

IMUNOLOGIE NÁDORŮ – SOUČASNÝ STAV A POZNATKY Z 1. MEZINÁRODNÍ KONFERENCE ZÁKLADNÍ A KLINICKÉ IMUNOGENOMIKY. ČÁST II – PROTINÁDOROVÁ IMUNOTERAPIE

TUMOUR IMMUNOLOGY – PRESENT STATUS AND LESSONS FROM THE 1ST INTERNATIONAL CONFERENCE ON BASIC AND CLINICAL IMMUNOGENOMICS. PART II – TUMOUR IMMUNOTHERAPY

HATINA J.

UNIVERSITA KARLOVA, LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI, ÚSTAV BIOLOGIE

Souhrn: Cílem imunoterapie nádorů je ovlivnit pacientův imunitní systém v průběhu samotného nádorového onemocnění tak, aby došlo k eliminaci či alespoň redukcí populace nádorových buněk. Aktivní imunoterapie se snaží tohoto cíle dosáhnout prostřednictvím aktivní imunizace, tj. terapeutickou vakcinací. Její podstatou je specifická aktivace imunitního systému pacienta vhodnou aplikací nádorových antigenů, v nejrůznějších formách (letálně ozářené nádorové buňky, nádorové lyzáty, purifikované proteiny, peptidy, peptidy naložené dendritické buňky aj.). Dosavadní účinnost těchto postupů, vyjádřená klinickou odezvou, je nízká (3 – 10 %). Současný vývoj aktivní imunoterapie nádorů se ubírá dvěma směry. Prvním je snaha pochopit faktory determinující klinickou odezvu na terapeutickou vakcinaci nádorů na imunologické a molekulárně biologické úrovni, tj. analýzou diferenciální exprese genů či polymorfismů přímo v sekvenci genomu. Důležitým dílčím cílem tohoto úsilí je předpovědět s dostatečnou přesností klinickou odezvu nádoru před zahájením vlastní vakcinace. Druhým směrem vývoje je hledání nových nádorových antigenů, popř. nových vakcinačních strategií, s vyšší klinickou úspěšností. Jako velmi nadějný nádorový antigen pro terapeutickou vakcinaci vystupuje v poslední době katalytická podjednotka telomerázy. Z nových vakcinačních schémat na sebe podobně upozorňuje použití komplexů peptidů a proteinů tepelného šoku. Jejich terapeutická účinnost ovšem musí být vymezena rozsáhlejšími klinickými studiemi. Druhým hlavním přístupem protinádorové imunoterapie je pasivní imunoterapie, jejíž podstatou je doplnění imunitního systému onkologického pacienta *ex vivo* připravenými a aktivovanými imunitními efektory. Tradičním zástupcem pasivní imunoterapie je protilátková léčba, v poslední době byly zaznamenány významné klinické úspěchy rovněž ve dvou oblastech buněčné pasivní imunoterapie – v oblasti aktivace NK-buněk v rámci alogenní či haploidentické transplantace hematopoetických kmenových buněk při léčbě některých leukemií a v oblasti krátkodobé *in vitro* expanze/aktivace tumor-infiltrujících lymfocytů při léčbě metastazujícího maligního melanomu. Novým směrem pasivní buněčné imunoterapie je snaha o cílené zásahy do genů pro T-buněčné receptory s cílem zvýšení jejich afinity pro nádorové antigeny. Poněkud stranou těchto dvou hlavních proudů protinádorové imunoterapie je léčba cytokiny, zejména interleukinem-2 a interferony- α . Molekulárně biologická analýza expresních změn melanomových buněk v odpověď na aplikaci IFN α naznačuje, že výsledkem interferonové léčby by mohlo být oslabení imunodominance některých liniově-specifických antigenů, čehož by mohlo být s výhodou využito v rámci následné terapeutické vakcinace.

Klíčová slova: terapeutická vakcinace, telomeráza, komplexy peptidů a proteinů tepelného šoku, protilátková léčba, NK-buňky, adoptivní transfer tumor-specifických efektorových buněk, cytokinová léčba

Summary: The ultimate goal of tumour immunotherapy is to modulate a patient's immune system in the course of cancer disease to the extent of being able to eliminate or at least reduce the tumour load. The active immunotherapy tries to achieve this goal by active immunization, i.e. therapeutic vaccination. Its underlying principle is a specific activation of the patient's immune system by a convenient delivery of tumour antigens of choice, which can adopt a variety of forms (lethally irradiated cancer cells, tumour lysates, antigenic proteins or peptides, peptide-loaded dendritic cells etc.). Actual efficacy of these approaches, in terms of an objective clinical response, is quite low (3 – 10 %). Two prominent directions are appearing in the current development of the active immunotherapy of cancer. The first is an effort to understand the factors determining the clinical response on a level of basic immunological and molecular biological knowledge, e.g. in terms of differentially expressed genes or polymorphic information in the genome itself. Important goal of this approach is to predict with reasonable accuracy the clinical response of a tumour before starting the vaccination. The second direction of the current development in this field is a search for new tumour antigens or vaccination protocols with improved clinical efficacy. Telomerase seems to be such a promising new antigen and, likewise, application of vaccines based on complexes of peptides with heat shock proteins is similarly regarded with hope. Their clinical impact awaits, nevertheless, validation in larger clinical studies. The second main approach to the tumour immunotherapy, namely the passive immunotherapy, consists in supplementing the patient's immune system with *ex vivo* prepared and activated immune effectors. Traditionally represented by antibody-based therapies, passive immunotherapy approaches scored recently important clinical successes for cell-based therapies as well, namely in exploiting natural killer cell activation in frames of allogeneic and haploidentical blood stem cell transplantation in treatment of some leukaemias, and in adoptively transferred short-term *in vitro* expanded autologous tumour infiltrating lymphocytes in treatment of metastasizing malignant melanoma. A new development in passive cellular immunotherapy is an effort to manipulate the T cell receptor genes to increase their affinity for a tumour antigen in question. A little removed from these two main immunotherapeutic branches is tumour treatment based on sole cytokine administration, with the two major cytokines being interleukin-2 and interferons- α . Molecular analysis of genes activated and repressed by IFN α treatment of malignant melanoma suggests that this treatment might result in suppression of some melanocyte-specific immunodominant antigens, which could be exploited with advantage in terms of successive therapeutic vaccination.

Key words: therapeutic vaccination, telomerase, heat shock protein-peptide complexes, antibody therapy, natural killer cells, adoptive transfer of antitumour cells, cytokine therapy

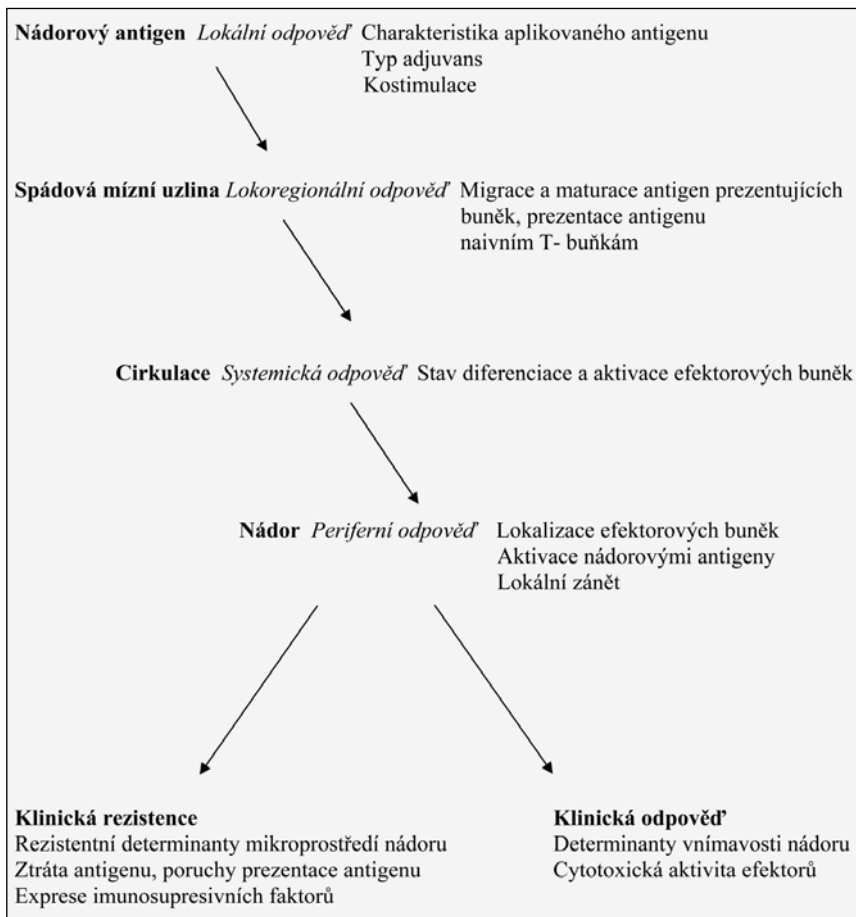
Imunoterapie nádorů

Znalost dobře charakterizovaných nádorových antigenů spolu s důkazem existence přirozené imunitní odpovědi vůči nádoru přímo vybízí k hledání strategií jak využít tuto protinádorovou imunitu klinicky, tj. jakožto léčebnou strategii. Nádorová imunoterapie může být koncipována buď jako aktivní, t.zn. terapeutická vakcinace, jejímž cílem je vhodnou imunizací aktivovat imunitní systém nemocného, nebo pasivní, spočívající v podávání již hotových efektorových složek, jako jsou protilátky či aktivované a expandované lymfocyty (1-6). Aktivní imunoterapie, pakliže by se jí skutečně podařilo formulovat do podoby účinné vakcíny, by měla celou řadu předností - v případě účinného a široce exprimovaného nádorového antigenu by ji bylo možno podávat širokému souboru pacientů, léčba by mohla probíhat ambulantně a vzhledem k existenci endogenních regulačních mechanismů se ukazuje riziko nežádoucí aktivity imunitního systému, například v podobě indukce autoimunity, jako nízké (7). Navíc, u úspěšné vakcinace se předpokládá dlouhodobá imunitní odpověď, tedy vytvoření imunologické paměti, i když se v době velmi nedávné ukázalo, že imunitní paměť může být výsledkem i některých zdařilých protokolů pasivní imunoterapie. V klinických experimentech byla dosud testována celá řada vakcinačních schémat, které lze velmi povšechně rozdělit na dvě skupiny - vakcinace nádorovými buňkami nebo vakcinace přímo nádorovým antigenem. Nejjednodušší vakcíny mají podobu letálně ozářené krátkodobé nádorové buněčné kultury či nádorového antigenu, buď v podobě celého proteinu nebo přímo specifického prezentovaného peptidu. Součástí takových vakcín ovšem rovněž může být vhodné adjuvans, jehož úkolem je atrahovat a aktivovat antigen-prezentující buňky; jako na vhodné adjuvans lze nahlížet i na některé cytokiny, např. GM-CSF či IL-2. Jinou cestou k aktivaci prezentace nádorových antigenů je vakcinovat dendritickými buňkami, které byly předtím *in vitro* ošetřeny tak, aby ve zvýšené míře prezentovaly cílový nádorový antigen, například inkubací s nádorovým lysátem, nádorovým antigenem či přímo prezentovaným peptidem (tzv. peptide-pulsed dendritic cells), či transfekcí genu pro nádorový antigen (1-6). Řada těchto klinických studií terapeutické vakcinace byla před velmi krátkou dobou předmětem kritického shrnutí, jež vyústilo v konstatování velmi nízké klinické účinnosti terapeutické vakcinace (nicméně je třeba podotknout, že z uvedeného shrnutí byly vyloučeny ty studie, kdy vakcinační protokol zahrnoval také nespecifickou aktivaci imunitního systému cytokiny, takže výsledek tohoto shrnutí není zcela reprezentativní) (7). Toto konstatování vyvolalo následnou diskusi o perspektivnosti celé této imunoterapeutické strategie (8); podle zdroje kompilace se klinická odpověď na terapeutickou vakcinaci udává v rozmezí od 3% do 10% vakcinovaných pacientů. Proč se terapeutická vakcinace zatím jen zřídka setkala s klinickým

úspěchem? Je třeba především uvést, že se jedná o cíl ze samotné biologické podstaty značně ambiciózní - aktivovat imunitní systém v průběhu onemocnění tak, aby byl schopen toto onemocnění zlikvidovat. Tohoto cíle se zatím nepodařilo dosáhnout ani u virových onemocnění, které často bývají uváděny jako nedostižný vzor protinádorové aktivní imunoterapie, ovšem u nichž se dosažené úspěchy omezují na profylaktickou vakcinaci, tj. před vlastním onemocněním, a to je přitom imunogenicitu virových antigenů daleko vyšší než je tomu u nádorových antigenů. U terapeutické vakcinace nádorů k tomu přistupuje navíc celkové zeslabení imunitního systému jak v důsledku samotného nádoru, tak v důsledku léčby předcházející vlastní imunoterapií.

O systematický pohled na problémy aktivní imunoterapie nádorů se ve svém příspěvku pokusil Dr. Francesco Marincola (Immunogenetics Section, Department of Transfusion Medicine, Clinical Center, National Institutes of Health, Bethesda) (Obr.1). Imunitní odpověď na terapeutickou vakcinaci sestává z několika diskretních kroků, z nichž každý musí proběhnout s dostatečnou účinností, aby mohlo dojít ke klinické odpo-

Obr. 1. Sled procesů formování imunitní odpovědi vůči nádoru. Nádorový antigen, ať už původu endogenně se vyvíjejícího nádoru nebo aplikovaný v rámci aktivní imunoterapie, vede nejprve k lokální odpovědi, nejčastěji v rámci spádových lymfatických orgánů. Zde dochází k prezentaci antigenu profesionálními antigen-prezentujícími buňkami naivním T-lymfocytům a k diferenciaci jak APC, tak aktivovaných T-buněk. Intenzita této lokální odpovědi závisí na řadě faktorů, jako je imunogenicitu antigenu, cytokinové prostředí, exprese kostimulačních molekul atp., a tyto faktory také určují, nakolik je lokální odpověď rozvinuta do systemické odpovědi. Pro klinickou protinádorovou odpověď je nezbytné, aby se systemická imunitní odpověď posléze přenesla na úroveň nádoru. To předpokládá lokalizaci aktivovaných protinádorových T-lymfocytů v místě nádoru a jejich přímou cytotoxickou aktivitu vůči nádorovým buňkám, zprostředkovanou jejich rozeznáním na základě exprimovaných nádorových antigenů. Bezprostřední klinická odpověď je do značné míry předurčena charakteristikami mikroprostředí každého nádoru, na délce klinické odpovědi ve smyslu relapsu původně citlivých nádorů se vedle toho významně podílejí faktory imunoeditingu, kdy imunitní systém působí jakožto selekční prostředí růstu rezistentních buněčných klonů, které ztratily původní citlivost např. v důsledku ztráty exprese nádorových antigenů, poruchy jejich prezentace či aktivity exprese imunosupresivních faktorů. Upraveno podle ref. 9.



vědi (9). V rámci současných vakcinačních schémat se zdá být relativně schůdné dosáhnout systemické imunitní odpovědi u významné části vakcinovaných pacientů, hlavním problémem zůstává, že tato systemická imunitní odpověď nenalézá svou odzvu v odpovídající klinické odpovědi nádoru. Tým Dr. Marincoly se pokusil porozumět tomuto poslednímu problému analýzou diferenciální exprese genů a polymorfismů v sekvenci DNA, tedy prostředky moderní genomiky. První otázka zněla - je nějaký rozdíl v globální expresi genů mezi individuálními metastázami (všechny projekty byly řešeny na modelu maligního melanomu) odpovídajícími klinicky na aktivní imunoterapii a těmi, u kterých ke klinické odpovědi nedošlo? U citlivých metastáz došlo v průběhu klinické odpovědi k aktivaci exprese specifické sady genů, zatímco u rezistentních lézí žádnou specifickou genovou expresi nebylo možné prokázat. Tento výsledek je možno interpretovat v tom smyslu, že mikroprostředí každého jednotlivého nádoru obsahuje determinanty, které rozhodují o jeho citlivosti vůči aktivovaným lymfocytům. Nejsou-li tyto determinanty naplněny, je nádor vůči okolní systemické imunitní odpovědi rezistentní. Klinická rezistence vůči aktivní imunoterapii je tedy v první řadě způsobena nedostatečnou citlivostí a tedy nikoli mechanismy úniku odpovídajícími imunoeditingu v případě spontánní protonádorové imunity (protože jinak by rovněž u rezistentních metastáz musela být prokazatelná specifická expresní změna) (10).

Druhá otázka byla následující - je možné identifikovat geny, jejichž exprese před vlastní vakcinací bude prediktabilní pro následnou klinickou odpověď či rezistenci? Odpověď Dr. Marincoly zní ano - srovnáním expresního profilu metastáz později klinicky odpovídajících a klinicky rezistentních bylo identifikováno 33 genů, jejichž expresní profil kolektivně určuje pozdější klinickou odpověď; asi polovina z těchto genů, u nichž je známa jejich funkce, kóduje proteiny přímo implikované v imunitní a zánětlivé odpovědi, což opět hovoří ve prospěch předešle naznačeného principu, že mikroprostředí každého jednotlivého nádoru má v sobě již v okamžiku zahájení vakcinace zakódovanou pozdější klinickou odpověď (10). Otázka třetí - lze na molekulární úrovni charakterizovat úlohu IL-2 jakožto adjuvans terapeutické vakcinace? Úloha IL-2 v regulaci imunitní odpovědi je totiž značně komplexní; na jedné straně působí jako prominentní růstový faktor T-lymfocytů a NK-buněk, který je nepostradatelnou součástí všech rychlých kultivačních médií používaných pro jejich *in vitro* expanzi a aktivaci, na druhé straně myši nesoucí mutace v genu pro IL-2 či v genech kódujících jeho receptorové podjednotky trpí generalizovanou autoimunitou (a nikoli imunodeficiencí, jak by na základě *in vitro* kultivace bylo možno soudit) (11, 12). Řešení tohoto imunologického paradoxu pravděpodobně představují výše zmíněné regulační T-lymfocyty (CD4⁺CD25⁺) - CD25 představuje α -podjednotku receptorového komplexu pro IL-2, nutnou pro vysoce afinitní vazbu ligandu, a IL-2 je nepostradatelný pro vývoj této buněčné populace, odkud pramení zřejmě jeho tolerizační účinek (11).

IL-2 se ovšem ukázal jako faktor významně zvyšující imunitní i klinickou odpověď na terapeutickou vakcinaci a ve světle jeho spíše tolerizačního účinku není lehké porozumět, proč tomu tak je. Odpověď vzešla opět z analýzy diferenciální exprese genů a zjistilo se přitom, že všechny geny aktivované IL-2 v rámci aktivní imunoterapie hrají úlohu v procesu aktivace monocytů a makrofágů. Tedy makrofágy a monocyty, a nikoli lymfocyty, jsou oním buněčným typem stojícím za terapeutickým efektem IL-2 v rámci vakcinačních protokolů a tento nálezkou hovoří ve prospěch významu lokálního zánětu pro klinickou odpověď nádoru.

Posledním diskutovaným projektem skupiny Dr. Marincoly, o němž na konferenci referovala Dr. Wangová, byla analýza DNA-polymorfismu jakožto klíče k dešifrování výsledku protinádorové imunitní odpovědi. Otázka přitom zněla - do jaké míry je klinická odpověď nádoru vysvětlitelná faktory nádorové heterogenity a specifického mikroprostředí každého nádoru a do jaké míry je naopak určena rozdíly na úrovni genomu?

Zmíněný projekt vycházel z pozorování velmi odlišné odpovědi na terapeutickou vakcinaci peptidem gp100₂₀₉₋₂₁₇ (jeden z klasických melanom-asociovaných antigenů) v kombinaci s IL-2, pro nějž byla v jedné studii zaznamenána velmi dobrá systemická imunitní i klinická odpověď v bělošské populaci a prakticky žádná odpověď v čínské populaci. Z vakcinovaných pacientů obou populací byly izolovány mononukleární periferní krve, které jednak posloužily jako zdroj DNA pro analýzu typu SNP (single nucleotide polymorphism) (13), jednak byly dále kultivovány v přítomnosti IL-2 a využity jako zdroj RNA pro analýzu transkripčního profilu na cDNA mikročipu a zdroj proteinů pro proteomickou analýzu. U obou populací lze najít jasné rozdíly v genech aktivovaných IL-2 jak na úrovni transkripce, tak na úrovni proteomu, a v současnosti jsou tyto rozdíly korelovány s polymorfismem v sekvenci DNA. Nalezení funkčních a regulačních polymorfismů v sekvenci příslušných genů a jejich promotorů ve vztahu k odlišné aktivaci interleukinem-2 nepochybně významně posune naše pochopení imunomodulačního účinku tohoto cytokinu, a to jak v rámci aktivní protinádorové terapie, tak i nad její rámec v oblasti obecné imunologie. Zjevným cílem v oblasti terapeutické vakcinace nádorů je najít takové polymorfismy v DNA, které by byly prediktabilní pro pozdější imunitní a klinickou odpověď. To by umožnilo lépe selektovat pacienty podrobující se aktivní imunoterapii a zvýšit tak efektivitu celého tohoto terapeutického přístupu.

Bylo rovněž formulováno několik imunologických strategií, jak zvýšit účinnost terapeutické vakcinace. Jednou z možností je současně s vakcinací provádět blokování negativních regulačních mechanismů zodpovědných za udržování imunologické tolerance. Jedná se například o použití blokujících protilátek vůči CTLA-4 (povrchová molekula aktivovaných T-lymfocytů, která interaguje s kostimulačními molekulami B7-1 a B7-2 a výsledkem této interakce je velmi silný negativní signál doručený T-lymfocytu) (14), či o neutralizaci CD4⁺CD25⁺ regulačních T-lymfocytů prostřednictvím α -CD25-neutralizační protilátky (problematická strategie, poněvadž CD25 je exprimován rovněž na aktivovaných efektorových T-lymfocytech) nebo farmakologicky (5). Pro ani jednu z těchto možností nejsou k dispozici odpovídající klinické studie, lze ovšem předpovědět, že jedním z problémů bude riziko obecné autoimunní aktivity.

Jinou z možností je použít pro vakcinaci peptidy, do jejichž sekvence byly zaneseny cílené aminokyselinové substituce, které zvyšují jejich afinitu vůči prezentujícím HLA-molekulám (6). Konečně, je také nutné uvažovat o nové generaci nádorových antigenů, které se vedle vysoké specifické exprese vyznačují rovněž přímou funkcí v procesu nádorové transformace; lze předpokládat, že nádorové buňky nebudou schopny reprimovat expresi takových antigenů do té míry, jak to bylo například popsáno u řady tumor-asociovaných antigenů. Přestože mechanismy úniku nehrají zřejmě žádnou významnou roli v první rezistenci nádoru vůči imunoterapii (viz výše), v průběhu samotné imunoterapie se zcela jistě dostávají ke slovu a projevují se relapsem a rezistencí původně citlivých nádorů (4). Jedním z těchto nových tumorových antigenů, jehož imunoterapeutické využití by tímto nebezpečím nemělo být zatíženo, je telomeráza, a první klinické výsledky s terapeutickou vakcinací prezentoval na konferenci Dr. Gustav Gaudernack (Section of Immunotherapy, Institute for Cancer Research, The Norwegian Radium Hospital, Oslo).

Telomeráza jako nádorový antigen nové generace

Telomeráza představuje komplexní ribonukleoprotein schopný aktivního prodlužování konců chromozomů - telomer, a tímto způsobem uděluje buňce imortalizovaný fenotyp. Buněčná imortalizace je důležitou a stabilní součástí nádorové transformace a ektopicky exprimovaná telomeráza je schopna kopekovat s buněčnými a virovými onkogeny v procesu transforma-

ce lidských buněk *in vitro*. Telomerázový komplex sestává z několika podjednotek, z nichž jako limitní vystupuje katalytická podjednotka - hTERT (human telomerase reverse transcriptase). Aktivace exprese této reverzní transkriptázy je nalézána ve šhruba 85 % klinických nádorů, vedle toho v germinálních buňkách a na podstatně nižší úrovni v bazální vrstvě keratinocytů, kmenových buňkách a aktivovaných lymfocytech (15). Telomeráza je cílem vyvíjené protinádorové terapie nejen ve smyslu imunoterapie, ale samozřejmě též ve smyslu farmakologických inhibitorů. U farmakologického blokování ovšem stále zůstávají pochybnosti ohledně možných toxických účinků na zmíněné normální telomeráza-pozitivní buňky, zatímco imunoterapie se v tomto ohledu zdá velmi nádorově-specifická; nízká exprese v kmenových buňkách zřejmě vylučuje, aby se tyto buňky, vzhledem k nízké aktigenní denzitě, staly citlivé vůči příslušným cytotoxickým T-lymfocytům, a germinální buňky zase vůbec neexprimují *HLA*-geny I. třídy, se stejným efektem. Bylo prokázáno, že hTERT-protein je procesován a odpovídající peptidy prezentovány nejrozšířenějšími class I *HLA*-alelickými variantami - *HLA*-A2, -A3 a -A24, a rovněž, což může být důležité z hlediska dlouhodobé imunitní odpovědi, *HLA* class II -prezentační drahou (*HLA*-DR7). CD8⁺ CTL specifické pro několik hTERT-peptidů byly izolovány z periferní krve a po *in vitro* aktivaci byly schopné lyzovat celou škálu nádorových buněčných linií, rovněž byly izolovány odpovídající CD4⁺ pomocné T-lymfocyty. Z této teoretické práce vyplynulo, že telomeráza vystupuje jako efektivní a univerzální nádorový antigen (16).

Dr. Gaudernack prezentoval předběžné výsledky norskó-švýcarské klinické studie terapeutické vakcinace hTERT-peptidy u nemocných s neoperovatelným karcinomem pankreatu (bez předchozí chemoterapie), nemalobuněčnou rakovinou plic a maligním melanomem. K vakcinaci byl použit pár z části identických peptidů - delší peptid představoval *HLA* class II -epitop pro indukci pomocných T-lymfocytů, z něho odvozený kratší peptid byl selektován pro vazbu s *HLA* molekulami I. třídy pro indukci cytotoxických T-lymfocytů. Peptidy byly aplikovány intradermálně současně s GM-CSF (pro aktivaci dendritických a Langerhansových buněk) v režimu 1., 2., 3., 4., 6. a 10. týden. Uvedený vakcinační režim byl schopen velmi efektivní aktivace imunitní odpovědi (indukce pomocných a cytotoxických T-lymfocytů byla zaznamenána u 80 % pacientů - a první výsledky naznačují velmi slibnou klinickou odezvu - v první malé sérii pacientů se objevilo několik kompletních a částečných klinických odpovědí u všech tří nádorových kategorií. Aktivovaná imunitní a klinická odpověď byly přitom nezávislé na *HLA*-alelické konfiguraci, což potvrzuje dřívější výsledky široké prezentace telomerázových peptidů napříč *HLA*-alelickým spektrem. Podařilo se rovněž optimalizovat dávku peptidu pro vakcinaci; ukázalo se totiž, že výsledkem příliš vysoké dávky peptidu je anergie T-lymfocytů, pravděpodobně v důsledku nadměrného aktivačního signálu.

Vakcinace buněčnými komplexy peptidů a proteinů tepelného šoku

Nevýhodou běžných vakcinačních strategií tak, jak byly popsány až dosud, je, že se jedná o do značné míry neselektivní postup ve vztahu k jednotlivým nádorům, který nepřiléhá k unikátním molekulárním vlastnostem každého jednotlivého nádoru. Tyto neselektivní strategie musí být nutně založeny na tumor-asociovaných antigenech, tedy převážně normálních buněčných proteinech koexprimovaných ve významném podílu nádorů dané nádorové kategorie. Tato strategie s sebou nese dvě základní nevýhody. Jednak vzhledem k tomu, že tyto proteiny nejsou nijak funkčně implikovány v procesu nádorové transformace, představuje utlumení jejich exprese jeden z příhodných mechanismů úniku nádorových buněk před imunitním atakem, jednak, jelikož se jedná o tělu vlastní normální proteiny, lze vycházet z toho, že imunitní odpověď vůči nim bude zatížena současně probíhajícími mechanismy tolerance

a jejich imunogenicita bude tudíž poměrně slabá. Již z klasických experimentů transplantace nádorů vyplývá, že většina nádorů vlastní silné imunogenní determinanty, které jsou ovšem specifické pro každý individuální nádor a které podle všeho odpovídají tumor-specifickým antigenům, tj. mutovaným proteinům kauzálně implikovaným v etiologii daného nádoru (2). Z hlediska nádoru tudíž nebude lehké tyto geny expresně vypnout a vzhledem k tomu, že se jedná o nové proteinové sekvence vzniklé mutacemi původních genů, mechanismy imunologické tolerance vůči nim nebudou zřejmě aktivní. Unikátní kombinace těchto specifických antigenních determinant v každém nádoru ovšem vylučuje běžné vakcinační postupy, např. peptidy či peptidem naloženými dendritickými buňkami. Objevila se ovšem nová vakcinační strategie, která by mohla být zaměřena právě vůči těmto unikátním tumor-specifickým antigenům, a to vakcinace komplexy peptidů a proteinů tepelného šoku (HPC-PC - heat shock protein-peptide complexes).

Proteiny tepelného šoku totiž vedle své klasické funkce molekulárních chaperonů v procesu sbalení proteinu do správné sekundární a terciální struktury mají ještě další specifickou funkci v procesu aktivace imunitního systému, a sice jako transportéry peptidů. V cytoplazmě každé buňky byly detekovány komplexy těchto proteinů s antigenními peptidy; předpokládá se přitom, že dojde-li ve tkáni k buněčné lýze, jsou tyto komplexy uvolněny do prostředí a následně interagují se specifickými receptory na povrchu profesionálních antigen-prezentujících buněk, především dendritických buněk. Dosud bylo popsáno několik receptorů pro HSP-PC, zejména CD14, CD91 a receptory Toll-like rodiny, především TLR2 a TLR4. Tato interakce vede k endocytóze komplexů, ovšem následované class I -prezentační drahou (crosspresentation). Takto dopravené peptidy jsou následně vystaveny na povrchu APC v komplexu s MHC glykoproteiny I. třídy a mohou tak nastartovat aktivaci cytotoxických CD8⁺ T-lymfocytů. HSP-PC zastávají kromě tohoto transportu peptidů další významné imunomodulační funkce, zejména aktivují diferenciaci dendritických buněk (a tedy zvýšení exprese kostimulačních molekul) a současně jsou schopny přímou vazbou aktivovat NK-buňky. HSP-PC tedy aktivují výhradně buněčnou imunitní odpověď (17). Proteiny tepelného šoku představují z biochemického hlediska dosti heterogenní skupinu, zahrnující nejméně 5 proteinových rodin, výrazně se lišících ve svých imunogenních vlastnostech; největší imunogenicitu vykazují peptidové komplexy hsp-proteinů Hsp 70 a gp 96. HSP-PC svým složením, tedy zastoupením jednotlivých peptidů, vždy odráží její antigenní vlastnosti buněk, ze kterých jsou izolovány. Izolace HSP-PC z nádorů tedy poskytuje cestu k unikátním tumor-specifickým antigenním peptidům a vzhledem k jejich shora naznačené funkci lze HSP-PC komplexy izolované z chirurgicky odstraněného nádoru přímo použít jakožto protinádorovou vakcínu (18). Své zkušenosti s tímto způsobem vakcinace na konferenci prezentoval Dr. Giorgio Parmiani (Unit of Immunotherapy of Human Tumors, Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori, Milan).

Dr. Parmiani prezentoval výsledky dvou malých klinických studií, jedné zaměřené na maligní melanom a druhé na do jater metastazující kolorektální karcinom. Ve všech případech byly k vakcinaci použity peptidové komplexy s proteinem tepelného šoku gp96, izolované z chirurgicky odstraněného nádoru a aplikované intradermálně, buď samostatně nebo, u jedné skupiny pacientů s maligním melanomem, společně s GM-CSF (s cílem aktivace dendritických buněk) a interferonem- α (s cílem zvýšení exprese *HLA* molekul I. třídy). Ve všech případech se podařilo dosáhnout významné systematické protinádorové imunity; vzhledem k tomu, že v tomto případě neznáme specifický antigen, je nutné přijmout speciální postupy kvantifikace této systemické imunitní odpovědi - kvantifikace se v tomto případě prováděla na základě schopnosti lymfocytů periferní krve lyzovat nádorové buňky určitého repre-

zentativního panelu nádorových buněčných linií. Celková doba přežití byla signifikantně vyšší u pacientů odpovídajících na vakcinaci systemickou imunitou ve srovnání s pacienty, u nichž této systemické odpovědi dosaženo nebylo; u skupiny pacientů s kolorektálním karcinomem bylo možné toto odlišení provést na velmi silné hladině významnosti ($p < 0,0001$), u maligního melanomu tak impozantní hladiny významnosti dosaženo nebylo ($p < 0,01$). Stejně jako u jiných přístupů terapeutické vakcinace nebylo možné ani zde korelovat systemickou imunitu a klinickou odpověď nádoru. Za zmínku stojí rovněž skutečnost, že ve všech případech pozitivní odpovědi na vakcinaci byla prokázána aktivace protinádorových CTL i NK-buněk.

V literatuře je možné najít několik dalších koncepčně podobných klinických studií terapeutické vakcinace HSP-peptidovými komplexy, se srovnatelnými výsledky. Randomizovaná studie fáze III v současnosti probíhá u melanomu a karcinomu ledviny a její výsledky lze očekávat s velkým zájmem. Zřetelnou nevýhodou tohoto způsobu vakcinace je ovšem naprostá závislost na vstupním vzorku odoperovaného nádoru, a to jak v kvantitativním slova smyslu (k přípravě HSP-peptidových komplexů je nutná určitá minimální velikost nádoru, aspoň 1 až 5 g, lépe 10 g, vakcinace končí vyčerpáním tohoto jednorázově připraveného množství HSP-PC), tak kvalitativně (nádor by měl být například prost rozsáhlejší nekrózy, problémy s přípravou HSP-PC mohou činit rovněž nádory ze tkáně se zvýšeným obsahem proteáz jako je například karcinom žaludku či pankreatu) (18). Možné řešení těchto problémů načrtl ve svém přehledu Milani et al., a to že by bylo možné sestavit pro každou nádorovou kategorii určitý antigenně reprezentativní panel nádorových buněčných linií a ty by pak představovaly potenciálně nekonečný zdroj HSP-peptidových komplexů pro vakcinaci (17). Důmyslné rozvinutí této strategie zmínil v diskusi Dr. Parmiani - podařilo-li by se sestavit tento reprezentativní panel nádorových buněčných linií, bylo by je možné stabilně transfektovat modifikovanými genovými konstrukty *hsp*-genů, které by umožnily sekreci HSP-PC do kulturního média, což by ohromně usnadnilo přípravu odpovídající vakcíny. Zdá se tudíž, že v této oblasti protinádorové terapeutické vakcinace lze v budoucnosti očekávat fascinující vývoj.

Pasivní imunoterapie

Terapeutická vakcinace představuje základní směr aktivní protinádorové terapie. Druhou možnou cestou je pasivní imunoterapie, při které doplňujeme pacientův imunitní systém již hotovými *ex vivo* připravenými a aktivovanými efektorovými mechanizmy. Z hlediska humorální imunity přicházejí v úvahu jako snad nejnámější představitelé pasivní imunoterapie monoklonální protilátky, z nichž několik získalo postavení standardních schválených léčiv. Postavení protilátek v nádorové imunologii obecně je ovšem zahaleno řadou otázek. Z hlediska mechanismu účinku si lze představit dvojitý typ působení - působení založené na imunologických mechanismech a působení založené na blokování a následné funkční neutralizaci povrchových signálních molekul. Imunologické mechanismy si lze v podstatě představit trojího druhu - aktivaci komplementu, aktivaci tzv. na protilátkách závislé buněčné cytotoxicity (ADCC - antibody dependent cellular cytotoxicity), jejíž podstatou je vazba Fc-receptorů a následná aktivace specifických efektorových buněčných populací, zejména NK-buněk a makrofágů, či konečně za třetí aktivaci idiotypické regulační sítě (14). Protilátky proti nádorovým antigenům jsou stabilní součástí séra onkologických pacientů, ostatně metodika identifikace nádorových antigenů screenováním expresních knihoven sérem onkologických nemocných (SEREX) již byla několikrát zmíněna. Žádné zjevné lytické působení těchto protilátek na nádorové buňky *in vivo* ovšem nikdy nebylo prokázáno, přestože *in vitro* po přidání heterologního komplementu může být tento

efekt docela snadno pozorován (2). Vyhraněně humorální typ imunitní odpovědi vůči nádoru lze považovat za prognosticky spíše špatné znamení, poněvadž tento typ imunitní odpovědi předpokládá polarizaci pomocných T-lymfocytů ve směru subsetu Th2, což s sebou automaticky nese potlačení diferenciací ve směru subsetu Th1, který je kriticky významný pro rozvoj buněčné imunitní odpovědi, jejíž místo v protinádorové imunitě je na rozdíl od protilátek nezpochybnitelné (19).

Kromě strategií zaměřených na imunologické popřípadě signálně-blokující mechanismy lze afinitu protilátek vůči povrchovým nádorovým antigenům využít ještě jedním způsobem, totiž jakožto prostředku transportu cytotoxických substancí do bezprostřední blízkosti nádorové buňky. V tomto případě se ovšem nepoužívají zpravidla protilátky v té podobě, jak se vyskytují *in vivo* (tzn. tetramer dvou lehkých a dvou těžkých řetězců), nýbrž metodikou rekombinantní DNA se ve vhodném uspořádání kombinují genové úseky odpovídající antigen-vazebným doménám (tzv. single-chain antibody). Na tyto molekuly je potom možné konjugovat např. radioaktivní izotop, rostlinný toxin nebo cytostatikum. Obecným problémem protilátkové léčby je u pevných nádorů přístupnost buněk lokalizovaných uvnitř nádoru. Zřejmě nejsnadnější bude proto uplatnění protilátkové léčby buď ve stádiu minimální reziduální nemoci u pevných nádorů, anebo při léčbě leukémií (1).

Buněčná pasivní imunoterapie rovněž prošla svým vývojem a jejím klasickým klinickým příkladem je využití tzv. LAK-buněk (lymphokine activated killers). Jedná se o heterogenní populaci lymfocytů periferní krve aktivovaných krátkodobou kultivací v přítomnosti interleukinu-2 a poté zpětně aplikovaných příslušnému pacientovi. Uvedený postup vedl v některých případech ke klinické odezvě u pacientů s melanomem a karcinomem ledviny, tento výsledek ve ovšem nepodařilo potvrdit v širší koncipovaných klinických studiích a celá tato strategie byla v podstatě opuštěna. Možné imunologické vysvětlení fenoménu LAK-buněk je v zásadě dvojitý - jednak aktivace NK- a NK T-buněk, jednak aktivace cytotoxických T-lymfocytů (IL-2 představuje možný kostimulační signál pro aktivaci CTL a bylo prokázáno, že tumor-infiltrující lymfocyty nabývají schopnosti lyzovat nádorové buňky až po několika hodinách kultivací v přítomnosti IL-2) (1, 20). Heterogenní povaha LAK-populace ovšem dosti ztěžuje imunologickou analýzu tohoto fenoménu.

Klinicky významným příkladem buněčné antigen-nespecifické pasivní imunoterapie je alogenní, resp. haploidentická transplantace kostní dřevě či hematopoetických kmenových buněk při léčbě celé řady zhoubných onemocnění krevních buněk. Vyzkávají-li dárce a příjemce transplantátu alelické rozdíly v HLA-genech, zejména I. třídy, pak to může vést jednak k odhojení transplantátu tak, jako u transplantací všech ostatních orgánů, nebo, specificky v případě transplantace kmenových buněk krvetvorby, k reakci nově zrekonstruovaného imunitního systému proti somatickým buňkám příjemce transplantátu (graft vs. host disease - GvHD - reakce štěpu proti hostiteli). Tato reakce představuje na jedné straně významnou klinickou postrtransplantační komplikaci, ovšem podařilo se jí překonat, snižuje se výrazně riziko pozdějšího relapsu leukémie (tzv. efekt graft vs. leukaemia - GvL). Toto zprvu empirické pozorování se vysvětluje tak, že imunitní odpověď nově zrekonstruovaného imunitního systému na bázi kmenových buněk dárce transplantátu aktivovaná alelickým rozdílem v HLA-genech se také zaměřuje proti reziduálním leukemickým buňkám, které přežily chemo- a radioterapii předcházející vlastní transplantaci. Dvě buněčné populace jsou zřejmě z hlavních částí odpovědné za GvL-efekt - aktivované T-lymfocyty a NK-buňky. Z hlediska CTL je GvL-efekt vysvětlován tak, že výsledkem alelických rozdílov v prezentujících HLA glykoproteinech je odlišné spektrum prezentovaných peptidů polymorfních vnitrobuněčných proteinů, kte-

ré se označují jako tzv. minoritní histokompatibilní antigeny (4, 20). Co se týče NK-buněk, právě jejich význam je v současnosti předmětem bedlivé analýzy a teoretický základ jejich využití pro GvL-efekt poskytla obecně imunogenetická přednáška, kterou na konferenci proslavil Dr. John Trowsdale (Immunology Division, Department of Pathology, University of Cambridge).

Pro biologickou aktivaci NK-buněk jsou klíčové receptory pro MHC glykoproteiny I. třídy; u člověka jsou tyto receptory kódovány tzv. *KIR*-geny (killer immunoglobuline-like receptors), přičemž interakce s odpovídajícím HLA class I-ligandem představuje pro NK-buňku prominentní negativní signál (tato koncepce aktivace NK-buněk se označuje jako „missing self“). Vedle těchto inhibičních receptorů jsou k dispozici rovněž aktivující KIR, platí ovšem, že každá NK-buňka exprimuje určitý inhibiční receptor a že jím doručeny negativní signál dominuje i v případě současného aktivujícího signálu. Na genetické úrovni vykazují *HLA*-geny i *KIR*-geny řadu pozoruhodných paralel. V obou případech jsou geny uspořádány do velkých genových clusterů - *HLA*-komplex na chromozomu 6p21 a *LCR* (leukocyte receptor complex), jehož složkou je *KIR*-podkomplex, na chromozomu 19q13. V obou případech došlo ke značné diverzifikaci jak počtu genů, tak na úrovni alelické bohatosti. Z evolučního hlediska se zdá, že tyto aspekty se během evoluce vyvíjely opakovaně a nezávisle - srovnání např. člověka a myši neumožňuje kupř. dedukovat ortologní geny pro MHC geny I. třídy (neexistuje žádná sekvenční homologie, která by umožnila přiřadit *HLA*-A, -B a -C k myším *H-2K*, -D a -L genům) a ještě o poznání větší druhová specifita existuje u *KIR*-genů. Tyto geny jsou u myši přítomny jen rudimentárně a jejich funkci plní strukturně odlišné geny rodiny *Ly-49* - to je důkazem rychlé evoluce obou genových sestav. Podstatné je rovněž, že *HLA*- a *KIR*-geny spolu na několika úrovních funkčně interagují. Například na genetické úrovni byla prokázána epistáze (tj. interaktivní, nikoli aditivní působení) v genetické etiologii komplexní imunitních fenotypů, jako je např. progresivní AIDS a psoriatická artritida (21, 22).

Na úrovni vývoje imunitního systému a z hlediska vysvětlení GvL-efektu je klíčový jiný typ interakce. Jde o to, že alelická sestava *HLA*-genů I. třídy diktuje to, které konkrétní *KIR*-geny budou klonálně exprimovány NK-buňkami tak, aby byla naplněna koncepce „missing self“. Jinými slovy, populace NK-buněk každého jedince sestává z klonů, z nichž každý exprimuje určitou typickou kombinaci *KIR*-genů, které souborně doručují negativní signál při interakci s přítomnými alelickými variantami *HLA*-glykoproteinů I. třídy - tímto způsobem je zajištěna tolerance na úrovni NK-buněk (23). A odtud pramení vysvětlení účasti NK-buněk v GvL-reakci. Alelický rozdíl v *HLA*-genech I. třídy (zejména *HLA*-B a *HLA*-C genech) mezi příjemcem a dárce transplantátu, je-li takové povahy, že NK-buňky dárce nejsou inhibovány *HLA*-glykoproteiny příjemce, vede k aktivaci NK-buněk. Tato aktivace je z důvodů, které nejsou dosud uspokojivě vysvětleny, zaměřena především vůči krevním buňkám příjemce (a nikoli ostatním somatickým buňkám jako je tomu u T-lymfocytů s výsledkem GvHD). To má několik důsledků. Za prvé se tím přímo vysvětluje GvL-efekt. Za druhé se tato aktivita rovněž obrací k reziduálním T-lymfocytům příjemce transplantátu, čímž se snižuje pravděpodobnost jeho odhojení, a za třetí vůči anti-gen-prezentujícím buňkám příjemce (zejm. dendritickým buňkám), které jsou nezbytné pro aktivaci T-lymfocytů transplantátu v rámci GvHD, jejíž frekvence se tudíž také snižuje - všechny tyto efekty byly klinicky prokázány u akutní myeloidní leukémie i samozřejmě na experimentální úrovni u myšího modelu tohoto onemocnění. Zdá se tedy, že typizace dárce a příjemce transplantátu na vhodnou alelickou neshodu *HLA*-genů I. třídy a *KIR*-genů může mít významné klinické uplatnění (24-26).

Pasivní specifická buněčná nádorová imunoterapie má v současnosti zejména podobu pokusů o adoptivní transfer defino-

vaných populací tumor-antigen-specifických cytotoxických T-lymfocytů, například v podobě izolace, *in vitro* expanze a zpětné aplikace tumor-infiltrujících lymfocytů (TIF) či z nich odvozených buněčných klonů tumor-reaktivních CTL. *In vitro* expanze těchto buněk se většinou provádí α -CD3 monoklonální protilátkou (což simuluje antigenní signál zprostředkovaný TCR) při kultivaci v přítomnosti IL-2. Tato *in vitro* expanze je dnes metodicky dobře zvládnutá a tímto způsobem je možné dosáhnout u ošetřovaných pacientů jednorázově velmi vysokých hladin tumor-reaktivních T-lymfocytů, zajisté výrazně vyšších, než je hladina dosažitelná aktivní imunizací (20). Touto metodikou *in vitro* expanze a následného adoptivního transferu se v nedávné době podařilo dosáhnout významných klinických úspěchů při léčbě pacientů s pokročilým metastazujícím maligním melanomem. Klinická odezva byla ovšem zaznamenána jen při adoptivním transferu krátkodobě expandovaných TIF (tedy nikoliv při aplikaci čistých buněčných klonů), a to pacientům, u nichž byla těsně před adoptivním transferem indukována lymfopenie krátkodobou intenzivní chemoterapií (kombinací cyklofosfamidu a fludarabinu). Objektivní klinická odpověď při tomto režimu adoptivního transferu byla zaznamenána u 50% ošetřených pacientů, což je výsledek nikdy nedosažený jakoukoli terapeutickou vakcinací (27).

Za ním stojí pravděpodobně několik nezávislých imunologických fenoménů. Použití krátkodobě expandované heterogenní směsi tumor-infiltrujících lymfocytů je pravděpodobně spojeno s nízkou mírou vyčerpání vnitřního proliferačního potenciálu buněk. Bylo rovněž prokázáno, že tato heterogenní TIF-populace obsahuje jak CD8⁺ tak i CD4⁺ T-lymfocyty a lze tudíž předpokládat, že v tomto případě se aplikují aktivované cytotoxické i pomocné lymfocyty, jejichž kooperace je nutná pro krátkodobou i dlouhodobou imunitní odpověď; v této souvislosti není překvapující velmi nedávné sdělení, že adoptivně přenesené CTL diferencují až v paměťové cytotoxické T-lymfocyty (29). Obdobná aplikace klonovaných vysoce afinitních CD8⁺-CTL musí být logicky spojena s daleko větší úrovní *in vitro* expanze (s možnými důsledky například v podobě přiblížení se senescenčnímu limitu) a nijak neřeší otázku pomocných T-lymfocytů. Indukovaná lymfopenie pak pravděpodobně působí na úrovni tzv. homeostatické proliferace, tj. poměrně málo definovaného přirozeného regulačního mechanismu udržujícího fyziologické hladiny periferních lymfocytů. Jednou ze složek této homeostatické regulace může být kompetice o limitní koncentrace prorůstových cytokinů (IL-2, IL-7, IL-15) - v tomto případě si lze představit, že cílená redukce endogenního imunitního systému před vlastním adoptivním transferem udělí kompetitivní výhodu přenášeným lymfocytům. V každém případě pouze uvedená kombinace krátkodobě expandovaných tumor-infiltrujících lymfocytů a lymfopenického příjemce těchto lymfocytů zajišťuje dlouhodobou perzistenci (po řadu měsíců) vysokých hladin (až 70 % všech lymfocytů periferní krve) aktivovaných antitumorových lymfocytů, která s sebou nese klinickou odpověď (27, 28).

Zajímavou možností dalšího vývoje pasivní buněčné imunoterapie shrnul ve svém příspěvku Dr. Michael I. Nishimura (Department of Surgery, University of Chicago, Chicago). Jedná se o strategii cíleného směřování imunitní odpovědi transferem α - a β -genů pro T-buněčné receptory specifických pro žádaný nádorový antigen. Jde tedy o to klonovat geny pro T-buněčné receptory vykazující vysokou specifitu a afinitu vůči prezentovaným peptidovým epitopům daného nádorového antigenu, tyto geny vsunout do retrovirových vektorů a tyto vektory použít pro genovou manipulaci vlastních pacientových lymfocytů. Zdrojem vhodných *TCR*-genů mohou být tumor-infiltrující lymfocyty či například *HLA*-transgenní myši po příslušné imunizaci. Ty jsou zejména výhodné pro izolaci vysoce afinitních TCR vůči self-antigenům (což je značná část tumor-asociovaných antigenů), protože v tomto případě lze

předpokládat, že T-buňky nesoucí vysoce afinitní TCR budou deletovány z periferního repertoáru člověka (30). Dr. Nishimura v této souvislosti prezentoval nanebevšest pozoruhodný nálezy, a to identifikaci TCR specifického pro peptid tyrozinázy (368-376, restrikce HLA-A2), izolovaného z klonu CD4⁺T-lymfocytů z TIF-populace maligního melanomu (31). Jedná se tedy o výjimečný případ TCR exprimovaného CD4⁺T-lymfocyty a přesto rozeznávající peptid v kontextu prezentace HLA molekulami I.třídy. Tento nálezy otevírá cestu k jedné velmi zajímavé praktické možnosti a k celé řadě experimentálních aplikací.

Afinita příslušného TCR vůči komplexu daného peptidu a prezentující molekuly HLA-A2 je zjevně tak velká, že je schopen efektivní interakce s nádorovým epitopem i bez přítomnosti koreceptoru, tj. CD8 (exprimovaný CD4 se nemůže v kontextu HLA molekul I.třídy uplatnit). Lze si tudíž představit možnost, že by mohlo dojít k současné interakci nádorové buňky s adoptivně podanými geneticky manipulovanými CD4⁺T-lymfocyty vybavenými tímto TCR a endogenními tumor-specifickými CD8⁺ CTL, a v tomto případě by k aktivaci protinádorové buněčné imunitní odpovědi mohlo dojít přímo v prostředí nádoru, poněvadž tyto geneticky modifikované CD4⁺T-lymfocyty by přímo zde mohly uplatnit svoji pomocnou funkci.

Z experimentálních aplikací je celá oblast manipulace lymfocytů *TCR*-geny propůjčujícími známou antigenní specifitu a afinitu velmi vhodná pro analýzu vzájemného vztahu afinity (tj. síly molekulární interakce mezi TCR- a MHC-komplexy), avidity (vyjadřující celkovou sílu interakce mezi CTL a cílovou nádorovou buňkou, která je funkcí exprimovaných koreceptorů, afinity a hladiny exprese interagujících TCR- a MHC-komplexů) a fenoménu aktivaci-indukované buněčné smrti (AICD - activation induced cell death). Podstatou AICD je skutečnost, že příliš silný signál doručený TCR-komplexem indukuje v příslušném T-lymfocytu apoptózu, a pro záměrné programování T-lymfocytů transferem *TCR*-genů je samozřejmě kriticky významné znát optimální úroveň afinity a expresní hladiny vnesených *TCR*-genů, která by zajišťovala maximální specifitu a aviditu vůči cílovým nádorovým buňkám, ale ještě neindukovala AICD.

Klinické použití interferonů a ostatních cytokinů

Různé cytokiny jsou součástí řady protokolů aktivní i pasivní imunoterapie, jak je v jednotlivých konkrétních případech uvedeno výše, vedle toho ovšem existují protokoly samostatného farmakologického použití některých cytokinů. Nejrozšířenější jsou v tomto ohledu interferony, zejména interferony- α , a interleukin-2. Přímé farmakologické nasazení cytokinů nemá zdaleka tak obecný charakter jako je tomu u ostatních imunoterapeutických postupů a týká se pouze několika typů nádorů - vedle několika hematologických nádorových onemocnění jde z pevných nádorů zejména o karcinom ledviny a maligní melanom, u IL-2 i o hepatocelulární karcinom.

Léčebné použití samotného IL-2 je principiálně totožné s jeho adjuvantním uplatněním v protokolech terapeutické vakcinace či adoptivního transferu efektorových buněk, jedná se tedy o pokus obecně aktivovat imunitní systém. Již předešle citované příklady dokládají ovšem, že IL-2 se nijak nevymyká z obecných dvou principů fungování cytokinů - redundance a pleiotropie, tj. řada fenotypických efektů IL-2 je také determinována dalšími cytokiny, ať už nezávisle či v kooperaci, a IL-2, jakožto každý jiný cytokin, má řadu různých a někdy i protichůdných efektů na různé populace leukocytů; jeho současné postavení v mechanismech aktivace efektorové odpovědi i tolerance bylo již předešle popsáno. Lze proto jen zopakovat závěr, který byl na stránkách tohoto časopisu již učiněn, že samostatné podávání imunomodulačních cytokinů bude vždy tak trochu sázkou do loterie, poněvadž klinická odezva bude vždy velmi závislá na velmi jemných odstínech stavu a míry aktivity imunitního systému ošetřovaného pacienta,

a to jak na systemické úrovni, tak na úrovni léčeného nádoru, přičemž je velmi obtížné tyto aspekty v potřebné míře analyzovat před zahájením terapie (32).

Postavení interferonů je v tomto ohledu poněkud odlišné. Biologický účinek interferonů zahrnuje totiž jak imunomodulační působení, v některých ohledech analogické interleukinu-2, ovšem jeho součástí je rovněž přímý efekt na somatické buňky. Receptory interferonů (zejména typu α/β) jsou široce tkáňově distribuovány a mezi přímé biologické efekty na úrovni somatických buněk patří např. inhibice proliferace, indukce diferenciace a inhibice angiogeneze. Signál doručený interferony je buňkou zpracováván v poměrně velmi komplexní podobě na několika úrovních, jejichž podrobný popis přesahuje rámec tohoto článku - primární signál je z buněčného povrchu do jádra převáděn transdukcí drahou JAK-STAT, mezi takto nově exprimovanými geny se ovšem nalézají geny pro další transkripční faktory, jako je rodina transkripčních faktorů IRF, dále PML a CIITA, které propagují interferonový signál v rámci sekundární transkripční odpovědi (33, 34). Mezi geny aktivovanými interferonem je i klasický tumorový supresorový gen *p53*, a to jak v rámci primární odpovědi (35), tak prostřednictvím faktoru PML (36, 37), vedle toho byl přímý tumorový supresorový účinek popsán i pro protein IRF-1 (38). Interferony vedle toho standardně zvyšují expresi *HLA* genů I.třídy. Interferonový signál má ovšem na druhé straně za následek i represu specifických genů, mj. genu pro vaskulární endotelový růstový faktor-1, odkud se pravděpodobně odvozuje jeho inhibiční účinek na nádorovou angiogenezi (39).

Maligní melanom je nádor, u kterého je IFN α přímo farmakologicky používáno (40) a molekulární podstata tohoto farmakologického působení interferonů byla předmětem příspěvku Dr. Józsefa Tímára (National Institute of Oncology, Budapest). Cílem bylo identifikovat geny, jejichž exprese zakládá v klinické praxi velmi heterogenní odezvu na aplikaci interferonů. Po metodické stránce projekt zahrnoval identifikaci a porovnání souboru aktivovaných a reprimovaných genů kultivovaných buněčných populací kryjících celou škálu vývoje a progresu melanomu (normální kultivované melanocyty, melanomové buněčné linie odpovídající různým stádiím nádorové progresu - primární vs. invazivní vs. metastatické - a různým úrovním růstové senzitivity na interferonový signál - senzitivní vs. rezistentní). Projekt dosud nebyl publikačně dokončen a proto není možné uvést detailní výčet zjištěných diferencially exprimovaných genů. Dva nálezy ovšem stojí za zdůraznění - zjistilo se, že IFN α reprimuje expresi genu pro MART-1/Melan A a současně zvyšuje expresi genu pro multilekovou rezistenci *MDR-1*. Tyto nálezy jsou velice zajímavé z hlediska diskuse, jaká forma následné terapie by byla nejvýhodnější v případě, že daný melanom vykazuje rezistenci vůči interferonu. Aktivace *MDR-1*-genu dopředu diskvalifikuje chemoterapii, ovšem jak represe *MART-1/Melan A*-genu, tak aktivace *MDR-1*-genu spolu s aktivací *HLA*-genů I.třídy by bylo potenciálně možné s výhodou využít pro následnou specifickou imunoterapii. *MDR-1*-pumpa totiž podle všeho zvyšuje sekreci cytokinů, včetně IL-2 (41), což by mohlo přispět k vytvoření vhodného mikropředtří pro aktivaci imunitní odpovědi. Ještě významnější se zdá nálezy represe *MART-1/Melan A*-genu. Jedná se totiž o imunodominantní liniově-specifický antigen, tzn. že je exprimován už na melanocytech, T-lymfocyty namířené proti němu musí být tudíž fyziologicky předmětem mechanismů tolerance, zároveň ovšem, vzhledem ke své imunodominanci, diktuje specifitu imunitní odpovědi a zastihuje pozdější melanomově-specifické antigeny. Represe tohoto genu následkem předchozí interferonové terapie by tudíž mohla být velmi výhodná právě z pohledu zrušení této imunodominance, což by mohlo otevřít dveře k vývoji a uplatnění nových melanomově-specifických vakcín s lepší vyhlídkou na klinickou odezvu.

Literatura

- Falk C.S., Riethmüller G., Gruber R. (2004): Tumorimmunologie. In: Hiddemann W., Huber H., Bartram C. (eds): Die Onkologie, pp.355-380, Berlin, Heidelberg: Springer.
- Schreiber H. (1999): Tumor immunology. In: Paul W.E. (ed.): Fundamental Immunology, Fourth Edition, pp.1237-1270, Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Zaloudík J. (1997): Protinádorová imunoterapie. Klinická onkologie 10, 94-96.
- Kuball J., Derigs H.-G., Wölfel T. (2002): T-Zelltherapie in der Onkologie. Therapeutische Vakzination, allogene Blutstammzelltransplantation und adoptiver T-Zelltransfer. Dtsch.Med.Wochenschr. 127, 755-762.
- Blattman J.N., Greenberg P.D. (2004): Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. Science 305, 200-205.
- Ko E.C., Wang X., Ferrone S. (2003): Immunotherapy of malignant diseases. Int.Arch.Allergy Immunol. 132, 294-309.
- Rosenberg S.A., Yang J.C., Restifo N.P. (2004): Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. Nature Med. 10, 909-915.
- Mocellin S., Mandruzzato S., Bronte V., Marincola F.M., Timmerman J.M., Levy R., Rosenberg S.A., Yang J.C., Restifo N.P. (2004): Cancer vaccines: pessimism in check. Nature Med. 10, 1278-1280.
- Marincola F.M., Wang E., Herlyn M., Seliger B., Ferrone S. (2003): Tumors as elusive targets of T-cell-based active immunotherapy. Trends Immunol. 24, 335-342.
- Wang E., Miller L.D., Ohnmacht G.A., Mocellin S., Perez-Diez A., Petersen D., Zhao Y., Simon R., Powell J.J., Asaki E., Alexander H.R., Duray P.H., Herlyn M., restifo N.P., Liu E.T., Rosenberg S.A., Marincola F.M. (2002): Prospective molecular profiling of melanoma metastases suggests classifiers of immune responsiveness. Cancer Res. 62, 3581-3586.
- Nelson B.H. (2004): IL-2, regulatory T cells, and tolerance. J.Immunol 172, 3983-3988.
- Hatina J. (2002): Molekulární biologie imunitní odpovědi – 11. mezinárodní imunologický kongres, Stockholm, 22. – 27.7.2001. Epidemiol.Mikrobiol. Immunol. 51, 82-87.
- Erichsen H.C., Chanock S.J. (2004): SNPs in cancer research and treatment. British J.Cancer 90, 747-751.
- Schwarz T. (2003): Immunology. In: Bologna J.L., Jorizzo J.L., Rapini P.R. (eds.): Dermatology, pp.65-81, New York: Mosby.
- Hatina, J., Reischig J. (2001): Molekulární biologie buněčné immortalizace a její vztah ke karcinogenezi. Klinická onkologie 14, 145 – 153
- Nguyen B., Elmore L.W., Holt S.E. (2003): Telomerase as a target for cancer immunotherapy. Cancer Biol.Therap. 2, 131-136.
- Milani V., Endres M., Kuppner M.C., Issels R.D., Noessner E. (2004): Hitzenschokproteine, Immunokompetenz und Vakzinierung. Dtsch. Med. Wochenschr. 129, 31-35.
- Oki Y., Younes A. (2004): Heat shock protein-based cancer vaccines. Expert Rev.Vaccines 3, 403-411.
- Lauerová L., Kocák I. (2001): Regulace protinádorové imunity pomocnými CD4+ Th1/Th2 lymfocyty. Klinická onkologie 14, 154-156.
- Bernhard H., Schmidt B., Meyer zum Büschenfelde C., Peschel C. (2001): Adoptiver Transfer von tumorreaktiven T-Zellen. Onkologie 7, 1196-1202.
- Trowsdale J. (2001): Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. Immunity 15, 363-374.
- Trowsdale J., Parham P. (2004): Defense strategies and immunity-related genes. Eur.J.Immunol. 34, 7-17.
- Shilling H.G., Young N., Guethlein L.A., Cheng N.W., Gardiner C.M., Tyan D., Parham P. (2002): Genetic control of human NK cell repertoire. J.Immunol. 169, 239-247.
- Kärre K. (2002): A perfect mismatch. Science 295, 2029-2031.
- Ruggeri L., Capanni M., Urbani E., Perruccio K., Shlomchik W.D., Tosti A., Posati S., Rogaia D., Frassoni F., Aversa F., Martelli M.F., Velardi A. (2002): Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. Science 295, 2097-2100.
- Velardi A., Ruggeri L., Capanni M., Mancusi A., Burchielli E., Perruccio K., Aversa F., Martelli M.F. (2004): Natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplantation. Hematology 2004, 337-341.
- Dudley M.E., Wunderlich J.R., Robbins P.F., Yang J.C., Hwu P., Schwarzenberger D.J., Topalian J.C., Sherry R., Restifo N.P., Hubicki A.M., Robinson M.R., Raffeld M., Duray P., Seipp C.A., Rogers-Freezer L., Morton K.E., Mavroukakis S.A., White D.E., Rosenberg S.A. (2002): Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. Science 298, 850-854.
- Rosenberg S.A., Dudley M.E. (2004): Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 101 (Suppl.2), 14639-14645.
- Powell D.J.Jr., Dudley M.E., Robbins P.F., Rosenberg S.A. (2005): Transition of late-stage effector T cells to CD27+CD28+ tumor reactive effector memory T cells in humans after adoptive cell transfer therapy. Blood 105, 241-250.
- Kaplan B.L.F., Yu D.C., Clay T.M., Nishimura M.I. (2003): Redirecting T lymphocyte specificity using T cell receptor genes. Intern.Rev.Immunol 22, 229-253.
- Roszkowski J.J., Yu D.C., Rubinstein M.P., McKee M.D., Cole D.J., Nishimura M.I. (2003): CD8-independent tumor cell recognition is a property of the T cell receptor and not the T cell. J.Immunol. 170, 2582-2589.
- Zaloudík J. (1998): Lokoregionální aplikace interleukinu-2 u solidních nádorů. Klinická onkologie 11, 8-13.
- Adam Z., Vorlíček J. (1996): Biologie, farmakologie a přehled léčebného užití interferonů. Klinická onkologie 9, 115-120.
- Boudný V., Kocák I., Kovářik J. (2002): Patogeneze transdukčních drah interferonových signálů a jejich význam pro predikci citlivosti nádoru na imunoterapii. Klinická onkologie 15, 126-129.
- Takaoka A., Hayakawa S., Yanai H., Stoiber D., Negishi H., Kikichi H., Sasaki S., Imai K., Shibue T., Honda K., Taniguchi T. (2003): Integration of interferon- α/β signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. Nature 424, 516-523
- Bernardi R., Scaglioni P.P., Brgmann S., Horn H.F., Vousden K.H., Pandolfi P.P. (2004): PML regulates p53 stability by sequestering mdm2 to the nucleolus. Nature Cell Biol. 6, 665-672.
- de Stanchina E., Querido E., Narita M., Davuluri R.V., Pandolfi P.P., Ferbeyre G., Lowe S.W. (2004): PML is a direct p53 target that modulates p53 effector function. Molecular Cell 13, 523-535.
- Taniguchi T., Lamphier M.S., Tanaka N. (1997): IRF-1: the transcription factor linking the interferon response and oncogenesis. Biochim. Biophys. Acta 1333, M9-M17.
- von Marschall Z., Scholz A., Cramer T., Schafer G., Schirmer M., Oberg K., Wiedenmann B., Hocker M., Rosewicz S. (2003): Effects of interferon alpha on vascular endothelial growth factor gene transcription and tumor angiogenesis. J.Natl.Cancer Inst. 95, 437-448.
- Sabel M.S., Sondak V.K. (2003): Pros and cons of adjuvant interferon in the treatment of melanoma. The Oncologist 8, 451-458.
- Drach J., Gsur A., Hamilton G., Zhao S., Angerler J., Fiegl M., Zojer N., Raderer M., Haberl I., Andreeff M., Huber H. (1996): Involvement of P-glycoprotein in the transmembrane transport of interleukin-2 (IL-2), IL-4, and interferon- γ in normal human T lymphocytes. Blood 88, 1747-1754.