глубокого понимания системы в действии. Этот метод обеспечивает гибкость исследований — от простого анализа клеток, трансфицированных репортерными флуоресцентными белками, до многопараметрического анализа различных клеточных характеристик, таких как клеточное здоровье, метаболизм, изменения ДНК, образование цитокинов и другие клеточные фенотипы в огромной гетерогенной популяции клеток.

Проточный цитометр Attune NxT Flow Cytometer с технологией акустической фокусировки

Высокоточный и высокопроизводительный проточный цитометр Invitrogen™ Attune™ NxT Flow Cytometer — это настольный прибор с изменяемой конфигурацией, использующий до 4 лазеров, 6-16 параметров, плюс сверхскоростная технология, с 10-ти кратным увеличением скорости в сравнении с традиционными цитометрами, имеющий конструкцию, устойчивую к закупорке системы. Переключение между пробирками и планшетами осуществляется за секунды, с полной автоматизацией для 96- и 384-луночных планшетов с помощью автоматизированной роботизированной системы забора пробы Invitrogen™ Attune™ NxT Autosampler.

- **Сохранение ценных образцов** — конструкция, устойчивая к закупорке, технология акустической фокусировки, высококачественная гидросистема (флюидика) и широкая проточная ячейка — все это помогает предотвратить потерю ценных образцов



- **Работает быстрее** — высокоскоростной проточный цитометр с акустической фокусировкой, первоклассные оптоволоконные лазеры с плоско-вершинным профилем луча и высококачественная флюидика — именно это в действительности позволяет собирать данные со скоростью 35 000 событий в секунду при потоке образца в 10 раз быстрее (1 мл/мин.)
- **Детекция редких событий** — возможность увидеть каждую клетку
- **По-настоящему полная автоматизация** — планшетный автоматизированный пробозаборник и конструкция, устойчивая к закупорке системы, обеспечивают полную автоматизацию в режиме работы с 96- и 384-луночными планшетами
- **Подсчет клеток** — подсчет абсолютного количества клеток, не требующий использования частиц
- **Гибкость** — модульный дизайн с 1-4 лазерами с возможностью модернизации на рабочем месте, расширяющейся вслед за расширением вашего исследования

Узнайте больше на thermofisher.com/attune

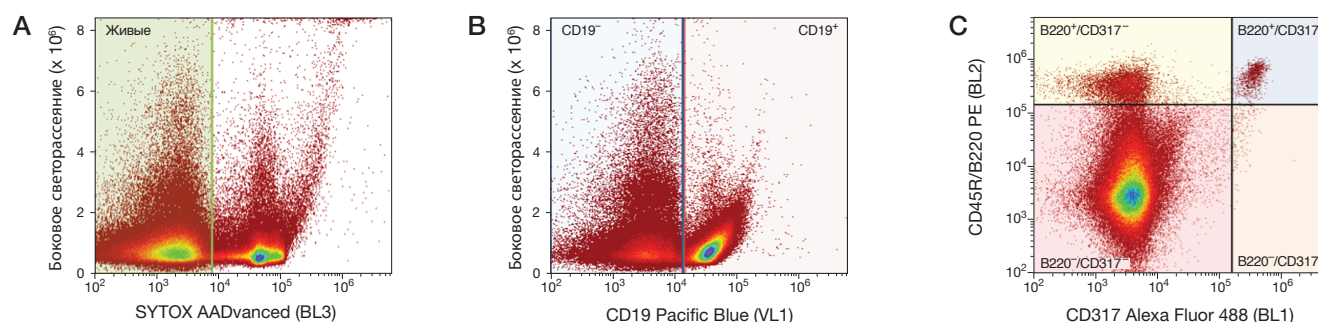


Рисунок 1. Выделение по гейту и анализ плазмоцитоидных дендритных клеток (pDC). (A) Выделение по гейту живых клеток с использованием красителя мертвых клеток Invitrogen™ SYTOX™ AADvanced™ Dead Cell Stain (Кат. № S10274; канал BL3, длинноволновой фильтр 640 нм), (B) Последующее выделение по гейту CD19-клеток среди живых клеток (канал VL1, полосовой фильтр (BP) с полосой пропускания 450/40 нм). (C) Детекция pDC с использованием двухпараметрического графика со значениями CD45R/B220 напротив CD317 (канал BL1, полосовой фильтр с полосой пропускания 530/30 нм; канал BL2, полосовой фильтр с полосой пропускания 574/26 нм); pDC были идентифицированы по двойному позитивному окрашиванию B220+/CD317+ (правый верхний квадрант) и составили 0,851% среди живых CD19- клеток что составило 0,194% от всех спленцитов. Для анализа было получено 1,3 миллиона клеток при скорости потока образца 500 мкл/мин, что в 3 раза быстрее, чем то же количество, полученное на обычном цитометре с гидродинамической фокусировкой.

Антитела и реагенты для проточной цитометрии при онкологических исследованиях

Расширьте ваши эксперименты по проточной цитометрии и извлеките из них максимум с помощью специально подобранных реагентов, рассчитанных на получение лучших результатов — от пробоподготовки до реагентов для отслеживания и анализа клеток.

- **Пробоподготовка** — наборы для фиксации и пермеабиллизации, лизиса клеток и растворы для хранения проб
- **Антитела** — специально разработанные для проточной цитометрии
- **Реагенты** — красители для определения клеточного здоровья, синтеза ДНК, жизнеспособности и отслеживания клеток
- **Выделение клеток** — с помощью магнитных микроносителей Invitrogen™ Dynabeads™ magnetic beads

Узнайте больше на thermofisher.com/flow-sample и thermofisher.com/flowantibodies

Жизнеспособность клеток

Мертвые клетки могут давать ложно-положительные результаты, так как они неспецифическим образом связываются со многими реагентами. Удаление мертвых клеток является ключевым этапом в получении корректных результатов в проточной цитометрии. Выберите из набора красителей и тестов на жизнеспособность Invitrogen™:

- Красители жизнеспособных клеток, допускающие фиксацию и красители на жизнеспособность без возможности фиксации

Узнайте больше на thermofisher.com/flow-cellviability

Пролиферация клеток

Определение уровня клеточной пролиферации путем измерения синтеза ДНК является фундаментальным методом для оценки здоровья клетки, определения генотоксичности и оценки противораковых препаратов. Тест Invitrogen™ Click-iT™ EdU assays (Рисунок 3) позволяет:

- Проводить количественную оценку новосинтезированной ДНК
- Обеспечивать детекцию без денатурации ДНК
- Совмещать с чувствительными тандемными красителями R-PE и флуоресцирующими белками
- Осуществлять детекцию очень быстро — всего за 60 минут
- Является альтернативой для трудоёмкого теста с использованием BrdU

Узнайте больше на thermofisher.com/flow-cellproliferation

Детекция клеточных популяций

Клетки, перманентно меченные флуоресцентными красителями для отслеживания поколений или клеточных делений без влияния на морфологию и физиологию. Набор для исследования клеточной пролиферации (Рисунок 4) предлагает:

- Мечение *in vitro* или *in vivo*
- Яркое окрашивание с единственным пиком
- Длительный стабильный сигнал
- Варианты сочетаний с различными лазерами

Узнайте больше на thermofisher.com/flow-cellproliferation

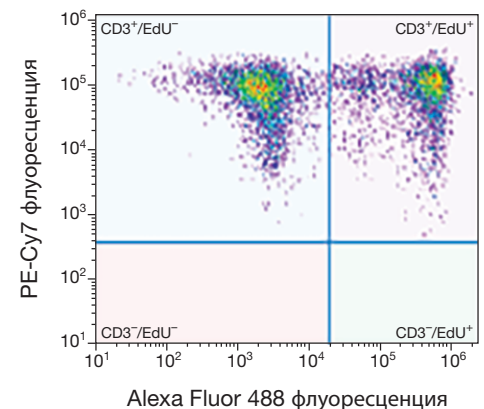


Рисунок 3. Определение CD3 и наличия разрывов цепи ДНК на Т-клетках человека, двухпараметрический график.

CD3 определяли с помощью антител, меченых PE-Cy7™. Разрывы цепи ДНК определяли с помощью набора Invitrogen™ Click-iT™ Plus EdU Alexa Fluor™ 488 Flow Cytometry Assay Kit.

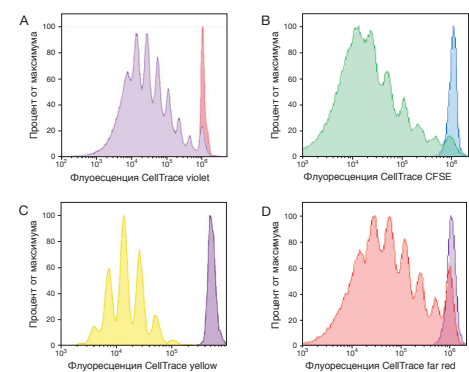


Рисунок 4. Мечение выделенных Т-лимфоцитов реагентами на пролиферацию Invitrogen™, и отслеживание метки в следующих семи поколениях.

Образцы были окрашены (A) реагентом CellTrace™ violet, (B) реагентом CellTrace™ CFSE, (C) реагентом CellTrace™ yellow и (D) реагентом CellTrace™ far red. Показан участок перекрывания нестимулированного родительского поколения в виде наиболее яркого пика в правой части каждой гистограммы.

Визуализация клеток

Многоцветная визуализация клеток даёт огромный объём информации при изучении клеток и биологических систем. В дополнение к различному уровню содержания белков, визуализация даёт также информацию о пространственном расположении и других показателях клеток. Одним из них является гипоксия. Клеточный ответ на снижение кислорода (условия гипоксии) связывают с широким спектром патологических состояний человека, включая развитие опухоли, атеросклероз, воспаление и патологический ангиогенез. Хотя значимость гипоксии в индукции этих состояний хорошо известна, для многих исследователей чрезвычайно трудно создавать модельные системы, с возможностью точно контролировать условия гипоксии. До недавнего времени, чтобы делать это эффективно, требовались доступные тщательно продуманные системы визуализации, которые бы обеспечили поддержание и точный контроль температуры, влажности и содержания газов (CO_2 и O_2) в процессе эксперимента. Система визуализации Invitrogen™ EVOS™ FL Auto Imaging System вместе с настольным инкубатором Onstage Incubator решает данную проблему. Климатическая камера позволяет точно контролировать уровень кислорода, обеспечивая тем самым исследователя эффективной системой для оценки клеточного ответа на гипоксию с помощью системы длительной визуализации флуоресценции живых клеток (Рисунок 5).

Система визуализации EVOS FL

Система визуализации EVOS FL Auto с настольным инкубатором Onstage Incubator предназначена для устранения сложностей, связанных с визуализацией живых клеток в течение долгого времени, позволяя исследователям сосредотачиваться на получении данных, а не эксплуатации и техобслуживании прибора. Это обеспечивает получение покадровых изображений при длительном наблюдении за клеточными культурами. Это гибкое, высокоэффективное и доступное решение для визуализации живых клеток, обеспечивающее вам:

- **Контроль** — легко контролировать параметры среды и параметры съёмки
- **Увидеть больше** — построение покадровых изображений для каждой лунки 96-луночного планшета
- **Экономия пространства** — сохраняет полезное пространство лаборатории, имея небольшие размеры и изящный дизайн
- **Экономичность** — помогает экономить финансы, обладая низкой стоимостью расходов на эксплуатацию

Узнайте больше на thermofisher.com/evos

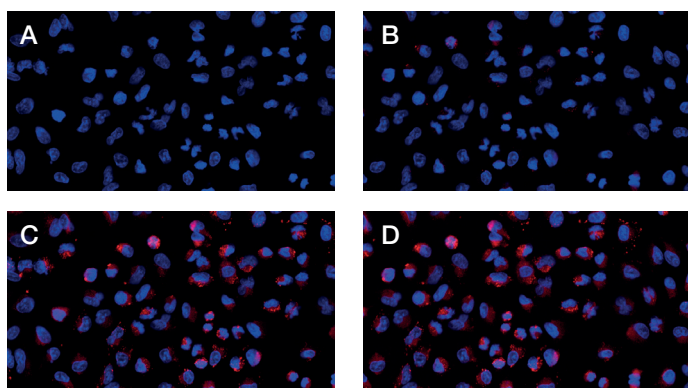
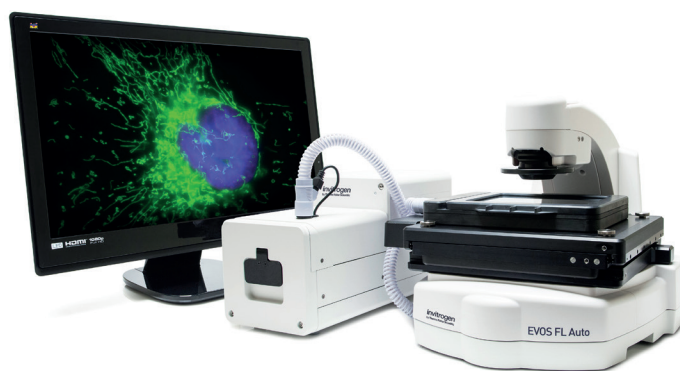


Рисунок 5. Клетки линии A549, окрашенные реагентом Invitrogen™ Image-iT™ NucleoRed Reagent в условиях различного содержания кислорода. (A) 20% O_2 . (B) 5% O_2 . (C) 2.5% O_2 . (D) 1% O_2 .



Одновременный многопараметрический анализ

Подобно проточной цитометрии, одновременный многопараметрический анализ (ОМА) даёт разрешение на уровне клетки, чтобы проводить количественные измерения на уровне отдельных клеток с использованием нескольких каналов флуоресценции. В отличие от проточной цитометрии, одновременный многопараметрический анализ обеспечивает визуализацию каждой клетки с пространственным разрешением (Рисунок 6). Поклеточная сортировка помогает устанавливать механизмы нарушения взаимосвязанной работы сигнальных путей и токсического воздействия на клетки. Как таковой, клеточный анализ все чаще используется при исследовании ответа клетки на стимул, обеспечивая более точное отражение эффектов на уровне клетки по сравнению с традиционными методами биохимического анализа. Это позволяет быстрее оценивать степень воздействия и нежелательные побочные эффекты различных способов терапии CAR T-клетками.

Платформа для одновременного многопараметрического анализа CellInsight CX7 High-Content Screening (HCS) Platform

Платформа для одновременного многопараметрического анализа CellInsight CX7 High-Content Screening Platform — единственная ОМА-платформа, которая одновременно позволяет получать 4-цветное светлопольное, 7-цветное флуоресцентное и конфокальное изображение. Эта система обладает гибкостью и устойчивостью, которые необходимы для каждого рабочего процесса ОМА, а также совместима с существующей биоинформатической системой анализа данных.

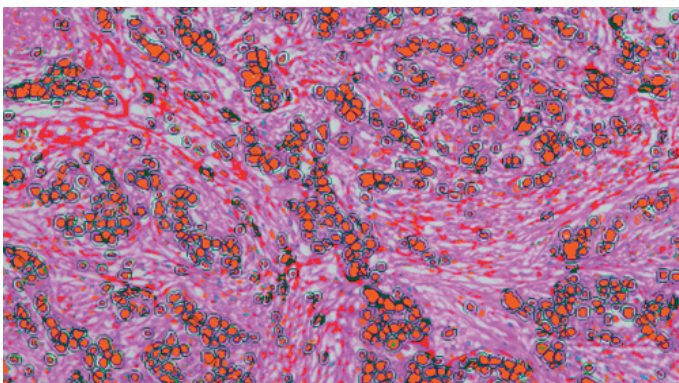
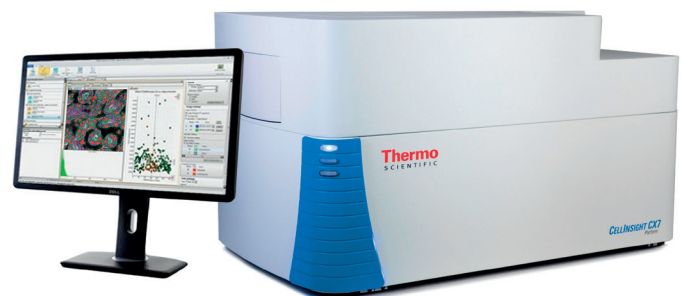


Рисунок 6. Ткань рака молочной железы с окраской на маркер пролиферации Ki67-DAB с докраской гематоксилин-эозином.

- **Глубже познайте биологию процесса** — 8-канальное LED-возбуждение для более широкого выбора образцов
- **Используйте больше методов** — сканируйте в широкопольном, светлопольном и конфокальном режимах в пределах одного анализа
- **Используйте большее количество типов образцов** — от образцов на предметных стеклах до образцов в 1536-луночных планшетах
- **Защитите свои образцы** — высокочувствительная детекция и лазерная автофокусировка помогут сократить световую экспозицию
- **Экономьте время** — интеллектуальное программное обеспечение и лазерная автофокусировка ускорят время сканирования
- **Получайте свои данные скорее** — анализ данных в процессе съёмки для скорейшего результата

Узнайте больше на [thermofisher.com/CX7](https://www.thermofisher.com/CX7)



Цитокиновый профиль: иммунологическое тестирование

Цитокиновый профиль образцов является важной составляющей иммуноонкологического исследования, так как он используется для отслеживания синдрома выброса цитокинов (СВЦ) и эффективности самих CAR T-клеток. Многие пока неизвестно о высвобождающихся цитокинах, также как и об их происхождении. Проявление СВЦ является наиболее распространенным серьезным побочным эффектом в иммуноонкологической терапии. Кроме того, развитие СВЦ часто, но не всегда ассоциировано с клинически благоприятной опухолевой регрессией. Чем больше известно о цитокинах и о том, как их контролировать, тем больше может быть сделано для снижения негативных эффектов СВЦ при повышении их противоопухолевой эффективности.

Определение и количественная оценка белковых факторов из различных биологических образцов указывают на множество биологических и патологических явлений. ИФА и мультиплексные иммунологические тесты обычно используются для количественной оценки растворимых белков, таких как цитокины, хемокины, факторы роста и другие иммунологические маркеры.

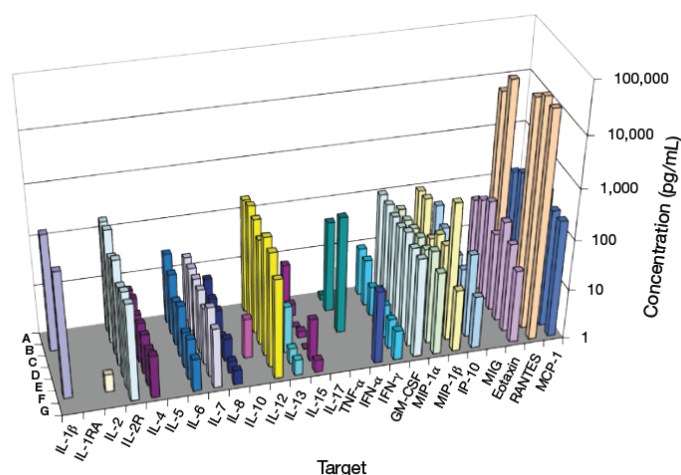


Рисунок 7. Семь индивидуальных образцов сыворотки были проанализированы с помощью панели Invitrogen™ Human Cytokine Magnetic 25-Plex Panel (Кат. № LHC0009M) для одновременного определения уровня 25 различных цитокинов и хемокинов. Измерения выполнялись с использованием системы Luminex™ 200.

ИФА и мультиплексные иммунологические тесты для платформы Luminex

Мультиплексные иммунологические тесты Invitrogen™, использующие технологию Luminex™ xMAP™, позволяют проводить одновременное измерение до 35 различных аналитов с использованием всего лишь 25-50 мкг образца за то же время, которое занимает выполнение ИФА (рисунок 7). Иммунологические и биологические сигнальные пути состоят из сети секретируемых белков, включающих цитокины, хемокины, факторы роста и другие белки. Мультиплексные иммунологические тесты — это эффективный, экономящий ваше время метод профилирования биомаркеров широкого ряда белков, содержащихся в малых образцах. В связи с этим, мультиплексные иммунологические тесты оказались бесценным инструментом для всеобъемлющего исследования биологических систем.

- **Быстрота** — количественная оценка белков за 3 часа с минимальными временными затратами на работу руками
- **Количественный тест** — количественная оценка до 35 белков одновременно
- **Простота** — так же просто работать, как и с ИФА
- **Расширение возможностей** — расширение или изменение вашего профиля биомаркеров для новых научных достижений

Узнайте больше о наших мультиплексных тестах для платформы

Luminex™ на thermofisher.com/ELISA

Получите больше информации на thermofisher.com/lifescience

ThermoFisher
SCIENTIFIC