REVIEW ARTICLE

Tumor Immunotherapy, History and Achievements

Fatemeh Pak[1],
Mahdieh Shokroallahi[1,2],
Mehdi Barati[1,2],
Parviz Kokhaei[1]

[1] Cancer Research Centre, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran
[2] Student Research Committee, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

(Received May 23, 2014 ; Accepted August 12, 2015)

Abstract

Cancer treatment is one of the main fields in basic and clinical research. Immunotherapy or using immune response is considered as one of the most important and effective complementary approaches in cancer therapy after surgery, chemotherapy and radiotherapy. In recent years many clinical trials have investigated this approach. The complications involved in immune response against a tumor calls for appropriate protocol in cancer immunotherapy. Direct and active immune response in cancer immunotherapy using components of the immune system such as stimulating the patient's own immune cells and injection of in vitro stimulated immune cells into the individual is called active immunotherapy. Applying the products of immune system, like monoclonal antibodies and cytokines is called passive immunotherapy. Another approach for cancer immunotherapy is based on the classification of components used in immunotherapy including cellular immunotherapy (DC, T cell and NK cell), monoclonal antibody, cytokine therapy, vaccines, and DNA-mediated immunotherapy using viruses and bacteria. New findings indicate that combination of immune therapies and chemotherapy could be more effective in cancer treatments. In this review a history of accomplishments in immunology and the future prospects of cancer treatment by immune system have been discussed.

Keywords: Cancer immunotherapy, cancer vaccines, Viruimmunotherapy

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(128): 123-146 (Persian).

مـــروری

مجـــلـــه دانـشـــگاه عـــلـــوم پـــزشـــکـــی مـــازنـــدران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۲۸ شهریور سال ۱۳۹۴ (۱۴۶-۱۲۳)

ایمونوتراپی تومور، تاریخچه و دست آورد ها

فاطمه پاک[1]
مهدیه شکراللهی[2,1]
مهدی براتی[2,1]
پرویز کوخایی[1]

چکیده

درمان سرطان یکی از مهم‌ترین حیطه‌های پژوهشی علوم پایه و بالینی در علوم پزشکی می‌باشد. ایمونوتراپی یا استفاده از سیستم ایمنی برای درمان، پس ازجراحی، شیمی درمانی و رادیوتراپی به عنوان مهم‌ترین روش مکمل و تاثیرگذار در درمان سرطان مطرح شده و امروزه کارآزمایی‌های بالینی وسیعی در انواع مختلف آن در حال انجام است. بررسی پیچیدگی برخورد سیستم ایمنی با تومور لازمه ارائه ی راهکار درمانی مناسب جهت ایمونوتراپی سرطان می‌باشد.

ایمونوتراپی سرطان در صورت به‌کارگیری مستقیم و پاسخ ایمنی فعال اجزای سیستم ایمنی مانند تحریک سلول‌های سیستم ایمنی بیمار و تزریق مجدد این سلول‌ها به خود فرد، ایمونوتراپی فعال (Active)؛ و در صورت تحریک غیر مستقیم و استفاده از محصولات ایمنی در جهت حذف آنتی‌ژن‌های توموری مانند آنتی‌بادی مونوکلونال، ایمونوتراپی غیر فعال (Passive) خوانده می‌شود. رویکرد دیگر در طبقه‌بندی روش‌های ایمونوتراپی سرطان بر پایه اجزای به کار گرفته شده در ایمونوتراپی می‌باشد که از این حیث می‌توان به روش‌های ایمونوتراپی سلولی(DC، T cell و NK cell)، آنتی‌بادی مونوکلونال، سایتوکاین تراپی، واکسن‌های DNA و ایمونوتراپی با واسطه ویروس‌ها و باکتری‌ها اشاره کرد.

نتایج به دست آمده از کارآزمایی‌های بالینی موید طراحی پروتوکل‌های ترکیبی (Combined therapy) و استفاده از روش‌های ترکیبی درمان سرطان است که عبارت از ترکیب انواع روش‌های ایمونوتراپی در کنار شیمی درمانی و یا ترکیب چند روش ایمونوتراپی در کنار یکدیگر است. در این مقاله ضمن مرور تاریخچه دستاوردهای علم ایمونولوژی، چشم انداز آینده درمان سرطان با ابزارهای حاصل از سیستم دفاعی بدن مورد بررسی قرار گرفته است.

واژه های کلیدی: ایمونوتراپی سرطان، واکسن های سرطان، ویروایمونوتراپی

مقدمه

در سال های اخیر سرطان یکی از عمده‌ترین دلایل مرگ و میر در جهان بوده است. این بیماری در بسیاری از جوامع بعد از بیماری‌های قلبی- عروقی رتبه نخست را از این نظر به خود اختصاص داده است. امروزه روش‌های درمانی متعددی در مهار سرطان به کار گرفته می‌شوند؛ بعد از جراحی، شیمی درمانی و رادیوتراپی، ایمونوتراپی در خط بعدی درمان قرار می‌گیرد. ایمونوتراپی یک روش اختصاصی است‌که برای حذف توده توموری و فعال‌سازی سیستم ایمنی فقط بر علیه سلول‌های توموری به‌کار گرفته می‌شود، در حالی که روش‌های درمانی دیگر با اثرات سوء جانبی برگشت‌پذیر و گاه غیرقابل بر گشت همراه هستند(۱). از این‌رو بسیاری از مراکز تحقیقاتی و

مولف مسئول: پرویز کوخایی- سمنان: دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سرطان E-mail:p_kokha@yahoo.com
۱. مرکز تحقیقات سرطان، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران
۲. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۳/۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۳/۳۱ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۵/۲۱

شرکت‌های بزرگ داروسازی جهان هزینه زیادی را برای روش‌های ایمونوتراپی و طراحی داروهای هدفمند علیه سرطان اختصاص داده‌اند. در به کارگیری سیستم ایمنی علیه سرطان، دو روش توصیف شده است: ۱.ایمونوتراپی فعال؛ و ۲. ایمونوتراپی غیرفعال، که تاثیر انفعالی این روش ممکن است پس از بهبودی فرد باعث ایجاد خاطره‌ی ایمنی شود(۲). طبقه‌بندی روش‌های ایمونوتراپی از چشم‌اندازی دیگر به اجزای به کار گرفته شده در ایمونوتراپی مربوط است. ایمونوتراپی یا با استفاده از سلول‌های سیستم ایمنی (شامل لنفوسیت‌های T، مونوسیت‌ها، سلول‌های دندریتیک، سلول‌های کشنده طبیعی و سایر سلول‌ها) و یا با استفاده از مولکول‌های اثرگذار سیستم ایمنی (شامل آنتی‌بادی مونوکلونال، سایتوکاین‌ها، میانجی‌های ایمونولوژیک فعال‌کننده سیستم ایمنی مانند سیستم کمپلمان، کموکاین‌ها و غیره) انجام می‌شود(۳). در یک طبقه‌بندی جدید سه نوع ایمونوتراپی مطرح می‌شود: ۱- ایمونوتراپی با واسطه باکتری‌ها که شامل استفاده از سوپر آنتی ژن‌های باکتریایی به عنوان ادجوانت و استفاده از CpG DNA است؛ ۲- ایمونوتراپی با واسطه مهندسی ژنتیک و انتقال ژن که در حیطه واکسن‌های DNA مورد استفاده در درمان سرطان باهدف تحریک سیستم ایمنی است و ۳- ایمونوتراپی با واسطه ویروس‌ها یا ویروایمونوتراپی که شامل استفاده از ویروس‌های انکولیتیک، RNA های دو رشته‌ای (dsRNAs) ویروسی تحریک‌کننده سیستم ایمنی و استفاده از virosome[1] و غیره است.

۱- تاریخچه ایمونوتراپی تومور

تشخیص و درمان سرطان از قدیم الایام یکی از مهم‌ترین دغدغه‌های پزشکان بوده است. بعد از انتشار اوّلین دست نوشته‌های بقراط در ۴۰۰ سال پیش از میلاد و نظریه‌های یونانیان باستان در مورد درمان سرطان، سند علمی معتبری مبنی بر روش قاطع درمان این بیماری معرفی نشد. با وجود این که امروزه شیمی درمانی و رادیوتراپی عمده‌ترین راه‌های درمان سرطان پس از جراحی به شمار می‌روند، روش‌های درمانی بر پایه تحریک سیستم ایمنی یا ایمونوتراپی، یکی از روش‌های درمانی در کنترل رشد سرطان پس از جراحی بوده است(۴). آن‌چه‌که امروزه به عنوان اوّلین گام به‌کارگیری ایمونوتراپی در درمان سرطان مشهور است، مربوط به اوّلین مقالات منتشر شده در سال ۱۸۹۱ مبتنی بر درمان سرطان با روش‌هایی غیر از جراحی و سوزاندن، حاصل مطالعات دکتر Coley بوده است. او اعتقاد داشت که تزریق باکتری زنده (بار نخست باکتری *استرپتوکوکوس پیوژنز*) به موضع تومور باعث کاهش اندازه و رشد توده تومور می‌شود. وی مطالعات خود را ابتدا از سرطان استخوان آغاز کرد و حدود چهل سال در مورد اثر عفونت باکتریایی بر درمان سرطان تحقیق نمود(۵). Coley به ۹۰۰ بیمار سرطانی، باکتری زنده یا محصولات باکتریایی[2] تزریق کرد. در آن زمان روش دکتر Coley مورد پذیرش همه قرار نگرفت ولی بعدها با پیشرفت علم و کشف نقش تحریک سیستم ایمنی در حذف سلول‌های سرطانی، به روشی که دکتر Coley در درمان سرطان به کار برده بود، ایمونوتراپی سرطان اطلاق شد و ایشان را بنیانگذار علم ایمونوتراپی نامیدند(۷،۶). با کشف واکسن‌ها و نقش توکسین‌های باکتریایی در ایمنی‌زایی، راهی برای درمان سرطان با استفاده از واکسن‌های باکتریایی باز شد که تا مدتی در صدر روش‌های درمانی قرار گرفت، به‌طوری‌که در سال ۱۹۰۰ این روش همراه با پرتوتابی روش قطعی درمان سرطان به شمار می‌رفت(۹،۸،۳). با وجود موفقیت‌های چشمگیر این روش در اوایل کاربرد آن، در ادامه موارد متعددی فوت بر اثر حساسیت و شوک ناشی از تزریق سم باکتری گزارش شد که باعث منسوخ شدن این روش در آن زمان گشت. مطالعات Paul Ehrlich در

۱. پوشش ویروسی فاقد ویرولانت فاکتور های ویروسی که به صورت هدفدار برای انتقال ژن و پروتئین مانند وزیکول و میسل عمل می کند.

۲. در آن زمان به موادی که دکتر کولی به بیماران تزریق می کرد، سموم Coley می گفتند.

سال‌های بعد نشان داد موادی در بدن وجود دارند که قادر به حذف سلول‌های سرطانی هستند. بعدها مشخص شد که منظور ارلیخ آنتی‌بادی‌ها و سلول‌های سیستم ایمنی بوده است(۱۰). Ralph M. Steinman (پدر ایمنی ذاتی) در سال ۱۹۷۳ با کشف سلول‌های دندریتیک (DC) خون محیطی دریچه جدیدی را در علم ایمونولوژی با توجه به نقش ایمنی ذاتی در مبارزه با پاتوژن‌ها و سلول‌های سرطانی گشود. نقش بارز این سلول‌ها در عرضه آنتی ژن وی را بر آن داشت تا از این سلول‌ها برای عرضه آنتی ژن توموری و ایجاد واکسن سلولی استفاده نماید. مراحل ابتدایی استفاده از DC علیه سرطان درمحیط کشت انجام شد و درسال ۲۰۰۰ اولین کارآزمایی بالینی روی ۱۰۳ بیمار به طور مستقل و همزمان با شیمی درمانی صورت گرفت(۱۲،۱۱). از سال ۲۰۰۰ به بعد نسل دوّم و سوّم واکسن‌های سلول‌های دندریتیک همراه با آنتی ژن، ادجوانت، سلول نکروتیک و یا سلول آپوپتوتیک مورد آزمایش قرار گرفت(۱۳). نتایج اوّلیه حاکی از آن بود که طراحی واکسن‌های سلولی در مجاورت با اجسام آپوپتوتیک پاسخ درمانی بهتری داشته است(۱۵،۱۴،۱۱،۳) کشف سلول‌های بدخیم میلومایی تولیدکننده آنتی‌بادی توسط Goerge Kohler در سال ۱۹۷۵ که منجر به طراحی پروتکل تولید آنتی‌بادی مونوکلونال شد انقلاب عظیمی در علم ایمونولوژی و کاربرد ایمونولوژی در درمان بیماری‌ها ایجاد کرد(۱۶). در سال ۱۹۸۲ اوّلین آنتی‌بادی مونوکلونال بر علیه لنفوم سلول B به طور موفقیت آمیز طراحی و ساخته شد و در سال ۱۹۸۶ استفاده درمانی آن برای سرطان‌های لنفوم توسط سازمان FDA مورد تایید قرار گرفت(۱۷). در سال ۱۹۹۰ تکنیک تهیه آنتی‌بادی مونوکلونال رسماً پایه‌گذاری شد(۱۸) و در سال ۱۹۹۷ برای درمان سرطان‌های لنفوم غیر هوچکین مورد تایید قرار گرفت. این آنتی‌بادی، آنتی CD20 بود که با نام تجاری Rituximab در بازار عرضه شد و اوّلین بار توسط شرکت داروسازی IDEC Pharmaceuticals به تولید انبوه رسید(۱۹). در سال ۱۹۸۸ با کلون کردن ژن CTLA4 توسط Dariavach مراحل تولید آنتی بادی مونوکلونال علیه این مارکر آغاز شد. در سال ۱۹۹۳ با کشف آنتی‌بادی‌های شتری و طراحی و تولید نانو آنتی‌بادی‌ها و تخلیص قطعات سبک و متغیر آنتی بادی‌های شتری، امید تازه ای برای به دست آوردن آنتی‌بادی‌های مورد نیاز در درمان سرطان و سایر بیماری‌ها حاصل شد(۲۰). همزمان در همان سال‌ها با تولید آنتی‌بادی‌های خوراکی در تخم‌مرغ و تهیه واکسن‌های خوراکی در سبزیجاتی مثل گوجه فرنگی و کاهو، ایمونوتراپی سرطان وارد فاز بیوتکنولوژی پیچیده‌ای شد که هنوز هم در مسیر مطالعات و آزمایش‌های اوّلیه قرار دارد(۲۱). در سال ۱۹۸۰ گروهی از محققین در انستیتو علوم Wiesmann در حال تولید سلول‌های هیبریدومای جدیدی برای تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال بودند که موفق به ارائه ایده‌ای در مورد تولید سلول‌های T کارا و اختصاصی آنتی‌ژن‌های توموری با استفاده از ویژگی‌های مناطق متغیر آنتی‌بادی شدند(۲۲). در این روش، سلول‌های T بر اساس Scfv[1] و TCR اختصاصی به صورت پلی‌کلونال یا مونوکلونال طراحی شدند(۲۳). تلاش‌های این گروه به رهبری Zelig Eshhar ادامه یافت تا جایی که آن‌ها در سال ۱۹۸۹ موفق به تولید اوّلین نسل از سلول‌های T مهندسی ژنتیک شدند که دارای گیرنده های اختصاصی با عنوان CAR[2] بودند(۲۴). علاوه بر لنفوسیت T و DC از سال ۲۰۱۰ تاکنون روی لنفوسیت B و نوتروفیل‌ها نیز به عنوان نامزد ایمونوتراپی سلولی مطالعاتی انجام شده است(۲۵). از سال ۱۹۸۰ با پیشرفت روش‌های کلونینگ و الکتروپوریشن در سلول‌های یوکاریوتی، طراحی پلازمید و انتخاب حامل مناسب، ساخت اوّلین واکسن‌های DNA پایه گذاری شد. در سال ۱۹۹۲ آزمایشگاه Harbor اعلام کرد که واکسن‌های DNA در به کارگیری سیستم ایمنی همورال و سلولی بسیار کار آمد هستند(۲۶). طراحی

1. Single-chain variable fragment
2. Chimeric antigen receptor

و گسترش DNA واکسن‌ها باعث پیشرفت و ایجاد نسل‌های جدیدی از واکسن‌های سلولی شد. از سال ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۳ این مطالعات وارد فاز جدیدی شدند و انتقال ژن‌های MHC و یا DNA مربوط به آنتی‌ژن‌های توموری به سلول‌های T و سلول‌های دندریتیکی عرضه‌کننده آنتی‌ژن در مواردی با موفقیت روبرو شد(۲۷). مدل آزمایشگاهی به کار گرفته شده در این مطالعات اکثراً سگ یا لمور بود که در حال حاضر نیز از این مدل ها استفاده می‌شود(۲۸). پس از کشف اینترلوکین ۲ و تاثیر ضد توموری آن در سال ۱۹۸۳ روی سایر سایتوکاین‌ها نیز مطالعاتی انجام شد. استفاده از سایتوکاین‌ها به عنوان ایمونوتراپی در واقع برای جبران اثرات زیانبار داروهای مورد استفاده در شیمی درمانی و رادیوتراپی، به منظور بازیابی سلول‌های بنیادی مغز استخوان و سلول‌های خونی بوده است. اوّلین سایتوکاین نوترکیب برای ساخت سلول‌های هماتوپویتیک مدل نوترکیب سایتوکاین GM-CSF بود که در سال ۱۹۹۰ با نام rhCSF[1] وارد بازار شد. TNF-α و اینترفرون گاما سایتوکاین‌های بعدی بودند که برای درمان سرطان مورد ارزیابی قرار گرفتند که البته به دلیل طیف وسیع پاسخ‌های فیزیولوژیک بدن در برابر این سایتوکاین‌ها، قطعیت استفاده از آن‌ها در هاله‌ای از ابهام قرار دارد(۲۹). FDA با توجه به سیستمیک بودن آثار سایتوکاین‌ها از جمله اینترلوکین‌های ۶،۷، ۱۲ و ۲۱ که امروزه در فازهای ۲ و ۳ کارآزمایی بالینی هستند و پاسخی که از مطالعات کارآزمایی بالینی در فاز۳ و۴ گرفته می‌شود، درمورد تایید استفاده‌ی دارویی آن‌ها تصمیم خواهد گرفت. یکی از جدیدترین مباحث در ایمونوتراپی سرطان استفاده از اجزای ویروسی در انتقال ژن یا موارد تحریک‌کننده‌ی سیستم ایمنی است. از سال ۲۰۰۷ تا کنون طراحی محصولات ویروسی مانند Virosome[2]، برای انتقال آنتی‌ژن یا سایتوکاین به محل تومور در صدر مطالعات روز ایمونوتراپی سرطان قرار دارد(۳۲- ۳۰).

1. recombinant hematopoietic Colony Stimulating Factor

۲. پوشش ویروس بدون آنتی ژن های بیماری زا به همراه محتوای ژنتیکی ویروس

۲- ایمونوتراپی با واسطه سلول های دندریتیک

آن چه که در مورد سلول‌های دندریتیک در دنیای علم بحث می‌شود، مرهون تلاش‌های علمی ایمونولوژیستی کانادایی به نام Ralph Steinman است. وی با کمک همکارانش دندریتیک سل را کشف کرد(۳۴،۳۳) و در سال ۲۰۱۱ به همراه Beutlerو Hoffmann به صورت مشترک به خاطر این کشف و کاربرد آن در درمان سرطان شایسته دریافت جایزه نوبل در شاخه فیزیولوژی و علوم پزشکی شناخته شد(۳۵). Steinman خود از جمله بیمارانی بود که به علت درمان با این سلول ها چندین سال در مقابل سرطان پانکراس مقاومت کرد اما در نهایت مغلوب سرطان پانکراس شد و دو روز قبل از دریافت جایزه نوبل درگذشت و جایزه مذکور به نیابت به همسر ایشان اهدا شد(۱۱). فکر و ایده ی این دانشمند فقید توسعه پیدا کرد به طوری که امروزه شاهد تجاری شدن یکی از محصولات دندریتیک سلی به نام دندریون (Dendreon®) علیه سرطان پروستات هستیم. این پروژه در سال ۲۰۰۰ وارد کارآزمایی‌های بالینی شد(۳۶)، در سال ۲۰۰۶ به طراحی و ساخت انجامید، در سال ۲۰۱۰ به تایید FDA رسید و در حال حاضر در درمان سرطان پروستات از آن استفاده می شود(۳۸،۳۷). مطالعات در مورد استفاده از سلول‌های دندریتیک جهت ایمونوتراپی پیشرفت چشمگیری داشته است به طوری که تنها ۲۸۹ کارآزمایی بالینی در سال ۲۰۱۳ در مورد واکسن‌های دندریتیک سلی به ثبت رسیده و در حال حاضر نیز درحال انجام است(۳۹).

پس از کشف دندریتیک سل توسط Steinman و گروه تحقیقاتی اش در سال ۱۹۷۳، همین گروه شروع به مطالعه روی استخراج و بلوغ این سلول‌ها کرد به طوری که در مراحل بعدی سلول‌های دندریتیکی فولیکولار(۴۰) و لنفوئیدی(۴۱) شناسایی شدند. بعد از مدتی نقش اصلی سلول‌های دندریتیک کشف و محدودیت MHC و عرضه‌ی آنتی ژن توسط این سلول‌ها به لنفوسیت های T مطرح شد(۴۲). در نسل اوّل واکسن‌های دندریتیک سلی

سلول‌ها بدون طی فرآیند حساس‌سازی طراحی شدند و علت این امر کشف نشدن TLR[1] ها و PRR[2] و نقش الگوهای PAMP[3] در فعال‌سازی سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن در آن زمان بود. پس از معرفی PRR ها در سال ۱۹۸۹ توسط Janeway(۴۳) و TLRها در سال ۱۹۹۶ توسط Hoffmann (۴۴)، برای حساس کردن این سلول‌ها (maturation یا بلوغ دندریتیک سل‌ها) از ایمونوژن‌های قوی مانند LPS,BCG، TNF-α، poly I:C[4]، poly[5] ICLC و غیره استفاده شد و سلول‌های دندریتیک بین ۲۴ تا ۴۸ ساعت پس از مواجهه با این ادجوانت ها به فرم بالغ و فعال تبدیل شدند تا از پاسخ‌های تنظیمی یا خودایمنی جلوگیری شود(۴۷-۴۵). بعد از حساس‌سازی یا بلوغ سلول دندریتیک این سلول‌ها باید توانگر یا باردار شوند تا سلولی حاصل شود که بهترین و کاراترین آنتی ژن را با قدرت القای بالا به لنفوسیت T عرضه کند(۱۴،۱۱). اوّلین آزمایش‌ها بر اساس مواجهه مستقیم سلول توموری با دندریتیک سل بود. تجربه فیوژن سلول توموری با سلول دندریتیکی در سال ۲۰۰۰ نتایج قابل توجهی در مدل موشی و نمونه‌های انسانی داشت؛ به این سلول‌ها، دندریتیک سل‌های فیوژنی نیز گفته می‌شد (۴۹،۴۸).

۲-۱. *Whole tumor antigen presenting dendritic cells* (۵۰)

نسل اوّل واکسن‌های دندریتیک سلی بر اساس مواجهه مستقیم سلول سرطانی با دندریتیک سل طراحی و با عنوان واکسن‌های فعال یا فیوژن معرفی شدند(۴۹،۴۸). در این واکسن‌ها سلول‌های دندریتیک همراه با آنتی ژن‌های توموری، با آنتی‌ژن‌های خودی سلول‌های سرطانی نیز مواجه می‌شدند و بروز موارد پاسخ به خودی غیر قابل اجتناب بود(۵۱). علاوه بر این، تنوع آنتی‌ژن‌های توموری و هم‌چنین غیرقابل دسترس بودن بعضی سلول‌های سرطانی فرد بیمار برای جراحی یا شناسایی توسط سیستم ایمنی از مشکلات دیگر این روش محسوب می‌شد. این روش بیش‌تر برای لوسمی‌ها یا موارد قابل جراحی انجام پذیر بود(۵۲).

استفاده از سلول‌های لیز شده توموری در محیط کشت

دندریتیک سل‌های مشتق شده از مونوسیت‌ها پس از تمایز و بلوغ در محیط کشت مورد مواجهه با لایزت (lysate) سلول‌های توموری قرار می‌گیرند(۵۳). در in vitro میزان تکثیر سلول‌های T در مواجهه با سلول‌های دندریتیک باردار شده و فعال مورد بررسی قرار می‌گیرد(۵۴). در in vivo، در مدل آزمایشگاهی تغییر سایز و وزن تومور در موش مبتلا به سرطان ارزیابی می‌شود و در مطالعات کارآزمایی بالینی مرحله‌ی ۱ تعداد سلول‌های توموری یا سایز تومور و تغییر سرعت پیشرفت بیماری بررسی می‌گردد(۵۵). مطالعات نشان می‌دهند که استفاده از سلول‌های آپوپتوتیک توموری در مقایسه با لایزت سلولی در بیماران CLL نتایج بهتری دارد که حاکی از برتری سلول‌های آپوپتوتیک در فعال کردن سلول‌های دندریتیک نسبت به لایزت سلولی بوده است(۵۷،۵۶،۴۷).

۲-۲ : *Peptide-loaded dendritic cells*

در این روش، دندریتیک سل‌ها پس از بلوغ، در محیط کشت با پپتیدهای آنتی‌ژن تخلیص شده یا نوترکیب، مواجه می‌شوند. دندریتیک سل‌ها این پپتیدها را بلعیده و در سطح خود در شیار MHCII یا MHCI بیان می‌کنند. اساس این تکنیک روی استفاده از آنتی‌ژن‌های مرتبط با تومور TAA (Tumor Associated Antigen) استوار است. این آنتی‌ژن‌ها یا تخلیص می‌شوند یا به صورت نوترکیب تهیه شده و یا پپتید خاصی از آن‌ها ساخته شده و ارائه می‌شود(۵۷-۵۹). تاثیر پپتید ارائه شده به دندریتیک سل از لحاظ ایمونوژنیسیته و کارایی دندریتیک سل تولید شده، با بررسی مکانیسم‌های بهبود اتصال پپتید به MHC (۶۰)، افزایش پایداری و اتصال پپتید به MHC، (۶۱) کاهش دایمریزاسیون(۶۲) و افزایش هدف‌گیری گیرنده T cell (۶۳) مورد سنجش قرار می‌گیرد.

1. Toll like receptor
2. Pattern recognition receptor
3. Pathogen-associated molecular pattern
4. Poly inosininic acid, Cytidylic acid
5. Poly inosininic acid, Cytidylic acid and poly-L-lysine double-stranded RNA

۲-۳: mRNA transfected dendritic cell

در این روش mRNA پپتید آنتی‌ژنی با واسطه وکتور خاصی به دندریتیک سل انتقال داده می‌شود(۶۵،۶۴). در این روش mRNA آنتی‌ژن‌های توموری مانند CEA (Carcinogen Embryonic Antigen) و آنتی‌ژن‌های توموری ویروسی مانند HPV (عامل سرطان دهانه رحم) به سلول دندریتیکی انتقال داده می شوند. این mRNA در سیتوپلاسم دندریتیک سل به یک پپتید ترجمه شده و در سطح سلول توسط سیستم MHC عرضه می گردد. شواهد نشان می‌دهد که کارایی الکتروپوریشن mRNA بسیار بیشتر از انتقال DNA در عرضه پپتید آنتی‌ژن بوده است(۶۶). ویروس‌هایی که در باردار کردن سلول‌های دندریتیک به کار می‌روند حاوی پپتید یا cDNA پپتید مورد نظر هستند و یا خود mRNA مورد نظر را دارند. به عنوان مثال، از این ویروس‌ها می‌توان به Retroviruses، Lentiviruses، Adenoviruses و Fowlpox اشاره کرد(۶۷).

۳- ایمونوتراپی با استفاده از سلول های T

یکی از مهم‌ترین انواع ایمونوتراپی اقتباسی یا Adoptive[1] سرطان، استفاده از لنفوسیت‌های T کشنده در درمان اختصاصی سرطان است. Adoptive T-cell transfer cancer immunotherapy مهم‌ترین ایمونوتراپی با واسطه سلول‌های سیستم ایمنی اکتسابی است که اختصاراً Adoptive cell transfer (ACT) نامیده می‌شود(۶۸). اساس این روش استفاده از لنفوسیت‌های T اتولوگ توانگر علیه تومور است. پاسخ سلول‌های T وابسته به مجموعه‌ی سازگاری نسجی (MHC) است. مهم‌ترین جمعیت سلول‌های T که در برابر سلول‌های توموری فعال می‌شوند سلول‌های T کشنده هستند(۶۹). فعالیت لنفوسیت‌های T کشنده یا CTL (Cytotoxic T Lymphocyte)ها محدود به MHC I و آنتی ژن عرضه شده در کنار این مولکول‌ها در سطح تمام سلول‌ها است(۷۰).

در ایمونوتراپی تومور با واسطه لنفوسیت‌های T، لنفوسیت‌هایی که به داخل توده توموری نفوذ کرده اند یا TIL (Tumor Infiltrated Lympocyte) اهمیت فوق‌العاده‌ای دارند. در اوّلین ایمونوتراپی‌های انجام شده با استفاده از سلول‌های T، سلول‌های TIL از توده توموری بیمار خارج و در محیط آزمایشگاهی فعال و به بیمار تزریق می‌شدند. این سلول‌ها معمولاً به آنتی‌ژن‌های مربوط به تومور یا TAA (Tumor Associated Antigen) پاسخ اختصاصی می‌دهند. اولین TAAهایی که شناسایی شدند، آنتی‌ژن‌های ملانومایی بودند (MART1، تیروزیناز و gp100) (۷۲،۷۱). اوّلین کارآزمایی بالینی روی TCR محدود به MHC برای ژن MART-1 با واسطه HLA-A2 در بیماران ملانومایی انجام شد(۷۴،۷۳). این روش معایبی داشت که دانشمندان را وادار به استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک و طراحی سلول‌های T مهندسی شده برای ایمونوتراپی سرطان کرد(۷۵).

سلول‌های T برای فعال شدن به سه پیام نیاز دارند. پیام اوّل در اثر اتصال پپتید آنتی ژنی ارائه شده در کنار MHCI به گیرنده‌ی TCR ایجاد می‌شود. در این حالت کمپلکس CD3 فسفریله شده و مسیرهای سیگنالی داخل سلولی منجر به تولید IL-2 می‌شود. پیام دوّم به واسطه واکنش بین کمک محرک‌ها صورت می گیرد و اصلی ترین میانکنشی که در این مسیر انتقال پیام رخ می‌دهد اتصال CD8 به MHCI است. در ادامه به ترتیب CD28، CD137، ICOS و CD134 به CD80/86، CD137L، CD275 و OX40L متصل شده و باعث راه‌اندازی سیگنال‌های داخل سلولی می‌شوند که در تداوم بقا و تولید سایتوکاین‌های سلول T نقش دارند. پیام سوّم مربوط به گیرنده سایتوکاینی است که در اثر اتصال سایتوکاین فعال‌شده و منجر به راه اندازی مسیرهای پیام‌رسانی اختصاصی‌تر می‌شود(۷۶). از آن‌جا که راه‌اندازی هر سه پیام در سلول T وابسته به حضور سلول عرضه‌کننده آنتی‌ژن است و یکی از بارزترین مکانیسم‌های فرار سلول‌های توموری از سیستم ایمنی نیز کاهش بیان

1. Adoptive cell cancer immunotherapy

MHC I در سطح سلول است، پس سلول مورد استفاده در ایمونوتراپی باید هر سه پیام را خود به تنهایی داشته باشد، لذا به گیرنده‌ای نیاز دارد که دومین‌هایش توانایی راه‌اندازی هر سه پیام را داشته باشند(۷۷).

سلول‌های دست ورزی شده دارای گیرنده منحصر به فرد هستند. گیرنده‌های سلول‌های T که به آنتی ژن‌های TAA پاسخ می‌دهند می‌توانند از خود بیمار (انتخاب کلون شایع سلول T برای آنتی‌ژن اختصاصی) و یا موش انتخاب شوند و یا با تکنیک‌های بیولوژی مولکولی و مهندسی ژنتیک ایجاد شوند(۷۸). به گیرنده‌های مشتق شده از نواحی متغیر آنتی‌بادی و کلون شده اصطلاحا CAR (Chimeric Antigen Receptor) می گویند(۲۴). سلول‌های T با گیرنده‌ی CAR به طور مستقل از MHC عمل می کنند. CAR دارای اسکلتی از TCR است که دست ورزی شده است. CAR شامل سه دومین است. دومین خارج سلولی که از قطعه کوچک متغیر زنجیره آنتی بادی انسانی (scFv) تشکیل شده است. این قسمت از گیرنده‌های اختصاصی لنفوسیت‌های B فعال شده ضد آنتی‌ژن‌های توموری TAA جدا شده و ممکن است موشی یا Humanized باشد. این دومین با یک ساختار حلقه مانند توسط یک دومین درون غشایی به دومین درون سلولی که توالی آمینو اسیدی مربوط به کمپلکس CD3ζ در آن کد شده متصل است(۷۹-۸۱). این ساختار مربوط به نسل اوّل سلول‌های طراحی شده با CAR است. عمر و فعالیت این سلول‌ها بسیار پایین است و کارایی کم‌تری دارند. برای پایداری و افزایش فعالیت سلول T سیگنال دوّم و سوّم نیز باید در آن فعال شوند و چون CAR ها مستقل از MHC عمل می کنند موارد بعدی نیز باید از طریق مهندسی ژنتیک اعمال شوند. در نسل دوّم CAR هایی طراحی شدند که نقص مربوط به سیگنال کمک محرک‌ها به خصوص کمک محرک اصلی CD28 در آن‌ها برطرف شدند. به این‌منظور دومین مربوط به CD28 که فسفریلاسیون آن باعث القای پیام داخل سلولی می‌شود در انتهای دومین درون غشایی قرار گرفت تا همزمان با فعال شدن کمپلکس CD3 این دومین نیز فعال شود. این دومین می‌تواند از دومین‌های فعال‌کننده سایر کمک محرک‌ها مانند CD27، CD134، ICOS و LCK نیز باشد(۸۴-۸۲). نتایج اعمال این تغییرات حاکی از افزایش کارایی و بقای سلول T به خاطر وجود دومین تغییر یافته‌ی حاوی منطقه‌ی القای پیام کمک محرک بود(۸۴).

در نسل سوّم این سلول‌ها، نقص کمبود مسیر پیام رسانی سوّم جبران شد و دومین‌های تیروزین کینازی که در پایین دست مسیر سیگنالی گیرنده‌ی سایتوکاینی فعال می‌شدند در ساختار CAR طراحی شده قرار گرفت. دومین مزبور حاوی سکانسی از تیروزین کیناز ها یا گیرنده‌های سایتوکاینی خاص مانند دومین ZAP70، TRAF1، PI3K، CD137، GRB2 و غیره بود(۸۵،۸۶).

۴. ایمونوتراپی با واسطه سلول‌های NKT (Natural Killer T cells):

در سال ۱۹۸۷ دو گروه به صورت مستقل یک جمعیت جدید از سلول‌های T را کشف کردند. این سلول‌ها دو نوع هستند: سلول‌های NKT I و NKT II. سلول‌های نوع ۱ به iNKT (invariant NKT) مشهورند و به آن‌ها NKTهای کلاسیک گفته می‌شود(۸۷). گیرنده TCR این سلول‌ها به میزان کمی متغیر بوده و در فرآیندهای التهابی، عفونت‌های ویروسی و حذف سلول‌های توموری نقش بارزی دارند. سلول‌های نوع ۲ به vNKT (variant NKT) یا NKTهای غیر کلاسیک مشهورند که به نوعی آنتاگونیست سلول‌های نوع ۱ هستند و سیستم ایمنی را تنظیم می کنند. این سلول‌ها در ایمنی تومور نقش منفی داشته و سیستم ایمنی را مهار می کنند(۸۸). در این مطالعه تاکید روی سلول‌های iNKT و مسیرهای فعالیت و ایمونوتراپی آن است. در سال ۲۰۰۸ گروه Dhodapkar گزارش دادند که لیزوفسفوپپتیدیل کولین (LPC) استخراج شده از بیماران میلومایی باعث افزایش ترشح IL-13 ازسلول‌های T محدود به CD1d می‌شود(۸۹).

در ادامه در مطالعه‌ای مستقل در آزمایشگاه Gumperz اثبات شد که LPC به تنهایی باعث افزایش کلون‌های iNKT می‌شود. این مطالب نشان دهنده اختصاصیت این سلول‌ها در پاسخ به آنتی ژن‌های لیپیدی و گلیکو لیپیدی درون‌زاد (مانندGPI[1]، GD3[2] وGP[3]) و برون‌زاد است(۹۳-۹۰). امروزه مشخص شده است که آلفا گالاکتورونوسیل سرامید (α-GalA-Cer) با نام تجاری KRN7000 (۹۴) و آلفا گلوکورونیل سرامید (α-GlcA-Cer) (۹۵) قادر به تحریک تولید سایتوکاین اینترفرون گاما از سلول های iNKT هستند(۹۶). آگونیست دیگری که سلول‌های iNKT را تحریک می‌کند بتا مانوزیل سرامید (β-Man-Cer) است که باعث فعال شدن مسیرهای اکسیداتیو(NOS[4]) در سلول iNKT شده و در ادامه TNF-α آزاد می‌شود(۹۷). مطالعات ثابت کرده‌اند که فعال شدن iNKT با آلفا گالاکتوزیل سرامید باعث مهار متاستاز سلول‌های توموری می‌شود(۹۸). در واقع آلفا گالاکتوزیل سرآمید اساس ایمونوتراپی سلول iNKT است.

۵. ایمونوتراپی با واسطه DNA واکسن ها

واکسن‌های DNA یکی از جدیدترین روش‌های واکسیناسیون مولکولی یا ژنتیکی در پیشگیری از بیماری‌ها هستند. کنترل و مدیریت واکسن‌های DNA در درمان سرطان به سهولت سایر روش‌های ایمونوتراپی نیست اما در صورت طراحی و اجرای مناسب یکی از اختصاصی‌ترین روش‌های ایمونوتراپی سرطان محسوب می‌شود. مطالعات نشان داده است که تزریق مستقیم پلازمید DNA به داخل ماهیچه افزایش بیان طولانی مدت ژن مورد نظر را در پی دارد(۹۹). پدیده ایمنی‌زایی علیه تومور مبتنی بر از بین بردن تولرانس سیستم ایمنی علیه سلول‌های توموری است. طراحی واکسن‌های DNA علیه ترکیبات محیط اطراف تومور (TME)[5]و سلول‌های مهارکننده سیستم ایمنی مانندMDSC، Treg، ماکروفاژهای توموری (TAM)[6] و فیبروبلاست‌های مرتبط با سرطان (CAF)[7] از مهمترین اهداف طراحی واکسن‌های DNA می‌باشند(۱۰۰). واکسن‌های DNA وارد شونده به ژنوم از تشکیل پاسخ‌های ضد DNA سیستم ایمنی فرار می‌کنند. از طرف دیگر، در صورت عدم دخول دقیق واکسن DNA به ژنوم، احتمال جهش و نقص‌های ژنتیکی و کروموزومی وجود دارد. بنابراین، احتمال پاسخ‌های ضد DNA سیستم ایمنی و احتمال ایجاد خود ایمنی یکی از مواردی است که در کارآزمایی‌های بالینی به آن دقت می‌شود(۱۰۱). مدل‌های حیوانی مناسب برای مطالعات واکسن‌های DNA سگ، خوک، میمون، شامپانزه و موش هستند(۱۰۲).

در طراحی واکسن DNA باید به موارد زیر توجه کرد: سهولت طراحی محتوای واکسن DNA با روش‌های بیوانفورماتیک و سهولت سنتز آن با روش PCR، اطمینان از مکانیسم‌های بیان ژن در سلول هدف، سهولت روش تزریق و انتقال ژن به سلول هدف، انتخاب وکتور مناسب، سهولت تولید سریع و انبوه آن، بدون خطر و غیر پاتوژن بودن در محیط In vivo، پایداری در محیط و ایمنی زایی بالا در سلول‌های هدف(۱۰۳). واکسن‌های DNA باعث افزایش عرضه‌ی آنتی‌ژن به سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن شده و در ادامه پاسخ‌های سلول‌های T کمکی را تقویت می‌کنند. این پاسخ‌ها باعث افزایش فعالیت سلول‌های T کشنده می‌شود. نسل‌های جدید واکسن‌های DNA از طرفی باعث افزایش کموتاکسی و ایمنی عمومی بدن نسبت به تومور می‌شوند و از طرف دیگر مسیرهای سیگنالی مهارکننده سیستم ایمنی در شرایط تومور را مسدود می‌کنند(۲۷).

طراحی وکتور و مهندسی ژنتیک

در طراحی واکسن‌های DNA نوع وکتور یا حامل انتقال دهنده‌ی ژن در کارایی و افزایش احتمال انتقال ژن اهمیت بالایی دارد.

1. Glyco phosphatidyl inositol
2. Gangliosid3
3. Glyco phospholipid
4. Nitric Oxide Synthesis
5. Tumor Micro Environment
6. Tumor Associated Macrophage
7. Cancer Associated of Fibroblast

۶. ایمونوتراپی با واسطه سایتوکاین ها

اوّلین مطالعات انجام شده روی سایتوکاین‌ها که البته در آن زمان به این نام شناخته نمی شدند مربوط به کشف اینترلوکین ۱، فاکتور رشد عصبی و اینترفرون‌ها در سال‌های ۱۹۵۰ تا ۱۹۵۵ است(۱۰۴). در ادامه در سال ۱۹۶۰ مواد محلول آزاد شده از لنفوسیت‌ها را لنفوکاین(۱۰۵) نامیدند و بعدها با گسترده شدن طیف سلول‌های تولید کننده این مولکول‌ها و مولکول‌های مشابه ۵ تا ۲۰ کیلودالتونی، سایتوکاین‌ها مطرح شدند(۱۰۶). در محیط اطراف تومور سایتوکاین‌ها نقش اساسی و سرنوشت‌سازی در سیر بدخیمی تومور، مهار رشد یا القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی، تهاجم یا متاستاز و آنژیوژنز در توده‌ی تومور دارند(۱۰۷). در بررسی سایتوکاین‌ها و نقش آن ها در درمان سرطان دو دسته‌بندی مطرح است: سایتوکاین‌های درمانی و سایتوکاین های خونساز(۱۰۸).

سایتوکاین های درمانی

این سایتوکاین‌ها شامل مواردی هستند که تزریق آن‌ها به بیمار باعث تقویت سیستم ایمنی ذاتی یا اکتسابی در مواجهه با سلول‌های توموری می‌شوند. اغلب این سایتوکاین‌ها به طور طبیعی در بدن از سلول‌های T ترشح می‌شوند و تزریق سیستمیک آن‌ها به بیمار باعث راه‌اندازی مسیرهای کمک تحریکی سلول‌های T کمکی یا سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن می گردد(۱۰۹).

اینترفرون‌های نوع I

تمام اینترفرون‌های نوع I کمپلکس رسپتوری یکسانی دارند (INF-αR1, INF-αR2). IFNα و IFNβ خانواده‌ای را تشکیل می‌دهند که درمجموع از ۲۰ مولکلول پروتئینی مجزا تشکیل شده‌اند و بر اساس توانایی فعال‌سازی رسپتورهای اینترفرون نوع I دسته بندی می‌شوند. در حال حاضر تنها مورد تایید شده‌ی کابرد اینترفرون آلفا در درمان سرطان به عنوان دارو که با هدف ادجوانت درمانی به کار گرفته می‌شود در بیماران با رتبه‌ی ۲ به بالای سرطان ملانوما است(۱۱۰).

اینترفرون های نوع II

اینترفرون گاما (IFN-γ) مشهورترین سایتوکاین فعال‌کننده سلول‌های T کمکی و سلول‌های عرضه‌کننده آنتی ژن است که نقش آن در ایمنی اکتسابی و ذاتی در سال ۱۹۶۵ کشف شد(۱۱۱). اوّلین کارآزمایی بالینی در مورد این سایتوکاین مربوط به سال ۱۹۸۶ است(۱۱۲). مشهورترین اینترفرون گامای نوترکیب که در بسیاری از بیماری‌ها به خصوص CGD[1] مورد استفاده قرار می گیرد Actimmune® نام دارد که استفاده از آن در درمان سرطان امروزه در مراحل مختلف کارآزمایی بالینی است(۱۱۳).

اینترلوکین ۲

اینترلوکین ۲ از خانواده ی سایتوکاین های مرتبط با اینترلوکین ۲ و فاکتورهای رشد سلول T است که روی سلول‌های TCD4+، TCD8+ و NKcell ها اثر می گذارد. این سایتوکاین بیش‌تر به صورت پاراکراین و اتوکراین عمل می کند(۱۱۴). اثر این سایتوکاین در درمان کارسینوم ملانوما به اثبات رسیده است. تزریق دوز بالای آن در ۱۵ تا ۲۰ درصد از بیمارانی که در مرحله‌ی پیشرفته‌ی ملانوما بودند تاثیر گذار بوده است. این سیتوکاین تاثیرات ضد آنژیوژنیک و ضد التهابی دارد(۱۱۵).

اینترلوکین ۷

اینترلوکین ۷ از سایتوکاین‌های فعال کننده رده لنفوئیدی بوده و از خانواده سایتوکاین‌های مرتبط با اینترلوکین ۲ است. نتایج مراحل اوّلیه کارآزمایی بالینی نشان می‌دهد که اینترلوکین ۷ با دوزی محدود باعث افزایش جمعیت سلول‌های CD4+ و CD8+ خون محیطی شده و تعداد سلول‌های T تنظیمی را در توده‌ی تومور کاهش می‌دهد و از این رو به طور بالقوه دارای آثار ضد توموری گسترده است(۱۱۶).

1. Chronic granulomatous disease

اینترلوکین ۱۵

این سایتوکاین نیز از خانواده سایتوکاین‌های مشابه اینترلوکین ۲ است که موجب حفظ عملکرد لنفوسیت‌های فعال شده و باعث طولانی شدن و بقای سلول‌های خاطره CD8+ می‌شود. این سایتوکاین در مرحله اوّل کارآزمایی بالینی هم در Invitro و هم در Invivo موفق بوده و برنامه‌ریزی‌هایی برای گسترش استفاده از آن در قالب درمان‌های سلولی انجام شده است(۱۱۷).

سایتوکاین های خونساز

این سایتوکاین‌ها اثر مستقیم در ایمونوتراپی سرطان ندارند و برای جبران آثار منفی شیمی درمانی و رادیوتراپی که باعث از بین رفتن سلول‌های بنیادی مغز استخوان بیمار شده است، مورد استفاده قرار می گیرند. از سال ۱۹۸۸ استفاده از این سایتوکاین‌ها در افزایش سلول‌های خونساز کاربرد درمانی داشت(۱۱۸). امروزه سایتوکاین‌های مهمی که به این منظور استفاده می‌شوند عبارتند از: GM-CSF، G-CSF، M-CSF و اینترلوکین ۷.

از بین این سایتوکاین ها، GM-CSF از همه مشهورتر بوده و اثرات ضد توموری نیز دارد. این سایتوکاین در تمایز دندریتیک سل‌ها در محیط کشت و نیز افزایش آن در خون محیطی نقش مهمی دارد و به طور کلی باعث افزایش مکانیسم های ضد توموری می‌شود(۱۱۹). FDA استفاده از GM-CSF نوترکیب را برای درمان نوتروپنی حاصل از شیمی درمانی تایید کرده است و امروزه به عنوان یکی از داروهای اساسی در درمان نوتروپنی بعد از شیمی درمانی تجویز می‌شود(۱۲۰).

استراتژی های مهار سایتوکاین‌ها

برخی از سایتوکاین‌ها در سرطان پروتوموری یا توموروژنیک هستند یا این که مانع از فعالیت های ضد توموری سیستم ایمنی می‌شوند. این سایتوکاین‌ها مترشحه از سلول‌های T تنظیمی مانند اینترلوکین ۱۰ و TGF-β (۱۲۱) هستند و یا این که مربوط به سلول های میلوئیدی مهاری (MDSC)(۱۲۲)و یا سلول های TH2 هستند (مانند اینترلوکین ۴ و اینترلوکین 13)(۱۲۳). سایتوکاین‌های TH17 مانند اینترلوکین 17A و اینترلوکین 17B اثر دوگانه‌ای دارند و مشخص نیست چه زمانی باعث حذف تومور می‌شوند و چه زمانی باعث تحریک متاستاز و آنژیوژنز می گردند(۱۲۴). برخی از سایتوکاین‌های التهابی مانند اینترلوکین ۶ نیز از جمله این سایتوکاین‌ها هستند(۱۰۷).

استراتژی های استفاده از سایتوکاین در درمان سرطان

تاکنون روش‌های متعددی برای درمان سرطان با استفاده از سایتوکاین پیشنهاد شده است که به طور اجمالی عبارتند از:

- تزریق سیستمیک سایتوکاین به صورت داخل وریدی
- تزریق منطقه‌ای سایتوکاین به صورت جلدی یا داخل توده توموری
- فیوژن سایتوکاین با آنتی‌بادی مونوکلونال (ایمونوسایتوکاین)
- فیوژن سایتوکاین با ترکیبات شیمیایی مانند پلی‌اتیلن گلیکول (PEGylation)
- مهندسی ژنتیک سلول های سیستم ایمنی (واکسن‌های سلولی و ACT)
- استفاده از ویروس های نوترکیب حامل ژن سایتوکاین (Ricombinant Viruses as Delivery system)

آنتی بادی مونوکلونال

پیشنهاد استفاده از آنتی‌بادی‌ها در درمان سرطان را اوّلین بار پاول ارلیش در حدود یک قرن پیش ارائه داد. در آن زمان ارلیش نام گلوله آتشین (Magische Kugel) را بر روی آنتی‌بادی‌ها گذاشت، چون تصور می‌شد آنتی‌بادی توانایی حمل مواد توکسیک و عناصر رادیواکتیو به بافت‌های اختصاصی را دارد(۱۲۵). در آن زمان از سلول‌های هیبریدومای موشی برای تولید آنتی بادی‌های مونوکلونال استفاده می‌شد که سبب افزایش ایمونوژنیسیته این آنتی‌بادی‌ها می‌شده است. با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک تغییراتی در ساختار آنتی‌بادی‌ها انجام

شد که منجر به تولید آنتی‌بادی‌های کایمریک با ساختاری نیمی انسانی- نیمی موشی و در ادامه تماماً انسانی شد که تا حدودی مشکلات کاربردی این آنتی‌بادی‌ها را برطرف نمود(۱۲۶). در طی یک دهه گذشته میزان استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال در درمان سرطان به خاطر اثر بخشی مطلوب این داروها افزایش یافته است(۱۲۷). آنتی‌بادی‌ها می‌توانند گیرنده رشد (HER2)را بر روی سلول سرطانی شناسایی کرده و آن را مهار کنند (جدول شماره ۱). از طرفی می‌توان این آنتی‌بادی‌ها را با مواد رادیواکتیو یا مواد توکسیک کونژوگه کرد تا از این طریق بتوان به صورت کاملاً اختصاصی و با کم‌ترین اثر جانبی سلول هدف را از بین برد. بعضی آنتی‌بادی‌ها از طریق ممانعت فضایی برای اتصال لیگاند به گیرنده و در نتیجه ممانعت از انتقال سیگنال عمل می‌کنند مانند Trastuzumab (اتصال به گیرنده HER2) و بعضی از طریق ممانعت از تشکیل دایمر یا شکل کامل رسپتور (Cetuximab در گیرنده HER2). بعضی آنتی‌بادی‌های مورد استفاده در ایمونوتراپی، ریز محیط اطراف تومور را مورد هدف قرار می‌دهند. برای مثال، Bevacizumab یک آنتی‌بادی علیه فاکتور رشد اندوتلیال عروقی(VEGF) می‌باشد که فعالیت رگ‌زایی این فاکتور رشد را در ریز محیط توموری مهار می‌کند(۱۲۸).

به طور کلی آنتی‌بادی‌ها از سه طریق میانجی پاسخ ایمنی بر اهداف ایمونولوژیک هستند:

۱- سایتوتوکسیسیتی وابسته به آنتی‌بادی (ADCC)؛ برای مثال Retuximab

۲- سایتوتوکسیستی وابسته به کمپلمان(CDC)؛ برای مثال Alemtuzumab(آنتی بادی علیه CD-52)

۳- القا پاسخ ایمنی از طریق عرضه متقاطع (Cross priming).

اثر بخشی ایمونوتراپی با آنتی‌بادی‌ها را می‌توان با تلفیق این مواد با راه کارهایی مانند شیمی درمانی، رادیوتراپی، واکسن‌ها و محرک‌های ایمنی به میزان زیادی بهبود بخشید. ترکیب فولفیری (FOLFIRI) با Bevacizumab در مقایسه با استفاده منفرد از شیمی درمانی می‌تواند زمان بقا را به بیش‌تر از چند ماه افزایش دهد. به طور مشابه استفاده از ایمونوتراپی در کنار رادیوتراپی نیز می‌تواند نتایج مطلوبی داشته باشد(۱۲۹). برای مثال، روش درمانی ایمونوتراپی با Cetuximab و رادیوتراپی مرحله سوّم از مراحل آزمایشات بالینی خود را به عنوان یک راه‌کار درمانی طی می‌کند. در مطالعه‌ای مشخص شد که این روش درمانی می‌تواند زمان بقا را تا پنج سال در بیماران مبتلا به سرطان سر و گردن افزایش دهد(۱۳۰). استفاده همزمان از آنتی‌بادی مونوکلونال به همراه سایتوکاین‌های تقویت کننده سلول‌های فعال در روند ADCC می‌تواند روند درمانی ایمونوتراپی را مطلوب تر نماید. برای مثال، استفاده از Retuximab به همراه IL-2 می‌تواند ADCC سلول‌های NK، ماکروفاژها و مونوسیت‌ها را تقویت کند(۱۳۱). ترکیب ایمونوتراپی و عناصر درمانی اختصاصی راه کار درمانی جدیدی است که از طرفی با هدف قرار دادن سیگنال رشد در سلول هدف و از سوی دیگر با تحریک سیستم ایمنی می‌تواند درمان موثری در تومورهای مقاوم به شیمی درمانی باشد(۱۳۲). برای مثال، استفاده ترکیبی از SU6668 به همراه آنتی‌بادی مونوکلونال CD86-IgG می‌تواند سیگنال‌های تحریکی را برای سلول‌های CD8+ T راه یافته به محیط توموری فراهم کند. به طور مشابه استفاده از ترکیب دارویی Lapatinib و Trastuzumab می‌تواند درمان موثری برای سرطان پستان باشد. Lapatinib سبب تحریک تشکیل هومودایمر غیرفعال HER2 درغشاء پلاسمایی می‌شود. Trastuzumab از طریق افزایش ADCC نیز نتایج بهتر درمانی را در مقایسه با استفاده تک‌تک از این عناصر درمانی باعث می‌شود(۱۳۳). استفاده از ایمونوتواپی با آنتی‌بادی مونوکلونال و واکسن توموری نیز نتایج مطلوبی در بعضی سرطان‌ها داشته است(۱۳۴). در مدل‌های موشی استفاده از سلول‌های توموری B16 غیرفعال به عنوان

واکسن به همراه آنتی‌بادی مونوکلونال علیه CTLA-4 توانست سلول‌های CD8 T و سلول‌های NK را به میزان بیشتری نسبت به واکسن منفرد تحریک کند(۱۳۵).

ایمونوتراپی با واسطه ویروس‌ها (Viro-immunotherapy)

ایمونوتراپی با واسطه ویروس‌ها یکی از جدیدترین شاخه‌های ایمونوتراپی سرطان است که امروزه مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است.

ویروس های انکولیتیک(OV)[۴]

ویروس‌های انکولیتیک ویروس‌هایی هستند که منجر به لیز و کشته شدن سلول‌های توموری می‌شوند. از ویروس‌های انکولیتیک معروف می‌توان به آدنو ویروس‌ها، رئویروس‌ها و برخی ویروس‌های دیگر اشاره کرد. ویروس‌های انکولیتیک از راه‌های مختلفی منجر به حذف سلول‌های توموری می‌شوند:

- ویروس‌هایی که به‌طور ذاتی در سلول‌های توموری تکثیر می‌شوند. این ویروس‌ها برای تکثیر به پروتئین‌هایی نیاز دارند که در سلول‌های توموری بیش‌تر بیان می‌شوند. در این روش هیچ دست ورزی ژنتیکی در ویروس‌ها انجام نمی‌شود. از این میان می‌توان به VSV، Newcastle-disease virus، پاروویروس و رئویروس شاره کرد.

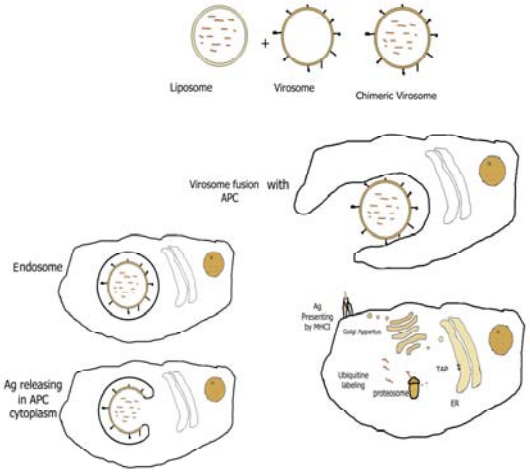
- ویروس‌های کاهش حدت یافته یا ویروس‌هایی که محتوای ژنتیکی آن‌ها و ژن‌های بیماری‌زای آن‌ها حذف شده است. از این میان می‌توان به آدنو ویروس، واکسینیا، پولیو و میزلز اشاره کرد.

- ویروس‌هایی که مکانیسم عملشان وابسته به فاکتورهای رونویسی است. فاکتورهای رونویسی این ویروس‌ها دچار تغییر شده و فقط قادر به فعالیت در پروموترهای سلول‌های توموری هستند که جهش یافته‌اند. هرپس ویروس و آدنو ویروس از این گروه هستند.

Virosome در سال ۲۰۰۱ ترکیبی نیمه مصنوعی معرفی شد که از ذرات ویروسی بدون نوکلئیک اسید تشکیل شده بودند. این ترکیب دارای قدرت فیوژن ویروس بوده ولی محتوای اسید نوکلئیک آن عامل بیماری‌زایی را ندارد. از وایروزوم برای انتقال آنتی ژن، دارو و موارد مورد نظر به سلول هدف استفاده می‌شود. البته نخستین وایروزوم از ویروس آنفلوآنزا در سال ۱۹۷۵ ساخته شد(۱۳۶). عملکرد وایروزوم مشابه لیپوزوم‌هاست همان‌طورکه لیپوزوم‌های حاوی آنتی‌ژن TAA باعث افزایش پاسخ CTL می‌شوند وایروزوم‌ها نیز قادر به این فرآیند بوده و آنتی‌ژن‌ها را راحت تر در سلول هدف رها می‌کنند(۱۳۷). وایروزوم‌هایی که امروزه طراحی می شوند تحت لیسانس داروهای وایروزمی هستند که معمولا روی دو نوع ویروس آنفلوآنزا و هپاتیت آ طراحی می‌شوند. از داروهای تایید شده که باعث فعال شدن پاسخ‌های هومورال می‌شوند می‌توان به Epaxal® و Inflexal® اشاره کرد. وایروزوم‌های دیگر را که از ویروس‌های دیگر گرفته می‌شوند به این نام نمی‌خوانند بلکه به این ترکیبات، ترکیبات شبه ویروسی می‌گویند. اخیراً نوعی ترکیب شبه ویروسی از هپاتیت B ایجاد شده است که دارای اپی‌توپ آنتی‌ژن، پروتئین p33 (تحریک کننده‌ی CTL) و موتیف CpG (ادجوانت) است. نتایج in vitro این ترکیب در موش‌های مبتلا به فیبروسارکوم رضایت بخش و بدون عوارض بود(۱۳۸).

نسل جدید وایروزوم‌ها، وایروزوم‌های کایمریک هستند که از الحاق وایروزوم و لیپوزوم ایجاد می‌شوند. محتوای داخل وایروزوم می‌تواند پپتید آنتی‌ژن، mRNA یا DNA باشد که به وایروزوم‌های حاوی DNA، DNA-virosome می‌گویند. پس از فیوژن وایروزوم با سلول APC محتوای داخل آن در سیتوپلاسم رها می‌شود. آنتی ژن‌های پروتئینی پس از نشانه‌گذاری یوبیکوئیتینی وارد پروتئوزوم شده در ادامه پپتیدهای پردازش شده وارد شبکه آندوپلاسمی شده و همراه با MHC I در سطح سلول عرضه می‌شوند. این روش زمانی که برای سلول‌های ایمنی عرضه‌کننده آنتی‌ژن به صورت هدفمند انجام می‌شود همراه با استفاده از ویروس‌های انکولیتیک ازبهترین روش‌های مورد

استفاده در ایمونوتراپی سرطان با واسطه ویروس‌هاست (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: نحوه عرضه آنتی ژن با کمک وایروزوم

ایمونوتراپی با واسطه ی باکتری(۱۳۹)

پس از مطالعات مستقلی که ویلیام کولی پزشک آمریکایی و دانشمندان آلمانی، Busch و Fehleisen، حدود صد سال قبل روی اثر باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز بر سرطان داشتند، استفاده از باکتری و محصولات باکتریایی برای درمان سرطان به عنوان یکی از گزینه‌های درمانی مطرح شد(۱۴۰). سموم کولی در آن زمان به عنوان یکی از مطرح‌ترین و موثرترین روش‌های درمان سرطان پیشنهاد شد(۵). در ادامه استفاده از سموم باکتریایی مجدداً مطرح شد که امروزه به عنوان اصلی‌ترین ادجوانت‌ها در ایمونوتراپی سرطان مطرح می‌شوند. این ادجوانت‌ها عبارتند از: LPS، CpG DNA و BCG.

باکتری‌هایی که برای درمان سرطان به کار می روند در سه کلاس طبقه بندی می شوند:

Class I: Bifidobacteria، که به باکتری‌های بی‌خطر مشهورند. بیهوازی اجباری بوده و اصلی‌ترین عضو خانواده باکتری‌های پروبیوتیک به شمار می‌روند. این باکتری‌ها گرم مثبت بوده و بیش‌تر به منظور وکتور بیانی به صورت دهانی و داخل وریدی استفاده می‌شوند(۱۴۱).

Class II: این باکتری‌ها جز باکتری‌های داخل سلولی اختیاری محسوب می‌شوند. هم گرم مثبت و هم گرم منفی بوده و بیهوازی اختیاری هستند. این باکتری‌ها بیماری‌زای روده به شمار می‌روند و در درمان تومورهای دستگاه گوارش نقش مهمی دارند. از این گروه می‌توان به سالمونلا، لیستریا و اشرشیاکولی اشاره کرد. این باکتری‌ها از پتانسیل قوی برای طراحی واکسن‌های توموری برخوردارند(۱۴۲).

Class III: کلیستریدیوم ها اصلی‌ترین عضو این کلاس از باکتری‌ها هستند. از اسپور باکتری بیش‌تر به عنوان درمان استفاده می‌شود زیرا ایمونوژنی پایینی داشته و می‌توان حتی آن را به صورت داخل وریدی نیز تزریق نمود(۱۴۳). استفاده از این باکتری های بیهوازی و اسپور باکتری‌ها باعث می شود در محیط بیهوازی در شرایطی که توده توموری گسترش پیدا کرد، باکتری‌ها تکثیر شده و سلول‌های توموری را لیز کنند(۱۴۴). باکتری‌ها باعث کموتاکسی اختصاصی سلول‌های سیستم ایمنی به موضع تومور می‌شوند. با جذب نوتروفیل‌ها به موضع آلودگی باکتری، التهاب ایجاد شده منجر به افزایش پاسخ‌های ایمنی می‌شود به خصوص در مواردی که از باکتری‌های درون سلول استفاده شود(۱۴۵).

ترکیب روش‌های ایمونوتراپی با شیمی درمانی

محققین بر این باورند که استفاده ترکیبی از داروهای شیمی درمانی به همراه روش‌های هدفمند ایمونوتراپی در افزایش حذف سلول‌های توموری و روند بهبود بیماری آثار مثبت بارزی دارد. ازمهم‌ترین زمینه‌های استفاده ترکیبی، کاربرد واکسن‌های ایمونوتراپی در کنار داروهای شیمی درمانی است. البته دراین مورد شکی نیست‌که شیمی درمانی اثر سایتوتوکسیک بالایی داشته و انتخابی نیست و نتیجه‌گیری بهتر به مطالعات بالینی بیش‌تری نیازمند است.

بحث

نتایج کارآزمایی‌های بالینی نشان داده است که

روش‌هـای ایمونـوتراپی بـه تنهـایی بـرای حـذف کامـل تومور کافی نیستند. علـت ایـن مسـاله سیسـتم پویـا و در حال تغییر ایمنی بدن است که تومور بر اساس شدت بـد خیمی می تواند خـود را بـا انـواع تغییـرات وفـق دهـد از جملـه تغییـر آنتـی‌ژن‌هـای سـطحی پـس از یـک دوره ایمونوتراپی. این مسـاله مختـص تمـام تومورهـا نیسـت و همانند اکثر سرطان‌ها با شدت پیشـروی بـالا عـدم پاسـخ مناسب و کافی به ایمونوتراپی می‌تواند بـه خـاطر وجـود سلول‌های سرطانی بنیـادی باشـد کـه توانـایی بـالایی در تطابق با سیسـتم ایمنـی داشـته و بـه سـهولت از دسـترس سیستم ایمنی فرار می‌کنند. منشـا پیـدایش ایـن سـلول‌هـا دقیقا مشخص نیست ولی مشخص شده است که در اکثر سرطان‌های بدخیم پیشرونده میزان Cancer stem cell هـا بالاست(۱۴۶) و به‌کارگیری روش‌های ترکیبی ایمونـوتراپی یا ایمونوتراپی به همراه رادیوتراپی و شیمی درمانی نتایج بهتری داشته‌اند(۱۴۷). اهداف روش‌هـای درمـانی بـه ایـن صورت طبقه‌بندی می‌شوند:

– از بین بردن سلول‌ها و مولکول‌های تضعیف‌کننده‌ی پاسخ‌های سیستم ایمنی علیه تومور. از این دست می‌توان به آنتی‌بادی‌های اختصاصـی علیـه سـلول‌هـای Treg، یـا آنتی CTLA4 یا آنتی PD1 و مواردی از این قبیل اشاره کرد(۱۴۸). حذف سلول‌های Treg با رادیوتراپی یا شیمی درمانی قبل از انتقال سلول‌های CAR نیز جزو این دسـته از راه‌کارهای درمانی است(۱۴۹).

– حذف اختصاصی سلول‌هـای تومـوری. ایـن نـوع درمان اساسی‌ترین حیطه ایمونـوتراپی سـرطان بـه شـمار می‌رود. در ایمونوتراپی فعال مانند ایمونوتراپی با واسـطه ویـروس‌هـا، ویـروس‌هـای انکولیتیـک منجـر بـه حـذف اختصاصی تومور شده و در روش‌هـای غیـر فعـال ماننـد انتقال سلول‌های سیستم ایمنی یا آنتی‌بـادی مونوکلونـال، هدف از بین بردن سلول‌های توموری همراه با کـم‌تـرین عوارض ممکن در سلول‌های طبیعی بدن است. ایـن روش وقتی با شیمی درمـانی همـراه مـی‌شـود بـه خصـوص در حذف سلول‌های سـرطانی بنیـادی پاسـخ‌دهـی آن تـا ۱۰ برابر افزایش می‌یابد(۱۴۶).

– تقویت پاسخ‌های سیسـتم ایمنـی بـدن. بسـیاری از روش‌هـای ایمونـوتراپی ماننـد سـایتوکاین‌تراپـی یـا واکسن‌های DNA یا استفاده از باکتری‌ها، بیش‌تـر بـرای تقویت سیستم ایمنی و جلب سیستم ایمنی به موضع تومـور به‌کار می‌روند. ترکیب روش‌های ایمونوتراپی تقویت‌کننده سیستم ایمنی، یکی از الزامی‌ترین روش‌هـای درمـانی در دنیا بعد از روش‌های تهـاجمی ماننـد رادیـوتراپی اسـت. این روش اوّلین روش ترکیبی درمان سرطان است که در لوسـمی‌هـا بعـد از تخلیـه‌ی مغـز اسـتخوان بیمـار بـرای تحریـک تولیـد سـلول‌هـای خونسـاز اسـتفاده شـده است(۱۵۰) (تصویر شماره ۲). امروزه روش‌هـای ترکیبـی جدیدتری به ایـن روش‌هـای درمـانی افـزوده مـی‌شـوند. داروهای سنتتیک هوشمندی در حال طراحی هستند کـه همانند اجزای سیسـتم ایمنـی عمـل کـرده و بـه صـورت آپتامر، ترکیبات وایروزمی و یـا واکسـن هـای ویروسـی اختصاصی ترکیب شده با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، بـه صورت اختصاصی سلول هـای تومـوری را نشـانه‌گیـری می‌کنند. استفاده از سلول‌های بنیادی نیز جزء فرضیه‌های در دست مطالعه می‌باشد.

تصویر شماره ۲: الگوی روش ترکیبی جدید

References

1. World Health Organization (WHO). Cancer mortality and morbidity [Internet , Report]. World Health Organization. 2012.
2. Foon KA. Biological response modifiers: the

new immunotherapy. Cancer Res 1989; 49(7): 1621-1639.
3. Lesterhuis WJ, Haanen JB, Punt CJ. Cancer immunotherapy--revisited. Nat Rev Drug Discov 2011; 10(8): 591-600.
4. Major Events in the History of Cancer A timeline of cancer discoveries and treatments [Internet]. AARP The Magazine. Apr./May 2012.
5. Mc Carthy EF. The Toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. Lowa Orthop J 2006; 26: 154-158
6. Hoption Cann SA, Van Netten JP, Van Netten C. Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. Postgrad Med J 2003; 79(938): 672-680.
7. Parish CR. Cancer immunotherapy: The past, the present and the future. Immunol Cell Biol 2003; 81(2): 106-113.
8. Carleton HA. Combating Evolving Pathogens: Pathogenic Bacteria as Vaccine Vectors: Teaching Old Bugs New Tricks. Yale J Biol Med 2010; 83(4): 217-222.
9. Coley WB. The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins (the mixed toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus). Proceedings of the Royal Society of Medicine 1910; 3(Surg Sect): 1.
10. Turk JL. Paul Ehrlich--the dawn of immunology. J R Soc Med 1994; 87(6): 314-315.
11. Steinman RM. Decisions about Dendritic Cells: Post, Present and Future. Annu Rev Immunol 2011; 30: 1-22.
12. Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, et al. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. Cell 2000; 100(5): 575-585.
13. Palma M, Adamson L, Hansson L, Kokhaei P, Rezvany R, Mellstedt H, et al. Development of a dendritic cell-based vaccine for chronic lymphocytic leukemia .Cancer Immunol Immunother. 2008; 57(11): 1705-1710.
14. van Spriel AB, de Jong EC. Dendritic cell science: more than 40 years of history. J Leukoc Biol 2013; 93(1): 33-38.
15. Kokhaei P, Rezvany MR, Virving L, Choudhury A, Rabbani H, Osterborg A, et al. Dendritic cells loaded with apoptotic tumour cells induce a stronger T-cell response than dendritic cell-tumour hybrids in B-CLL. Leukemia 2003; 17(5): 894-899.
16. Danon YL. Monoclonal antibodies: George Kohler. Harefuah. 1996; 130(2): 108-109.
17. Freysd'ottir J. Production of monoclonal antibodies. Methods Mol Med 2000; 40: 267-279.
18. Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. Nat Rev Immunol 2010; 10(5): 317-327.
19. mith MR. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. Oncogene 2003; 22(47): 7359-3768.
20. Fotolia OS. Tiny Antibody Fragments Raised in Camels Find Drug Targets in Human Breast Cancer Cells. Faseb J, 2011. Available from: http://www.sciencedaily.com. and http://www.fasebj.org/content/early/
21. Prakash CS. Edible Vaccines and Antibody Producing Plants. Biotechnology and Development Monitor 1996; 27: 10-13.
22. Kaufmann Y, Berke G, Eshhar Z. Cytotoxic T lymphocyte hybridomas that mediate specific tumor-cell lysis in vitro. Proc Natl Acad Sci 1981; 78(4): 2502-2506.

23. Amedei A, Niccolai E, D'Elios MM. T cells and adoptive immunotherapy: recent developments and future prospects in gastrointestinal oncology. Clin Dev Immunol 2011; 2011.
24. Gross G, Gorochov G, Waks T, Eshhar Z. Generation of effector T cells expressing chimeric T cell receptor with antibody type-specificity. Transplant Proc 1989; 21(1 Pt 1): 127-130.
25. Gregory AD, Houghton AM. Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. Cancer Res 2011; 71(7): 2411-2416.
26. Kutzler MA, Weiner DB. DNA vaccines: ready for prime time? Nat rev Gen 2008; 9(10): 776-788.
27. Fioretti D, Iurescia S, Fazio VM, Rinaldi M . DNA Vaccines: Developing New Strategies against Cancer. J Biomed Biotechnol 2010; 2010.
28. Liu MA. DNA vaccines: a review. J Int Med 2003; 253(4): 402-410.
29. Sondel PM, Gillies SD. Current and Potential Uses of Immunocytokines as Cancer Immunotherapy. Antibodies 2012; 1(2): 149-171.
30. Kaneda Y. Virosome: a novel vector to enable multi-modal strategies for cancer therapy. Adv Drug Deliv Rev 2012; 64(8): 730-738.
31. Benatar T, Cao MY, Lee Y, Li H, Feng N, Gu X, et al. Virulizin induces production of IL-17E to enhance antitumor activity by recruitment of eosinophils into tumors. Cancer Immunol Immunother 2008; 57(12): 1757-1769.
32. No authors listed. Virulizin. BioDrugs 2002; 16(5): 374-537.
33. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. J Exp Med 1973; 137(5): 1142-1162.
34. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. Nature. 2007; 449(7161): 419-426.
35. Beutler BA, Hoffmann JA, Steinman RM. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2011: Greeting. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2011/greetings.html?pageNum_Get Greetings.
36. Lodge PA, Jones LA, Bader RA, Murphy GP, Salgaller ML. Dendritic cell-based immunotherapy of prostate cancer: immune monitoring of a phase II clinical trial. Cancer Res 2000; 60(4): 829-833.
37. FDA News Release. FDA takes actions on Darvon, other pain medications containing propoxyphene. Available at www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm170769.html. Accessed August 23, 2010.
38. Saenz A. Dendreon Gets FDA Approval for Prostate Cancer Fighting Provenge, Stock Leaps: http://singularityhub.com/2010/04/29/dendreon-gets-fda-approval-for-prostate-cancer-fighting-provenge-stock-leaps/; 04/29/2010 [cited 2013 03/01/2013].
39. A Service of the U.S National Institues of Health. Dendritic Cell Vaccine Trial U.S.A: clinical trials. gov; 2013. Available from: http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Dendritic+Cell+Vaccine&pg=7.
40. Chen LL, Frank AM, Adams JC, Steinman RM. Distribution of horseradish peroxidase anti-HRP immune complexes in mouse spleen with special reference to follicular dendritic cells. J Cell Biol 1978; 79(1): 184-199.
41. Steinman RM, Witmer MD. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice.

Proc Natl Acad Sci USA 1978; 75(10): 5132-5136.
42. Zinkernagel R, Doherty P. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. Nature 1974; 248(5450): 701-702.
43. Medzhitov R, Janeway Jr CA. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. Curr Opin Immunol 1997; 9(1): 4-9.
44. Imler JL, Hoffmann JA. Toll receptors in innate immunity. Trends Cell Biol 2001; 11(7): 304-311.
45. Inaba K, Inaba M, Naito M, Steinman RM. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. J Exp Med 1993; 178(2): 479-488.
46. Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. Nat Immunol 2000; 1(4): 311-316.
47. Palma M, Hansson L, Choudhury A, Nasman-Glaser B, Eriksson I, Adamson L, et al. Vaccination with dendritic cells loaded with tumor apoptotic bodies (Apo-DC) in patients with chronic lymphocytic leukemia: effects of various adjuvants and definition of immune response criteria. Cancer Immunol Immunother 2012; 61(6): 865-879.
48. Gong J, Nikrui N, Chen D, Koido S, Wu Z, Tanaka Y, et al. Fusions of human ovarian carcinoma cells with autologous or allogeneic dendritic cells induce antitumor immunity. J Immunol 2000; 165(3): 1705-1711.
49. Lee WT. Dendritic cell-tumor cell fusion vaccines. Adv Exp Med Biol 2011; 713: 177-186.
50. Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. Nature 2001; 411(6835): 380-384.
51. Gilboa E. The risk of autoimmunity associated with tumor immunotherapy. Nat Immunol 2001; 2(9): 789-792.
52. Samadi-Foroushani M, Vahabpour R, Memarnejadian A, Namdar A, Khamisabadi M, Sadat SM, et al. Immune responses regulation following antitumor dendritic cell-based prophylactic, concurrent, and therapeutic vaccination. Med Oncol 2011; 28: S660-S666.
53. Mahdian R, Kokhaei P, Najar HM, Derkow K, Choudhury A, Mellstedt H. Dendritic cells, pulsed with lysate of allogeneic tumor cells, are capable of stimulating MHC-restricted antigen-specific antitumor T cells. Med Oncol 2006; 23(2): 273-282.
54. Lesterhuis WJ, de Vries IJ, Schreibelt G, Lambeck AJ, Aarntzen EH, Jacobs JF, et al. Route of administration modulates the induction of dendritic cell vaccine-induced antigen-specific T cells in advanced melanoma patients. Clin Cancer Res 2011; 17(17): 5725-5735.
55. Buchsel PC, DeMeyer ES. Dendritic cells: emerging roles in tumor immunotherapy. Clin J Oncol Nurs 2006; 10(5): 629-640.
56. Kokhaei P, Choudhury A, Mahdian R, Lundin J, Moshfegh A, Osterborg A, et al. Apoptotic tumor cells are superior to tumor cell lysate, and tumor cell RNA in induction of autologous T cell response in B-CLL. Leukemia 2004; 18(11): 1810-1815.
57. Morse MA, Clay T, Colling K, Lyerly HK. Preparation of peptide-loaded dendritic cells for cancer immunotherapy. Mol Biotechnol 2003; 25(1): 95-99.
58. Parmiani G, Castelli C, Dalerba P, Mortarini R, Rivoltini L, Marincola FM, et al. Cancer

Immunotherapy With Peptide-Based Vaccines: What Have We Achieved? Where Are We Going? J Natl Cancer Inst 2002; 94(11): 805-818.

59. Thumann P, Moc I, Humrich J, Berger TG, Schultz ES, Schuler G, et al. Antigen loading of dendritic cells with whole tumor cell preparations. J Immunol Methods 2003; 277(1-2): 1-16.
60. Valmori D, Fonteneau J-F, Lizana CM, Gervois N, Liénard D, Rimoldi D, et al. Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. J Immunol 1998; 160(4): 1750-1758.
61. Parkhurst MR, Salgaller ML, Southwood S, Robbins PF, Sette A, Rosenberg SA, et al. Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A* 0201-binding residues. J Immunol 1996; 157(6): 2539-2548.
62. Chen J-L, Dunbar PR, Gileadi U, Jäger E, Gnjatic S, Nagata Y, et al. Identification of NY-ESO-1 peptide analogues capable of improved stimulation of tumor-reactive CTL. J Immunol 2000; 165(2): 948-955.
63. Rivoltini L, Squarcina P, Loftus DJ, Castelli C, Tarsini P, Mazzocchi A, et al. A superagonist variant of peptide MART1/Melan A27–35 elicits anti-melanoma CD8+ T cells with enhanced functional characteristics: implication for more effective immunotherapy. Cancer Res 1999; 59(2): 301-316.
64. Gilboa E, Vieweg J. Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells. Immunol Rev 2004; 199: 251-263.
65. Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. J Exp Med 1996; 184(2): 465-472.
66. Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Cancer immunotherapy using RNA-loaded dendritic cells. Clin Exp Immunol 2003; 134(3): 378-384.
67. Berzofsky JA, Terabe M, OH S, Belyakov IM, DAhlers JD. Ahlers, et al. Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cance. J Clin Invest 2004; 113(11): 1515-1525.
68. Kershaw MH, Westwood JA, Darcy PK. Gene-engineered T cells for cancer therapy. Nat Rev Cancer 2013; 13(8): 525-541.
69. Finn OJ. Cancer immunology. N Eng J Med 2008; 358(25): 2704-2715.
70. Tey S-K, Bollard CM, Heslop HE. Adoptive T-cell transfer in cancer immunotherapy. Immunol Cell Biol 2006; 84(3): 281-289.
71. Kawakami Y, Eliyahu S, Jennings C, Sakaguchi K, Kang X, Southwood S, et al. Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression. J Immunol 1995; 154(8): 3961-2968.
72. de Vries TJ, Fourkour A, Wobbes T, Verkroost G, Ruiter DJ, van Muijen GN. Heterogeneous expression of immunotherapy candidate proteins gp100, MART-1, and tyrosinase in human melanoma cell lines and in human melanocytic lesions. Cancer Res 1997; 57(15): 3223-3229.
73. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. Science 2006; 314(5796): 126-129.
74. Kawakami Y, Eliyahu S, Sakaguchi K, Robbins PF, Rivoltini L, Yannelli JR, et al.

Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. J Exp Med 1994; 180(1): 347-352.

75. Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. Science 1986; 233(4770): 1318-1321.
76. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. Annu Rev Immunol 2009; 27: 591-619.
77. Turtle CJ, Hudecek M, Jensen MC, Riddell SR. Engineered T cells for anti-cancer therapy. Curr Opin Immunol 2012; 24(5): 633-639.
78. Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. Nat Rev Immunol 2012; 12(4): 269-281.
79. Westwood JA, Smyth MJ, Teng MW, Moeller M, Trapani JA, Scott AM, et al. Adoptive transfer of T cells modified with a humanized chimeric receptor gene inhibits growth of Lewis-Y-expressing tumors in mice. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102(52): 19051-19056.
80. Sadelain M, Rivière I, Brentjens R. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. Nat Rev Cancer 2003; 3(1): 35-45.
81. Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. Curr Opin Immunol 2009; 21(2): 215-223.
82. AlvarezVallina L, Hawkins RE. Antigen-specific targeting of CD28 mediated T cell costimulation using chimeric singlechain antibody variable fragmentCD28 receptors. Eur J immunol 1996; 26(10): 2304-2309.
83. Savoldo B, Ramos CA, Liu E, Mims MP, Keating MJ, Carrum G, et al. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor–modified T cells in lymphoma patients. J Cin Invest 2011; 121(5): 1822.
84. Zhao Y, Wang QJ, Yang S, Kochenderfer JN, Zheng Z, Zhong X, et al. A herceptin-based chimeric antigen receptor with modified signaling domains leads to enhanced survival of transduced T lymphocytes and antitumor activity. J Immunol 2009; 183(9): 5563-5574.
85. Milone MC, Fish JD, Carpenito C, Carroll RG, Binder GK, Teachey D, et al. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. Mol Ther 2009; 17(8): 1453-1464.
86. Curran KJ, Pegram HJ, Brentjens RJ. Chimeric antigen receptors for T cell immunotherapy: current understanding and future directions. J Gene Med 2012; 14(6): 405-415.
87. Cardell S, Tangri S, Chan S, Kronenberg M, Benoist C, Mathis D. CD1-restricted CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. J Exp Med 1995; 182(4): 993-1004.
88. Ambrosino E, Terabe M, Halder RC, Peng J, Takaku S, Miyake S, et al. Cross-regulation between type I and type II NKT cells in regulating tumor immunity: a new immunoregulatory axis. J Immunol 2007; 179(8): 5126-5136.
89. Chang DH, Deng H, Matthews P, Krasovsky J, Ragupathi G, Spisek R, et al. Inflammation-associated lysophospholipids as ligands for CD1d-restricted T cells in human cancer. Blood 2008; 112(4): 1308-1316.

90. Fox LM, Cox DG, Lockridge JL, Wang X, Chen X, Scharf L, et al. Recognition of lyso-phospholipids by human natural killer T lymphocytes. PLoS Biol 2009; 7(10): e1000228.
91. Wu DY, Segal NH, Sidobre S, Kronenberg M, Chapman PB. Cross-presentation of disialoganglioside GD3 to natural killer T cells. J Exp Med 2003; 198(1): 173-181.
92. Mattner J, DeBord KL, Ismail N, Goff RD, Cantu C, Zhou D, et al. Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. Nature 2005; 434(7032): 525-529.
93. Pei B, Speak AO, Shepherd D, Butters T, Cerundolo V, Platt FM, et al. Diverse endogenous antigens for mouse NKT cells: self-antigens that are not glycosphingolipids. J Immunol 2011; 186(3): 1348-1360.
94. Kobayashi E, Motoki K, Uchida T, Fukushima H, Koezuka Y. KRN7000, a novel immunomodulator, and its antitumor activities. Oncol Res 1995; 7(10-11): 529-534.
95. Parekh VV, Wilson MT, Van Kaer L. iNKT-cell responses to glycolipids. Crit Rev Immunol 2005; 25(3): 183-213.
96. Yang YF, Tomura M, Ono S, Hamaoka T, Fujiwara H. Requirement for IFN-gamma in IL-12 production induced by collaboration between v(alpha)14(+) NKT cells and antigen-presenting cells. Int Immunol 2000; 12(12): 1669-1675.
97. O'Konek JJ, Illarionov P, Khursigara DS, Ambrosino E, Izhak L, Castillo BF, et al. Mouse and human iNKT cell agonist β-mannosylceramide reveals a distinct mechanism of tumor immunity. J Clin Invest 2011; 121(2): 683-694.
98. Hafner M, Falk W, Echtenacher B, Mannel DN. Interleukin-12 activates NK cells for IFN-gamma-dependent and NKT cells for IFN-gamma-independent antimetastatic activity. Eur Cytokine Netw 1999; 10(4): 541-548.
99. Manthorpe M, Cornefert-Jensen F, Hartikka J, Felgner J, Rundell A, Margalith M, et al. Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. Hum Gene Ther 1993; 4(4): 419-431.
100. Reisfeld RA. The tumor microenvironment: a target for combination therapy of breast cancer. Crit Rev Oncog 2013; 18(1-2): 115-133.
101. Mor G, Eliza M. Plasmid DNA vaccines. Immunology, tolerance, and autoimmunity. Mol Biotechnol 2001; 19(3): 245-250.
102. Saade F, Petrovsky N. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. Expert Rev Vaccines 2012; 11(2): 189-209.
103. Rice J, Ottensmeier CH, Stevenson FK. DNA vaccines: precision tools for activating effective immunity against cancer. Nat Rev Cancer 2008; 8(2): 108-120.
104. Bennett Jr IL, Beeson PB. Studies on the pathogenesis of fever: II. Characterization of fever-producing substances from polymorphonuclear leukocytes and from the fluid of sterile exudates. J Exp Med 1953; 98(5): 493-508.
105. Dumonde D. 'Lymphokines': molecular mediators of cellular immune responses in animals and man. Proc R Soc Med 1970; 63(9): 899-902.
106. Dinarello CA. Historical insights into cytokines. Eur J Immunol 2007; 37(Supple 1): S34-45.
107. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. Nat Rev Cancer 2004; 4(1): 11-22.
108. Kim-Schulze S, Taback B, Kaufman HL. Cytokine Therapy for Cancer. Surg Oncol Clin 2007; 16(4): 793-818.

109. Margolin K, Lazarus M, Kaufman HL. Cytokines in the Treatment of Cancer. Cancer Immunotherapy: Springer; 2013. p. 173-210.
110. Cameron DA, Cornbleet MC, Mackie RM, Hunter JA, Gore M, Hancock B, et al. Adjuvant interferon alpha 2b in high risk melanoma–the Scottish study. Br J Cancer 2001; 84(9): 1146-1149.
111. Billiau A, Matthys P. Interferon-γ: a historical perspective. Cytokine Growth Factor Rev 2009; 20(2): 97-113.
112. Sessions P. Interferons as cell growth inhibitors and antitumor factors. Gene 1986; 2: 218-220.
113. Hartmann TB, Thiel D, Dummer R, Schadendorf D, and Eichmüller S. SEREX identification of new tumour-associated antigens in cutaneous T-cell lymphoma. Br J Dermatol 2004; 150(2): 252-258.
114. Renner U, Pagotto U, Arzt E, Stalla GK. Autocrine and paracrine roles of polypeptide growth factors, cytokines and vasogenic substances in normal and tumorous pituitary function and growth: a review. Eur J Endocrinol 1996; 135(5): 515-532.
115. Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, Margolin K, et al. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. J Clin Oncol 1999; 17(7): 2105-2116.
116. Rosenberg SA, Sportès C, Ahmadzadeh M, Fry TJ, Ngo LT, Schwarz SL, et al. IL-7 administration to humans leads to expansion of CD8+ and CD4+ cells but a relative decrease of CD4+ T-regulatory cells. J Immunother 2006; 29(3): 313-319.
117. Fehniger TA, Cooper MA, Caligiuri MA. Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. Cytokine Growth Factor Rev 2002; 13(2): 169-183.
118. Socinski MA, Elias A, Schnipper L, Cannistra SA, Antman KH, Griffin JD. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man. Lancet 1988; 331(8596): 1194-1198.
119. Duhrsen U, Villeval J-L, Boyd J, Kannourakis G, Morstyn G, Metcalf D. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. Blood 1988; 72(6): 2074-2081.
120. Komrokji RS, Lyman GH. The colony-stimulating factors: use to prevent and treat neutropenia and its complications. Expert Opin Biol Ther 2004; 4(12): 1897-1910.
121. Fung Wong S, Lai LC. The role of TGFβ in human cancers. Pathology 2001; 33(1): 85-92.
122. Nagaraj S, Gabrilovich DI. Tumor escape mechanism governed by myeloid-derived suppressor cells. Cancer Res 2008; 68(8): 2561-2563.
123. Fukushi J-I, Ono M, Morikawa W, Iwamoto Y, Kuwano M. The activity of soluble VCAM-1 in angiogenesis stimulated by IL-4 and IL-13. J Immunol 2000; 165(5): 2818-2823.
124. Tartour E, Fossiez F, Joyeux I, Galinha A, Gey A, Claret E, et al. Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. Cancer Res 1999; 59(15): 3698-3704.
125. Ehrlich P, Bolduan C. Collected Studies on Immunity. J Nerv Ment Dis 1907; 34(8): 549.
126. Potter M. Immunoglobulin-producing tumors and myeloma proteins of mice. Physiol Rev 1972; 52(3): 631-719.
127. Nissim A, Chernajovsky Y. Historical development of monoclonal antibody

therapeutics. Handb Exp Pharmacol 2008 (181): 3-18.

128. Tol J, Punt CJ. Monoclonal antibodies in the treatment of metastatic colorectal cancer: a review. Clin Ther 2010; 32(3): 437-453.
129. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. N Engl J Med 2004; 350(23): 2335-2342.
130. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Cohen RB, Jones CU, Sur RK, et al. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. Lancet Oncol 2010; 11(1): 21-28.
131. Khan KD, Emmanouilides C, Benson DM, Jr, Hurst D, Garcia P, Michelson G, et al. A phase 2 study of rituximab in combination with recombinant interleukin-2 for rituximab-refractory indolent non-Hodgkin's lymphoma. Clin Cancer Res 2006; 12(23): 7046-7053.
132. Li F, Zhao C, Wang L. Molecular-targeted agents combination therapy for cancer: developments and potentials. Int J Cancer 2014; 134(6): 1257-1269.
133. Baselga J, Bradbury I, Eidtmann H, Di Cosimo S, de Azambuja E, Aura C, et al. Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. Lancet 2012; 379(9816): 633-640.
134. Takaku S, Terabe M, Ambrosino E, Peng J, Lonning S, McPherson JM, et al. Blockade of TGF-beta enhances tumor vaccine efficacy mediated by CD8(+) T cells. Int J Cancer 2010; 126(7): 1666-1674.
135. van Elsas A, Hurwitz AA, Allison JP. Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4(CTLA-4) and granulocyte/ macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. J Exp M 1999; 190(3): 355-366.
136. Almeida J, Edwards DC, Brand C ,Heath T. Formation of virosomes from influenza subunits and liposomes. Lancet 1975; 306(7941): 899-901.
137. Schumacher R, Adamina M, Zurbriggen R, Bolli M, Padovan E, Zajac P, et al. Influenza virosomes enhance class I restricted CTL induction through CD4+ T cell activation. Vaccine 2004; 22(5-6): 714-723.
138. Storni T, Ruedl C, Schwarz K, Schwendener RA, Renner WA, Bachmann MF. Nonmethylated CG motifs packaged into virus-like particles induce protective cytotoxic T cell responses in the absence of systemic side effects. J Immunol 2004; 172(3): 1777-1785.
139. Patyar S, Joshi R, Byrav DS, Prakash A, Medhi B, Das BK. Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. J Biomed Sci 2010; 17(1): 21.
140. Nauts HC. The Beneficial Effects of Bacterial Infections on Host Resistance to Cancer End Results in 449 Cases. 2nd ed. New York: Cancer Res Inst; 1980. p. 22-50.
141. Van Mellaert L, Barbé S, Anné J. Clostridium spores as anti-tumour agents. Trends Microbiol 2006; 14(4): 190-196.
142. Fotiadis CI, Stoidis CN, Spyropoulos BG, Zografos ED. Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. World J Gastroenterol 2008; 14(42): 6453-6457.

143. Wei MQ, Ellem KA, Dunn P, West MJ, Bai CX, Vogelstein B. Facultative or obligate anaerobic bacteria have the potential for multimodality therapy of solid tumours. Eur J Cancer 2007; 43(3): 490-496.
144. Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. Nat Rev Cancer 2004; 4(6): 437-447.
145. Westphal K, Leschner S, Jablonska J, Loessner H, Weiss S. Containment of tumor-colonizing bacteria by host neutrophils. Cancer Res 2008; 68(8): 2952-2960.
146. Radvanyi L. Immunotherapy Exposes Cancer Stem Cell Resistance and a New Synthetic Lethality. Mol Ther 2013; 21(8): 1472-1474.
147. Drake CG. Combination immunotherapy approaches. Ann Oncol 2012; 23(suppl 8): viii41-viii46.
148. Sugiyama D, Nishikawa H, Maeda Y, Nishioka M, Tanemura A, Katayama I, et al. Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+ CD4+ regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans. Proc Natl Acad Sci 2013; 110(44): 17945-17950.
149. Dudley ME, Yang JC, Sherry R, Hughes MS, Royal R, Kammula U, et al. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. J Clin Oncol 2008; 26(32): 5233-5239.
150. Lee S, Margolin K. Cytokines in Cancer Immunotherapy. Cancers 2011; 3(4): 3856-3893.