

KLINICKÁ ONKOLOGIE

Imunoterapie v onkologii

Kolektiv autorů



Vydává ČLS JEP. ISSN 0862-495X. ISSN 1802-5307 on-line přístup
Indexed in MEDLINE/PubMed, EMBASE/Excerpta Medica, EBSCO,
SCOPUS, Bibliographia medica čechoslovaca, Index Copernicus

ročník 28 | **2015** | Supplementum 4

Editorial

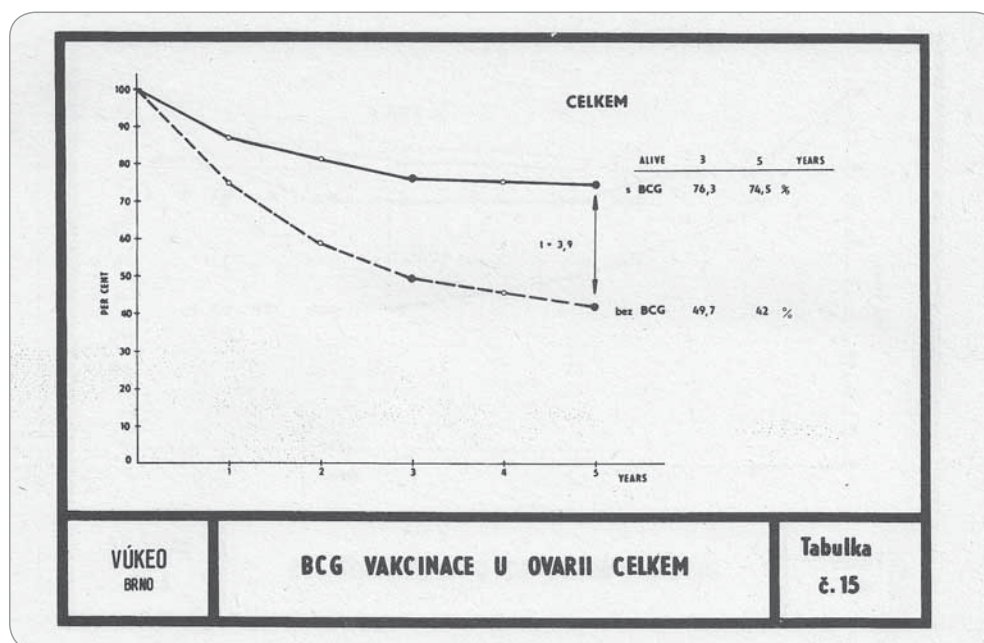
Vážení čtenáři,

úspěchy, které v současnosti zaznamenáváme s protinádorovou léčbou inhibitory kontrolních bodů imunitní reakce, T lymfocyty s chimérickými antigenními receptory nebo protinádorovými vakcínami, dodávají nám i pacientům potřebnou víru na cestě, kterou kráčíme společně. Myslím, že s celým autorským kolektivem, který přispěl ke vzniku tohoto supplementa, jsme zajedno v názoru, že stojíme na počátku nové éry, ve které budeme schopni využívat síly imunitního systému v léčbě a prevenci nádorových onemocnění. Sice si stále a opatrně připomínáme, že možná stejné prožitky jsme v souvislosti s imunoterapií v onkologii již v minulosti zažili, ale dnešní doba je přece jenom jiná. Pokročila významně dál v poznání imunitního systému, jeho interakci s nádorem a současně i v technologiích. Výzkum a vývoj v této oblasti určitě není u konce. I v klinické praxi na nás již nyní čeká řada nezodpovězených otázek, od hledání prediktorů účinnosti imunoterapie po využití možnosti vzájemné potenciace stávající cytostatiky a cílené protinádorové léčby a imunoterapie.

Na tomto místě bych chtěl ještě poděkovat všem autorům, kteří se podíleli na vzniku tohoto supplementa věnovaného imunoonkologii, včetně těch, jejichž články musely být z kapacitních důvodů přesunuty do nadcházejícího řádného čísla časopisu Klinická onkologie. Současně bych rád níže přiloženým obrázkem připomenul klinickou studii, od jejíhož ukončení uplynulo právě 40 let a slibné výsledky byly před 35 lety publikovány ve sborníku Brněnských onkologických dnů.

Hodně úspěchů imunoonkologii!

*doc. MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.
editor supplementa*



Graf. Křivky celkového přežití pacientek s ovariálním karcinomem v závislosti na aplikaci BCG vakcíny. Studie probíhala v letech 1972–1975. Vakcinace BCG vakcínou byla prováděna skarifikační technikou do kůže, první aplikace před operací, další za 14 dnů po operaci, týden po zahájení intermitentní léčby cyklofosfamidem, a pokračovala v týdenních aplikacích (případně dvoutýdenních při výskytu reakce) po dobu jednoho roku, střídavě s chemoterapií.

Převzato: Kučera F, Ptáčková B. Pokus o imunoterapii rakoviny vaječníků. Brněnské onkologické dny, květen 1979. Publikováno ve Sborníku Brněnských onkologických dnů, květen 1980.

Vydání supplementa bylo podpořeno edukačním grantem firmy Bristol-Myers Squibb spol. s r. o.

Nádorová imunoterapie: Jsme na úsvitu nové éry?

Historicky vzato je ze všech potenciálních přístupů k léčbě nádorových onemocnění systémová léčba přístupem nejmladším. Farmakoterapii využíváme k účinné léčbě zhoubných nádorů pouze několik posledních desetiletí a u řady diagnóz optimální léčebné postupy teprve hledáme. Většina v současné době používaných léků patří mezi cytotoxická léčiva, která neselektivně zasahují dělíci se buněčné populace. Tato relativní neselektivita s sebou nese časté nežádoucí účinky. Navíc je účinnost cytotoxických léků u řady nádorových onemocnění velmi omezená. Z cílených léčebných přístupů se může uplatnit hormonální léčba u nádorů, které jsou závislé na hormonech. Kromě toho se v posledních dvou desetiletích objevila řada léků cílících na mechanismy spojené s nádorovou transformací. Ačkoliv jsou tyto mechanismy společné většině nádorových onemocnění [1], na molekulární úrovni je patogeneze nádorové transformace pro každý nádor specifická, a tudíž i účinnost konkrétního cíleného léku je omezena pouze na určité nádorové onemocnění nebo skupinu nádorů. Na progresi nádoru se navíc většinou podílí několik odlišných molekulárních mechanismů a léčba cílící pouze na jediný z těchto mechanismů je zákonitě nakonec odsouzena k selhání. Tato omezení stran spektra účinnosti a délky účinku znamenají dvě zásadní limitace použití cílené léčby.

Nádorová imunoterapie potenciálně může současně překonat obě tyto limitace. Nádorová imunoterapie je účinná u celého spektra různých nádorových onemocnění a účinnost imunoterapie se zdá být dlouhodobá. I když snahy o využití imunitního systému v léčbě nádorových onemocnění se datují nejméně 100 let zpět, nádorová imunoterapie se stala reálnou léčebnou možností v podstatě až nyní. Kirkwood et al [2] nedávno rozdělili vývoj nádorové imunoterapie v posledních 40 letech do tří fází: fáze

nadšení, fáze skepse a fáze znovuzrození. Počátek současné fáze znovuzrození (renaissance phase) sice Kirkwood klade již do roku 1997, nicméně skutečnou akceleraci zájmu o imunoterapii jako metodu léčby nádorových onemocnění můžeme pozorovat až v posledních pěti letech. Ze zpětného pohledu je zřejmé, že teprve v posledních pěti letech se nádorová imunoterapie stala skutečně rovnocennou modalitou systémové léčby nádorových onemocnění, která je významem srovnatelná s jinými postupy. Tento zásadní obrat je spojen s příchodem monoklonálních protilátek zasahujících regulační mechanismy imunitní odpovědi.

Již v 90. letech minulého století bylo zřejmé, že aktivace imunitního systému může navodit dlouhotrvající, ve své podstatě prakticky trvalou, úplnou léčebnou odpověď u nemocných s metastatickými nádory. Tato dlouhotrvající odpověď se stala podkladem pro registraci interleukinu-2 (IL-2), nicméně bylo ji možno navodit u méně než 10 % nemocných [3,4]. Léčba vysokými dávkami IL-2 byla navíc spojena s vysokou toxicitou a byla také finančně velmi náročná. I když se zdála být léčba vysokými dávkami IL-2 srovnatelně účinná u celého spektra solidních nádorů [5], uplatnila se pouze u metastatických nádorů zcela rezistentních na cytotoxické léky, jako jsou maligní melanom a karcinom ledviny. Nízké procento pacientů odpovídajících na léčbu vedlo k tomu, že v randomizovaných studiích nebylo celkové přežití celé skupiny léčených pacientů statisticky významně ovlivněno. Nízká účinnost spolu s vysokými náklady a toxicitou pak neumožnily významnější rozšíření této léčby.

K obratu, který se z historického pohledu jeví jako zásadní, došlo s příchodem monoklonálních protilátek zasahujících regulační mechanismy imunitní odpovědi. Velmi rychle se tato léčiva stala standardním léčebným postupem u nemocných s metastatickým maligním

melanomem [6–8] a ukazují se účinnými i u jiných nádorů, např. u karcinomu plic [9] nebo karcinomu ledviny [10]. Je velmi pravděpodobné, že tyto léky budou mít významnou aktivitu i u dalších solidních nádorů.

Se zvýšeným zájmem o oblast nádorové imunologie a imunoterapie navíc vyšlo najevo, že jedním z mechanismů protinádorového účinku některých monoklonálních protilátek, které jsme dosud spíše vnímali jako inhibitory proliferace nádorových buněk, např. trastuzumabu nebo cetuximabu, je kromě jiného i aktivace imunitního systému [11–14]. Je rovněž zřejmé, že i na účinnosti cytotoxické chemoterapie se podílí imunitní systém prostřednictvím mechanismu imunogenní buněčné smrti [15,16]. Jako kliničtí onkologové jsme si tedy uvědomili, že imunoterapii ve smyslu manipulace imunitního systému již běžně provádíme, pouze jsme si této skutečnosti dosud nebyli vždy plně vědomi.

Příchod imunoterapie jako reálné léčebné metody samozřejmě znamená zásadní změnu v léčbě nádorových onemocnění. Postupně se mění léčebné postupy u celého spektra nádorů. Příchod imunoterapie jako důležité léčebné metody s sebou samozřejmě nese nutnost posílit vzdělávání klinických onkologů v této oblasti. Články v současném čísle *Klinické onkologie* přináší ucelený pohled na oblast imunologie a imunoterapie nádorových onemocnění a ukazují, že onkologická komunita si tuto problematiku osvojila a dále ji rozvíjí. Při studiu problematiky budou bedlivému čtenáři zřejmě i některé mezery v našem poznání. Za nejzávažnější z těchto mezer je možno považovat absenci prediktivních biomarkerů odpovědi na imunoterapii [17]. Lze však doufat, že intenzivní výzkum v této oblasti tuto mezeru brzy vyplní.

S rostoucí rolí imunoterapie roste samozřejmě i role klinického onkologa jako specialisty kompetentního pro léčbu ce-

lého spektra nádorových onemocnění. Problémy s aplikací léčby, včetně hodnocení odpovědi, jsou podobné u různých nádorů. Interní erudice klinických onkologů je navíc připravuje k zvládnutí nežádoucích účinků této léčby, které jsou rozmanité a mohou být velmi závažné. Opět se zde potvrzuje nutnost zachování klinické onkologie jako celku.

I když další pokrok nádorové imunoterapie je podmíněn pokroky experimentální imunologie, musí zůstat i nadále aplikace protinádorové imunoterapie výlučnou kompetencí klinického onkologa. Podobně jako cytotoxickou chemoterapii neřídí klinický biochemik, je role klinického imunologa jinde. Navíc více než imunologické laboratorní metody, které jsou v současné době v klinické praxi prakticky nepřínosné, se pravděpodobně uplatní v oblasti biomarkerů histologické vyšetření nádorové tkáně, včetně imunohistochemického vyšetření na přítomnost tumor infiltrujících lymfocytů a molekul regulujících imunitní odpověď, takže patolog bude podobně jako v jiných oblastech cílené léčby důležitou součástí týmu.

Musíme si však uvědomit, že jsme pouze na počátku rozvoje nádorové imunoterapie, která se může stát počátkem nové éry rozvoje klinické onkologie. Stav této rodící se nové éry shrnuje toto číslo časopisu *Klinická onkologie*.

Literatura

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
2. Kirkwood JM, Butterfield LH, Tarhini AA et al. Immunotherapy of cancer in 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62(5): 309–335. doi: 10.3322/caac.20132.
3. Fyfe G, Fisher RI, Rosenberg SA et al. Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy. *J Clin Oncol* 1995; 13(3): 688–696.
4. Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC et al. Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. *Ann Surg* 1989; 210(4): 474–484.
5. Dillman RO, Church C, Oldham RK et al. Inpatient continuous-infusion interleukin-2 in 788 patients with cancer. The National Biotherapy Study Group experience. *Cancer* 1993; 71(7): 2358–2370.
6. Robert C, Long GV, Brady B et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med* 2015; 372(4): 320–330. doi: 10.1056/NEJMoa1412082.
7. Robert C, Schachter J, Long GV et al. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2015; 372(26): 2521–2532. doi: 10.1056/NEJMoa1503093.
8. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363(8): 711–723. doi: 10.1056/NEJMoa1003466.
9. Garon EB, Rizvi NA, Hui R et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 372(21): 2018–2028. doi: 10.1056/NEJMoa1501824.
10. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012; 366(26): 2455–2465. doi: 10.1056/NEJMoa1200690.
11. Zhang W, Gordon M, Schultheis AM et al. ECGR2A and FCGR3A polymorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor-expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *J Clin Oncol* 2007; 25(24): 3712–3718.
12. Hudis CA. Trastuzumab-mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* 2007; 357(1): 39–51.
13. Valabrega G, Montemurro F, Aglietta M. Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Oncol* 2007; 18(6): 977–984.
14. Arnould L, Gelly M, Penault-Llorca F et al. Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *Br J Cancer* 2006; 94(2): 259–267.
15. Hornychova H, Melichar B, Tomsova M et al. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast carcinoma. *Cancer Invest* 2008; 26(10): 1024–1031.
16. Denkert C, Loibl S, Noske A et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28(10): 105–113. doi: 10.1200/JCO.2009.23.7370.
17. Melichar B. Laboratory medicine and medical oncology: the tale of two Cinderellas. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51(1): 99–112. doi: 10.1515/cclm-2012-0496.

prof. MUDr. Bohuslav Melichar, Ph.D.
Onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

Obsah | Contents

Editorial: Imunoterapie v onkologii	4S3
Editorial: Nádorová imunoterapie: Jsme na úsvitu nové éry?	4S4
 OBECNÁ ČÁST GENERAL PART	
Historie imunoterapie – od Coley toxinů ke kontrolním bodům imunitní reakce	4S8
History of Immunotherapy – from Coley Toxins to Checkpoints of the Immune Reaction Říhová B., Šťastný M.	
Protinádorové zbraně imunitního systému	4S15
Antitumor Weapons of the Immune System Hořejší V.	
Úloha regulačních T buněk v protinádorové imunitní odpovědi	4S23
The Role of Regulatory T-cells in Antitumor Immune Response Klabusay M.	
Únikové strategie nádorů pozornosti imunitního systému	4S28
Escape Strategies of Tumors from Immune Surveillance Šťastný M., Říhová B.	
Role imunoterapie v dětské onkologii	4S38
Role of Immunotherapy in Pediatric Oncology Bajčiová V.	
Chimérický antigenní receptor T lymfocytů – genová terapie budoucnosti u nádorových onemocnění?	4S44
Chimeric Antigen Receptor T-cells – Gene Therapy of the Future for Malignant Diseases? Šmída M.	
Význam imunogenní buněčné smrti v protinádorové imunitě	4S48
The Concept of Immunogenic Cell Death in Antitumor Immunity Fučíková J., Bartůňková J., Špišek R.	

SPECIÁLNÍ ČÁST | SPECIAL PART

Význam imunitního systému a možnosti imunoterapie u maligního melanomu Importance of the Immune System and Immunotherapeutic Options in Malignant Melanoma Krajsová I.	4S56
Imunoterapie renálního karcinomu Immunotherapy for Renal Cell Carcinoma Büchler T.	4S64
Význam imunitního systému a možnosti imunoterapie u karcinomu prostaty Role of the Immune System and Possibilities of Immunotherapy in Prostate Cancer Kubáčková K.	4S69
Dosavadní zkušenosti a perspektivy imunoterapie bronchogenního karcinomu Present Experience and Perspectives of Immunotherapy of Lung Cancer Havel L.	4S73
Imunoterapie u bronchogenního karcinomu a její perspektivy Immunotherapy of Bronchogenic Carcinoma and Its Perspectives Koubková L.	4S77
Immunoscore a jeho prediktivní hodnota u kolorektálního karcinomu Immunoscore and Its Predictive Value for Colorectal Cancer Závadová E., Špaček J., Vočka M., Konopásek B., Fučíková T., Netíková I., Dundr P., Skálová H., Petruželka L.	4S82
Imunitní systém u pacientů s nádory hlavy a krku Immune System in Patients with Head and Neck Carcinoma Partlová S., Bouček J., Kloudová K., Záborský M., Špišek R., Fialová A.	4S86
Imunoterapie uroteliálního karcinomu močového měchýře – od BCG vakcín k cílené imunoterapii Immunotherapy of Urothelial Carcinoma of the Bladder – from BCG Vaccines to Targeted Therapy Matoušková M.	4S95
Nežádoucí účinky moderní imunoterapie a jejich řešení v klinické praxi Side-effects of Modern Immunotherapy and How to Solve Them in the Clinics Lakomý R., Poprach A.	4S103
Terapeutický efekt a tolerance ipilimumabu u metastatického maligního melanomu v dětském věku – kazuistika Therapeutic Effect and Tolerance of Ipilimumab in Metastatic Malignant Melanoma in Children – a Case Report Bajčiová V.	4S115

Historie imunoterapie – od Coley toxinů ke kontrolním bodům imunitní reakce

History of Immunotherapy – from Coley Toxins to Checkpoints of the Immune Reaction

Říhová B.^{1*}, Šťastný M.^{2**}

¹ Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha

² Bristol-Myers Squibb spol. s r.o., Praha

Souhrn

Imunoterapie začala v roce 1868 tím, že německý lékař Busch úmyslně infikoval pacienta se sarkomem měkké tkáně růží. Pozoroval sice rychlé zmenšení nádoru, ale reakce byla jen částečná a nádor se posléze vytvořil znova. A byl to William B. Coley, který v roce 1891 podal pacientovi se sarkomem měkké tkáně kulturu streptokoka. Následně došlo sice k řadě závažných ataků infekce, ale nádor poté nekrotizoval a pacient byl následujících osm let zdravý. Směs streptokoků a dalších bakterií včetně kmenů *Serratia marcescens*, *Staphylococcus* a *Escherichia coli* byla nazvána „Coleyovy toxiny“ a používána dalších 45 let. Na začátku 20. století byla tato imunoterapie nahrazena exaktnější radioterapií a později i první chemoterapií, pro kterou byl používán yperit. Imunoterapie je ale léčba, která využívá pro likvidaci nádoru vlastní imunitní systém pacienta a má proto před ostatními způsoby léčby řadu výhod. Rozhodujícími momenty se v imunoterapii v polovině 80. let 20. století staly: a) adoptivní buněčná terapie spoléhající na pacientovy tumor infiltrující lymfocyty, b) podání rekombinantních cytokinů, jako byl rIL-2, c) určení prvních s tumorem asociovaných antigenů a d) vývoj monoklonálních protilátek se specifitou namířenou proti nádoru. Následovaly vakcíny z dendritických buněk. Nesmírný pokrok imunoterapie byl zaznamenán v posledních 20 letech a byl umožněn tím, že byly pochopeny některé z komplexních vztahů mezi nádorem a imunitním systémem. Tak začalo testování nových způsobů umožňujících manipulaci s protinádorovou odpovědí. Patří mezi ně blokáda inhibitorů imunitních checkpointů – kontrolních bodů imunitní reakce.

Klíčová slova

BCG vakcína – adoptivní buněčná imunoterapie – rozpoznání nádoru

Summary

Immunotherapy dates back to 1868 when German physicist Busch intentionally infected patients suffering from soft tissue sarcoma with erysipelas. Rapid tumor shrinkage was observed but response was only partial and tumor recurrence subsequently occurred. It was William B. Coley who in 1891 injected a patient with a soft tissue sarcoma with streptococcal cultures. Following a severe attack of erysipelas, the tumor underwent extensive necrosis and the patient remained disease-free for eight years. The mixture of *Streptococcus* and other bacteria including *Serratia marcescens*, *Staphylococcus* and *Escherichia coli* was referred to as 'Coley's toxin' and was used for the next 45 years. This first immunotherapy was replaced at the beginning of the 20th century by more exact radiotherapy and later on by first chemotherapy with yperit. However, immunotherapy is a treatment that uses patient's own immune system to help fight cancer and as such has several advantages over other treatments. Thus, the next major milestones in immunotherapy came in the middle of the 80s as a) adoptive cell therapy relaying on patients' tumor infiltrating lymphocytes, b) injection of recombinant cytokines such as rIL-2, c) identification of the first tumor-associated antigens and d) development of tumor-specific monoclonal antibodies. It was followed by dendritic cells vaccines. Tremendous progress has been made in the past two decades with regard to understanding the complex interactions between tumors and the immune system and developing innovative ways to manipulate the antitumor immune response. It is recently represented as blockage of immune checkpoint inhibitors.

Key words

BCG vaccine – adoptive cellular immunotherapy – cancer recognition

Tato práce byla podpořena grantem GAČR P301/12/1254 a IGA MZ ČR NT/11542-6.

This work was supported by grant GACZ P301/12/1254 a IGA MH CZ NT/11542-6.

* Autorka deklaruje, že v souvislosti s předmětem studie nemá žádné komerční zájmy.

* The author declares she has no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

** Prohlašuji, že v souvislosti s výše uvedeným příspěvkem, jehož jsem autorem/spoluautorem, mám střet zájmů se společností Bristol-Myers Squibb spol. s r. o.

Autor je bývalý pracovník Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i., Praha.

** I declare that, in connection with this contribution of which I am the author/co-author, I have a conflict of interest with following company: Bristol-Myers Squibb al. s r. o.

Author is former employee of Institute of Microbiology of the AS CR, v. v. i., Prague.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



prof. RNDr. Blanka Říhová, DrSc.
Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.
Videňská 1083
142 20 Praha 4
e-mail: rihova@biomed.cas.cz

Obdrženo/Submitted: 4. 8. 2015

Přijato/Accepted: 14. 9. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko2015458>

Myšlenka využít imunitní systém k spolupráci při léčbě závažných nádorových onemocnění napadla pravděpodobně někoho z vědecky zaměřených lékařů dávno předtím, než se před 150 lety, přesně **v roce 1868**, objevila v literatuře v podobě prvního odborného článku [1]. Už tehdy šlo o pozitivní vztah mezi život ohrožující infekcí – erysipélem – a maligním nádorem – lymfosarkomem. O tom, že původcem erysipelu je bakterie *Streptococcus*, se v té době ještě nevědělo. To zjistil až o mnoho let později, v roce **1881**, německý lékař Friedrich Fehleisen, kterému se jako prvnímu kultivace streptokoků povedla. A také on pozoroval ústup nádorového onemocnění po rozsáhlé streptokokové infekci [2]. Oba články pravděpodobně vzbudily pozornost odborníků, protože vzápětí bylo podobných pozorování publikováno hned několik. Zmínili se o něm i další vynikající mikrobiologové, jakými byli přírodovědec Louis Pasteur nebo lékaři Robert Koch a Emil von Behring. Ale na odvahu použít tuto znalost ve formě **prvního exaktního imunoterapeutického přístupu** bylo nezbytné čekat dalších 10 let. **V roce 1891** mladý newyorský chirurg William Bradley Coley podal pacientovi s neléčitelným lymfosarkomem opakovaně přímo do nádoru živou kulturu bakterií *Streptococcus erysipelatis* [3]. Informace získal z nemocničního archivu, kde byly dokumentovány tři případy, ve kterých došlo buď k vyléčení, nebo alespoň k výraznému ústupu inoperabilního lymfosarkomu v souvislosti s atakem erysipelu. V odborné literatuře bylo možno najít dalších 38 podobných případů. Pacienta se podařilo vyléčit, a tak William Coley ve svém výzkumu pokračoval. Zjistil, že podobný, ale mnohem bezpečnější efekt mají bakterie usmrcené teplem. O rok později, v roce **1892** se objevila informace, že *B. prodigiosus* (*Serratia marcescens*) a jeho toxiny zvyšují virulenci ostatních mikroorganismů [4], a později (**1907**) dokonce i to, že toxiny mají výrazný protinádorový efekt [5]. Bylo proto přirozené, že pacientům byla nadále podávána směs usmrcených bakterií obohacená nejenom o *S. marcescens*, ale také o *Staphylococcus pyogenes aureus* a o *Escherichia coli*. Téměř vzápětí se

pro stejný účel používaly jen filtráty uvedených bakteriálních kultur v nejrůznějších kombinacích. Kolem roku **1900** prokázal I. I. Mečnikov význam fagocytů při infekčních onemocněních. Definoval zánět jako nejdůležitější projev imunitní reakce organismu a věnoval se i úloze fagocytózy při hojení erysipelu [6]. Také na základě tohoto pozorování bylo možné efekt „Coley toxinů“ vysvětlit jako schopnost injikovaných bakterií vyvolat zánět a stimulovat fagocyty s antibakteriální aktivitou, které mohou vedlejším účinkem (bystander effect) zabít také nádorové buňky.

Během následujících 40 let dosáhl Coleyův tým poměrně významných výsledků, a to nejenom při léčbě lymfosarkomů, ale i při léčbě osteosarkomů, sarkomů měkkých tkání a melanomů [7]. Směs bakterií byla nazvána „Coley toxiny“ a on sám byl označen jako „otec imunoterapie“. Výsledky však byly obtížně reprodukovatelné a hlavně vědecky nedostatečně odůvodněné. Proto se pro léčbu nádorů začala **počátkem 20. století** čím dál častěji používat modernější a exaktnější **radioterapie** a **kolem roku 1945** byl pro léčbu lymfoidních malignit poprvé použit jako moderní chemoterapie **yperit**. Léčba „Coley toxiny“ byla pro svou větší riskantnost a nejisté výsledky pomalu opouštěna, ačkoliv byla během své 40leté historie značně zdokonalena. Znamenala ale začátek dokumentované imunoterapie, k jejímž principům se dnes, po více než 100 letech znovu vracíme. Původně spíše jen teoretická představa, a to že aktivace T buněčné složky imunitní odpovědi by mohla významně přispět k protinádorové terapii, získává v současné době první klinicky významné výsledky.

Historie moderní imunoterapie začíná **50. lety minulého století**, kdy bylo prokázáno, samozřejmě pouze v modelových experimentálních systémech, že **imunitní systém** a jeho buňky jsou nejenom schopny **nádor rozpoznat, ale dokonce ho i odstranit**. Byl to Sir MacFarlane Burnet, který v roce **1957** vyslovil hypotézu, že fyziologickou úlohou imunitního systému je rozpoznat pro organismus potenciálně nebezpečné buňky, včetně buněk nádorových, a zlikvidovat je pomocí efektorových mechanismů jak vrozené, tak získané imunity. Tato hy-

potéza byla nazvána hypotézou imunitního dohledu (immunosurveillance) [8]. Po původně všeobecném přijetí ale byla desítky let zpochybňována a dnes je nahrazována hypotézou imunoeditace, někdy také nazývanou hypotézou tří E (elimination, equilibrium, escape) [9].

První úspěšné klinické pokusy, *de facto* navazující na původní Coleyovu myšlenku o imunoterapii nádorů s pomocí infekčních agens, byly publikovány **v polovině 70. a začátkem 80. let minulého století**. Pacientům, kteří trpěli různými nádory, na počátku zejména těm s karcinomem prsu, byla podávána živá bacillus Calmette-Guerin (BCG) vakcína [10] nebo *Corynebacterium parvum* [11]. Dnes je BCG terapie vyhrazena pro intravezikální aplikaci pacientům s povrchovými lézemi karcinomu močového měchýře.

Výsledky imunoterapie ale nebyly zcela přesvědčivé, a proto fázi prvotního nadšení vystřídalo období skepse. Novou naději vzbudily až **v roce 1984 a 1989** práce prof. Rosenberga a spolupracovníků z National Cancer Institute (NCI, USA) o imunoterapeutických možnostech interleukinu-2 (IL-2) [12,13] a **v roce 1985** také metoda přenosu tumor infiltrujících lymfocytů (TIL), adoptivní T buněčná terapie [14,15]. Tu povolil americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (US Food and Drug Administration – FDA) koncem 80. let minulého století pro léčbu metastazujícího melanomu a první úspěšné výsledky byly publikovány již **v roce 1988** [16]. Metoda adoptivního T buněčného přenosu patří do oblasti pasivní imunoterapie, od které se očekává víceméně okamžitý efekt. Princip spočívá v izolaci autologních TIL, případně i mononukleárních buněk z periferní krve, u kterých jsou *ex vivo* pomocí imunostimulujících cytokinů (IL-2) zesíleny jejich tumoricidní vlastnosti. Po mnohahodinové kultivaci jsou pak tyto buňky vráceny jako vysoce účinné LAK (lymphokine-activated killer cells – zabíječi aktivovaní lymfokiny) intravenózní cestou zpět pacientovi.

Na základě dnešních poznatků se domníváme, že úspěšnost této terapie závisí především na schopnosti efektorových T lymfocytů aktivovaných *ex vivo* podílet se na změně supresivního mikro-

prostředí nádoru tím, že nahrazují/vytěsňují buněčné populace se supresivními vlastnostmi, jako jsou T regulační buňky (Treg) a myeloid-derived suppressor cells (MDSC). Klinicko-patologické studie potvrzují, že mezi prodloužením života pacienta a přítomností intratumorálních CD3⁺ nebo CD8⁺ cytotoxických buněk existuje poměrně silná korelace.

Moderní podoba adoptivní T buněčné terapie využívá od roku 2006 molekulárně-biologickými metodami vytvořené tumor atakující **CAR T lymfocyty** [17]. Ty mají vysoce specifický chimerický antigenní receptor (chimeric antigen receptor – CAR), který rozpoznává intaktní povrchový antigen nádorové buňky pomocí afinitní domény, většinou scFv protinádorové protilátky. Intracelulární část je obohacena o signalizační domény kostimulačních molekul. Použití CAR T lymfocytů tak obchází podmínku vyžadující, aby nádorová buňka měla fungující antigen-přezentační mechanismus, exprimovala vysoké hladiny MHC (major histocompatibility complex) glykoproteinů I. a II. třídy a stimulovala tím dostatečnou T buněčnou odpověď. Úspěchu napomáhá také lymfodeplece nežádoucích endogenních Treg, která přenosu aktivovaných TIL předchází a usnadňuje tím jejich přijetí. Tento přístup je v řadě případů doprovázen kompletním a dlouhotrvajícím vyléčením.

Do pasivní imunoontoterapie je třeba počítat také podávání některých **monoklonálních protilátek**. Princip jejich vzniku a izolace byl prvně popsán **v roce 1975** [18]. Jejich objevitelům, George Köhlerovi a Césarovi Milsteinovi, byla za tento objev **v roce 1984** udělena Nobelova cena. K pasivní imunoontoterapii se používají ty monoklonální protilátky, které jsou namířeny proti vybraným povrchovým znakům a nádorové buňky buď opsonizují a umožňují jejich eliminaci prostou fagocytózou, aktivací komplementového systému, mechanismem zvaným na protilátkách závislá cytotoxicita (antibody-dependent cellular cytotoxicity – ADCC), anebo antagonizují jejich onkogenní dráhy. V ojedinělých případech se účinek připisuje i částečné stimulaci adaptivní imunitní odpovědi, což naznačuje důležité pro-

pojení pasivní a aktivní imunoontoterapie. Efekt monoklonálních protilátek lze zesílit navázáním toxinů (imunotoxiny), radionuklidů nebo léčiv. Tyto možnosti se označují jako **cílená terapie** a testují se **od začátku 80. let minulého století**.

Od 90. let minulého století je pasivní imunoontoterapie postupně nahrazována déletrvající imunoontoterapií aktivní, i když striktně oddělit jednu od druhé prakticky nelze. Výhody aktivní imunoontoterapie jsou v tom, že je specifitější, ale zejména dlouhodobější. V optimálním případě by měla pacienta chránit před event. pozdějším relapsem doživotně.

Na základě moderních poznatků dnes víme, že v zásadě existují tři místa, která je možné aktivně imunoontoterapeuticky ovlivnit tak, aby bylo dosaženo efektivní protinádorové odpovědi. Je potřeba: a) zajistit a posílit antigen-přezetující schopnost dendritických buněk, b) zahájit protektivní T buněčnou odpověď a c) překonat imunosupresivní prostředí nádoru. Dnešní aktivní imunoontoterapie se proto zaměřuje na posílení imunitního systému pacienta s nádorem ve smyslu zlepšení jeho schopnosti nádor rozpoznat, dodat mu chybějící imunokompetentní buňky vykonávající efektorové funkce, a zejména odstranit nebo alespoň zeslabit výrazně imunosupresivní prostředí nádoru [19].

T buněčná protinádorová reakce je mimořádně komplexní a pozitivně a negativně regulovaná na tolika úrovních, že to obtiže prvních imunoterapeutických přístupů a léta skepse, které je doprovázely, vysvětluje. Na nádor se dlouho pohlíželo jako na problém nádorových buněk a na nádor samotný jako na geneticky podmíněnou chorobu. Přesně v tom smyslu **v roce 2000 Hanahan a Weinberg** definovali šest základních charakteristik nádorové buňky. Je to 1. udržování proliferačních signálů, 2. odolnost buněk k smrti, 3. indukce angiogenezy, 4. schopnost nesmrtelné replikovatelnosti, 5. aktivace invaze a metastáze a 6. schopnost vyhýbat se růstovým supresorovým aktivitám [20]. **O 10 let později se pohled na nádor změnil** a nádor je dnes považován za systémovou chorobu, u které je imunitní systém důležitou komponentou. Byly definovány čtyři další základní charakteristiky,

z nichž dvě se týkají imunitního systému. Je to 7. schopnost vyhnout se imunitní destrukci, jakou je akutní zánět, a 8. vyvolat naopak zánět chronický, který růst nádoru podporuje [21].

Specifická protinádorová reakce začíná tím, že nádorový antigen, ať už produkován, nebo uvolněný z umírajících a mrtvých nádorových buněk, je fagocytován nezralými dendritickými buňkami. Ty pohlcený antigen zpracovávají pro prezentaci na MHC glykoproteinech II. třídy nebo pro cross-prezentaci na MHC glykoproteinech I. třídy a se zpracovaným antigenem putují do nejbližších lymfatických uzlin. Pokud se zachycení a prezentace odehrají v prostředí imunogenních maturačních signálů, dendritické buňky vyžívají v antigen prezentující buňky a v lymfatické uzlině zahajují specifickou protinádorovou reakci. V opačném případě dochází k navození imunologické tolerance, která způsobí T buněčnou depleci, anergii nebo produkci indukovaných inhibičních T regulačních buněk (iTreg). Na protinádorové reakci se podílí cytotoxické CD8⁺ efektorové T lymfocyty, CD4⁺ pomocné T lymfocyty, NK buňky (natural killer) a NKT buňky (natural killer T). Správnou polarizaci tumor infiltrujících antigen prezentujících buněk lze ovlivnit pomocí aktivačních signálů, které často dodávají patogenní bakterie. Pro intenzitu protinádorové reakce je zásadně důležitá interakce povrchových ligand CD80/86 dendritických buněk s T buněčnými pozitivními (CD28) a negativními (CTLA-4) kostimulačními molekulami. Pozitivní interakce CD28 s CD80/86 zahájí potenciálně protektivní T buněčnou odpověď, zatímco negativní interakce CTLA-4 s CD80/86 T buněčnou odpověď potlačuje, a navíc dochází k vzniku supresorové Treg subpopulace. Negativní interakce je fyziologický způsob, kterým se organismy chrání před nadměrnou imunitní reakcí a v důsledku toho i autoimunitami. T buněčnou anergii až depleci způsobuje také interakce T buněčné povrchové molekuly PD-1 s ligandy PD-L1/PD-L2.

Antigenem aktivované T buňky spolu s B buňkami a NK buňkami opouštějí lymfatickou uzlinu a akumulují se mik-

roprostředí solidního nádoru. Měla by to být nakonec silná adaptivní imunita doprovázená imunitní pamětí, která vede k odstranění těch nádorových buněk, které nezabije žádná z klasicky využívaných terapií, jako je chirurgie, chemoterapie, radioterapie a hormonální terapie, a která pacienta ochrání před opakovaným výskytem nádoru.

Nedílnou součástí protinádorové reakce je sekrece řady prozánětlivých cytokinů, které dále zesilují efektorové mechanismy vrozené imunity a podporují expanzi a produkci nádorově specifických T buněk a protilátek v adaptivní imunitě. Jejich úloha je však silně kontraverzní. V období akutního zánětu těsně po začátku imunitní reakce je jejich účast při eliminaci maligních buněk výhodná, nebo dokonce nezbytná, jejich dlouhotrvající produkce vyvolává chronický zánět, který je často místem vzniku maligního onemocnění.

V oblasti **prvního zásahového místa, lymfatické uzliny**, se velké naděje dávaly a dávají protinádorovým vakcínám. Ty mohou být buď exogenní, nebo endogenní. **Exogenní** vakcína je to, co si pod pojmem klasické vakcíny většinou představujeme. Jde o podání předem vybraného peptidového nebo proteinového antigenu ve vhodném adjuvansu a někdy i s vhodným nosičem. U infekčních agens je tento způsob známý **od konce 18. století (Edward Jenner, 1796)** a je velmi účinný jak u protektivních, tak u terapeutických vakcín. Mnohem horší výsledky má dosud vakcinace u nádorů. Důvody mohou být jak ve špatném zpracování a prezentaci antigenu dendritickými buňkami, tak v použití suboptimálního adjuvansu, v nepřítomnosti látek, které by podporovaly, nebo dokonce umožňovaly T buněčnou odpověď anebo pomáhaly při odstraňování imunosupresivního prostředí nádoru. Profylaktické/preventivní vakcíny lze teoreticky připravit všude tam, kde je etiologický agens znám. Proto jsou využívány jako forma prevence proti hepatocelulárnímu karcinomu, který bývá důsledkem chronického zánětu způsobeného virovou hepatitidou B, i jako prevence nádoru děložního čípku, za jehož

původce je označován lidský papilomavirus (HPV). Vývoj terapeutických vakcín určených k léčbě již probíhajícího onemocnění je nepoměrně složitější.

Pro vývoj exogenních protinádorových vakcín bylo zásadní pochopení úlohy antigen prezentujících dendritických buněk. To vedlo **v polovině 90. let minulého století** k výzkumu a později i k zavedení tzv. **DC vakcín** [22] neboli vakcín využívajících autologních dendritických buněk pacienta. Jsou buď preventivní, nebo terapeutické. Využívají jedinečné antigen prezentující schopnosti dendritických buněk, které účinně předkládají antigen i subpopulaci naivních CD4⁺ (pomocné T buňky, helper T-cell – Th) a efektorových CD8⁺ (cytotoxické T lymfocyty – CTL) T lymfocytů. V praxi se to provádí tak, že monocytů pacienta, které se po *ex vivo* kultivaci stanou nezralými dendritickými buňkami, jsou *in vitro* vystaveny vybranému typu antigenu. Může tím být vlastní nádor pacienta, vybraná nádorová buněčná linie nebo izolovaný nádorový antigen. Po stimulaci cytokiny a/nebo polyklonálními aktivátory dendritické buňky vyzrají a stanou se plně funkčními antigen prezentujícími buňkami, které po navrácení zpět pacientovi zesilují jeho vlastní T buněčnou protinádorovou reakci [23,24]. V optimálním případě ji i zahajují.

První buněčnou vakcínou na bázi dendritických buněk byl **sipuleucel-T (Provenge)**, vakcína uvedená na farmaceutický trh **v roce 2010** a určená k léčbě pokročilého metastatického, na hormony rezistentního nádoru prostaty. Byla původně vyvíjena jako autologní vakcína využívající izolované dendritické buňky. V moderní podobě se používá komplexní směs periferních krevních mononukleárních buněk, ke kterým je přidáván cytokin GM-CSF a s nádorem asociovaný diferenciací antigen (fúzní protein složený z PAP; prostatic acid phosphatase – prostatická kyselá fosfatáza). Klinické výsledky však bohužel vždy neukazují významné zmenšení nádoru nebo oddálení progresu choroby. Další z terapeutických vakcín je **PROSTVAC** určený pro pacienty s minimálně symptomatickým na kastraci rezistentním nádorem prostaty a **DCVAC** vyvíjený jako terapeutická vakcína na bázi

dendritických buněk proti karcinomu prostaty a ovaria [23].

Jiná forma dendritických vakcín využívá B lymfomový receptor pro antigen (idiotyp), který je příkladem klonálně exprimovaného nádorově specifického antigenu. Rekombinantní idiotypy jsou připravovány individuálně pro jednotlivé vybrané pacienty a jsou podávány současně s GM-CSF pod jehož vlivem dendritické buňky vyzrají z nezralých fagocytujících buněk do vyzrálých forem buněk optimálně prezentujících antigen [24]. Výsledky těchto studií ale nejsou úplně přesvědčivé.

Antigen aktivací signály uplatňující se ve vakcínách mohou být terapeuticky nahrazeny buď exogenně, nebo endogenně. K těm exogenním patří ligandy toll-like receptorů (TLR) nebo agonistické protilátky proti aktivujícím receptorům. Endogenní signály poskytují umírající nebo nekrotické nádorové buňky, které uvolňují molekuly typu alarminů (high-mobility group box 1 – HMGB1 protein) nebo ATP přispívající ke zranění a akumulaci dendritických buněk v nádoru. Proto lze za **endogenní vakcíny** v současné době považovat i některá chemoterapeutika, zejména antracyklinová antibiotika [25,26] nebo cílená polymerní léčiva na bázi HPMa obsahující doxorubicin [27,28], které vyvolávají imunogenní buněčnou smrt neboli imunogenní apoptózu nádorových buněk [25,26]. Je to způsob smrti buněk, které jsou vystaveny stresu. Kromě chemoterapeutik tak působí i radioterapie a zřejmě i některé fyzikální podněty. Stresu podrobená nádorová buňka translokuje z endoplazmatického retikula kalretikulin a vystavuje ho na svém povrchu. Dává tím najevo, že je poškozená, potenciálně nebezpečná, a proto vhodná pro fagocytózu dendritickými buňkami. Kromě toho uvolňují umírající nádorové buňky ATP a alarmin HMGB1, které se vážou na receptory nezralých dendritických buněk. Kalretikulin se váže na receptor CD91, ATP na receptor P2X7 a HMGB1 na toll-like receptor 4 (TLR4). Pod vlivem komplexního cytokinového prostředí a také pod vlivem HMGB1 se mění nezralé dendritické buňky ve zralé formy schopné optimálně prezentovat nádorový antigen

T lymfocytům a zahájit specifickou protinádorovou reakci. Je to sice děj o něco méně kontrolovaný než je ten vyvolaný exogenní vakcínou, na druhou stranu to umožňuje reakci na stovky mutací nádorových buněk, které vznikají až během růstu nádoru. Pravděpodobnost silné imunitní odpovědi je proto velká, protože proti vznikajícím neoantigenům se nemohla vytvořit centrální tolerance, a nemohou být tudíž cílem protektivní imunosuprese. Jako endogenní vakcíny jsou také využívány onkolytické viry podávané přímo do nádoru [29]. Správně načasovaná endogenní vakcína by mohla vést k dlouhotrvající remisi. Ovšem to, do jaké míry bude takto vyvolaná imunitní odezva dostatečná k tomu, aby překonala supresivní mikroprostředí nádorů, je předmětem dalších výzkumů.

Lymfatická uzlina je také **druhým zásahovým místem**, protože tam dochází k aktivaci funkční T buněčné protinádorové odpovědi, a to buď zesílením preexistující protinádorové odpovědi pacienta, nebo v některých případech k její indukci *de novo*. T buněčnou stimulaci mohou zvyšovat agonistické protilátky namířené proti pozitivním/aktivujícím kostimulačním molekulám nebo blokující protilátky namířené proti negativním kostimulačním molekulám. Po letech spíše skromných úspěchů slaví imunoterapie období renesance zejména proto, že byly definovány imunitní checkpoints neboli kontrolní body imunitní reakce, které se staly cílem blokujících monoklonálních protilátek umožňujících modulaci endogenní T buněčné odpovědi [30,31].

Nejdále je využití CTLA-4 molekuly [32] molekuly PD-1 [33], které ale nejsou zdaleka jedinými kontrolními body imunitní reakce a v budoucnu budou nepochybně klinicky testovány blokátory dalších specifit. CTLA-4 antigen (CD152) byl **koncem 80. let minulého století** studován jako klíčový negativní T buněčný regulátor, který se na plazmatické membráně T lymfocytů objevuje během jejich aktivace a váže se na členy rodiny B7 molekul (B7-1/2; CD80/86), exprimované antigen-přesunujícími buňkami. Vazba inhibičního receptoru CTLA-4 s členy rodiny B7 molekuly je silnější než je vazba s aktivačním

receptorem CD28, a to je důležité pro regulaci intenzity imunitní reakce. Umožňuje to její zastavení v momentě, kdy je nebezpečný antigen odstraněn a další reakce by byla nejenom nadbytečná, ale mohla by ve svém důsledku vést až k reakci autoimunitní. Z hlediska potřebné dlouhotrvající protinádorové reakce je to ale nevýhodné, a je proto žádoucí tuto negativní regulaci blokovat např. působením monoklonálních anti-CTLA-4 protilátek. Napomáhá to i selektivní depleci intratumorálních Treg, které konstitutivně exprimují vysoké hladiny CTLA-4 a které se na vytváření imunosupresivního prostředí nádoru významně podílejí. Další z T buněčných receptorů, který má podobně jako CTLA-4 supresivní funkci, je LAG-3. Také limituje aktivitu CD4⁺ a CD8⁺ buněk a zvyšuje aktivitu Treg.

Inhibiční molekula PD-1 (CD279), která byla počátkem 90. let minulého století japonskými biology popsána na umírajících T buňkách, je inducibilně exprimována na povrchu aktivovaných T a B buněk a buněk myeloidních. Dynamika výskytu molekuly PD-1 a jejího ligand (PD-L1/L2) je na specificky aktivovaných imunitních buňkách podobná výskytu molekuly CTLA-4. O čím pozdější fázi imunitní reakce se jedná, tím je jí tam víc. Provázáním receptoru PD-1 a jeho ligand jsou T lymfocyty inaktivovány nebo zabíjeny, mohou to dokonce dělat i navzájem. Nefyziologicky exprimují PD-L1/L2 ligandy některé nádory, zejména melanomy, nemalobuněčné karcinomy plic, urogenitální nádory, karcinomy ovarií, prsu, děložního čípku, slinivky, žaludku a glioblastomy. Brání se tím specifické protinádorové odpovědi.

S moderní blokační imunoterapií souvisí nežádoucí vedlejší toxicity. Postihují poměrně vysoké procento pacientů a mohou být i velmi závažné. Jenom tím potvrzují význam a intenzitu přirozených imunitních reakcí a možné důsledky jejich dysregulací. Většinou se jedná o závažná zánětlivá onemocnění, nejčastěji kolitidy a hypofyzitidy, které jsou s největší pravděpodobností autoimunitní povahy. Problém je ale v tom, že ani přítomnost vedlejší toxicity ani její závažnost nepředpovídají pozitivní reakci na léčbu. Jinými slovy, pacienti mohou být

ohroženi zánětlivým onemocněním, aniž by měli jistotu, že s tím bude spojen protinádorový efekt. Proto je **v současné době** mimořádná pozornost věnována právě tomu, jak výskyt a závažnost zánětlivých onemocnění snížit.

Třetím zásahovým místem pro imunoterapii je vlastní mikroprostředí nádoru, do kterého musí aktivované imunokompetentní buňky s protinádorovou aktivitou z lymfatické uzliny migrovat. Nádor se vyvíjí a uniká kontrole buď proto, že nádorové buňky jsou podobné buňkám vlastním, a tudíž nevyvolávají dostatečnou imunitní reakci, anebo proto, že se významně podílí na supresi a tvorbě periferní tolerance. Nádorové mikroprostředí je primárně imunosupresivní a nádor se tím protinádorové reakci a tím i vlastní eliminaci aktivně brání. Suprese vychází ze schopnosti nádorových buněk potlačit, nebo dokonce znemožnit normální protinádorovou imunitní odpověď tím, že ztrácí MHC glykoproteiny I. třídy, nevytváří dostatek dobře rozpoznatelných nádorových antigenů, ztrácí citlivost na komplement a exprimují PD-L1/L2 ligandy. Vlastní prostředí nádoru pak brání vyžívání dendritických buněk, expanzi nádorově specifických cytotoxických T lymfocytů (CTL) a pomocných Th lymfocytů a naopak umožňuje lokální expanzi populací se supresorovou aktivitou, jakými jsou Treg lymfocyty a MDSC. U řady nádorů infiltrace Treg buňkami koreluje se špatnou prognózou [34], a proto se předpokládá, že jejich deplece nebo alespoň inaktivace by mohla snížit lokální imunosupresi a zvýšit akumulaci efektorových protinádorových T buněk. **Dosud ale nebyla** pro buňky se supresorovou aktivitou nalezena specifická povrchová molekula/receptor, protože většina povrchových molekul Treg buněk je exprimována i aktivovanými efektorovými T lymfocyty. V krátkodobé terapii by mohla pomoci deplece Treg pomocí anti-CD25, určité zeslabení funkce umožňuje i nízkodávkové podávání cyklofosfamidů.

Nádory také produkují imunosupresivní molekuly typu IDO (indoleamine 2,3-dioxygenáza) a PGE2. K dalším supresorovým molekulám, které lze v nádoru prokázat, patří argináza a NO syntáza,

kteří produkují MDSC. Kromě toho hypoxické prostředí nádoru podporuje tvorbu adenosinu a produkci CCL28. Adenosin omezuje funkci T lymfocytů a CCL28 zvyšuje akumulaci Treg buněk. Mezenchymální kmenové buňky nádorového stromatu blokují proliferaci a funkci efektorových T buněk a nádorové vaskulární buňky potlačují T buněčnou adhezi k stěně nádorových cév. Tím omezují infiltraci solidního nádoru imunokompetentními buňkami. Tento efekt se zčásti připisuje vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru (vascular endothelial growth factor – VEGF) a zčásti endotelin-B receptoru (ETBR). Proto je blokáda obou další možností budoucí imunoonkoterapie. V určitém ohledu se také zkouší využití mediátorů, které ovlivňují zánětlivé prostředí nádoru a mezi které patří IL-6, IL-17, IL-23 a TNF- α .

Tradičně je hlavním způsobem protinádorové léčby **kombinační chemoterapie**, která v současnosti využívá i nově objevené inhibitory buněčného dělení. Při rozhodnutí o tom, jaké kombinace použít, je třeba vzít v úvahu, že inhibitory jsou typicky malé molekuly, které mohou spolu s klasickou chemoterapií blokovat funkci dendritických buněk nebo T lymfocytů. Mohou dokonce modifikovat nádorové mikroprostředí způsobem, který bude vývoj imunity potlačovat. Velmi dobrými kandidáty pro kombinaci s imunologicky aktivními agens jsou cytotoxické látky, které vyvolávají imunogenní buněčnou smrt, imunogenní apoptózu. Je ovšem potřeba používat je v dávkách a schématech, která nepoškozují efektorové funkce cytotoxických T lymfocytů. Významné by mohlo být i kombinované použití anti-CTLA-4 a anti-PD-1 monoklonálních protilátek, protože tyto dvě agens odstraňují různé „brzdy“ T buněčné aktivity. Anti-CTLA-4 protilátka ovlivňuje proliferaci část protinádorové imunitní odpovědi a anti-PD-1 protilátka se uplatňuje v efektorové fázi imunitní reakce. Obě obnovují a podporují reakci preexistujících T buněk, v ojedinělých případech snad mohou T reakci i započít. Velké naděje se vkládají nejenom do kombinací obou blokujících monoklonálních protilátek [35], ale i do jejich kombinací s ostatními typy léčby,

zejména s vakcinací, chemoterapií a radioterapií, od které se očekává zvýšení diverzity repertoáru T buněčných receptorů nacházejících se na intratumorálních T lymfocytech [36].

Při imunoonkoterapii se uplatňují jiné mechanismy protinádorové intervence než při klasických metodách, jako je chemoterapie, radioterapie nebo i hormonální terapie. Dosud používané klasické hodnocení úspěšnosti léčby, tj. zmenšení nádorové masy způsobené přímým zabíjením nádorových buněk, nejsou pro imunoonkoterapii vhodné. Imunoonkologická léčba představuje stimulaci T buněčné odpovědi, při které se pozitivní reakce na léčbu může objevit až za několik měsíců. Některé biopsie z metastáz pacientů léčených vakcínami ukazují na přítomnost imunního infiltrátu, který se účastní destrukce nádorové hmoty. To může být ale doprovázeno dočasným extenzivním otokem, za kterým může následovat fibróza. Podobné důsledky lze očekávat i při blokační imunoonkoterapii, a proto pouhé sledování velikosti nádoru nemůže být jediným kritériem terapeutického efektu a podkladem pro rozhodnutí, zda v léčbě pokračovat, či nikoliv. Na základě klinických pozorování byla proto doporučena nová kritéria a nazvána immune related response criteria (irRC) [37].

Teprve **21. století** přineslo jasné klinické důkazy o tom, že imunitní systém je při protinádorové terapii možné využít. Je to nepochybně důsledkem pochopení řady regulačních systémů, které aktivitu imunitního systému ovlivňují.

Literatura

1. Busch W. Verhandlungen ärztlicher gesellschaften. Berl Klin Wochenschr 1868; 5: 137–138.
2. Fehleisen F. Über die Züchtung der Erysipelkokken auf künstlichem Nährboden und ihre Übertragbarkeit auf den Menschen. Dtsch Med Wochenschr 1882; 8: 553–554.
3. Coley WB. II. Contribution to the knowledge of sarcoma. Ann Surg 1891; 14(3): 199–220.
4. Roger GH. Contribution à l'étude expérimentale du streptocoque de l'érysipèle. Rev De Med 1892; 12: 929–956.
5. Beebe SP, Tracy M. The treatment of experimental tumors with bacterial toxins. JAMA 1907; 49: 1493–1498.
6. Mečnikov II. Otázky imunity. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd 1955.
7. Nauts HC, Swift WE, Coley BL. The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late William B. Coley, M.D. reviewed in the light of modern research. Cancer Res 1946; 6: 205–216.

8. Burnet FM. Cancer – a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. Br Med J 1957; 1(5023): 841–847.
9. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nat Immunol 2002; 3(11): 991–998.
10. Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. J Urol 1976; 116(2): 180–183.
11. Fritze D, Massner B, Becher R et al. Combination of chemotherapy (VAC/FMC) with immunostimulation in metastatic breast cancer: a randomized study comparing different times and routes of administration of Corynebacterium parvum. Klin Wochenschr 1984; 62: 162–167.
12. Rosenberg SA, Grimm EA, McGroan M et al. Biological activity of recombinant human interleukin-2 produced in Escherichia coli. Science 1984; 223(4643): 1412–1414.
13. Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC et al. Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. Ann Surg 1989; 210(4): 474–484.
14. Rosenberg SA. Lymphokine-activated killer cells: a new approach to immunotherapy of cancer. J Natl Cancer Inst 1985; 75(4): 595–603.
15. Ettinghausen SE, Lipford EH 3rd, Mulé JJ et al. Recombinant interleukin 2 stimulates in vivo proliferation of adoptively transferred lymphokine-activated killer (LAK) cells. J Immunol 1985; 135(5): 3623–3635.
16. Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. N Engl J Med 1988; 319(25): 1676–1680.
17. Maude SL, Frey N, Shaw PA et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. N Engl J Med 2014; 371(16): 1507–1517. doi: 10.1056/NEJMoa1407222.
18. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 256(5517): 495–497.
19. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. Nature 2011; 480(7378): 480–489. doi: 10.1038/nature10673.
20. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011; 144(5): 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
21. Finn OJ. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. Ann Oncol 2012; 23 (Suppl 8): viii6–viii9. doi: 10.1093/annonc/mds256.
22. Emens LA, Jaffee EM. Cancer vaccines: an old idea comes of age. Cancer Biol Ther 2003; 2 (4 Suppl 1): S161–S168.
23. Podrazil M, Bartůňková J. Imunoterapie nádorových chorob. Postgrad Med 2015; 17: 304–309.
24. Röllig C, Schmidt C, Bornhäuser M et al. Induction of cellular immune responses in patients with stage-I multiple myeloma after vaccination with autologous idiotype-pulsed dendritic cells. J Immunother 2011; 34(1): 100–106. doi: 10.1097/CJI.0b013e3181facf48.
25. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F et al. Calreticulin exposure dictates immunogenicity of cancer cell death. Nat Med 2007; 13(1): 54–61.
26. Kroemer Q, Galluzzi L, Kepp O et al. Immunogenic cell death in cancer therapy. Ann Rev Immunol 2013; 31: 51–72. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-100008.
27. Říhová B. Clinical experience with anthracycline antibiotics-HPMA copolymer-human immunoglobulin conjugates. Adv Drug Del Rev 2009; 61(13): 1149–1158. doi: 10.1016/j.addr.2008.12.017.
28. Říhová B, Kovář M. Immunogenicity and immunomodulatory properties of HPMA-based polymers. Adv Drug Del Rev 2010; 62(2): 184–191. doi: 10.1016/j.addr.2009.10.005.
29. Vassilev L, Ranki T, Joensuu T et al. Repeated intratumoral administration of ONCOS-102 leads to systemic anti-

tumor CD8+ T cell response and robust cellular and transcriptional immune activation at tumor site in a patient with ovarian cancer. *Oncoimmunology* 2015; 4: 15–21.

30. Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science* 2013; 342(6165): 1432–1433. doi: 10.1126/science.342.6165.1432.

31. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockage. *Science* 1996; 271(5256): 1734–1736.

32. Hodi FS, Day SJ, McDermott DF et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma.

N Engl J Med 2010; 363(8): 711–723. doi: 10.1056/NEJMoa1003466.

33. Robert C, Long CV, Brady B et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med* 2015; 372(4): 320–330. doi: 10.1056/NEJMoa1412082.

34. Mockler MB, Conroy MJ, Lysaght J. Targeting T cell immunometabolism for cancer immunotherapy; understanding the impact of the tumor microenvironment. *Front Oncol* 2014; 4: 107. doi: 10.3389/fonc.2014.00107.

35. Robert C, Schachter J, Long GV et al. KEYNOTE-006 investigators: pembrolizumab versus ipilimumab in advanc-

ed melanoma. *N Engl J Med* 2015; 372(26): 2521–2532. doi: 10.1056/NEJMoa1503093.

36. Twyman-Saint Victor C, Rech AJ, Maity A et al. Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer. *Nature* 2015; 520(7547): 373–377. doi: 10.1038/nature14292.

37. Wolchok JD, Hoos A, O'Day S et al. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clin Cancer Res* 2009; 15(23): 7412–7420. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1624.

Protinádorové zbraně imunitního systému

Antitumor Weapons of the Immune System

Hořejší V.

Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i., Praha

Souhrn

Východiska: Imunitní systém je principiálně schopen rozpoznávat a eliminovat nádorové buňky. Používá k tomu řadu mechanismů (fagocyty, protilátky, NK buňky, cytotoxické T lymfocyty). Tyto zbraně imunitního systému však většinou nejsou dostatečně účinné, protože nádorové buňky bývají imunitním systémem vyhodnoceny jako příliš podobné buňkám normálním a protože nádorové prostředí je silně imunosupresivní. **Cíl:** Cílem tohoto článku je podat velmi stručně základní přehled o buněčných a molekulárních mechanismech používaných imunitním systémem v boji proti nádorovým onemocněním a jejich využití pro vývoj moderních terapeutických přístupů. **Závěr:** Recentní výrazný pokrok v poznání mechanismů vztahů mezi imunitním systémem a nádorovými buňkami umožnil vývoj nových imunoterapeutických přístupů zahrnujících monoklonální protilátky rozeznávající nádorové antigeny, protilátky blokující inhibiční receptory T lymfocytů, bispecifické protilátkové konstrukty, pomnožení a stimulaci nádorově specifických T lymfocytů *in vitro*, chimérické antigenní receptory exprimované v T lymfocytech či vakcíny založené na dendritických buňkách. Zdá se, že imunoterapie nádorových onemocnění se skutečně stává realitou.

Klíčová slova

nádorové antigeny – imunitní dozor – imunoterapie – monoklonální protilátky – makrofágy – aktivace lymfocytů – NK buňky – regulační T lymfocyty

Summary

Background: Immune system is principally capable to recognize and eliminate tumor cells, using several mechanisms (phagocytes, antibodies, NK-cells, cytotoxic T-lymphocytes). These immune weapons are usually not sufficiently efficient as tumor cells are mostly evaluated by the immune system as too similar to normal cells and the tumor microenvironment is very immunosuppressive. **Conclusion:** Recent marked progress in elucidation of mechanisms underlying the relationships between the immune system and tumor cells made it possible to develop a number of very promising immunotherapeutic approaches, including monoclonal antibodies recognizing tumor antigens, antibodies blocking T-cell inhibitory receptors, bispecific antibody constructs, *in vitro* expansion and stimulation of tumor specific T-lymphocytes, chimeric antigenic receptors expressed in T-cells or dendritic cell-based vaccines. Immunotherapy of neoplastic diseases is apparently becoming reality.

Key words

tumor antigens – immunological surveillance – immunotherapy – monoclonal antibodies – macrophages – lymphocyte activation – NK-cells – T-lymphocytes regulatory

Práce byla realizována v rámci grantu GAČR č. P302-12-G101.

This study was supported by the grant GACR No. P302-12-G101.

Autor deklaruje, že v souvislosti s předmětem studie nemá žádné komerční zájmy.

The author declares he has no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



prof. RNDr. Václav Hořejší, CSc.

Ústav molekulární genetiky

AV ČR, v. v. i.

Vídeňská 1083

142 20 Praha 4

e-mail: vaclav.horejsi@img.cas.cz

Obdrženo/Submitted: 27. 7. 2015

Přijato/Accepted: 25. 8. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20154S15>

Úvod

Imunitní systém by měl organizmus chránit před různými nebezpečími vnějšího i vnitřního původu. Stěžejní význam má samozřejmě obrana proti infekčním onemocněním, ale imunitní systém likviduje i jiná nebezpečí – např. odstraňuje poškozené a odumírající buňky. Výrazné ohrožení představují samozřejmě také buňky nádorové. Ty se více nebo méně liší od normálních buněk, ze kterých vznikly, a proto by teoreticky měly být rozpoznány imunitními mechanismy a eliminovány. Obecně ovšem platí, že imunitní mechanismy jsou v obraně proti nádorům ve srovnání s mechanismy antiinfekčními poměrně neúčinné. To je způsobeno přílišnou podobností nádorových buněk buňkám normálním, takže je imunitní systém víceméně toleruje, ba dokonce chrání jako normální tkáň. Krom toho jsou nádorové buňky vybaveny řadou mechanismů, jimiž se útokům imunitních zbraní úspěšně brání. Pokud jsou tyto problémy překonány, může imunitní systém zapojit do boje proti nádorům v zásadě všechny zbraně, které používá třeba v boji proti virovým infekcím.

Nádorové antigeny

Základním předpokladem reakce imunitního systému s nádorovými buňkami je existence povrchových antigenů, které by umožnily imunitnímu systému jejich rozpoznání. Jsou známy dva typy nádorových antigenů: antigeny specifické pro nádory (tumor-specific antigens – TSA) a antigeny asociované s nádory (tumor-associated antigens – TAA) [1].

Mezi TSA patří molekuly, které se na normálních buňkách vůbec nevyskytují, jako např.:

- Komplexy HLA (human leucocyte antigen) molekul I. třídy (hlavně HLA-A, HLA-B) s abnormálními fragmenty buněčných proteinů (produkty mutovaných genů, resp. produkty abnormálního štěpení normálních proteinů v nádorové buňce). Takovéto TSA jsou typické pro chemicky indukované nádory a pro některé leukemie asociované s chromozomálními translokacemi, které produkují specifický abnormální protein (např. fúzní protein Bcr-Abl vznikající přepisem fúzního genu na tzv.

filadelfském chromozomu, produktu translokace mezi chromozomy 9 a 22).

- Komplexy HLA molekul s fragmenty proteinů onkogenních virů (u nádorů vyvolaných virem, jako je polyoma virus, SV40, EBV).
- Abnormální formy glykoproteinů; glykosylace, zejména sialylace (tj. připojování molekul kyseliny sialové na konce oligosacharidových řetězců) povrchových glykoproteinů mnohých nádorových buněk je odlišná od buněk normálních.
- Idiotypy myelomů a lymfomů; tyto druhy nádorových buněk odvozených od B, resp. T lymfocytů mají na povrchu klonotypické antigenně specifické receptory BCR, resp. TCR, jejichž vazebná místa jsou unikátními antigenními strukturami.

TAA nejsou výlučně specifické pro nádorové buňky, ale nacházejí se i na některých normálních buňkách, většinou původem velmi odlišných od příslušných buněk nádorových. Tyto TAA, popř. jejich solubilní formy uvolňované z povrchu nádorových buněk slouží jako užitečné diagnostické markery.

Mezi nejznámější TAA patří např.:

- Onkofetální antigeny přítomné na (resp. v) normálních embryonálních buňkách, v postnatálním období mizí a objevují se pouze na některých nádorových buňkách. Patří sem α -feto-protein (AFP) sekretovaný hepatomy a karcinoembryonální antigen (CEA) produkovaný buňkami karcinomu tlustého střeva.
- Některé melanomové antigeny (MAGE-1, Melan-A), které jsou silně exprimovány na melanomových buňkách, v menším množství na normálních melanocytech nebo jiných buňkách (testikulární tkáň).
- Antigen ERBB2 – receptor růstového faktoru epiteliálních buněk, který je v malém množství přítomen na normálních epiteliálních buňkách; na buňkách některých karcinomů mléčné žlázy je exprimován silně.
- Adhezivní molekula epiteliálních buněk EPCAM (silná exprese na metastázách karcinomů).
- Diferenční antigeny leukemických buněk, které jsou přítomny na normál-

ních buňkách vývojové řady leukocytů v těch diferenciacních stádiích, z nichž jsou leukemické buňky odvozeny. Nejznámější je povrchový antigen akutních lymfoblastických leukemií CALLA (common acute lymphoblastoid leukaemia antigen; CD10), charakteristický antigen pre-B buněk.

Protinádorové imunitní mechanismy

Vzhledem k tomu, že maligní buňky jsou odvozeny od buněk normálních, sdílejí s nimi většinu povrchových antigenů, které jsou ovšem imunitním systémem tolerovány jako organizmu vlastní. Pokud je však abnormalita nádorových buněk imunitním systémem rozpoznána, mohou se na boji s nimi podílet v zásadě všechny hlavní imunitní mechanismy: nespecifické (neutrofilní granulocyty, aktivované makrofágy, NK buňky) i antigenně specifické (opsonizační protilátky aktivující komplement, aktivující fagocytózu a buněčnou cytotoxicitu; zánětlivé Th1 a cytotoxické (Tc) buňky).

Imunitní dozor

Klasickým pojmem nádorové imunologie je „imunitní dozor“, tj. hypotéza, že nádorově transformované buňky ve tkáních běžně vznikají a jsou průběžně eliminovány imunitním systémem [2]. U pacientů s poruchami specifické buněčné imunity (vrozené, resp. získané imunodeficiency) bývá výrazně zvýšeno zvláště riziko nádorů vyvolaných virem. To ukazuje, že antigenně specifické imunitní mechanismy kontrolují přinejmenším tento druh nádorů, resp. spíše primární virová onemocnění, která nakonec mohou v některých buňkách vyústit i v nádorové přeměny. U imunodeficientních jedinců existuje však i poněkud zvýšené riziko vzniku spontánních a chemicky indukovaných nádorů (bez virové etiologie). To bylo prokázáno také ve studiích s geneticky modifikovanými zvířaty, jimž chybí nebo nefungují T, B, NK nebo NK T lymfocyty [3].

Aktivované makrofágy

Důležitou funkcí makrofágů je odstraňování (fagocytóza) pozůstatků odumřelých normálních i nádorových buněk a někdy i aktivní zabíjení abnormál-

ních buněk (hlavně ve spolupráci s opsonizačními protilátkami). Makrofágy se také podílejí na vzniku zánětlivých reakcí a jsou významnými producenty několika cytokinů, což se komplikovaným způsobem uplatňuje při interakci imunitního systému s nádory.

Existují nejméně dva typy aktivovaných makrofágů. Pod vlivem prozánětlivého cytokinu interferonu- γ (IFN- γ) vznikají makrofágy typu M1 produkující hlavně interleukin-12 (IL-12), které efektivně fagocytují a degradují zbytky odumřelých buněk a imunokomplexy v místě poškození tkáně a umí i likvidovat pohlčené mikroorganismy. Krom toho jimi produkovaný IL-12 podporuje další rozvoj zánětlivého procesu, protože stimuluje T lymfocyty a NK buňky.

Naproti tomu pod vlivem cytokinů IL-4 a IL-13 vznikají z klidových makrofágů buňky typu M2, jejichž hlavní funkcí je napomáhat hojení a regeneraci tkáně poškozených poraněním nebo mikrobiální infekcí; produkují hlavně protizánětlivé cytokiny IL-10 a TGF- β .

Makrofágy obvykle ve značném množství infiltrují nádory a jejich role je zde spíše negativní, jelikož bývají hlavně typu M2. Imunitní systém v tomto případě zjevně nepatřičně vyhodnocuje nádorovou tkáň jako poškozenou, zraněnou, které je potřeba pomoci. Makrofágy asociované s nádory tak dosti výrazně podporují růst nádorů, angiogenezi, ale i schopnost buněk primárního nádoru metastazovat [4]. Pacienti s nádory silně infiltrovanými makrofágy mívají horší prognózu než ti s infiltrací slabou.

Podobný protektivní účinek mají také makrofágům poněkud podobné, tzv. myeloidní tlumivé buňky (myeloid-derived suppressor cells – MDSC), které infiltrují nádory a potlačují v nich protinádorové imunitní mechanismy [5].

NK buňky

NK buňky (natural killer – „přirozený zabíječ“) byly popsány jako lymfocyty, které jsou schopny rychle (bez předchozí stimulace, proliferace a diferenciace) zabíjet některé nádorové a virově infikované buňky, a to mechanismy velmi podobnými těm, které používají i cytotoxické T lymfocyty (Tc, viz níže) [6]. Na rozdíl od

T a B lymfocytů nemají NK buňky antigenně specifické receptory; abnormální buňky (nádorové a některé virově infikované) rozeznávají podle toho, že mají na povrchu abnormálně málo HLA molekul I. třídy (HLA-A, -B, -C) a krom toho mají na svém povrchu zvýšené množství povrchových proteinů rozeznávaných jejich aktivačními receptory, mezi které patří molekuly zvané NKG2D, CD94, NKp46, NKp44 či NKp30. Signály poskytnuté těmito receptory aktivují NK buňky k vyhlazení obsahu jejich cytoplazmatických cytotoxických granulí na kontaktovanou nádorovou buňku. Podobně působí i signalizace přes aktivační Fc receptor CD16. Ten interaguje s Fc částmi protilátek molekul navázaných na povrch nádorových buněk a následně spouští degranulaci NK buněk. Tento mechanismus je znám jako ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) [7].

Protilátky

Protilátky se v protinádorové obraně uplatňují především tak, že se navazují na povrchové nádorové antigeny (typu TSA či TAA), tím je opsonizují, a tak umožňují jejich napadání fagocyty (makrofágy M1, neutrofilní granulocyty) či NK buňkami (mechanismus ADCC – viz výše). Uplatňovat se může také aktivace komplementu: protilátky některých izotypů navázané na povrch nádorové buňky mohou aktivovat klasickou cestu komplementu, což přispívá k opsonizaci, chemotaxi fagocytů, rozvoji zánětlivé reakce a finálně i k osmotické lýze membranolýtickým komplexem komplementu. Vazba protilátek na určité povrchové receptory může vyvolat v takto napadené nádorové buňce i její apoptotickou smrt. Zásadně důležité je, že pro vznik kvalitních vysokoafinních protilátek proti nádorovým antigenům nestačí, aby tyto nádorové antigeny byly rozpoznány specifickými B lymfocyty pomocí jejich antigenně specifických receptorů (B-cell receptor – BCR). Nezbytná je spolupráce těchto B lymfocytů s pomocnými T lymfocyty, které jim dodávají nepostradatelné kostimulační signály. Proto je nutné, aby nádorové antigeny (resp. jejich peptidové fragmenty navázané na HLA proteiny) byly těmito pomocnými buňkami předkládány zpravidla

prostřednictvím zralých dendritických buněk (viz níže).

T lymfocyty

K nejdůležitějším imunitním protinádorovým zbráním patří cytotoxické T lymfocyty (Tc) [8]. Ty rozeznávají pomocí svých antigenně specifických receptorů (T-cell receptor – TCR) buňky infikované virem nebo jinými intracelulárními parazity, popř. buňky jinak abnormální (poškozené stresem, některé nádorové buňky) a ničí je mechanismy závislými na bezprostředním těsném kontaktu mezi Tc a napadanou buňkou nebo prostřednictvím sekretovaných produktů.

Imunitní odpovědi založené na Tc (ale i na jiných typech T lymfocytů a *de facto* i na B lymfocytech spolupracujících s pomocnými T lymfocyty) jsou zahajovány v lymfatických uzlinách tak, že příslušné antigenně specifické T lymfocyty musí nejprve rozeznat komplexy HLA proteinů I., resp. II. třídy s antigenními peptidy (např. fragmenty virových proteinů nebo produktů onkogenů) na povrchu aktivovaných, zralých buněk prezentujících antigen (antigen presenting cell – APC), které musí mít patřičné adhezivní molekuly a kostimulační molekuly (ligandy několika kostimulačních receptorů T lymfocytů, z nichž nejdůležitější je CD28). Takovými APC mohou být hlavně dendritické buňky, případně také makrofágy nebo aktivované B lymfocyty. Tyto APC pohltnou příslušné antigeny, které pocházejí z infikovaných, nádorových nebo stresovaných buněk, rozštěpí je na peptidové fragmenty, které pak vystaví na svém povrchu v komplexu s HLA molekulami. Pokud prekurzorový T lymfocyt rozezná takovýto antigen na povrchu jiných buněk, které nemají stimulační vlastnosti profesionálních APC (typicky naprostá většina nádorových buněk), dostane pouze první signál (přes svůj TCR) a žádný kostimulační signál. To ji utlumí, nebo u ní dokonce navodí apoptotickou smrt. Dojde-li tedy k prvnímu kontaktu s antigenem na povrchu kvalitní APC, prekurzory Tc začnou proliferovat a diferencovat na klon zralých efektorových cytotoxických buněk (Tc). Poruchy účinné prezentace nádorových antigenů T lymfocytům jsou jednou z hlavních příčin selhávání imunitní obrany proti nádorům.

Zralé efektorové Tc jsou roznášeny krevním oběhem do tkání, kde mohou začít působit – tedy např. zabít nádorové buňky, které mají na svém povrchu správné komplexy HLA proteinů s fragmenty nádorových antigenů. Takovéto zralé Tc jsou už k aktivaci cytotoxických mechanismů stimulovány pouze jedním signálem (přes TCR, kostimulační signál přes CD28 už není potřebný).

Tc podobně jako NK buňky používají tři druhy cytotoxických mechanismů:

1. V cytoplazmě zralých Tc se nachází množství cytotoxických granulí (speciálně lysozomů), které obsahují protein perforin a proteázy zvané granzymy. Poté, co Tc lymfocyt rozezná pomocí adhezivních molekul a TCR „vadnou“ buňku, obsah granulí se uvolňuje do úzké štěrbině mezi oběma buňkami (dochází k „degranulaci“), perforin vytváří v plazmatické membráně napadené buňky póry, kterými do buňky proniknou molekuly granzymů. Ty pak spustí kaskádu reakcí kulminující v apoptotickou smrt takto zasažené buňky.

2. Na povrchu Tc se nachází protein zvaný Fas-ligand (FasL). FasL se váže na „apoptotický receptor“ Fas (CD95) přítomný na povrchu mnoha různých typů buněk, včetně buněk nádorových. Interakce FasL s receptorem Fas aktivuje v napadené buňce apoptotické mechanismy.

3. Oba předešlé způsoby vyžadují individuální kontakt cílové buňky s cytotoxickým lymfocytem. Tc používají k zabíjení cílových buněk také své sekretované produkty, zejména cytokin lymfotoxin (LT, TNF- β), který působí podobně jako FasL (indukuje apoptózu).

Kromě buněk Tc se v protinádorových imunitních reakcích uplatňují jako pomocné buňky také subpopulace Th1 a Th17, které produkují řadu prozánětlivých cytokinů (např. IL-2, IFN- γ , IL-6, IL-17) a podporují vyžrávání Tc.

Imunitní mechanismy tlumící protinádorové reakce

Pro průběh protinádorových imunitních reakcí má zásadní význam existence několika typů mechanismů, které imunitní reakce tlumí. Ty jsou obecně důležité proto, aby imunitní odpovědi nebyly provázeny příliš intenzivními sebepoškozujícími

cími imunopatologickými reakcemi. V případě protinádorových odpovědí jsou ale tyto „bezpečnostní pojistky“ příčinou obvykle nedostatečné účinnosti protinádorových imunitních mechanismů.

První typ tlumivých mechanismů je založen na několika inhibičních receptorech na povrchu aktivovaných T lymfocytů, především molekulách zvaných CTLA-4 a PD-1. Ty se vážou na ligandy (CD80 a CD86 v případě CTLA-4, PD-L1 a PD-L2 v případě PD-1), které se vyskytují na površích různých buněk, včetně APC a mnoha nádorových buněk. Interakce mezi inhibičními receptory a jejich ligandy vede prostřednictvím dobře prozkoumaných mechanismů k utlumení aktivace T lymfocytů.

Další velmi důležitý mechanismus negativní regulace imunitních odpovědí je založen na několika typech tzv. regulačních T lymfocytů (Treg) [9]. Tyto buňky jsou schopny potlačovat aktivity jiných efektorových T lymfocytů, ale i některých dalších buněk imunitního systému. Nejlépe prozkoumány jsou tzv. přirozené regulační CD4⁺ T lymfocyty (Treg), které vznikají v thymu, tvoří zhruba 5 % krevních lymfocytů a nesou „autoreaktivní“ TCR. Na rozdíl od jiných autoreaktivních T lymfocytů však vlastní tkáň nejen neapadají, ale naopak potlačují autoimunitní reakce. Mechanismy jejich působení jsou založeny hlavně na produkci tlumivých cytokinů (IL-10, TGF- β), ale působí také přímým kontaktem s jinými buňkami. Defekty Treg vedou ke vzniku autoimunitních onemocnění. Podobné tlumivé vlastnosti má zřejmě malá, dosud méně dobře prostudovaná subpopulace CD8⁺ T lymfocytů, pravděpodobně odpovídající buňkám dříve zvaným supresorové, resp. tlumivé T lymfocyty (Ts) [10]. Buňky Treg velmi účinně tlumí protinádorové imunitní mechanismy, protože nádorové buňky jsou jimi rozpoznávány jako buňky vlastní, zasluhující ochrany.

Důležitý tlumivý účinek mají také výše zmíněné makrofágy typu M2 a buňky MDSC zmíněné výše (odstavec Aktivované makrofágy).

Mechanismy odolnosti nádorů vůči imunitnímu systému

Různé typy nádorových buněk se liší způsoby, kterými se mohou vyhnout

útoku imunitního systému [11]. Řada mechanismů úniku je analogická s únikovými mechanismy infekčních mikroorganizmů. Nejdůležitější z nich jsou:

- Nádorové buňky jsou značně variabilní (vznik mutantních forem, které ztratily nádorový antigen a stávají se pro imunitní systém „neviditelnými“).
- Mnohé nádory produkují faktory inhibující T lymfocyty i jiné imunitní buňky (rozpuštěné formy nádorových antigenů odvržené z povrchu, cytokiny s inhibičním účinkem, např. TGF- β , IL-10).

A jak již bylo uvedeno výše, nádorové buňky navíc nefungují jako profesionální APC a naopak využívají působení regulačních (tlumivých) T lymfocytů (Treg), makrofágy typu M2 a MDSC, které chrání nádory podobně jako normální tkáň.

Možnosti imunoterapie nádorů

Dá se říci, že jako více či méně perspektivní se dnes jeví využití prakticky všech výše uvedených známých zbraní imunitního systému, a to jak jednotlivých, tak v kombinaci s konvenčnějšími postupy.

„Nespecifická“ stimulace imunitních mechanismů

Empirické zkušenosti již dávno indikovaly, že v některých případech intenzivní anti-infekční imunitní reakce mohou být provázeny regresí nádorů. To vedlo k pokusům vyprovokovat takovouto protinádorovou reakci pomocí úmyslně navozeného horečnatého infekčního onemocnění; výsledky této nebezpečné metody byly sice sporné, ale některé její aspekty jsou dále rozvíjeny [12]. Na podobném principu je založena i schválená metoda instilační imunoterapie povrchových nádorů močového měchýře pomocí nálevů obsahujících oslabené živé mykobakterie (BCG). Tento postup vede zřejmě k aktivaci několika typů imunitních buněk, které více či méně úspěšně likvidují nádorové buňky [13].

Pozoruhodné je, že některá chemoterapeutika (např. imatinib mesylát, cyklofosfamid, antracykliny, 5-fluorouracil) i určité režimy ozařování mají překvapivě imunostimulační účinky – nádorové buňky hynou jejich působením

„imunogenním způsobem“. Ten je charakterizován hlavně stresovou reakcí endoplazmatického retikula a prezentací intracelulárních molekul „signálů nebezpečí“ [14].

Potlačení makrofágů typu M2 a buněk MDSC asociovaných s nádory

Je nasnadě, že ke zvýšení úspěšnosti terapie nádorových onemocnění by mohlo přispět odstranění makrofágů typu M2 (a buněk MDSC) z nádorů, resp. jejich nahrazení makrofágy typu M1 [15]. Jednou možnou cestou je zabránit infiltraci nádorů krevními monocytů, jež se v nádorové tkáni přemění v makrofágy M2. Toho lze dosáhnout pomocí protilátek blokujících chemokin (chemotaktický cytokin) CCL2 produkovaný nádorovými buňkami, který vábí monocytů. V experimentálním myším modelu to skutečně vede k výraznému potlačení rozsevu primárního nádoru mléčné žlázy. Neočekávanou komplikací však bylo, že po skončení protilátkové terapie se nejen rychle obnovil metastatický proces, ale dokonce byl ještě intenzivnější – důvodem zřejmě byla snaha nádorových buněk kompenzovat ztrátu funkčního CCL2 jeho zvýšenou produkcí [16].

Poněkud paradoxní komplikací standardních terapií nádorových onemocnění může být to, že nádorové buňky odumírající v důsledku radio- či chemoterapie apoptoticky výrazně stimulují makrofágy přítomné v nádoru a v jeho blízkosti k posílení jejich M2 charakteru, tedy k posílení jejich vlastností podporujících růst nádoru. Je tedy pravděpodobné, že mnohé terapie nádorů vyvolávají dva protichůdné mechanismy – na jedné straně navozují žádoucí apoptotickou smrt nádorových buněk, ale na druhé straně těm odolnějším vytvářejí paradoxně lepší podmínky pro další růst. Pokud by se podařilo nějakým způsobem zamezit oné nežádoucí interakci apoptotických nádorových buněk s makrofágy, mohlo by to významně zvýšit účinnost některých terapeutických metod [17].

Protilátky proti některým TSA nebo TAA

V současné době se rutinně používá řada protinádorových monoklonálních

ních protilátek a ve fázi preklinického výzkumu nebo klinických studií je celá řada dalších. Mechanizmy jejich působení zahrnují většinu fyziologických funkcí protilátek, jako je blokování receptorů růstových faktorů nádorových buněk, opsonizace, aktivace fagocytů a NK buněk prostřednictvím Fc-receptorů (mechanismus zvaný ADCC, tedy „antibody-dependent cellular cytotoxicity“), aktivace komplementu, indukce apoptózy.

Pro klinické použití je nutné, aby terapeutické monoklonální protilátky (obvykle primárně myšího původu) byly genetickými manipulacemi maximálně „humanizovány“, tedy aby byly strukturně co nejpodobnější protilátkám lidským. Tím se minimalizuje imunogenita těchto preparátů v organismu pacienta. Komplikací je možnost poškození normálních tkání (monoklonální protilátka je obvykle zaměřena proti TAA) a imunoselektivity rezistentních variant nádorových buněk.

Poměrně úspěšně se klinicky používají (většinou v kombinaci s jinými terapeutickými prostředky) zejména např. následující monoklonální protilátky (v závorce příslušný antigen a onemocnění) [18–20]:

- trastuzumab, pertuzumab (ERBB2; karcinom prsu),
- rituximab, tositumomab (CD20; lymfomy),
- alemtuzumab (CD52; chronická lymfocytická leukemie),
- bevacizumab (VEGF; metastatický karcinom tlustého střeva, v kombinaci s jinými léčivými i některé jiné druhy nádorů; je třeba poznamenat, že zde se nejedná o nádorový antigen, ale o růstový faktor),
- cetuximab, panitumumab (EGFR; kolo- rektální karcinom).

Kromě samotných monoklonálních protilátek je možno použít i jejich konjugátů s účinnými toxiny (konjugáty se nazývají imunotoxiny) nebo radioizotopy (radioimunotoxiny). Příkladem je gemtuzumab ozogamicin (konjugát monoklonální protilátky proti antigenu myeloidních buněk CD33 s cytostatikem kalicheamycinem) použitelný k léčbě myeloidních leukemií nebo to-

situmomab-¹³¹I (konjugát monoklonální protilátky proti antigenu B lymfocytů CD20 s radioizotopem ¹³¹I). U těchto preparátů protilátka zanese toxin či radioizotop specificky do místa nádoru, čímž se snižuje nespecifické poškození zdravých tkání.

Protilátky blokující tlumivé receptory T lymfocytů

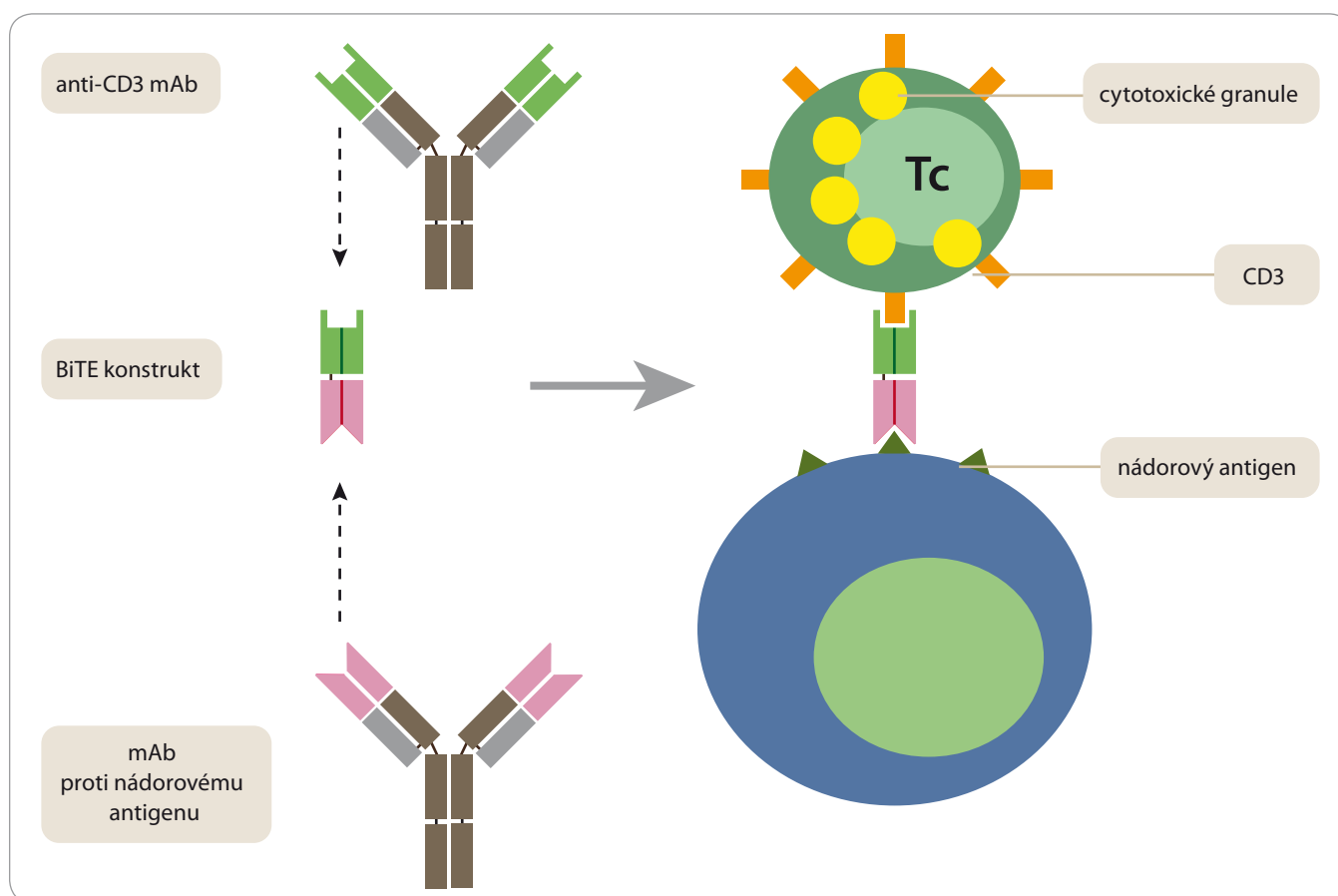
Jako neobyčejně perspektivní se v poslední době jeví použití monoklonálních protilátek blokujících tlumivé receptory T lymfocytů, především CTLA-4 a PD-1. Tento přístup vede k „odblokování“ nádorově specifických T lymfocytů a výraznému zvýšení jejich protinádorové aktivity. Schváleny, resp. v pokročilých fázích testování jsou např. následující preparáty této třídy (v závorce příslušný cílový inhibiční receptor a onemocnění) [21]:

- ipilimumab, tremelimumab (CTLA-4; karcinomy, melanomy, lymfomy),
- pembrolizumab, nivolumab (PD-1; karcinomy, melanomy, lymfomy, glioblastomy).

Kromě toho probíhá řada klinických testů ověřujících potenciál monoklonálních protilátek proti PD-L1 nebo proti dalšímu inhibičnímu receptoru LAG3 a ještě více preklinických studií zaměřených na řadu dalších potenciálně nadějných povrchových receptorů T lymfocytů (TIM3/CD366, CD200, TIGIT, BTLA/CD272, B7-H3/CD272, B7-H5/VISTA) [21].

Bispecifické protilátkové konstrukty

Jako nadějně se jeví také použití uměle konstruovaných bispecifických monoklonálních protilátek, jejichž jedno vazebné místo rozeznává nádorový antigen a druhé se váže na některou molekulu na povrchu T či NK buněk (CD3, CD2, CD16). Takovéto konstrukty (nazývané často bispecific T-cell engagers – BiTEs) jsou schopny přivést do těsného kontaktu nádorové buňky s velkým počtem T lymfocytů nebo NK buněk, přičemž tyto efektorové buňky nemusí být vybaveny receptory specificky rozpoznávajícími cokoli na povrchu nádorové buňky. Poněkud překvapivě stačí, aby takovýto uměle navozený kontakt mezi nádorovou buňkou a „nespecifickým“



Obr. 1. Bispecifický protilátkový konstrukt BiTE typu blinatumomab.

Konstrukt je připraven na genové úrovni tak, že se skládá z Fv fragmentu pocházejícího z monoklonální protilátky (mAb) proti povrchové molekule T lymfocytů CD3 a druhého Fv fragmentu pocházejícího z monoklonální protilátky proti nádorovému antigenu. Takový bispecifický konstrukt je schopen zprostředkovat těsný kontakt mezi T lymfocyty a maligními buňkami a navodit aktivaci cytotoxických mechanismů.

lymfocytem plně aktivoval jeho cytotoxické mechanismy vedoucí k likvidaci napadené nádorové buňky. Původní nepřilíši účinné konstrukty byly založeny na spojení celých monoklonálních protilátek, případně jejich Fab fragmentů. Optimální výsledky byly v poslední době dosaženy teprve s konstrukty složenými z minimálních Fv fragmentů příslušných monoklonálních protilátek (tj. fragmentů skládajících se z variabilních domén těžkého a lehkého řetězce, které vytvářejí specifické vazebné místo) spojených flexibilním linkerem 20 aminokyselin (sekvence GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS). Prvním preparátem tohoto typu schváleným FDA (pro léčbu refraktorní akutní lymfoblastické leukemie) je blinatumomab – konstrukt skládající se z Fv fragmentu monoklonální protilátky rozpoznávající povrchový protein normálních

i maligních B lymfocytů CD19 a Fv fragmentu monoklonální protilátky vážící CD3 podjednotku antigenně specifického receptoru T lymfocytů (obr. 1) [22].

Adoptivní T buněčná terapie

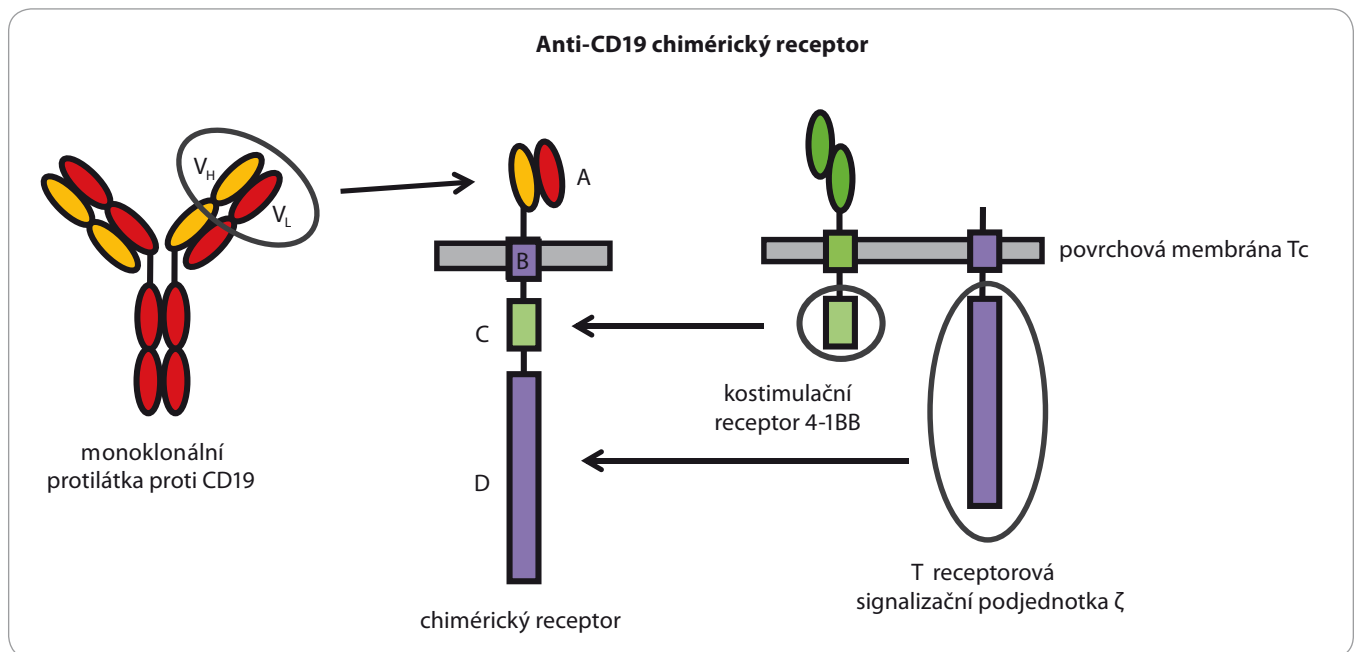
Tento přístup spočívá v namnožení a aktivaci pacientových T lymfocytů *ex vivo* a vrácení zpět nitrožilní infuzí [23]. Lymfocyty se získávají z krve nebo přímo z infiltrátu nádoru. V prvním případě jde o tzv. LAK buňky (lymphokine activated killers), v druhém o TIL (tumor infiltrating lymphocytes) buňky. LAK buňky se získají stimulací směsí T a NK buněk pacienta *in vitro* cytokiny (hlavně IL-2); předpokládá se, že se tím aktivují i utlumené nádorově specifické buňky. Takto stimulované buňky se vrátí zpět do krevního oběhu pacienta a v některých případech alespoň zčásti potlačí růst ná-

doru. Podobně je tomu u buněk TIL; v tomto případě se však izolují lymfocyty, které infiltrovaly do nádoru (získají se z chirurgicky odstraněného nádoru). Takové buňky by měly být nádorově specifické a pravděpodobně utlumené stykem s nádorem, který neposkytuje kostimulační signály; stimulace cytokiny *in vitro* může tento defekt částečně napravit.

Chimérické antigenní receptory

Imunitní systém obsahuje sice obrovské množství klonů lymfocytů, ale jen nepatrný zlomek z nich nese receptory vážící nádorové antigeny. To spolu s malou imunogenností nádorů způsobuje nedostatečnou přirozenou protinádorovou účinnost imunitního systému.

Pomocí moderních molekulárně-biologických metod lze ovšem vybavit velký



Obr. 2. Schéma chimérického antigenního receptoru (CAR) rozeznávajícího povrchový protein leukemických buněk CD19.

Molekula chimérického receptoru se skládá z: A. extracelulární rozeznávací části pocházející z molekuly monoklonální protilátky specifické pro povrchový antigen leukemických buněk CD19; B. krátkého transmembránového úseku (20 hydrofobních aminokyselin), kterým je receptor zakotven v povrchové membráně buňky; C. intracelulárního signálního úseku pocházejícího z pomocného (kostimulačního) receptoru T lymfocytů zvaného 4-1BB (CD137) a D. intracelulárního signálního úseku pocházejícího ze signální podjednotky $\alpha\beta$ T-receptorového komplexu. Molekula chimérického receptoru je na genové úrovni uměle „poskládaná“ z uvedených částí tří přirozených molekul a optimálně kombinuje jejich vlastnosti. Specifita takového konstruktu může být vcelku libovolně měněna použitím příslušných výchozích monoklonálních protilátek (resp. genů kódujících jejich polypeptidové řetězce).

počet T lymfocytů receptory žádoucí specifity. Genetické konstrukty kódující takové receptory jsou vytvořeny z úseků DNA kódujících antigenně specifické Fab nebo Fc fragmenty monoklonálních protilátek a genových úseků kódujících transmembránové a intracelulární signální části vhodných imunoreceptorů (TCR, CD28, CD40, CD137) (obr. 2). Po vnesení takového umělého genu do T lymfocytů pacienta a jejich namnožení *in vitro* získáme prakticky libovolně velký počet cytotoxických lymfocytů rozpoznávajících zvolený povrchový antigen nádorových buněk. Ty na svém povrchu stabilně exprimují produkty vneseného genetického konstruktu, tzv. chimérické antigenní receptory (CAR), které fungují v principu stejně jako normální antigenně specifické receptory, avšak jejich specifita je definovaná protilátkovou částí a jejich signální intracelulární části jsou mnohem účinnější, než je tomu u přirozených jednoduchých receptorů (obr. 3).

Tento postup založený na chimérických receptorech rozeznávajících povr-

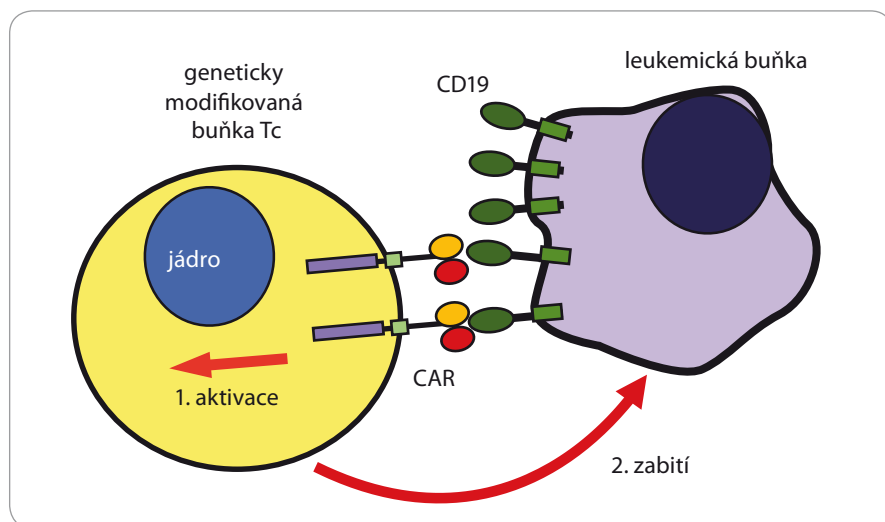
chový glykoprotein B lymfocytů a lymfomů CD19 byl v několika modifikacích použit s velmi nadějnými výsledky v klinických studiích u pacientů s hematologickými malignitami (leukemie a lymfomy) odvozených z B lymfocytů [24]. Při této terapii samozřejmě dochází také k likvidaci normálních B lymfocytů, a tím k protilátkovému deficitu, který lze ale snadno řešit podáváním imunoglobulinů.

Nádorové vakcíny

Po identifikaci peptidů rozeznávaných nádorově specifickými klony T lymfocytů určitého pacienta lze pomocí těchto synteticky připravených peptidů *in vitro* (samozřejmě v přítomnosti buněk prezentujících antigen) nebo *in vivo* stimulovat protinádorové T lymfocyty, a tím docílit účinné odpovědi. Nevýhodou je HLA restrikce (tj. použitelnost pouze u pacientů s vhodnými alelickými formami HLA molekul) a obecně malá imunogennost peptidů. Tento přístup byl použit v mnoha desítkách malých klinických studií s po-

měrně skromnými výsledky [25]. Jinou možností je využití dendritických buněk kultivovaných s nádorovými antigeny (ve formě prostého lyzátu nádoru, apoptotických nádorových buněk nebo purifikovaného antigenu, je-li znám) jakožto účinných buněk prezentujících antigen [26,27]. Dendritické buňky se v potřebném množství obvykle připravují z krevních monocytů působením směsi vhodných cytokinů (GM-CSF, IL-4). Ty se po inkubaci s nádorovými antigeny injikují pacientovi, v němž pak stimulují jeho T lymfocyty k protinádorové odpovědi. Doposud jediným případem takové vakcíny použitelné v praxi je Sipuleucel-T schválený pro terapii karcinomu prostaty. Řada dalších obdobných vakcín je ve fázi II–III klinických zkoušek u pacientů s melanomem nebo karcinomem prostaty či ledvin a zkouší se u celé řady dalších nádorových onemocnění.

Kromě uvedených dvou typů nádorových vakcín již mnoho let probíhá testování řady dalších experimentálních přístupů, jako jsou např. DNA-vak-



Obr. 3. Likvidace leukemické buňky buňkou Tc nesoucí CAR (chimérický receptor).

Buňka Tc rozezná pomocí chimérického „superreceptoru“ CAR na povrchu leukemické buňky povrchový antigen CD19. Kontakt mezi molekulami CAR a CD19 spustí v buňce Tc signalizační děje, které vyústí v aktivaci cytotoxických mechanismů a zabití napadené leukemické buňky. Buňka Tc následně může kontaktovat a zabít další leukemické buňky („sériové zabíjení“). Na povrchu příslušných buněk jsou desetitisíce až statisíce kopií molekul CD19, resp. CAR. Kromě toho jsou na jejich površích stovky jiných druhů povrchových proteinů (v tisících až milionech exemplářů).

cíny (expresních vektory (bakteriální, virové, plazmidové) nesoucí gen kódující nádorový antigen) či vakcíny založené na geneticky modifikovaných nádorových buňkách exprimujících kostimulační molekuly a cytokiny stimulující T lymfocyty. Tato tematika svým rozsahem dalece překračuje rámec tohoto stručného přehledu. Aktuální přehled o stavu probíhajících vakcinačních klinických studií podává recentní přehledný článek [26].

Závěr

Snahy o imunoterapii nádorových onemocnění prošly dlouholetým vývojem ve vlnách střídajících optimismus s pesimismem. Nyní jsme ve fázi velkého optimismu – zdá se, že na základě důkladného poznání řady základních imunitních mechanismů a jejich regulace v posledních 20 letech mohou některé imunoterapeutické postupy již velmi brzy přinést alespoň u některých onemocnění skutečný průlom a do značné míry přinejmenším účinně doplnit, ne-li

částečně nahradit standardní metody, jako je chemoterapie a radioterapie. Zdá se jisté, že poznatky získané z velkého počtu probíhajících klinických studií v příštích letech významně posílí význam imunoterapeutických přístupů v klinické onkologii.

Literatura

1. Vigneron N. Human tumor antigens and cancer immunotherapy. *Biomed Res Int*. In press 2015.
2. Klener P, Otahal P, Klener P et al. Immunotherapy approaches in cancer treatment. *Curr Pharm Biotechnol* 2015; 16(9): 771–781.
3. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunology* 2004; 21(2): 137–148.
4. Chanmee T, Ontong P, Konno K et al. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)* 2014; 6(3): 1670–1690. doi: 10.3390/cancers6031670.
5. Marvel D, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *J Clin Invest* 2015; 125(9): 3356–3364. doi: 10.1172/JCI80005.
6. Moretta L, Montaldo E, Vacca P et al. Human natural killer cells: origin, receptors, function, and clinical applications. *Int Arch Allergy Immunol* 2014; 164(4): 253–264. doi: 10.1159/000365632.
7. Wang W, Erbe AK, Hank JA et al. NK cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in can-

- cer immunotherapy. *Front Immunol* 2015; 6: 368. doi: 10.3389/fimmu.2015.00368.
8. Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P et al. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2014; 14(2): 135–146. doi: 10.1038/nrc3670.
9. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2014; 27: 1–7. doi: 10.1016/j.coi.2013.12.005.
10. Li S, Xie Q, Zeng Y et al. A naturally occurring CD8(+)CD122(+) T-cell subset as a memory-like Treg family. *Cell Mol Immunol* 2014; 11(4): 326–331. doi: 10.1038/cmi.2014.25.
11. Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G et al. Immune evasion in cancer: mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol*. In press 2015.
12. Tsung K, Norton JA. Lessons from Coley's toxin. *Surg Oncol* 2006; 15(1): 25–28.
13. Ingersoll MA, Albert ML. From infection to immunotherapy: host immune responses to bacteria at the bladder mucosa. *Mucosal Immunol* 2013; 6(6): 1041–1053. doi: 10.1038/mi.2013.72.
14. Adkins I, Fucikova J, Garg AD et al. Physical modalities inducing immunogenic tumor cell death for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 2015; 3(12): e968434.
15. De Palma M, Lewis CE. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer Cell* 2013; 23(3): 277–286. doi: 10.1016/j.ccr.2013.02.013.
16. Bonapace L, Coissieux MM Wyckoff J et al. Cessation of CCL2 inhibition accelerates breast cancer metastasis by promoting angiogenesis. *Nature* 2014; 515(7525): 130–133. doi: 10.1038/nature13862.
17. Ford CA, Petrova S, Pound JD et al. Oncogenic properties of apoptotic tumor cells in aggressive B cell lymphoma. *Curr Biol* 2015; 25(5): 577–588. doi: 10.1016/j.cub.2014.12.059.
18. Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(5): 317–327. doi: 10.1038/nri2744.
19. Redman JM, Hill EM, Al Deghaither D et al. Mechanisms of action of therapeutic antibodies for cancer. *Mol Immunol* 2015; 67(2 Pt A): 25–45. doi: 10.1016/j.molimm.2015.04.002.
20. Weiner GJ. Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2015; 15(6): 361–370. doi: 10.1038/nrc3930.
21. Turnis ME, Andrews LP, Vignali DA. Inhibitory receptors as targets for cancer immunotherapy. *Eur J Immunol* 2015; 45(7): 1892–1905. doi: 10.1002/eji.201344413.
22. Suryadevara CM, Gedeon PC, Sanchez-Perez L et al. Are BiTEs the „missing link“ in cancer therapy? *Oncoimmunology* 2015; 4(6): e1008339.
23. Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* 2015; 348(6230): 62–68. doi: 10.1126/science.aaa4967.
24. Dotti G, Gottschalk S, Savoldo B et al. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunol Rev* 2014; 257(1): 107–126. doi: 10.1111/imr.12131.
25. Pol J, Bloy N, Buqué A et al. Trial Watch: Peptide-based anticancer vaccines. *Oncoimmunology* 2015; 4(4): e974411.
26. Melero I, Gaudernack G, Gerritsen W et al. Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol* 2014; 11(9): 509–524. doi: 10.1038/nrclinonc.2014.111.
27. Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(4): 265–277. doi: 10.1038/nrc3258.

Úloha regulačních T buněk v protinádorové imunitní odpovědi

The Role of Regulatory T-cells in Antitumor Immune Response

Klabusay M.

Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno
Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Regulační T lymfocyty (Treg) jsou nezbytné v regulaci imunitní homeostázy a prevenci rozvoje autoimunitních reakcí. Regulační T buňky zabraňují vzniku autoimunitních nemocí, udržují imunitní homeostázu a modulují imunitní odpověď během infekce. Jejich aktivita je precizně kontrolována. Regulační T buňky jsou jednou ze skupin imunitních buněk, jež mohou podporovat růst nádoru. Svou funkci uskutečňují skrze inhibici efektorových T buněk a regulaci nádorového mikroprostředí pomocí produkce řady solubilních faktorů. Řada prací prokázala, že množství Treg buněk je zvýšeno u solidních nádorů i u hematologických malignit. Nicméně stále je málo známo o mechanismech, které vedou ke zvýšení a udržení zvýšených hladin Treg buněk u nádorových onemocnění. V tomto přehledu se mimo jiné zaměříme na popis funkce a fenotypu Treg buněk, jejich modulaci humorální imunitní odpovědi a interakci s nádorovými kmenovými buňkami. Nové možnosti ovlivnění účinků Treg buněk mimo jiné dovoluje i současný rozvoj moderní imunoterapie nádorů.

Klíčová slova

regulační T lymfocyty – Foxp3 – fenotyp – humorální imunita – nádorové kmenové buňky

Summary

Regulatory T-lymphocytes (Treg) are essential for regulation of immune homeostasis and prevention of autoimmune disease development. Regulatory T-cells prevent the onset of autoimmune diseases; they keep immune homeostasis and modulate immune response during infection. Their activity is precisely controlled. Regulatory T-cells belong to one group of immune cells, which can support tumor survival and growth. They realize their function through inhibition of effector T-cells and by regulation of tumor microenvironment through production of various soluble factors. Many publications have proven that the amount of Treg cells is elevated in both solid tumors and in hematologic malignancies. Nevertheless, little is known about mechanisms, which allow increase and maintenance of elevated Treg cells in cancer patients. In this review, we will focus, among others, on the description of function and phenotype of Treg cells, their modulation of humoral immune response and interaction with cancer stem cells. Current development of modern tumor immunotherapy allows new possibilities of influencing Treg cells function.

Key words

regulatory T-cells – Foxp3 – phenotype – humoral immunity – cancer stem cells

Tato práce byla podpořena projektem VaVpl RECAMO – CZ.1.05/2.1.00/03.010.

This work was supported by project VaVpl RECAMO – CZ.1.05/2.1.00/03.010.

Autor deklaruje, že v souvislosti s předmětem studie nemá žádné komerční zájmy.

The author declares he has no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



doc. MUDr. Martin Klabusay, Ph.D.
Klinika komplexní onkologické péče
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: martin.klabusay@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 2. 9. 2015

Přijato/Accepted: 10. 11. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20154S23>

Úvod

Relevantní výzkum, který se zabýval supresorovými T buňkami, započal začátkem 70. let 20. století. V roce 1971 byly identifikovány tzv. supresorové buňky [1], řada problémů však zpomalila další pokrok na tomto poli. Především bylo obtížné nalézt znaky, které by odlišily regulační T buňky (Treg) od ostatních T buněk. Molekulární mechanismus imunologické suprese regulačními T buňkami tak nebyl velmi dlouho pochopen. Ačkoliv v 80. letech 20. století zůstal koncept T supresorových buněk stále zahalen rouškou tajemství, identifikace $CD4^+$ T klonů, které potlačovaly autologní protinádorovou odpověď, naznačovala, že mechanismus celulórní imunosuprese stimulovaný nádorem *in vivo* musí existovat [2]. V 80. letech 20. století byly také popsány významné funkce různých cytokinů, včetně IL-10 [3]. V roce 1995 byla následně objevena koexprese antigenu CD25, a řetězce receptoru IL-2, na Treg [4]. Byly identifikovány T buňky $CD4^+$ fenotypu vysoce exprimující nízkoafinity receptoru IL-2 CD25, které zabráňovaly vzniku autoimunity na zvířecím modelu. Následně byly popsány rozdílné T subpopulace zahrnující přirozené $CD4^+25^{hi+}$ Treg buňky, indukované Treg (Tr1 a Th3 buňky) a $CD4^+25^{hi+}$ vznikající v periférii z $CD4^+25^-$ buněk [5]. U člověka není CD25 antigen zcela specifický pro Treg buňky a je exprimován v různé intenzitě také na efektorových T buňkách. Při hledání více specifického znaku byl identifikován transkripční faktor Foxp3. Charakteristickou vlastností $CD4^+25^{hi+}$ Foxp3⁺ Treg buněk je schopnost aktivně inhibovat $CD4^+$ a $CD8^+$ T buňky, dendritické buňky, NK buňky, NKT buňky a B buňky při mezibuněčném kontaktu, a to také v závislosti na jejich množství.

Funkce Treg buněk

Forkhead box P3 (Foxp3⁺) Treg buňky regulují mimo jiné (prevence vzniku autoimunitních chorob, regulace odpovědi na infekce virové, bakteriální a parazitické) protinádorovou a transplantační imunitní odpověď [6,7]. Treg buňky ve zdravém organismu musí navíc umožnit funkci protektivní protinádorové imu-

nity. Tyto buňky tedy modulují aktivity řady buněčných komponent, což závisí na jejich migraci do specifických tkání a mikroprostředí, aby se dostaly do kontaktu se svými cílovými buňkami. Treg buňky mohou být rozděleny do několika podskupin. Ačkoliv se Treg vyskytují v sekundárních lymfatických tkáních, mohou být nalezeny prakticky ve většině nelymfatických orgánů, dokonce bez přítomnosti zánětu [8]. Navíc se Treg buňky nacházejí v nádorové tkáni, kde mohou narušit efektivní protinádorovou odpověď [7].

Pro správnou distribuci a funkci exprimují Treg homing receptory, např. CD103 a chemokinový receptor CCR4. Ztráta exprese CCR7 např. blokuje migraci Treg do lymfatických uzlin. Treg buňky využívají pro své funkce celou řadu homing receptorů, včetně molekul CCR1 až CCR9, CXCR3 až CXCR6, integriny a ligandy P- a E-selektinu.

Existují také značné rozdíly mezi Treg v lymfatických a nelymfatických tkáních s velkou funkční i fenotypovou variabilitou. Vyvíjející se Treg v thymu jsou relativně homogenní populací $CD25^{hi+}62L^+CCR7^+$ buněk. Jakmile se buňka dostane do periferie, stává se $CD44^{hi+}$ a zvyšuje expresi homing receptorů. $CD44^{hi+}$ buňky také vykazují rychlejší proliferaci; IL-10 je rovněž produkován $CD44^{hi+}$ Treg buňkami. Treg buňky mohou indukovat perforin dependentní cytolyzu dendritických buněk v sentinelové lymfatické uzlině nádoru [9]. Treg buňky využívají také více mechanismů, které omezují aktivitu dendritických buněk v sekundárních lymfatických tkáních.

Fenotyp Treg buněk

Fenotyp této subpopulace T lymfocytů je nejčastěji definován jako $CD4^+25^+Foxp3^+$. Treg lymfocyty tvoří přibližně 10 % periferních $CD4^+$ T lymfocytů. CD25 se svou afinitou k IL-2 plní důležitou biologickou roli: normálně je trvale exprimován na Treg buňkách, zatímco je variabilně exprimován na aktivovaných T buňkách. Tento fakt činí antigen CD25 problematickým pro identifikaci Treg buněk. Dalším znakem Treg buněk je TNF receptor typu 2 (TNFR2). Znak CD103 je rovněž exprimován na Treg.

Skutečným strukturním znakem Treg buněk je forkhead box P3 (Foxp3) popsaný v roce 2003, který je i molekulou zprostředkující Treg funkce [10,11]. Foxp3 je extenzivně exprimován přirozenými Treg buňkami a je v současnosti jejich nejvíce specifickým markerem [12].

Glukokortikoid-induced TNF receptor-related gene (*GITR*, CD357) patří do TNFR superodiny je exprimován v Treg buňkách ve zvýšené míře. Regulace *GITR* řídí pro- i antiapoptotické efekty a u Treg buněk ukončuje jejich supresivní aktivitu [13]. *GITR* hraje důležitou úlohu v diferenciaci přirozených Treg buněk a v expanzi přirozených i indukovaných Treg buněk [14].

Expresí transkripčního faktoru Helios z rodiny Ikaros je důležitým znakem přirozených Treg buněk [15]. Faktor Helios se váže na faktor Foxp3. Potlačení faktoru Helios významně oslabuje supresivní funkci Treg. Bylo nicméně prokázáno, že faktor Helios se vyskytuje také u indukovaných Treg buněk [16].

Metodou detekce Treg buněk je multiparametrická průtoková cytometrie zaměřená na expresi jednotlivých CD antigenů. Alternativní možností je využití metylačně senzitivní PCR, která je zacílena na demetylované oblasti TSDR regionu genu *Foxp3* [17].

Subtypy Treg buněk

Často bývají rozlišovány přirozené Treg (nTreg) a indukované Treg (iTreg). Pro diverzitu fenotypu, secernovaných cytokinů a mechanismů suprese však musíme rozlišit nejméně čtyři (nejspíše však více než čtyři) subtypy Treg: přirozené Treg, Tr1, Th3 a Tr1-like buňky. Treg lymfocyty ve folikulárních centrech jsou označovány jako Tfreg buňky [18]. Tr1, Th3 a Tr1-like buňky vyžadují opakovanou antigenní stimulaci k tomu, aby mohly být generovány. Tr1 buňky produkují abundantly IL-10, který potlačuje imunitní reakci spolu s Tr1 buňkami [19–21]. Supresivní úloha Th3 buněk je zprostředkována sekrecí TGF- β , IL-4 a IL-10, zatímco Tr1-like buňky regulují nezralé dendritické buňky [22–24].

nTreg lymfocyty

Přirozené Treg lymfocyty se vytvářejí v časných stádiích embryonálního

a neonatálního vývoje T lymfocytů. Tyto buňky se vytvářejí v thymu a poté se dostávají do periferních tkání, kde plní svou funkci. nTreg buňky jsou CD4⁺, exprimují vysokou úroveň CD25, CTLA-4, *GITR* a Foxp3. nTreg jsou normálně se vyskytující subpopulací T lymfocytů [25].

iTreg lymfocyty

Klasický fenotyp této subpopulace T lymfocytů je CD4⁺25⁺Foxp3⁺. Treg lymfocyty hrají podstatnou roli v zachování imunologické self-tolerance [26,27]. Funkce Treg buněk je kontrolována jednak expresí transkripčního faktoru Foxp3 [28–30] regulujícího expresi CTLA-4 a snižujícího produkci IL-2 a udržováním epigenetické specifické DNA hypometylace, která je potřeba pro stabilitu a plnou funkčnost T buněk [31].

Tfreg lymfocyty

Kritickým faktorem v regulaci germinálních center je pomoc T lymfocytů [32,33]. Tfh buňky mají specializovanou funkci poskytující pomoc folikulárním B buňkám [34,35]. Treg buňky fenotypu CD4⁺25⁺69⁻ mají schopnost downregulace CCR7 a simultánní upregulace CXCR5, což jim dovolu- je migrovat do B buněčné zóny [36]. V důsledku toho mohou být tyto Tfreg buňky zobrazeny v germinálních centrech [36,37]. Tfreg buňky suprimují T dependentní produkci protilátek a inhibují produkci protilátek CD40 stimulovanými B buňkami v nepřítomnosti Th buněk [36,37]. Tfreg buňky exprimují vysokou úroveň CXCR5, PD-1 a ICOS, ne- exprimují IL-4, IL-21 a CD40L, ale expri- mují vysoké úrovně CTLA-4 a IL-10 [38]. Tfreg se diferencují z Treg buněk. Bylo také prokázáno, že Tfreg buňky kontro- lují expanzi Tfh buněk.

Treg a modulační humorální imunity

Treg buňky disponují řadou mecha- nizmů, kterými mohou modulovat humo- rální imunitu. Treg buňky mají široký re- pertoár supresivních mechanismů, který závisí na úrovni stimulů, jimž byly Treg buňky vystaveny [39]. Některé z těchto mechanismů jsou popsány v dalších odstavcích.

CTLA-4

Inhibiční molekula CTLA-4 je vysoce exprimována na povrchu Treg buněk a hraje klíčovou úlohu v jejich inhibiční funkci limitací dostupnosti CD80 a CD86. CD80 a CD86 jsou exprimovány na an- tigen prezentujících buňkách (anti- gen presenting cells – APC) a poskytují kostimulační signály T buňkám ligací CD28 společně se signalizací skrze T bu- něčný receptor (TCR) [40]. Mechanismy deplece molekul CD80 a CD86 byly re- centně objasněny: CTLA-4 je schopno transendocytovat CD80/CD86 z povr- chu APC do Treg buněk, kde jsou pak tyto molekuly degradovány [41]. CTLA-4 vá- zající se na CD80/CD86 na B buňkách může přímo ovlivňovat produkci protilá- tek v germinálních centrech.

PD-1

Inhibiční receptor PD-1 je důležitým re- gulátorem řady imunitních regulač- ních drah [42]. PD-1 je upregulován na Tfh a Tfreg buňkách. PD-1 rovněž regu- luje humorální imunitu. Jeho exprese je kritická pro udržení normální funkce Tfreg buněk. Za přítomnosti PD-1 mají Tfreg buňky zvýšený supresivní poten- ciál a zvýšenou schopnost inhibice pro- dukce protilátek [43]. Expresí PD-1 li- gandů na Treg buňkách může také hrát roli v jejich supresivní funkci. Treg spe- cifická exprese PD-1 ligandu 1 a li- gandů 2 přímo inhibuje funkci auto- reaktivních B buněk s expresí PD-1 bez nutnosti zprostředkované interakce s Th buňkami [44].

IL-10

Tento pleiotropní cytokin má komplexní úlohu v humorální imunitě a jeho funkci je inhibovat nebo posilovat protilátko- vou odpověď. Treg buňky samy vyža- dují IL-10 signalizaci k udržení své funkce a kontroly IL-17 produkujících buněk [45]. Role IL-10 je komplexní, neboť B buňky, dendritické buňky, efektorové T buňky i Treg buňky exprimují IL-10R a také samy mohou produkovat IL-10.

TGF-β

Supresivní cytokin TGF-β hraje roli v potlačení protilátkové odpovědi Treg buňkami. Membránově vázaný TGF-β zprostředkovává kontakt de-

pendentní supresi produkce protilátek B buňkami [46].

IFN-γ a IL-12

IFN-γ a IL-12 podporují diferenciaci a funkci Th1 buněk. IFN-γ aktivně inhi- buje generaci Foxp3⁺ Treg z naivních CD4⁺ buněk [47]. IFN-γ a IL-12 mohou jak podporovat, tak i inhibovat funkci Treg buněk v závislosti na síle cytokinové od- povědi a jejím kontextu.

IL-6

IL-6 je široce exprimovaný cytokin s mnohočetnými funkcemi, který ovliv- ňuje rovněž Treg vývoj a aktivitu. IL-6 za- braňuje vzniku TGF-β indukovaných Treg buněk a místo toho spolu s TGF-β indu- kuje Th17 diferenciaci [48].

Indukce apoptózy B buněk

Přímým mechanismem regulace B bu- ňek je indukce jejich apoptózy Treg buň- kami. *In vitro* aktivované Treg buňky pre- ferenčně zabíjejí antigen prezentující B buňky. Navíc může docházet ke gran- zyme indukované apoptóze a Fas-FasL indukované lýze B buněk pomocí Treg buněk [49].

Treg a nádorové kmenové buňky

Koncept nádorových kmenových buněk (cancer stem cells – CSC) by mohl být jed- ním z klíčů k léčbě nádorových onemoc- nění v budoucnu. Teorie, že CSC nebo nádor iniciující buňky (cancer initiating cells – CIC) jsou typem buněk zodpověd- ných za vznik a růst nádorů, získala v po- sledních letech značnou pozornost. Pro jejich vysokou rezistenci a potenciál ini- ciace nádorového růstu jsou CSC pova- žovány za kritický faktor spojený s relap- sem nádoru [50].

V hierarchickém modelu jsou nádory, podobně jako fyziologické tkáně, orga- nizovány rozdílnými buňkami s různou schopností sebeobnovy, úrovní difere- nciace a rezistencí k léčbě. CSC, skupina buněk na vrcholu pyramidu, tvoří mino- ritní populaci buněk, které iniciují nádor a udržují jeho růst. Ke své definici podle koncepce kmenových buněk obecně musí CSC splňovat nejméně dvě kritéria: 1. mít schopnost iniciovat růst nádoru a 2. mít schopnost asymetrické sebeob- novy. V roce 1994 byla popsána skupina

leukemii iniciujících buněk [51]. O více než 10 let později byla prokázána kapacita CD44⁺24⁺ buněk nádoru prsu iniciovat nový tumor [52]. Bohužel jednoznačné specifické markery CSC nebyly dosud identifikovány. V úloze mechanismů regulujících CSC buňky byly kromě mikroprostředí (stem-cell niche) prokázány tři dráhy: Wnt, Hedgehog a Notch. Podle stochastického modelu CSC představují volatilní kompartment, do něhož náhodně vstupují non-CSC buňky, a narušují tak představu klasického hierarchického modelu [53].

Regulační T lymfocyty zprostředkovávají svou funkci pomocí inhibice efektorových T buněk a regulací nádorového mikroprostředí sekrecí řady solubilních faktorů. Zde je možno sledovat styčné plochy Treg a CSC. Některé práce uvádějí přítomnost Treg jako nezávislý prognostický faktor u některých typů nádorů. Analýza interakce mezi Treg buňkami a CSC je předmětem současného výzkumu.

Kontrola CSC Treg buňkami prostřednictvím angiogeneze

Angiogeneze se podílí na působení Treg buněk na CSC. Je zde především důležitý vliv cévního niche a VEGF na regulaci kmenových vlastností CSC. Erlotinib, her-2 blokátory a bevacizumab inhibují CSC v nádorech se sníženou cévní denzitou. Protilátka anti-CD25 redukuje mikrovaskulární denzitu nádoru [54]. TGF- β exprimovaný Treg buňkami je rovněž zahrnut do tohoto regulačního procesu. Přežití při antiangiogenní léčbě metastatického karcinomu ledviny sunitinibem koreluje s poklesem Treg buněk. VEGF indukuje zvýšení Treg buněk. Ačkoliv je angiogeneze slibným zprostředkovatelem interakce mezi CSC a Treg, stále chybí dostatek přesvědčivých důkazů jak *in vivo*, tak *in vitro* pro komplikovanost Treg interakcí.

Foxp3⁺ IL-17 T buňky a CIC

Foxp3⁺ Treg buňky za určitých podmínek exprimují IL-17, který spolu s hypoxií hraje roli v regulaci nádoru iniciujících buněk [55]. Foxp3⁺ IL-17 buňky např. stimulují vývoj markerů asociovaných s kolorektálním karcinomem v mononukleárních buňkách kostní dřeně.

Hypoxie posiluje přechod Treg buněk do Foxp3⁺ IL-17⁺ buněk. Tyto buňky dále exprimují TGF- β , CXCR3 a CCR6.

Makrofágy zprostředkovaný nepřímý efekt na CSC

Makrofágy jsou modulovány mechanismy zprostředkovanými molekulami CTLA-4, IL-10 a TGF- β . V časných fázích vývoje nádoru M1 typ makrofágů infiltruje tumor a produkuje pro-inflamatorní molekuly. V pozdějších fázích růstu v hypoxických podmínkách dochází k tranzici do M2 typu. M2 makrofágy produkují chemokinové ligandy CCL17, CCL22 a CCL24, které přitahují Treg buňky. Diferenciace M2 makrofágů je indukována CD4⁺25⁺ Treg buňkami, zatímco M1 makrofágy mohou být indukovány CD4⁺25⁺ T efektorovými buňkami. Diferenciace M1/M2 je tedy modifikována přítomností Treg.

Modulace Treg CSC buňkami

Na druhé straně rovněž CSC ovlivňují Treg buňky rozličnými mechanismy. Navíc k solubilním faktorům, které jsou produkovány CIC, CSC také regulují Treg pomocí přímého kontaktu indukovaného PD-L1.

Závěry

Treg buňky mají vitální úlohu v kontrole T dependentní protilátkou odpovědi. Treg buňky preferenčně kontrolují expanzi autoreaktivních T a B buňčných klonů. Nicméně Treg buňky se mohou podílet i na kontrole non-self odpovědi. Modulace humorální imunity Treg buňkami je komplexní proces zahrnující několik mechanismů reagujících synergisticky nebo redundantně. CTLA-4 je klíčovým mechanismem, kterým Treg buňky regulují formaci germinálních center. Treg buňky mohou využívat celou škálu dalších supresivních mechanismů (jako jsou IL-10 a TGF- β), kterými mohou jemně ladit odpovědi germinálního centra.

Kvůli nedostatku znaků charakterizujících CSC a jejich vzájemný překryv zůstává specifická identifikace těchto buněk problematická. Experimentální výsledky ukazují na jejich vysokou rezistenci k chemoterapii a radioterapii, tedy zřejmý klinický význam jako terapeutický cíl v léčbě a prevenci recidivy

nádoru. Na druhé straně, vzhledem ke klinické korelaci mezi Treg a špatnou prognózou pacientů s nádory, jsou nezbytné studie objasňující mechanismus jejich interakcí. Existují přímé i nepřímé vazby mezi CSC a Treg. M2 typ makrofágů indukovaný Treg buňkami, který koreluje se špatnou prognózou některých nádorů, může hrát roli v regulaci CSC.

Četnost a funkce Treg u nádorů je významná, neboť zvýšený počet Treg buněk může podporovat rozvoj a růst nádoru. První práce přinesly informace o zvýšeném zastoupení Treg buněk u nemalobuněčného karcinomu plic a ovariálního karcinomu [56]. Tyto buňky produkovaly TGF- β a vykazovaly vysokou expresi CTLA-4. Zvýšený počet Treg buněk byl sledován u maligního melanomu [57] a u ovariálního karcinomu [58]. Totéž bylo prokázáno i u jiných typů nádorů. Tento fakt vyvolává další otázky: Je zvýšená frekvence Treg buněk časnou událostí při vzniku nádoru, nebo je pozdní reakcí organismu na existující nádor? Jak současná terapie ovlivňuje množství Treg buněk? Existuje možnost deplece Treg buněk *in vivo* bez rizika indukce autoimunitní odpovědi?

Z myších modelů vyplývá, že k indukci tumor specifických Treg buněk dochází velmi časně ve vývoji nádoru [59]. Tento fakt může mít značný klinický význam, neboť k indukci Treg buněk dojde pravděpodobně před stanovením diagnózy nádoru u většiny pacientů. Selektivní akumulace Treg buněk byla studována na myších modelech. Blokáda IL-10 a FGF- β částečně obrátila supresi indukovanou Treg buňkami. Dále pak místní deplece CD4⁺ buněk vedla k eradikaci tumoru a rozvoji dlouhodobé protinádorové paměti [60]. To naznačuje, že suprese protinádorové odpovědi Treg buňkami se odehrává především v místě nádoru a že lokální ovlivnění může být velmi efektivní. Deplece Treg buněk může vést k obnovení protinádorové imunitní odpovědi. Tento směr výzkumu naznačuje velmi slibné výsledky v budoucnu.

Literatura

1. Gershon RK, Kondo K. Infectious immunological tolerance. *Immunology* 1971; 21(6): 903–914.

2. Chakraborty NG, Twardzik DR, Sivanandham M et al. Autologous melanoma-induced activation of regulatory T cells that suppress cytotoxic response. *J Immunol* 1990; 145(7): 2359–2364.
3. O'Garra A, Murphy K. Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. *Curr Opin Immunol* 1994; 6(3): 458–466.
4. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alphachains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155(3): 1151–1164.
5. Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells in cancer. *Blood* 2006; 108(3): 804–811.
6. Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 2007; 7(11): 875–888.
7. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer* 2010; 127(4): 759–767. doi: 10.1002/ijc.25429.
8. Sather BD, Treuting P, Perdue N et al. Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *J Exp Med* 2007; 204(6): 1335–1347.
9. Boissonnas A, Scholer-Dahirel A, Simon-Blancal V et al. Foxp3+ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumordraining lymph nodes. *Immunity* 2010; 32(2): 266–278. doi: 10.1016/j.immuni.2009.11.015.
10. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299(5609): 1057–1061.
11. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4(4): 330–336.
12. Roncador G, Brown PJ, Maestre L et al. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol* 2005; 35(6): 1681–1691.
13. Nocentini G, Riccardi C. GITR: a multifaceted regulator of immunity belonging to the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Eur J Immunol* 2005; 35(4): 1016–1022.
14. Ronchetti S, Ricci E, Pettillo MG et al. Glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor-related protein: a key marker of functional regulatory T cells. *J Immunol Res* 2015; 2015: 171520. doi: 10.1155/2015/171520.
15. Getnet D, Grosso JF, Goldberg MV et al. A role for the transcription factor Helios in human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Mol Immunol* 2010; 47(7–8): 1595–1600. doi: 10.1016/j.molimm.2010.02.001.
16. Gottschalk RA, Corse E, Allison JP. Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2012; 188(3): 976–980. doi: 10.4049/jimmunol.1102964.
17. Tatura R, Zeschnigk M, Hansen W et al. Relevance of Foxp3+ regulatory T cells for early and late phases of murine sepsis. *Immunology* 2015; 146(1): 144–156. doi: 10.1111/imm.12490.
18. Wing JB, Sakaguchi S. Foxp3+ Treg cells in humoral immunity. *Int Immunol* 2013; 26(2): 61–69. doi: 10.1093/intimm/dxt060.
19. Den Haan JM, Kraal G, Bevan MJ. Cutting edge: lipopolysaccharide induces IL-10-producing regulatory CD4+T cells that suppress the CD8+ T cell response. *J Immunol* 2007; 178(9): 5429–5433.
20. Gregori S, Bacchetta R, Passerini L et al. Isolation, expansion, and characterization of human natural and adaptive regulatory cells. *Methods Mol Biol* 2007; 380: 83–105.
21. Groux H, O'Garra A, Bigler M et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389(6652): 737–742.
22. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J et al. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994; 265(5176): 1237–1240.
23. Zheng SG, Gray JD, Ohtsuka K et al. Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. *J Immunol* 2002; 169(8): 4183–4189.
24. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G et al. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 2000; 192(9): 1213–1222.
25. de Rezendes LC, Silva IV, Rangel LB et al. Regulatory T cell as a target for cancer therapy. *Arch Immunol Ther Exp* 2010; 58(3): 179–190. doi: 10.1007/s00005-010-0075-0.
26. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T et al. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133(5): 775–787. doi: 10.1016/j.cell.2008.05.009.
27. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* 2010; 11(1): 7–13. doi: 10.1038/ni.1818.
28. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299(5609): 1057–1061.
29. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4(4): 330–336.
30. Khattry R, Cox T, Yasayko SA et al. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003; 4(4): 337–342.
31. Ohkura N, Hamaguchi M, Morikawa H et al. T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. *Immunity* 2012; 37(5): 785–799. doi: 10.1016/j.immuni.2012.09.010.
32. Victorica GD, Schwickert TA, Fooksman DR et al. Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* 2010; 143(4): 592–605. doi: 10.1016/j.cell.2010.10.032.
33. Allen CD, Okada T, Tang HL et al. Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science* 2007; 315(5811): 528–531.
34. Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E et al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med* 2000; 192(11): 1545–1552.
35. Schaefer P, Willmann K, Lang AB et al. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med* 2000; 192(11): 1553–1562.
36. Lim HW, Hillsamer P, Kim CH. Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell-driven B cell responses. *J Clin Invest* 2004; 114(11): 1640–1649.
37. Lim HW, Hillsamer P, Banham AH et al. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2005; 175(7): 4180–4183.
38. Linterman MA, Pierson W, Lee SK et al. Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med* 2011; 17(8): 975–982. doi: 10.1038/nm.2425.
39. Yamaguchi T, Wing JB, Sakaguchi S. Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Semin Immunol* 2011; 23(6): 424–430. doi: 10.1016/j.smim.2011.10.002.
40. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/ B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 233–258.
41. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K et al. Transendothelial costimulation of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 2011; 332(6029): 600–603. doi: 10.1126/science.1202947.
42. Okazaki T, Honjo T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol* 2006; 27(4): 195–201.
43. Sage PT, Francisco LM, Carman CV et al. The receptor PD-1 controls follicular regulatory T cells in the lymph nodes and blood. *Nat Immunol* 2013; 14(2): 152–161. doi: 10.1038/ni.2496.
44. Gotot J, Gottschalk C, Leopold S et al. Regulatory T cells use programmed death 1 ligands to directly suppress autoreactive B cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(26): 10468–10473. doi: 10.1073/pnas.1201131109.
45. Chaudhry A, Samstein RM, Treuting P et al. Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. *Immunity* 2011; 34(4): 566–578. doi: 10.1016/j.immuni.2011.03.018.
46. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 2001; 194(5): 629–644.
47. Caretto D, Katzman SD, Villarino AV et al. Cutting edge: the Th1 response inhibits the generation of peripheral regulatory T cells. *J Immunol* 2010; 184(1): 30–34. doi: 10.4049/jimmunol.0903412.
48. Bettelli E, Carrier Y, Gao W et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441(7090): 235–238.
49. Janssens W, Carlier V, Wu B et al. CD4+CD25+ T cells lyse antigen-presenting B cells by Fas-Fas ligand interaction in an epitope-specific manner. *J Immunol* 2003; 171(9): 4604–4612.
50. Yu X, Li H, Ren X. Interaction between regulatory T cells and cancer stem cells. *Int J Cancer* 2012; 131(7): 1491–1498. doi: 10.1002/ijc.27634.
51. Lapidot T, Sirad C, Vormoor J et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; 367(6464): 645–648.
52. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(7): 3983–3988.
53. Gupta PB, Fillmore CM, Jiang G et al. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell* 2011; 146(4): 633–644. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.026.
54. Facciabene A, Peng X, Hagemann IS et al. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and Treg cells. *Nature* 2011; 475(7355): 226–230. doi: 10.1038/nature10169.
55. Yang S, Wang B, Guan C et al. Foxp3+HL-17+ T cells promote development of cancer-initiating cells in colorectal cancer. *J Leukoc Biol* 2011; 89(1): 85–91. doi: 10.1189/jlb.0910506.
56. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ et al. Regulatory CD4(+) CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2001; 61(12): 4766–4772.
57. Javie LR, Rosenberg SA. CD4+CD25+ suppressor lymphocytes in the circulation of patients immunized against melanoma antigens. *J Immunother* 2003; 26(1): 85–93.
58. Curiel TJ, Coukos G, Zou L et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; 10(9): 942–949.
59. Peng L, Kjaergaard J, Plautz GE et al. Tumor induced L-selectin high suppressor T cells mediate potent effector T cell blockade and cause failure of otherwise curative adoptive immunotherapy. *J Immunol* 2002; 169(9): 4811–4821.
60. Yu P, Lee Y, Liu W et al. Intratumor depletion of CD4 cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. *J Exp Med* 2005; 201(5): 779–791.

Únikové strategie nádorů pozornosti imunitního systému

Escape Strategies of Tumors from Immune Surveillance

Šťastný M.^{1*}, Říhová B.^{2**}

¹ Bristol-Myers Squibb spol. s r. o., Praha

² Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i., Praha

Souhrn

Imunitní systém musí být na jedné straně schopen efektivně zasáhnout proti cizím a nebezpečným patogenům, na straně druhé musí být schopen rozpoznat a tolerovat naše vlastní tkáně a orgány. Aktivita imunitního systému je ovlivňována celou řadou pozitivních (stimulačních) a negativních (inhibičních) signálů. Některé z těchto inhibičních receptorů zabráňují poškození našich tkání v místě zánětu tím, že tlumí příliš silnou či dlouhou imunitní reakci. Plní tak fyziologickou ochrannou funkci před silnou zánětlivou reakcí a možnou autoimunitní patologií. Některé z těchto mechanismů jsou ovšem využívány nádory k tomu, aby unikly pozornosti imunitního systému. Další únikové strategie spočívají v produkci cytokinů a faktorů vytvářejících v nádorovém mikroprostředí silnou imunosupresi, která zabráňuje efektivní imunitní odpovědi. Tato práce si klade za cíl popsat nejčastější strategie, které jsou nádory využívány k potlačení imunitní reakce.

Klíčová slova

imunitní úniky – únikové mechanismy nádorů – imunoterapie – CTLA-4 – PD-1 – kontrolní body imunitní reakce

Summary

Immune system must be able to protect us from foreign dangerous pathogens, but on the other side, it must be able to recognize our own tissues and organs. Activity of the immune system is affected by many positive (stimulatory) and negative (inhibitory) signals. Some of these negative receptors protect us from damage of our tissues at a place of inflammation as it blocks too intensive or long-lasting immune reaction. Thereby, they have a physiological protective function against strong inflammatory reaction and possible subsequent autoimmune pathology. However, some of these mechanisms are also utilized by tumors to avoid immune recognition and attention of the immune cells. Other tumor escape mechanisms involve increased production of cytokines and factors which are responsible for immunosuppressive tumor microenvironment where effective immune response is actively blocked. This review summarizes the most frequently used strategies, which are utilized by tumors to avoid immune recognition and/or killing by the immune cells.

Key words

immune evasion – tumor escape – immunotherapy – CTLA-4 – PD-1 – immune checkpoint

* Prohlašuji, že v souvislosti s výše uvedeným příspěvkem, jehož jsem spoluautorem, mám střet zájmů se společností Bristol-Myers Squibb spol. s r. o.

Autor je bývalý pracovník Mikrobiologického ústavu AV ČR, v. v. i., Praha.

* I declare that, in connection with this contribution of which I am the co-author, I have a conflict of interest with following company: Bristol-Myers Squibb a. s. r. o.

Author is former employee of Institute of Microbiology of the AS CR, v. v. i., Prague.

** Autorka deklaruje, že v souvislosti s předmětem studie nemá žádné komerční zájmy.

** The author declares she has no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Dr. Marek Šťastný, Ph.D.
Bristol-Myers Squibb spol. s r. o.
Budějovická 778/3
140 00 Praha 4
e-mail: marek.stastny@bms.com

Obdrženo/Submitted: 4. 8. 2015

Přijato/Accepted: 1. 10. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20154S28>

Úvod

Imunitní systém savců se vyvíjel desítky miliónů let a učil se reagovat na cizorodá (ohrožující) agens. Jedním z hlavních úkolů imunitního systému bylo zabránit úmrtí jedince na infekci a umožnit dosažení reprodukčního období. Imunitní systém se tedy vyvinul primárně pro boj s bakteriálními a virovými infekcemi, ne pro boj s nádory. V průběhu evoluce se totiž imunitní systém neměl příliš šanci s nádory potkat. Přestože jsou v archeologických výzkumech popisovány nálezy kostí neandrtalců deformovaných nádory [1], naprostá většina malignit se v současné době objevuje až po 50. roce života (graf 1), přičemž historická data ukazují, že ještě v polovině 19. století byla očekávaná doba přežití ve Velké Británii jen 25–30 let [2]. S jistou formou nadsázky lze tedy tvrdit, že imunitní systém člověka se s nádory „potkává“ teprve posledních 150 let, kdy došlo k významnému prodloužení průměrné doby přežití, a tím k vyššímu výskytu nádorových onemocnění.

Někdy se říká, že maligní nádory se chovají jako vlastní tkáň a vysvětluje se tím absence jejich rozpoznávání a následného odstranění imunitními mechanismy. Není to přesná formulace. Spíše se ukazuje, že imunitní systém některé nádory, které mutacemi nevytvořily dostatek antigenů cizích proteinů, glykoproteinů a lipoproteinů, prostě nerozpoznává jako potenciální nebezpečí. Nádory jako buňky těla „vlastní“ představují mnohem slabší imunogeny pro imunitní systém a navíc mají – stejně jako

normální netransformované buňky – řadu mechanismů, jak se chránit před napadením buňkami imunitního systému.

Myšlenka „imunitního dozoru“ byla u nádorů poprvé vyslovena Paulem Ehrlichem a později byla reformulována Burnetem a Thomasem v roce 1957. Tato teorie hovoří o tom, že imunitní systém je u imunokompetentního jedince (spolu)zodpovědný za prevenci nádorového bujení. Tato teorie budila řadu kontroverzí, protože se původně nepodařilo prokázat, že by athymické myši měly vyšší výskyt nádorů než imunokompetentní zvířata s funkčním thymem [3]. Později se však ukázalo, že tyto *nude* myši nejsou zcela imunodeficitní, a teprve s rozvojem geneticky modifikovaných myších modelů imunodeficiency v 90. letech minulého století se prokázalo, že imunitní systém hraje důležitou roli v kontrole nádorů. Skupina kolem prof. Schreiberova zdokumentovala, že zvířata deficitní v genech pro IFN- γ či pro všechny IFN receptory mají vyšší výskyt chemicky indukovaných nebo spontánně se objevujících nádorů v porovnání s imunokompetentními zvířaty [4,5]. Navíc se zjistilo, že imunitní systém nejen kontroluje počet nádorových buněk, ale i jejich imunogenicitu. Nádory rostoucí v imunodeficitních zvířatech byly totiž více imunogenní („needitované“) v porovnání s nádory rostoucími v imunokompetentních zvířatech („editované“ nádory) [6]. Tato teorie byla nazvána „nádorovou imunoeditací“. V dalších ex-

perimentech se pak ukázalo, že vztah mezi imunitním systémem a nádory prochází třemi fázemi, a proto se také někdy hovoří o teorii 3E, z anglického *elimination – equilibrium – escape* [7]:

1. fáze eliminace

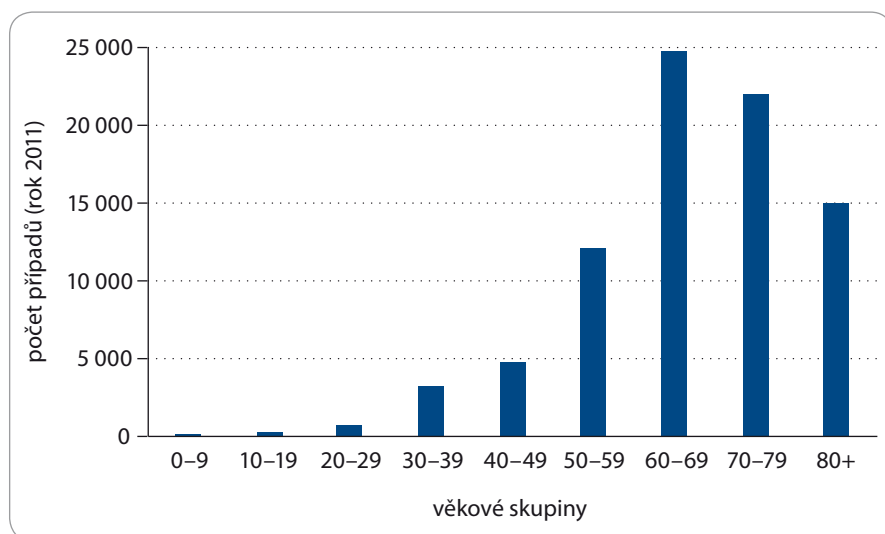
Tato fáze odpovídá v podstatě původní teorii imunitního dohledu, ve které dochází ke spolupráci vrozené a adaptivní složky imunitního systému při detekci rozvíjejícího se nádoru – v ideálním případě k jeho likvidaci – ještě předtím, než je nádor klinicky zjištělý. Mechanismy, kterými je imunitní systém „vavován“ o potenciálním nebezpečí, jsou komplexní, ne zcela jasné, ale mohou se na nich podílet tzv. DAMPs molekuly (*damage-associated molecular patterns*), které jsou uvolňovány z hynoucích nádorových buněk či ze stromálních buněk nádoru. Jedná se o molekulární vzory spojené s poškozením/nebezpečím, mezi něž patří např. nukleární či cytosolické proteiny (DNA, HSP, HMGB1, ATP a další) [7].

2. fáze rovnováhy

Část nádorových buněk může přežít fázi eliminace, které se tím se dostanou do fáze rovnováhy mezi imunitním systémem a nádorovými buňkami. V této fázi se adaptivní imunitní systém podílí na kontrole nádorového bujení a preferenčně dochází k likvidaci více imunogenních variant nádorových buněk. Na druhé straně může zcela dle Darwinových principů docházet k tomu, že se mohou objevovat méně imunogenní varianty nádorových buněk (ztráta povrchového antigenu/markeru nebo schopnost přežít útok imunitního systému), které nejsou kompletně eliminovány. V této fázi, která může být různě dlouhá (někdy může trvat roky či po celý život pacienta), je imunitní systém schopen držet reziduální nádorové buňky pod určitou kontrolou ve stavu funkční dormance. Nedochází sice ke kompletní eliminaci nádorových buněk, ale může být blokována jejich schopnost nekontrolovaného růstu či metastáz [7].

3. fáze úniku

V této fázi už dochází k tomu, že nádorové buňky získávají schopnost vyhnout se kontrole buňkami imunitního systému



Graf 1. Výskyt nádorů v ČR podle věku (rok 2011; zdroj: ÚZIS ČR, informace č. 25/2014).

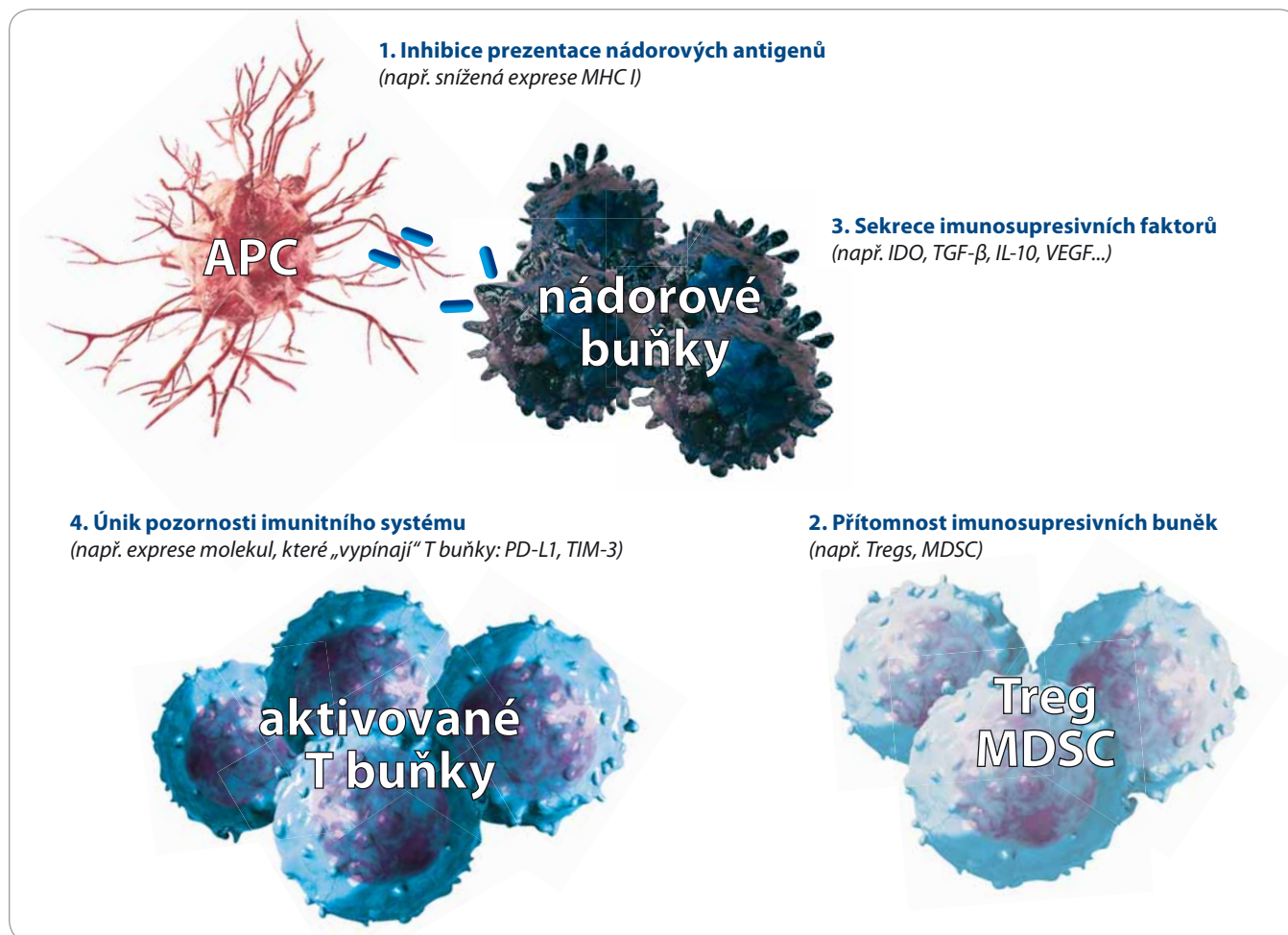
a rozpoznání či destrukci. Tato schopnost úniku imunitnímu systému dokonce patří k základním charakteristikám nádorů [7,8]. Proto v okamžiku, kdy je nádor klinicky detekovatelný, má už obvykle celou řadu mechanismů, které mu umožňují uniknout imunitní odpovědi hostitele (exprese cytokinů, chemokinů či dalších faktorů, jako je IL-10, TGF- β , VEGF, IDO).

Tyto fáze nádorové imunoeditace jsou velmi pěkně dokumentovány na preklinických modelech. Objevuje se vyšší výskyt chemicky indukovaných nádorů u imunodeficitních myši v porovnání s imunokompetentními jedinci. Naopak likvidací T buněčných subpopulací (CD4⁺, CD8⁺ IFN- γ +) dojde u 40–50 % myši k objevu nádoru, přestože u nich nízké dávky karcinogenu nádor neindukovaly [6,7,9]. Podrobná vyšetření pak ukázala, že u těchto zvířat jsou sice sarkomové buňky přítomny, ale jsou drženy

pod kontrolou imunitním systémem zvířete. V klinickém prostředí je přesvědčujících dat z logických důvodů výrazně méně, nicméně se ví, že pacienti s výraznou imunosupresí (transplantace) či oslabeným/nefunkčním imunitním systémem (AIDS) mají výrazně vyšší výskyt některých nádorů [10,11]. Velmi zajímavé jsou kazuistiky, kdy se u imunosuprimovaného pacienta s transplantací ledviny objeví melanom a zjistí se, že nejde o jeho vlastní nádor, ale o nádor pocházející z dárce [12]. Zpětným dohledáním se pak zjistilo, že dárci byl před desítkami let odstraněn melanom a on sám byl až do svého úmrtí zcela v pořádku. Zřejmě došlo k tomu, že v transplantovaném orgánu přežily desítky let dormantní melanomové buňky, které držel pod kontrolou imunitní systém dárce, a teprve poté, kdy byla ledvina přenesena do imunosuprimovaného jedince, došlo k růstu melanomu. Podobně se objevují kazuis-

tiky, kdy došlo k metastázování renálního karcinomu do plic osm let po nefrektomii, přičemž v té době měl pacient silnou imunosupresi kvůli transplantované ledvině [13]. U karcinomu prsu se ví, že u 30–40 % žen, které podstoupily mastektomii, jsou v krvi detekovány cirkulující nádorové buňky, a přesto u všech těchto žen nedochází 8–22 let po zákroku k relapsu karcinomu prsu [14]. Naopak existují i zajímavé případy, kdy došlo ke spontánní regresi plicních metastáz renálního karcinomu u pacienta s psoriázou v období, kdy došlo k exacerbaci choroby, a naopak remise psoriázy byla spojena s progresí nádoru [15].

Nádory unikají vrozené a získané imunitní odpovědi buď pasivně, nebo aktivně. Pasivní mechanismy se týkají přímo vlastností nádorových buněk. Při aktivním úniku jsou využívány i další buněčné systémy. Některé z těchto mechanismů ukazuje obr. 1.



Obr. 1. Některé z mechanismů, které nádory využívají k úniku pozornosti imunitního systému.

Pasivní obrana (imunoselektce, imunoeditace)

Nádory mutacemi ztrácejí antigeny, které by mohly imunitní reakci vyvolat

Princip imunoselektce spočívá v tom, že populace nádorových buněk je po určité době expanzivního růstu nádoru mimořádně heterogenní. Je geneticky nestabilní nejenom z imunologického, ale i z metabolického hlediska. A tato různorodost se neustále zvyšuje. Jsou nádory, u kterých se v průběhu několika let prokazují až tisíce mutací nebo delecí genů kódujících nádorové antigeny. Pokud nejde o antigeny vyžadované pro růst nádorových buněk nebo udržování transformovaného fenotypu, jsou imunologicky rozpoznatelné nádorové buňky během fáze ekvilibria imunitní editace odstraňovány a přežívají jen imunitním systémem nerozpoznatelné nádorové varianty. Proto je dnes imunoeditace považována za jeden z hlavních důvodů, proč nádory imunitnímu dohledu unikají. Experimentálně to bylo potvrzeno porovnáním růstu nádorů u konvenčních a imunodeficitních myší a jejich následnou transplantací do dalších imunokompetentních myší. Nádory původně rostoucí na imunodefektních myších imunokompetentní myši častěji odhojovaly. Je to důkaz toho, že nádory, které se vyvíjejí v prostředí normálního imunitního systému, se časem stávají méně imunogenní, protože přerůstají méně imunogenní varianty nádorových buněk [7].

Expresí MHC glykoproteinů I. třídy může být na nádorových buňkách snížena tak, že nejsou následně rozpoznávány cytotoxickými T lymfocyty

Nádory, podobně jako některé viry infikované buňky, snižují, nebo dokonce ztrácejí povrchovou expresi molekul MHC (major histocompatibility complex) glykoproteinů I. třídy, které jsou pro rozpoznávání cytotoxickými T lymfocyty (CTL) zásadní. Obě hlavní T buněčné subpopulace, CD4⁺ (pomocné) a CD8⁺ (cytotoxické) T buňky, rozpoznávají cílovou, tj. pro organismus nebezpečnou buňku jedněm tehdy, vystavuje-li své antigeny na pozadí výše zmíněných MHC molekul.

CD4⁺ T lymfocyty rozpoznávají antigenní peptidy vystavené na pozadí MHC glykoproteinů II. třídy, CD8⁺ T lymfocyty pak antigenní peptidy vystavené na pozadí MHC glykoproteinů I. třídy. Pokud takové molekuly na povrchu nejsou, antigeny na nich nemohou být vystavovány a pro T buňky imunitního systému se taková buňka teoreticky stává neviditelnou. Nejsou ale bohužel zcela exaktní důkazy o korelaci mezi hladinou MHC exprese a růstu nádorů, nicméně jsou známy případy tzv. smíšené odpovědi nádoru na imunoterapii, kdy část nádorových lézí regreduje a část se zvětšuje [16]. V neodpovídající lézi pak byla prokázána snížená exprese MHC molekul I. třídy. Nádorové snížení MHC exprese ale není jediný mechanismus, který umožňuje nádorovým buňkám pasivně uniknout imunitnímu dozoru. Nádorové buňky snižují nejenom syntézu celých MHC molekul, ale také jen β 2 mikroglobulinu nebo buněčných komponent typu transportérů zajišťujících převod zpracovaných peptidů z proteazomů do endoplazmatického retikula anebo jen některých podjednotek proteazomů. Jedná se nepochybně o reakci nádorů na selekční tlak ze strany imunitního systému pacienta a umožňuje to nádorovým buňkám uniknout T buněčné odpovědi.

Nádorové Ag jsou exprimovány tak, že nejsou imunitním systémem rozpoznatelné

Tento mechanismus bývá také někdy nazýván „maskování antigenu“ a je způsoben tím, že povrchové antigeny nádoru jsou překryty molekulami glykokalyxu. Jako příklad může sloužit sialová kyselina v mukopolysacharidech. Nádory často exprimují více glykokalyxových molekul než buňky normální.

Aktivní obrana

Nádory mohou samy aktivně využívat další buněčné systémy, aby zabránily imunitnímu systému v jejich rozpoznání. Za normálních okolností musí být imunitní systém schopen na jedné straně rozpoznávat a likvidovat nebezpečné patogeny (viry, bakterie, parazity), na straně druhé musí být zachována jeho schopnost tolerovat vlastní tkáň a orgány [17–21]. Protože klíčovou roli v rozpoznávání a likvidaci patogenů a nádorových buněk hrají T buňky, jejich aktivita musí být velmi striktně regulována. Aktivita T buněk je regulována pozitivními, kostimulačními signály a zároveň existuje velký počet negativních, inhibičních signálů (tzv. immune checkpoints nebo kontrolní body imunitní reakce – KBIR) (obr. 2). Tyto inhibiční receptory modulují trvání a intenzitu imunitní odpovědi a jejich význam je diskutován níže.

rových buněk hrají T buňky, jejich aktivita musí být velmi striktně regulována. Aktivita T buněk je regulována pozitivními, kostimulačními signály a zároveň existuje velký počet negativních, inhibičních signálů (tzv. immune checkpoints nebo kontrolní body imunitní reakce – KBIR) (obr. 2). Tyto inhibiční receptory modulují trvání a intenzitu imunitní odpovědi a jejich význam je diskutován níže.

Aktivace T buněk a kostimulační molekuly

Prvním krokem v aktivaci „naivních“ T buněk je vazba T buněčného receptoru (T-cell receptor – TCR) na MHC molekuly s navázaným antigenním peptidem na povrchu antigen prezentujících buněk (antigen presenting cells – APC; dendritické buňky, aktivované makrofágy či B buňky). APC pohlcují z okolního prostředí antigeny, zpracují je a v ideálním případě vystaví peptidový fragment z nádoru na svém povrchovém MHC. Po vazbě specifického TCR na MHC s příslušným antigenním peptidem dostane T buňka 1. signál [22]. Tento signál není dostatečný pro optimální aktivaci a T buňka musí dostat 2., kostimulační signál. Ten dostává vazbou receptoru CD28 na svém povrchu na molekuly B7 (B7.1/CD80 či B7.2/CD86) na povrchu aktivované APC. Tím dojde k plné aktivaci T buněčné odpovědi, sekreci příslušných cytokinů včetně IL-2, který indukuje proliferaci T buněk a vznik mnoha „kopií“ efektorových, aktivovaných T buněk [22–24]. T buňky, které byly aktivovány ve spádové uzlině, migrují zpět do místa primárního nádoru. Jakmile jsou tyto buňky aktivovány, už nevyžadují 2. kostimulační signál, ale stačí jim rozpoznání MHC antigenu s navázaným peptidovým fragmentem, což vede k napadení nádorové buňky a v ideálním případě k její likvidaci. Část aktivovaných T buněk se na konci imunitní odpovědi mění v tzv. paměťové T buňky, které jsou schopny rychlejší a silnější reakce v případě opětovného setkání s antigenním peptidem [22]. Molekuly, které dávají T buňkám 2. signál, aby došlo k jejich plné aktivaci a proliferaci, se nazývají kostimulační molekuly a část těchto molekul ukazuje obr. 1. Kromě již výše zmiňované molekuly CD28 existuje celá řada

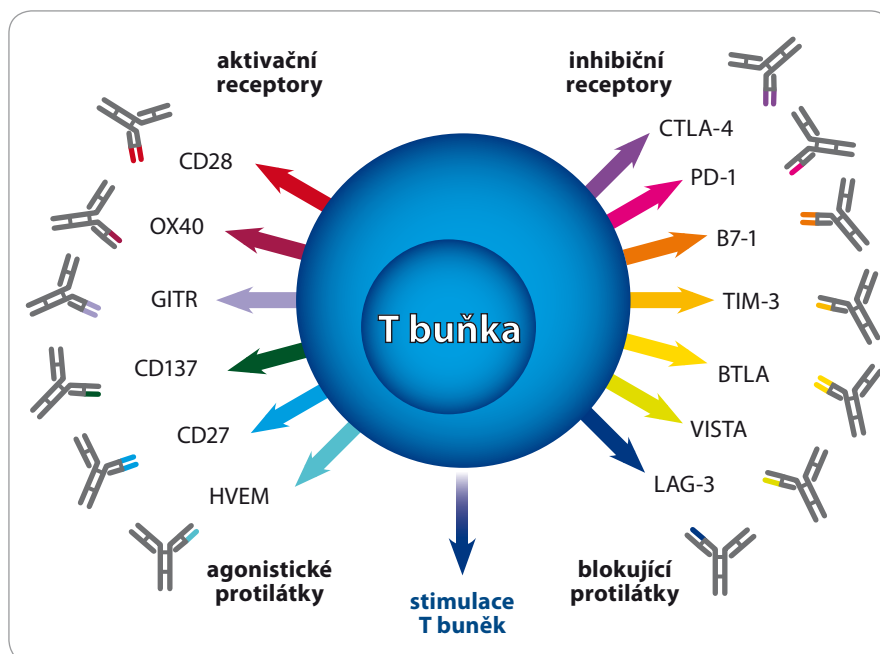
dalších kostimulačních molekul, které jsou důležité pro optimální efektorové funkce T buněk a pro tvorbu paměťových T buněk, které v organismu přežívají roky [25]. Vazba těchto molekul na své ligandy zesiluje aktivaci T buněk, zvyšuje proliferaci či sekreci cytokinů a obecně lze říci, že tyto molekuly představují potenciální cíl pro imunomodulační léčbu [26].

Inhibiční molekuly („immune checkpoints“ neboli kontrolní body imunitní reakce)

Kromě pozitivní kostimulace, kdy se z naivních T buněk stávají imunologicky aktivní cytotoxické T buňky, existuje také celá řada inhibičních receptorů a molekul, které přispívají k imunologické homeostáze a zabráňují nechtěným projevům autoimunity či nadměrnému poškození vlastních tkání v místě intenzivního zánětu. Aktivní blokáda imunitního dozoru patří také od roku 2011 k jedné z nových charakteristik nádorů [8]. Mezi nejdůležitější molekuly, které patří mezi tzv. immune checkpoints (kontrolní body imunitní reakce), patří CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4), receptor PD-1 (programmed death-1), LAG-3 (lymphocyte activation gene-3), TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3) a další [26].

CTLA-4

CTLA-4 je klíčový negativní regulátor imunitní odpovědi. Je exprimován exkluzivně na T buňkách, kde se objevuje 2–3 dny po jejich aktivaci, a jeho hlavní funkcí je regulovat aktivitu T buněk. Váže se na stejné molekuly jako kostimulační molekula CD28 (tedy na ligandy CD80 a CD86 na povrchu APC), a protože má k těmto molekulám vyšší afinitu než CD28, vytěsňuje tuto kostimulační molekulu z vazby a tím tlumí aktivitu T buněk [27–28]. Tato interakce je extrémně důležitá pro udržení imunologické rovnováhy a indukci periferní tolerance k vlastním antigenům. Je to „bezpečnostní pojistka“ či „brzda“, která zabráňuje nadměrné imunitní odpovědi a nechtěné autoimunitě. Studie na knockout myších ukazují, jak extrémně důležitou molekulou CTLA-4 je. Zvířata



Obr. 2. T buňky jsou ovlivňovány řadou pozitivních a negativních signálů (upraveno dle [21]).

bez genu pro CTLA-4 se sice narodí, ale hynou 3–4 týdny po narození na fatální periferní lymfoproliferaci s infiltrací orgánů T buňkami [29].

V počátku imunitní odpovědi je CTLA-4 na povrchu T buněk téměř nedetekovatelný a na povrchu se objevuje během 48–72 hod po jejich aktivaci [30]. CTLA-4 je tedy rozhodujícím „imunitním checkpointem“, který kontroluje trvání a intenzitu imunitní odpovědi [18,31]. Kromě toho CTLA-4 přispívá k imunomodulační aktivitě regulačních T buněk (Tregs), kde je (na rozdíl od efektorových T buněk) exprimován konstitutivně a přispívá k lokální imunosupresi vyvolané právě Tregs v nádorovém mikroprostředí [32,33]. Paradoxně se ukazuje, že zatímco CTLA-4 inhibuje efektorové T buňky, u regulačních T buněk dochází k opačné situaci – CTLA-4 zesiluje aktivitu Tregs a jejich proliferaci. Zdá se, že část protinádorového působení anti-CTLA-4 protilátek (ipilimumab, tremelimumab) je zprostředkována právě tím, že blokují imunosupresivní aktivitu Tregs [21,34].

PD-1 receptor

PD-1 je transmembránový imunomodulační receptor, který patří k nejintenzivněji studovaným molekulám v ob-

lasti protinádorového působení. Byl původně objeven jako gen indukovaný u T buněčných hybridomů při průchodu apoptózou [35]. Na klidových buňkách imunitního systému je minimální exprese PD-1, ale po aktivaci se PD-1 objevuje jak na T buňkách, tak na B buňkách, NK buňkách, NKT buňkách, ale i na dendritických buňkách (dendritic cells – DC) a makrofázích. Velký zájem pak vzbudila data, která ukazovala, že PD-1 je silně exprimován vyčerpanými nefunkčními T buňkami při chronické virové infekci a že blokáda PD-1 obnovila funkci T buněk a kontrolu virové replikace [36,37]. Ovšem u PD-1 deficitních myší vyvolala chronická virová infekce fatální autoimunitní reakci, což ukázalo na důležitou roli PD-1 dráhy v ochraně organismu před imunitně mediovanou destrukcí vlastních tkání při chronické antigenní stimulaci [38].

Fenotyp myší deficitních v genu pro PD-1 ukazuje, že role PD-1 je především v inhibici nadměrné aktivity T buněk v periferních tkáních. Na rozdíl od rychlého a fatálního nástupu autoimunity u zvířat deficitních v genu pro CTLA-4 zvířata bez genu pro PD-1 mají opožděný výskyt orgánově specifických autoimunit, jejichž spektrum se ještě liší podle použitého inbred-

ního kmene. U PD-1 deficitních myší kmene C57BL/6 dochází po šesti měsících k rozvoji lupus-like syndromu, zatímco u BALB/c myší dochází především k rozvoji autoimunitní kardiomyopatie [39,40]. Tyto a další důkazy ukazují, že PD-1 slouží jako inhibitor T buněčné odpovědi v periférii.

Expres PD-1 a jeho funkce

PD-1 se váže na dva různé ligandy, PD-L1 a PD-L2, jejichž exprese se výrazně liší. PD-L1 je exprimován na relativně širokém spektru buněk, od klidových i aktivovaných T buněk (včetně Tregs) přes B buňky, DC až po nehematopoietické buňky (např. endoteliální či epitelální buňky), což ukazuje na důležitou roli PD-L1 v regulaci periferní tolerance a v prevenci autoimunit. Oproti tomu PD-L2 exprese je spíše omezená na hematopoietické buňky (hlavně DC a makrofágy). Prozářlivé signály včetně INF- γ indukují expresi PD-L1 a ukazuje se, že celá řada nádorů exprimuje PD-L1 molekulu jako „ochranu“ před protinádorovou odpovědí T buněk. Po vazbě PD-1 na své ligandy tedy dochází k „vypnutí“ imunitní odpovědi, ke snížené produkci cytokinů a inhibici proliferace [41,42]. Zajímavé je však zjištění, že blokáda PD-1 monoklonálními protilátkami nejen zvrátí anergii na úrovni T buněk, ale je schopna i vyvolat zesílenou T buněčnou odpověď proti dalším „chronickým“ chorobám, jako jsou např. nádory [21,43]. Preklinická data ukázala, že protilátky blokující osu PD-1/PD-L1 zvyšují protinádorovou aktivitu na zvířecích modelech, a ukazuje se, že se možná jedná o relativně univerzální mechanismus, jak se nádory brání napadení T buňkami [21].

PD-1 a protinádorová terapie

PD-L1 ligand je exprimován poměrně širokým spektrem nádorů. Kromě toho se ukazuje, že tumor infiltrující lymfocyty (TILs) velmi často exprimují PD-1 molekulu, což nahrává domněnkám, že nádor jako „tělu vlastní“ tkáň je schopen využívat podobné mechanismy, které využívají normální tkáň v ochraně před nadměrnou imunitní reakcí. Myší modely ukazují, že zvýšená exprese PD-L1 na nádorových buňkách snižuje schopnost

T buněk zabít tyto nádorové buňky *in vitro*, a naopak *in vivo* tyto nádorové linie rostou rychleji. Blokáda PD-1 však tento fenomén inhibuje a ukazuje se, že tato protinádorová terapie funguje napříč nádorovými modely: model karcinomu prsu 4T1, myší model karcinomu pankreatu, melanom B16 či model kolorektálního karcinomu CT26 [44–47]. Podobná data se objevují i u lidských malignit. Expres PD-1 na povrchu tumor-infiltrujících lymfocytů spolu s expresí PD-L1 mnoha různými nádory ukazují, že by se mohlo jednat o univerzální mechanismus využívaný nádory k úniku pozornosti imunitního systému. Ukazuje se, že exprese PD-L1 na nádorové tkáni bývá často spojena s horší prognózou u hepatocelulárního karcinomu, melanomu, renálního karcinomu, nemalobuněčného karcinomu plic, ovariálního karcinomu, glioblastomu, Hodgkinova lymfomu a dalších [48–55].

Na základě těchto dat se v posledních pěti letech velmi intenzivně testují protilátky blokující osu PD-1/PD-L1 v klinických studiích [56–67]. V roce 2014 byly první anti-PD-1 molekuly registrovány pro léčbu metastatického melanomu a v roce 2015 pro skvamózní nemalobuněčný karcinom plic. S ohledem na počet studií, které se objevují (k 17. 6. 2015 více než 250 studií s anti-PD-1/anti-PD-L1 molekulami; www.clinicaltrials.gov), bude velmi zajímavé sledovat vývoj v této oblasti.

LAG-3

LAG-3 je další inhibiční molekula, která je ve zvýšené míře exprimována aktivovanými pomocnými (CD4⁺) nebo cytotoxickými (CD8⁺) T buňkami [68]. Ačkoliv byl LAG-3 klonován před více než 20 lety, jeho funkce „imunitního checkpointu“ byla definovaná teprve v roce 2005, kdy se ukázalo, že zesiluje funkci Tregs [69]. Kromě toho LAG-3 také přímo inhibuje funkci efektorových CD8⁺ buněk [70]. Jediným známým ligandem LAG-3 jsou MHC antigeny II. třídy, ovšem funkce této interakce a způsob ovlivnění efektorových a regulačních T buněk není zcela objasněn. Ukazuje se však, že duální blokáda LAG-3 a PD-1 synergistickým způsobem blokuje anergii u nádorové či virové specifických CD8⁺

T buněk při chronické, perzistentní infekci. Studie na dvojitém knockout myších (Pd1^{-/-}/Lag3^{-/-}) naznačily, že tato zvířata kompletně odhojovala i slabě imunogenní nádory, a naopak se u nich rychleji objevovaly autoimunitní syndromy než u myší s knockout genem buď pro PD-1, nebo pro LAG-3 [71].

TIM-3

TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin protein-3), jehož ligandem je galectin 9, inhibuje funkci pomocných TH1 buněk [72] a protilátky proti TIM-3 zesilují protinádorovou odpověď [73]. V několika studiích byla pozorována společná exprese molekul TIM-3 a PD-1 na nádorově specifických CD8⁺ T buňkách. Na zvířecích modelech se ukázalo, že simultánní blokáda PD-1 a TIM-3 zesiluje protinádorovou imunitní odpověď a vyvolává odhojení nádoru v situacích, kdy je blokáda jednotlivých receptorů TIM-3 nebo PD-1 jen slabě účinná [74]. Zajímavostí, která se ukázala u nádorů, je fakt, že dysfunkční T buňky exprimující jak Tim-3, tak PD-1 byly nalezeny pouze v nádorové tkáni, ale ne v periferní krvi. Navíc se ukázalo, že TIM-3 exprese charakterizuje regulační T buňky a byla spojena s progresí karcinomu plic [75]. Podobná data publikovala nedávno česká skupina kolem Špiška et al [76], která na úrovni mRNA u karcinomu hlavy a krku prokázala vysoké procento Tim-3⁺ PD-1⁺ buněk pouze v nádorové tkáni. Pomocí průtokové cytometrie prokázali, že cytotoxické CD8⁺ buňky s dvojité pozitivním fenotypem (Tim-3⁺/PD-1⁺) mají výrazně nižší procento buněk produkujících IFN- γ v porovnání s fenotypem Tim-3⁻/PD-1⁺ či Tim-3⁺/PD-1⁻. Právě exprese Tim-3 spolu s PD-1 může být považována u karcinomu hlavy a krku za lepší marker vyčerpanosti T buněk než jen samotný PD-1, a proto by tyto dvě molekuly mohly představovat zajímavý cíl pro budoucí imunoterapeutické přístupy v léčbě karcinomu hlavy a krku [76].

Produkty nádorů mohou imunitní reakci potlačovat

Deregulacemi získávají některé nádorové buňky schopnost produkovat imunosupresivní cytokiny a molekuly, které

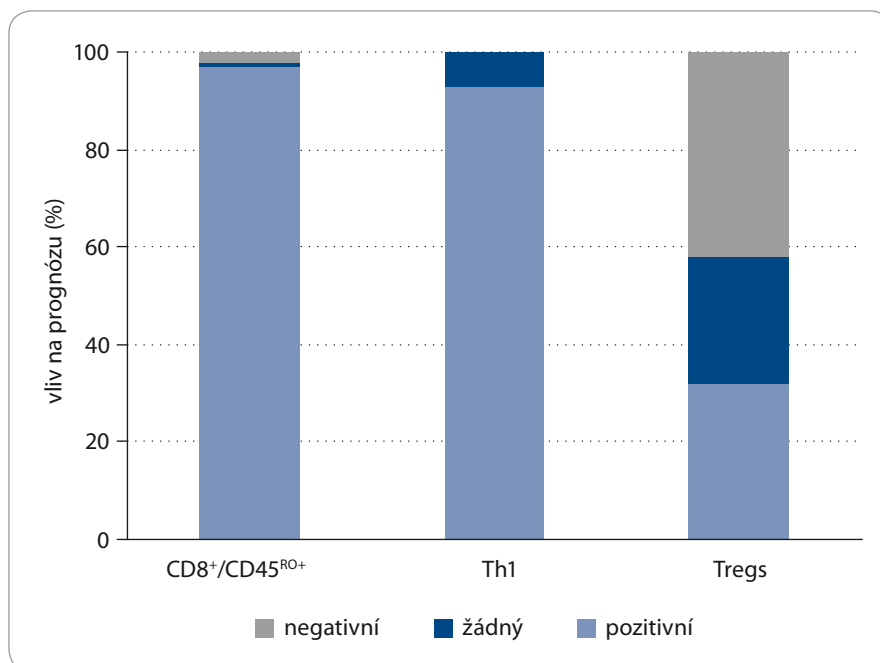
ovlivňují imunitní odpověď a utlumují či zcela inhibují funkci T buněk, případně způsobují, že jsou v nádorech přítomny takové subpopulace buněk, které nejenže nádorový růst neblokují, ale ještě mu pomáhají růst. Mezi nimi jsou nejdůležitější IDO, TGF- β a IL-10. Jsou to buněčné hormony, které výrazně inhibují proliferaci a efektorové funkce lymfocytů a makrofágů [24].

Indoleamin 2,3-dioxygenáza

Indoleamin 2,3-dioxygenáza (IDO) je enzym, který katabolizuje rozklad esenciální aminokyseliny L-tryptofanu na N-formylkynurenin [77]. Tryptofan je nezbytný pro správné fungování T buněčné odpovědi. IDO je produkován některými subpopulacemi makrofágů, regulačními T buňkami (což přispívá k vytvoření lokálního imunosupresivního prostředí), ale je to i strategie mnoha nádorů, jak se vyhnout pozornosti imunitního systému [78]. U některých nádorů se ví (ovariální karcinom), že zvýšená exprese IDO se podílí na progresi choroby a horším přežívání pacientů, pravděpodobně prostřednictvím útlumu lokální imunitní odpovědi [79]. Protože se jedná o mechanismus přispívající k imunosupresi v nádorovém mikroprostředí, objevují se první klinické studie s inhibitory IDO v monoterapii či v kombinaci s blokátory kontrolních bodů imunitní reakce [80].

Interleukin 10

Interleukin 10 (IL-10) je cytokin s protizánětlivými vlastnostmi a má centrální úlohu v tom, že inhibuje nadměrnou imunitní odpověď proti patogenům, čímž zabraňuje zánětlivé a autoimunitní patologii. IL-10 je produkován monocyty a v menší míře Th2 lymfocyty, mastocyty a regulačními T buňkami [81]. Myši deficitní v genu pro IL-10 vykazují zánětlivé procesy ve střevě po kolonizaci zažívacího traktu určitými mikroorganizmy. Původně byl IL-10 popsán jako cytokin, který inhibuje diferenciaci T buněk na Th1 fenotyp, ale podílí se i na diferenciaci tolerizujících nebo Treg, které mají obvykle imunosupresivní efekt na protinádorovou imunitu [82]. Navíc se ukazuje, že zatímco v počátcích tumorigeneze má IL-10 spíše stimulační efekt na NK buňky a cytoto-



Graf 2. Asociace mezi infiltrací nádoru různými buňkami imunitního systému a prognózou pacienta: analýza 124 publikací (upraveno dle [88]).

xické T buňky, v pokročilých fázích růstu mohou mít nádorové buňky na svém povrchu receptor pro IL-10 a IL-10 pak funguje jako silný promotor nádorového bujení [82].

Transforming growth factor β

Transforming growth factor β (TGF- β) představuje pleiotropní cytokin, který reguluje různé biologické procesy včetně vývoje orgánů a tkání, karcinogeneze a imunitní odpovědi. U normálních a premaligních buněk (časný rozvoj nádoru) hraje TGF- β důležitou roli v homeostáze a má tumor supresivní vlastnosti (blokáda růstu a vyvolání apoptózy). Ukazuje se však, že nádorové buňky mohou přestat reagovat na inhibiční působení TGF- β a naopak mohou získat schopnost využít TGF- β ke svému prospěchu, např. blokádou imunitní reakce a zvýšenou schopností tvořit metastatické kolonie [83]. TGF- β má také schopnost vyvolávat tzv. epiteliálně-mezenchymální tranzici (EMT), což je proces charakterizovaný ztrátou E-cadherinu, což vede následně k diferenciaci na invazivnější fenotyp [84]. TGF- β byl totiž původně objeven jako imunosupresivní cytokin, jehož přidání do buněčných kultur inhibovalo proliferaci T buněk [85].

Následně se ukázalo, že myši, které nemají TGF- β 1 nebo receptory pro něj, hynou velmi časně na systémové autoimunitní onemocnění vyvolané hyperaktivací a zvýšenou proliferací T buněk [86]. Při normálních fyziologických podmínkách tak TGF- β aktivně udržuje T buněčnou homeostázu a reguluje funkci T buněk. Na druhou stranu hraje TGF- β klíčovou roli při diferenciaci a expanzi Treg na periférii. To může spolu s expresí dalších imunosupresivních cytokinů a s následnou převahou Tregs v nádorovém mikroprostředí vyvolávat silnou lokální inhibici protinádorové imunity, kdy infiltrující CD8⁺ T buňky nejsou schopny se dělit a zabíjet nádorové buňky [87].

Regulační T buňky

Důležitou, i když ne zatím zcela pochoopenou funkci má podskupina T lymfocytů, tzv. Treg. Je to populace T buněk, která tvoří 5–10 % všech T buněk, inhibuje aktivaci jiných T lymfocytů a je nezbytná k udržení periferní tolerance vůči vlastním antigenům [88]. Většina regulačních buněk jsou typu CD4⁺ a exprimují α řetězec IL-2 receptoru (také označovaný jako CD25), CTLA-4 a transkripční faktor FoxP3. Deplece Treg

u myších nádorových modelů většinou vede k zlepšení protinádorové imunity a k redukci nádorového růstu. Naopak na myších modelech může přidání Treg zmírnit autoimunitní projevy [24]. Výsledky z experimentálních modelových systémů a od pacientů ukazují, že u některých typů nádorů je jejich hladina jak v periferní krvi, tak v buněčných infiltrátech významně zvýšena [88]. Není ale absolutním pravidlem, že jejich vyšší počet by byl vždy korelován s horší prognózou (graf 2). Oproti tomu přítomnost paměťových (CD45^{RO+}), cytotoxických buněk (CD8⁺) či Th1 buněk (produkují IFN- γ a IL-2) v nádoru je téměř vždy spojena s příznivým vlivem na prognózu pacientů [89].

Tumor-asociované makrofágy, M1 a M2

Další z buněčných populací, které zřejmě přímo podporují růst nádoru tím, že mění nádorové mikroprostředí a potlačují T buněčnou odpověď, jsou nádorově asociované makrofágy typu M2 [24]. Ty jsou, na rozdíl od klasických makrofágů označovaných jako M1, aktivovány cytokiny IL-4 a IL-13. Mají nejenom tkáňově-reparační, ale hlavně protizánětlivý charakter. Sekretují mediátory, jako je IL-10 a prostaglandin E2. Ty potlačují T buněčnou aktivaci a efektorové funkce [90]. M2 kromě toho produkují i velká množství TFG- β a VEGF, které podporují neoangiogenezi a tím urychlují růst nádoru [91].

MDSC

MDSC populace (myeloid-derived suppressor cells) představuje nezralé myeloidní prekurzory, které vznikají v kostní dřeni a akumulují se v lymfoidních tkáních, krvi a v nádorech jak experimentálních zvířat, tak nádorových pacientů, kde potlačují protinádorovou reakci jak vrozeného, tak získaného (specifického) charakteru [92]. Je to heterogenní populace několika buněčných typů, mezi které se počítají i prekurzory DC, monocytů a neutrofilů. Vyznačují se některými společnými povrchovými znaky včetně Ly6C a Ly6G a CD11b u myši a CD33, CD11b a CD15 u lidí. Vyplavování z kostní dřeni do lymfatických uzlin a dalších tkání vyvolává řada prozánětlivých mediátorů, z nichž některé jsou také produkovány nádory. Patří mezi ně prostaglandin E2, IL-6, VEGF a komplementový fragment C5a. Nejsou pro ně ale unikátní. MDSC se akumulují v místech chronického zánětu, který primárně není nádorem, i když se může během doby na vzniku nádoru rozhodujícím způsobem podílet. MDSC potlačují vrozenou imunitu tím, že syntetizují a uvolňují IL-10, který inhibuje různé zánětlivé procesy, na kterých se podílejí aktivované makrofágy M1 typu a DC. MDSC potlačují také T buněčnou odpověď, a to různými mechanismy. Mezi nimi je třeba poukázat na produkci volných radikálů, jako je peroxynitrid a IDO, která katabolizuje tryptofan nezbytný pro T buněčnou proliferaci. MDSC kromě toho poškozují protinádorovou T buněčnou odpověď tím, že podporují vývoj T regulačních lymfocytů a ovlivňují T buněčnou diferenciaci směrem k Th2 populaci, která, na rozdíl od Th1, má jen omezenou protinádorovou aktivitu [26].

Exprese FasL, aktivní protiútok

Probíhající imunitní reakce bývá po několika týdnech zastavena fyziologickou likvidací až 90 % specifických aktivovaných buněk. Je k tomu využívána řada mechanismů. Patří k nim aktivací indukovaná buněčná smrt (activation-induced cell death – AICD), což je apoptóza aktivovaných T buněk využívající inhibiční mechanismy, jako je vazba Fas ligandy (FasL) s membránovým Fas receptorem. Fas (CD95) je povrchový protein, který po vazbě na svůj ligand FasL (CD95L) indukuje apoptózu. Fas je relativně hojně exprimován napříč tkáněmi, nicméně silná exprese je v thymu, játrech, srdci či ledvinách. CD95L je exprimován hlavně aktivovanými T buňkami a NK buňkami a vyskytuje se též konstitutivně v tzv. imunoprivilegovaných tkáních, jako jsou varlata nebo oči. Genové experimenty se zvířaty, která nemají CD95, ukázala na důležitost této molekuly v udržení buněčné homeostázy a v ochraně organismu před autoreaktivními T buňkami [26]. Myši kmene gld (generalized lymphoproliferative disease) či lpr (lymphoproliferation) trpí autoimunitními projevy z důvodu ne-

dostatečné eliminace potenciálně autoreaktivních lymfocytů [93].

Zastavení nepotřebné antiinfekční imunity je po vyřešení akutní infekční hrozby nutné z hlediska homeostázy. Interakce Fas (CD95) a Fas ligandu sice byla původně popsána jako součást regulačních mechanismů přispívajících k regulaci periferní tolerance, nicméně čím dál více důkazů ukazuje na důležitou roli v karcinogenezi, nádorovém růstu a metastazování [94]. Ukazuje se, že nádory jsou relativně často rezistentní k apoptóze indukované vazbou CD95L na povrchu T lymfocytů na CD95 na povrchu nádorových buněk. Naopak nádory nebo endotelie nádorové tkáně mohou exprimovat CD95L, který přispívá k lokální supresi imunitní reakce tím, že indukuje apoptózu v infiltrujících T buňkách exprimujících CD95 tzv. nádorovým protiútokem [95,96]. Charakter, stejně tak jako dynamika protinádorové reakce se od reakce protiinfekční významně liší a v tomto ohledu je předčasné ukončení imunitní odpovědi možné považovat za jednu ze strategií, které nádory využívají k úniku [26].

Závěr

Posledních několik let se ukazuje, že imuno-onkologické přístupy v léčbě nádorů představují novou, nadějnou modalitu v léčbě pacientů s nádorovým onemocněním. Přestože byl protinádorový výzkum v oblasti imunoterapie a vakcín spojen velmi často se zklamáním, poslední roky ukazují, že koncept imunoterapie a imuno-onkologických přístupů se velmi intenzivně rozvíjí. Spolu se zvyšujícími se znalostmi o tom, jak je imunitní systém regulován, se objevují další a další naděje molekuly a přístupy využívající sílu imunitního systému. Kromě toho se zdá, že imuno-onkologické přístupy představují modalitu s potenciálem dostat se do možných kombinací nejen s chemoterapií, ale i s radioterapií, cílenou terapií, vakcínami, DC či tumor infiltrujícími lymfocyty. Imunitní systém je dynamický a má schopnost reagovat na měnící se nádor, který je schopen potlačovat imunitní systém a blokovat aktivitu T buněk. Navíc je imunitní systém vybaven něčím, co se může ukázat jako zásadní – tedy imunologickou pamětí.

Možná i to je jeden z důvodů, proč je délka trvání odpovědi po imunoterapii v porovnání s chemoterapií výrazně delší. Ne bezdůvodně nazval časopis Science protinádorovou imunoterapii průlomem roku 2013 [97].

Literatura

- Monge J, Kricun M, Radovčić J et al. Fibrous dysplasia in a 120,000+ year old Neandertal from Krapina, Croatia. *PLoS One* 2013; 8(6): e64539. doi:10.1371/journal.pone.0064539.
- Casanova JL, Abel L. The genetic theory of infectious diseases: a brief history and selected illustrations. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2013; 14: 215–243. doi: 10.1146/annurev-genom-091212-153448.
- Stutman O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* 1974; 183(4124): 534–536.
- Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS et al. Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(13): 7556–7561.
- Shankaran VH, Ikeda A, Bruce T et al. IFN γ , and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001; 410(6832): 1107–1111.
- Dunn GP, Bruce AT, Sheehan KC et al. A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat Immunol* 2005; 6(7): 722–729.
- Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Suppression and promotion cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer. *Science* 2011; 331(6024): 1565–1570. doi: 10.1126/science.1203486.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Koebel CM, Vermi W, Swann JB et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 2007; 450(7171): 903–907.
- Kasike BL, Snyder JJ, Gilbertson DT et al. Cancer after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant* 2004; 4(6): 905–913.
- Robbins HA, Pfeiffer RM, Shiels MS et al. Excess cancers among HIV-infected people in the United States. *J Natl Cancer Inst* 2015; 107(4): pii: dju503. doi: 10.1093/jnci/dju503.
- MacKie RM, Reid R, Junor B. Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. *N Engl J Med* 2003; 348(6): 567–568.
- Cozar JM, Aptsiauri N, Tallada M et al. Late pulmonary metastases of renal cell carcinoma immediately after post-transplantation immunosuppressive treatment: a case report. *J Med Case Rep* 2008; 2: 111. doi: 10.1186/1752-1947-2-111.
- Meng S, Tripathy D, Frenkel EP et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* 2004; 10(24): 8152–8162.
- Melichar B, Vanecková J, Morávek P et al. Spontaneous regression of renal cell carcinoma lung metastases in a patient with psoriasis. *Acta Oncol* 2009; 48(6): 925–927. doi: 10.1080/02841860902882451.
- Jäger E, Ringhoffer M, Altmannsberger M et al. Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 1997; 71(2): 142–147.
- Driessens G, Kline J, Gajewski TF. Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. *Immunol Rev* 2009; 229(1): 126–144. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00771.x.
- Peggs KS, Quezada SA, Korman AJ et al. Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer. *Curr Opin Immunol* 2006; 18(2): 206–213.
- Nurieva RI, Liu X, Dong C. Yin-Yang of costimulation: crucial controls of immune tolerance and function. *Immunol Rev* 2009; 229(1): 88–100. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00769.x.
- Peggs KS, Quezada SA, Allison JP. Cancer immunotherapy: co-stimulatory agonists and co-inhibitory antagonists. *Clin Exp Immunol* 2009; 157(1): 9–19. doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.03912.x.
- Pardoll DM. Immunology beats cancer: a blueprint for successful translation. *Nat Immunol* 2012; 13(12): 1129–1132. doi: 10.1038/ni.2392.
- Linsley PS, Ledbetter JA. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 191–212.
- Jenkins MK, Johnson JG. Molecules involved in T-cell costimulation. *Curr Opin Immunol* 1993; 5(3): 361–367.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (eds). Cellular and molecular immunology. 6th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders 2010.
- Moran AE, Kovacsics-Bankowski M, Weinberg AD. The TNFRs OX40, 4-1BB, and CD40 as targets for cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2013; 25(2): 230–237. doi: 10.1016/j.coi.2013.01.004.
- Perez-Gracia JL, Labiano S, Rodriguez-Ruiz ME et al. Orchestrating immune check-point blockade for cancer immunotherapy in combinations. *Curr Opin Immunol* 2014; 27: 89–97. doi: 10.1016/j.coi.2014.01.002.
- Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 1995; 182(2): 459–465.
- Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science* 2015; 348 (6230): 56–61. doi: 10.1126/science.aaa8172.
- Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN et al. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995; 3(5): 541–547.
- Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* 2001; 1(3): 220–228.
- Greenfield EA, Nguyen KA, Kuchroo VK. CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev Immunol* 1998; 18(5): 389–418.
- Pettrausch U, Poehlein CH, Jensen SM et al. Cancer immunotherapy: the role regulatory T cells play and what can be done to overcome their inhibitory effects. *Curr Mol Med* 2009; 9(6): 673–682.
- Liu VC, Wong LY, Jang T et al. Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25– T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF- β . *J Immunol* 2007; 178(5): 2883–2892.
- Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 2008; 322(5899): 271–275. doi: 10.1126/science.1160062.
- Ishida Y, Agata Y, Shibahara K et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 1992; 11(11): 3887–3895.
- Barber DL, Wherry EJ, Masopust D et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 2006; 439(7077): 682–687.
- Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 2006; 443(7109): 350–354.
- Intlekofer AM, Thompson CB. At the bench: preclinical rationale for CTLA-4 and PD-1 blockade as cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol* 2013; 94(1): 25–39. doi: 10.1189/jlb.1212621.
- Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 2001; 291(5502): 319–322.
- Okazaki T, Tanaka Y, Nishio R et al. Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice. *Nat Med* 2003; 9(12): 1477–1483.
- Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 677–704. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.
- Blank C, Mackensen A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56(5): 739–745.
- Weber J. Immune checkpoint proteins: a new therapeutic paradigm for cancer – preclinical background: CTLA-4 and PD-1 blockade. *Semin Oncol* 2010; 37(5): 430–439. doi: 10.1053/j.seminoncol.2010.09.005.
- Hirano F, Kaneko K, Tamura H et al. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res* 2005; 65(3): 1089–1096.
- Nomi T, Sho M, Akahori T et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13(7): 2151–2157.
- Peng W, Liu C, Xu C et al. PD-1 blockade enhances T-cell migration to tumors by elevating IFN- γ -inducible chemokines. *Cancer Res* 2012; 72(20): 5209–5218. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1187.
- Iwai Y, Terawaki S, Honjo T. PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *Int Immunol* 2005; 17(2): 133–144.
- Shi F, Shi M, Zeng Z et al. PD-1 and PD-L1 upregulation promotes CD8(+) T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients. *Int J Cancer* 2011; 128(4): 887–896. doi: 10.1002/ijc.25397.
- Hino R, Kabashima K, Kato Y et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer* 2010; 116(7): 1757–1766. doi: 10.1002/cncr.24899.
- Richendollar BG, Pohlman B, Elson P et al. Follicular programmed death 1-positive lymphocytes in the tumor microenvironment are an independent prognostic factor in follicular lymphoma. *Human Pathol* 2011; 42(4): 552–527. doi: 10.1016/j.humpath.2010.08.015.
- Dorfman DM, Brown JA, Shahsafaei A et al. Programmed death-1 (PD-1) is a marker of germinal center-associated T-cells and angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2006; 30(7): 802–810.
- Liu J, Hamrouni A, Wolowicz D et al. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- γ and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood* 2007; 110(1): 296–304.
- Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y et al. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(19): 12293–12297.
- Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(9): 3360–3365.
- Ishikawa T, Fujita T, Suzuki Y et al. Tumor-specific immunological recognition of frameshift-mutated peptides in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 2003; 63(7): 5564–5572.
- Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2013; 369(2): 122–133. doi: 10.1056/NEJMoa1302369.
- Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014; 515(7528): 563–567. doi: 10.1038/nature14011.
- Robert C, Ribas A, Wolchok JD et al. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab

- in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomized dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet* 2014; 384(9948): 1109–1117. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60958-2.
59. Weber JS, D'Angelo SP, Minor D et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomized, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16(4): 375–384. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70076-8.
60. Robert C, Long GV, Brady B et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med* 2015; 372(4): 320–330. doi: 10.1056/NEJMoa1412082.
61. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R et al. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med* 2015; 373(1): 23–34. doi: 10.1056/NEJMoa1504030.
62. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med* 2015; 372(21): 2006–2017. doi: 10.1056/NEJMoa1414428.
63. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 2015; 348(6230): 124–128. doi: 10.1126/science.aaa1348.
64. Rizvi NA, Mazières J, Planchard D et al. Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063): a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol* 2015; 16(3): 257–265. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70054-9.
65. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 373(2): 123–135. doi: 10.1056/NEJMoa1504627.
66. Gettinger SN, Horn L, Gandhi L et al. Overall survival and long-term safety of nivolumab (anti-programmed death 1 antibody, BMS-936558, ONO-4538) in patients with previously treated advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2015; 33(18): 2004–2012. doi: 10.1200/JCO.2014.58.3708.
67. Garon EB, Rizvi NA, Hui R et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 372(21): 2018–2028. doi: 10.1056/NEJMoa1501824.
68. Sierro S, Romero P, Speiser DE. The CD4-like molecule LAG-3, biology and therapeutic applications. *Expert Opin Ther Targets* 2011; 15(1): 91–101. doi: 10.1517/14712598.2011.540563.
69. Goldberg MV, Drake CG. LAG-3 in cancer immunotherapy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2011; 344: 269–278. doi: 10.1007/82_2010_114.
70. Grosso JF, Kelleher CC, Harris TJ et al. LAG-3 regulates CD8+ T cell accumulation and effector function in murine self- and tumor-tolerance systems. *J Clin Invest* 2007; 117(11): 3383–3392.
71. Woo SR, Turnis ME, Goldberg MV et al. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res* 2012; 72(4): 917–927. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1620.
72. Zhu C, Anderson AC, Schubart A et al. The Tim 3 ligand galectin 9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nature Immunol* 2005; 6(12): 1245–1252.
73. Ngiew SF, von Scheidt B, Akiba H et al. Anti TIM3 antibody promotes T cell IFN γ -mediated antitumor immunity and suppresses established tumors. *Cancer Res* 2011; 71(10): 3540–3551. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0096.
74. Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM et al. Targeting Tim 3 and PD 1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med* 2010; 207(10): 2187–2194. doi: 10.1084/jem.20100643.
75. Gao X, Zhu Y, Li G et al. TIM-3 expression characterizes regulatory T cells in tumor tissues and is associated with lung cancer progression. *PLoS One* 2012; 7(2): e30676. doi: 10.1371/journal.pone.0030676.
76. Partlová S, Bouček J, Kloudová K et al. Distinct patterns of intratumoral immune cell infiltrates in patients with HPV-associated compared to non-virally induced head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology* 2015; 4(1): e965570.
77. Uyttenhove L, Pilotte I, Théate I et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 2003; 9(10): 1269–1274.
78. Pilotte L, Larrieu P, Stroobant V et al. Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(7): 2497–2502. doi: 10.1073/pnas.1113873109.
79. Tanizaki Y, Kobayashi A, Toujima S et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase promotes peritoneal metastasis of ovarian cancer by inducing an immunosuppressive environment. *Cancer Sci* 2014; 105(8): 966–973. doi: 10.1111/cas.12445.
80. Jiang T, Sun Y, Yin Z et al. Research progress of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors. *Future Med Chem* 2015; 7(2): 185–201. doi: 10.4155/fmc.14.151.
81. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(3): 170–181. doi: 10.1038/nri2711.
82. Mannino MH, Zhu Z, Xiao H et al. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Lett* 2015; 367(2): 103–107. doi: 10.1016/j.canlet.2015.07.009.
83. Massague J. TGF β in Cancer. *Cell* 2008; 134(2): 215–230. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.001.
84. Elliott RL, Blobe GC. Role of transforming growth factor beta in human cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(9): 2078–2093.
85. Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB et al. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med* 1986; 163(5): 1037–1050.
86. Shull MM, Ormsby I, Kier AB et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992; 359(6397): 693–699.
87. Tu E, Chia PZ, Chen W. TGF β in T cell biology and tumor immunity: angel or devil? *Cytokine Growth Factor Rev* 2014; 25(4): 423–435. doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.07.014.
88. Kretschmer K, Apostolou I, Jaecel E et al. Making regulatory T cells with defined antigen specificity: role in autoimmunity and cancer. *Immunol Rev* 2006; 212: 163–169.
89. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(4): 298–306. doi: 10.1038/nrc3245.
90. Italiani P, Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Front Immunol* 2014; 5: 514. doi: 10.3389/fimmu.2014.00514.
91. Galdiero MR, Garlanda C, Jaillon S et al. Tumor associated macrophages and neutrophils in tumor progression. *J Cell Physiol* 2013; 228(7): 1404–1412. doi: 10.1002/jcp.24260.
92. Parker KH, Beury DW, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells: critical cells driving immune suppression in the tumor microenvironment. *Adv Cancer Res* 2015; 128: 95–139. doi: 10.1016/bs.acr.2015.04.002.
93. Cohen PL, Eisenberg RA. The *lpr* and *gld* genes in systemic autoimmunity: life and death in the Fas lane. *Immunol Today* 1992; 13(11): 427–428.
94. Owen-Schaub L, Chan H, Cusack JC et al. Fas and Fas ligand interactions in malignant disease. *Int J Oncol* 2000; 17(1): 5–12.
95. Igney FH, Behrens CK, Krammer PH. Tumor counter-attack-concept and reality. *Eur J Immunol* 2000; 30(3): 725–731.
96. Motz GT, Santoro SP, Wang LP et al. Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors. *Nat Med* 2014; 20(6): 607–615. doi: 10.1038/nm.3541.
97. Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science* 2013; 342(6165): 1432–1433. doi: 10.1126/science.342.6165.1432.

Role imunoterapie v dětské onkologii

Role of Immunotherapy in Pediatric Oncology

Bajčiová V.

Klinika dětské onkologie LF MU a FN Brno

Souhrn

Východiska: V současnosti lze standardní léčbou (operací, chemoterapií a radioterapií) vyléčit většinu onkologicky nemocných dětí. Limitujícím faktorem zůstává její těžká akutní toxicita a pozdní následky. V dětské onkologii má imunoterapie jisté zpoždění, ale iniciální klinické studie s imunoterapií prokazují její dobrou toleranci a slibné výsledky, především u refrakterních a rekurentních nádorů vysokého rizika. V článku předkládáme současnou situaci v dětské onkologii, které způsoby imunoterapie jsou testovány v klinické praxi, od monoklonálních protilátek a inhibitorů kontrolních bodů až po nádorové vakcíny, T lymfocyty exprimující chimerické antigenní receptory, cytokiny a vrozenou imunitu. **Závěr:** Imunoterapie je slibnou léčebnou modalitou pro děti a dospívající s rekurentními nádory vysokého rizika s potenciálem zlepšit nejen celkové přežívání, ale i kvalitu života. Problémem rozvoje imunoterapie v dětské onkologii zůstává věková bariéra při zavádění nových léků a limitovaný počet dětských klinických studií.

Klíčová slova

dětské nádory – imunoterapie – monoklonální protilátky – vakcíny – buněčná terapie – cytokiny

Summary

Background: Currently, most children with cancer can be cured with standard therapy (surgery, chemotherapy, radiotherapy). The only limiting factor is its severe acute toxicity and late adverse events. In pediatric oncology, immunotherapy has been delayed but the initial clinical trials of immunotherapy show a good tolerance and promising results, especially in the setting of refractory or recurrent high-risk tumors. In this article, we will discuss a current situation in pediatric oncology, what immunotherapies are being tested in the clinical practice, from monoclonal antibodies, checkpoint inhibitors to tumor vaccines, T-lymphocytes with chimeric antigen receptors, cytokines and innate immunity. **Conclusion:** Immunotherapy is a promising treatment modality for children and adolescents with recurrent high-risk cancer with potential to improve both survival and quality of life. The challenge of developing immunotherapies in pediatric oncology remains – age barriers for using new drugs and a limited number of pediatric clinical studies.

Key words

pediatric cancer – immunotherapy – monoclonal antibodies – vaccines – cell therapy – cytokines

Autorka deklaruje, že v souvislosti s předmětem studie nemá žádné komerční zájmy.

The author declares she has no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



MUDr. Viera Bajčiová, CSc.

Klinika dětské onkologie

LF MU a FN Brno

Černopolská 9

625 00 Brno

e-mail: vbajciova@fnbrno.cz

Obdrženo/Submitted: 24. 8. 2015

Přijato/Accepted: 16. 9. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20154538>

Úvod

Léčebné úspěchy dosažené v dětské onkologii v posledních 20 letech patří mezi jedny z největších v éře moderní medicíny, pět let přežívá více než 85 % pacientů. Tento úspěch byl dosažen nejen zavedením systémové chemoterapie a multimodální léčby, ale i zlepšením podpůrné péče a organizací péče s centralizací do dětských onkologických center [1].

Nicméně u 15–20 % dětí stále nedokážeme zvrátit nepříznivý průběh nemoci (neuroblastomy vysokého rizika, metastatické sarkomy měkkých tkání a kostí, vysoce rizikové nádory CNS) [2–4]. Pro tyto nádory je nutné hledat nové možnosti a strategie léčby.

Limitujícím faktorem standardní léčby zůstává toxicita chemo- a radioterapie a její pozdní následky, které mohou vést nejen ke snížení kvality života, ale i předčasným úmrtím u „vyléčeného“ dětského onkologického pacienta.

Zavedení imunoterapie do léčby zhoubných onemocnění v dětském věku má ve srovnání s onkologií dospělého věku zpoždění několik let, s výjimkou

transplantace kmenových buněk hematopoézy. Tento časový skluz je způsoben odlišnými, tzv. dětskými typy nádorů, jejich nízkou incidencí a vysokou efektivitou standardní onkologické léčby.

Specifika nádorů dětského věku

Dětské typy nádorů mají ve srovnání s onkologií dospělého věku několik specifických odlišností. Kromě incidence a etiologie jsou rozdílné i nejčastější histologické typy nádorů (převažují embryonální typy nádorů a nádory z pojivových tkání, karcinomy jsou raritní), výrazně agresivnější je jejich biologické chování s rychlým růstem a metastatickým šířením.

Z pohledu imunologie se dětské typy nádorů liší od nádorů dospělého věku ve třech oblastech:

a) Exprese glykoproteinů MHC třídy I u dětských nádorů

Ve srovnání s nádory dospělého věku jsou informace stran exprese molekul MHC třídy I (major histocompatibility complex) u nádorů dětského typu limitovány [5,6]. U neuroblastomu vysokého

rizika je exprese MHC třídy I nízká [6]. U Ewingova sarkomu je přítomna pouze částečná exprese MHC třídy I, u metastatických forem nádoru exprese chybí úplně [6]. U meduloblastomu je vyšší exprese MHC třídy I spojena s horší prognózou, což je v rozporu s ostatními typy nádorů [6]. Rozporné informace jsou i u špatně diferencovaného rhabdomyosarkomu, kde je exprese MHC třídy I negativní [6].

b) Mutační analýza dětských typů nádorů

Pediatrické typy nádorů mají ve srovnání s nádory dospělého věku nižší mutační nálož, nízkou frekvenci bodových somatických mutací a variabilní počet genových/chromozomálních alterací. Antigenní heterogenita dětských nádorů je při nízké genetické nestabilitě ve srovnání s nádory dospělého věku nižší [7].

c) Nádorové mikroprostředí dětských nádorů

Jedním z hlavních rozdílů mezi dospělými a pediatrickými typy nádorů je typ nádorového mikroprostředí a typ imunitních nádor infiltrujících buněk. U dospělých převažují dendritické buňky a T lymfocyty. Jejich typ, počet, lokalizace (centrální nebo marginální) je součástí imunitního prognostického skóre u mnoha nádorů [5]. U pediatrických nádorů převažuje infiltrace tumor asociovanými makrofágy (TAM) a myeloidními buňkami (myeloid derived suppressor cells – MDSC).

- **M2 makrofágy** jsou lokalizovány v hypoxických částech nádorové tkáně. Vysoká infiltrace TAM má prognostický význam u Ewingova sarkomu, neuroblastomu a osteosarkomu [3,8].
- **MDSC** v dětských solidních nádorech inhibují aktivitu T lymfocytů. MDSC lze ovlivnit dvojím způsobem – buď umožnit jejich diferenciaci podáním all-trans cis retinové kyseliny, nebo způsobit jejich inhibici podáním COX-2 inhibitorů [4].
- **Expres PD-L1** (programmed death ligand) je asociovaná s horší prognózou. U nádorů dětského věku nebyly dosud provedeny systematické studie exprese PD-L1. U neuroblastomu byla nalezena PD-L1 exprese u nádorových

Tab. 1. Expres PD-L1 u pediatrických typů nádorů [10].

Typ nádoru	PD-L1 exprese	Klinická poznámka
leukemie	+ AML/ALL (42–100 %)	vyšší exprese u relapsů, spojena s horším přežíváním
CNS nádory	+ gliomy (75–100 %)	koreluje se stupněm malignity
neuroblastom	+ pouze buněčné linie (14 %)	ND
Wilmsův nádor	+ (14 %)	expres koreluje se zvýšeným rizikem relapsu
B-NHL	ne	ND
ALCL	+ (80 %)	ND
DLBCL	+ (27 %)	ND
T-NHL	+	ND
Hodgkinův lymfom	+ (65–87 %)	koreluje s kratším přežitím
sarkomy měkkých tkání	+ (58 %)	výrazně nižší přežití
osteosarkom	+	ND
retinoblastom	+ pouze buněčné linie	ND

AML – akutní myeloidní leukemie, ALL – akutní lymfoblastová leukemie, B-NHL – non-Hodgkinův B lymfom, ALCL – anaplastický velkobuněčný lymfom, DLBCL – difuzní velkobuněčný B lymfom, T-NHL – non-Hodgkinův T lymfom, ND – žádná data

linií, ale ne ve vzorku nádoru. U Wilmsova nádoru byla exprese PD-L1 v korelaci s agresivním průběhem a rekurencí nádoru u příznivého histologického podtypu. Žádná exprese PD-L1 nebyla prokázána u pediatrického B-non Hodgkinova lymfomu (B-NHL), ale naopak až 80 % anaplastického velkobuněčného lymfomu mělo expresi PD-L1 pozitivní [8,9]. Přítomná pozitivní exprese PD-L1 byla až v 70 % nádorových buněk u dětských sarkomů měkkých tkání, kde byla asociovaná s vyšším klinickým stadiem, vyšším stupněm malignity a horší prognózou (tab. 1) [9].

Imunoterapie v dětské onkologii

Významné objevy v biologii nádorů a pokroky v technologiích vedly v posledních letech k dramatickému rozvoji protinádorové imunoterapie jako specifické léčebné modalit [10,11]. Imunologické metody v boji proti nádoru se zaměřují na:

- zvýšení imunogenicity nádorových buněk, čímž je dělají rozpoznatelné pro efektorové buňky imunitního systému;
- aktivaci imunitního systému nositele nádor-asociovanými cílovými antigeny;
- potlačení nádor-asociovaných supresorických buněk [10].

Mezi faktory limitující efekt imunoterapie patří heterogenita cílových antigenů a nepoměr mezi objemem nádoru a relativním nedostatkem efektorových buněk v nádoru. V dětské onkologii imunoterapie zatím nepatří mezi základní léčebné modalit [12].

Monoklonální protilátky

Mechanismus účinku monoklonálních protilátek (monoclonal antibody – mAb) je založen na blokování povrchových signálních receptorů, a tím jejich funkční neutralizaci. Pro efektivní cílenou léčbu mAb musí být splněny dvě podmínky – povrchový antigen musí být nádor specifický a jeho exprese na povrchu nádorové buňky musí být dostatečně vysoká [10]. Mezi další mechanismy účinku mAb s protinádorovým účinkem patří cytolyza cestou aktivace komple-

mentu, aktivace na protilátkách závislé buněčné cytotoxicity, zmírnění nádorem indukované imunosuprese (aktivace vlastních imunitních buněk nositele zablokováním CTLA-4 molekuly či PD-1) a „non-tumor“ cíle v heterogenní tkáni nádoru (stromální fibroblasty, VEGF či již dříve zmiňované TAM) [3,10,13].

Ve snaze o zvýšení protinádorového účinku mAb při současném pokroku v technologiích je možné navázání prakticky jakékoliv látky na mAb. Vznikají tak tzv. **konjugované mAb**, které fungují jako nosiče pro aktivní látku, která je na ně navázána. Jde např. o cytotoxické látky (gemtuzumab ozogamicin u refrakterní akutní myeloidní leukemie – AML), toxiny (pseudomonádový exotoxin u akutní lymfoblastická leukemie – ALL, ricin u Hodgkinova lymfomu), cytokiny (anti-disialogangliosid GD2/IL-2) nebo radioizotopy (EF8-131J konjugát s GD2) [2,4,10,13].

Bispecifické mAb jsou protilátky s duální specificitou (rozeznávají dva rozdílné antigeny). Navazují doménu na povrchu nádorových buněk na doménu, která aktivuje receptor na efektorové imunitní buňce. Anti-CD19/anti-CD3 bispecifická mAb (**blinatumomab**) zprostředkuje interakci mezi CD19⁺ na leukemických blastech a CD3⁺ na T lymfocytech. V souboru devíti dětských pacientů s relapsem B buněčné ALL (B-ALL) po alogenní transplantaci až 67 % z nich dosáhlo klinické remise po blinatumomabu. V současnosti je plánována klinická studie fáze III u dětských pacientů s relabovanou B-ALL [2,4,14].

Rituximab je chimerická mAb (anti-CD20) na povrchu B lymfocytů. V dětské onkologii je součástí kombinované imunochemoterapie. Rituximab je součástí klinických studií indukční fáze léčby 1. linie u B-NHL, zralé B-ALL. Rituximab je součástí léčby 1. linie u dětí i dospělých u posttransplantační lymfoproliferace. Stejná je jeho role v 1. linii léčby opsonklonus-myoklonus syndromu (OMA) u neuroblastomu [2–4,10,13].

Bevacizumab (anti-VEGF mAb) je součástí léčby metastatických sarkomů měkkých tkání, metastatického Ewingova sarkomu, studie fáze III léčby nádorů CNS vysokého rizika (embryonální supratentoriální nádory, high-grade gliomy). Rov-

něž je efektivní u low-grade gliomů u dětí s neurofibromatózou typ I [13]. Bevacizumab v kombinaci s metronomickou léčbou dosáhl významné terapeutické odpovědi u refrakterních a rekurentních solidních nádorů dětského věku a u nádorů s vysokým rizikem časného relapsu.

Denosumab (anti-RANKL mAb) je indikován u refrakterních, progredujících a metastatických obrovskobuněčných nádorů kostí, ve studii fáze II byla dosažena terapeutická odpověď až v 86 % [15].

Nimotuzumab (humanizovaná mAb anti-EGFR) je testován u difúzních gliomů mozkového kmene a gliomů mozku velmi vysokého rizika.

Figitumumab (plně humanizovaná IgG2 mAb proti IGF-1R) prokázala v klinické studii fáze I objektivní odpověď u Ewingova sarkomu [4]. Specifickým problémem v dětské onkologii může být fakt, že i normální zdravý dětský organizmus potřebuje pro svůj růst IGF růstovou dráhu.

Monoklonální protilátka proti gangliosidu G2 je indikována u neuroblastomu vysokého rizika po autologní transplantaci hematopoetických kmenových buněk (auto HSCT; 1. generace anti-GD2) nebo spolu s navázanými růstovými faktory či interleukinem-2 (IL-2; 2. generace anti-GD2, chimerická mAb **dinutuximab**) ve stadiu minimální reziduální nemoci (minimal residual disease – MRD). Randomizovaná klinická studie fáze III u pacientů s neuroblastomem vysokého rizika po autologní HSCT s následným použitím isotretinoidu a dinutuximabu prokázala signifikantní prodloužení přežití bez příhody (event-free survival – EFS: 66 vs. 46 %) a celkového přežití (overall survival – OS: 86 vs. 75 %) ve srovnání s pacienty bez použití dinutuximabu. V současnosti je k dispozici již 3. generace anti-GD2 terapeutik ve formě CARs (chimeric antigene receptors). National Cancer Institut (NCI) aktuálně registruje 18 otevřených klinických studií s anti-GD2 mAb [2–4,10].

Přehled mAb používaných v dětské onkologii je uveden v tab. 2.

V ČR jsou pro děti a dospívající kromě IgG2 a anti-GD2 všechny ostatní mAb dostupné dle paragrafu 16 zákona č. 48/1997 Sbírky.

Tab. 2. Monoklonální protilátky v dětské onkologii.

Monoklonální protilátka	Cílová struktura	Indikace	Klinická studie
rituximab	CD20	B-NHL, B-ALL, OMA syndrom	fáze III
denosumab	RANKL	obrovskobuněčný kostní nádor	fáze II
nimotuzumab	EGFR	difúzní gliom mozkového kmene	fáze II
dinutuximab	GD2	neuroblastom	fáze III
ipilimumab	CTLA-4	maligní melanom, rezistentní nádory	fáze I–II
vemurafenib	BRAF-V600E	BRAF + maligní melanom	fáze I
bevacizumab	VEGF	nádory CNS rekurentní dětské typy nádorů	fáze III fáze III
trastuzumab	HER-2	HER-2 + osteosarkom, synoviální sarkom	fáze II
cetuximab	EGFR	ORL nádory, CRC	–
alemtuzumab	CD52	T-ALL	fáze III
epratuzumab	CD22	B-NHL, relaps B-ALL	fáze II
brentuximab vedotin	CD30	3. linie Hodgkinova lymfomu	fáze I–II
blinatumomab	CD19/CD3	B-NHL, relaps B-ALL	fáze I–II
lexatumumab	TRAIL	refrakterní solidní dětské nádory	fáze I
figitumumab	IGF-1R	refrakterní solidní dětské nádory	fáze I
nivolumab	PD-L1	refrakterní maligní melanom	fáze I–II
brentuximab ozogamicin	CD33	refrakterní AML	fáze I–II
panitumumab	EGFR	rekurentní solidní dětské nádory	fáze I

B-NHL – non-Hodgkinův B lymfom, B-ALL – B buněčná akutní lymfoblastová leukemie, OMA – syndrom opsoklonus-myoklonus, ORL – nádory hlavy a krku, CRC – kolorektální karcinom, T-ALL – T buněčná akutní lymfoblastová leukemie, AML – akutní myeloidní leukemie

Inhibitory imunologických kontrolních bodů (checkpointů)

Checkpoints inhibitory jsou imunoterapeutika blokující povrchové molekuly exprimované na T lymfocytech, které přenášejí inhibující signály a umožňují tak únik nádoru z imunologického dohledu. Rozdíly v nádorovém mikroprostředí u dětských nádorů by mohly vést k domněnce, že blokáda imunologických checkpointů v dětské onkologii nemá terapeutický význam.

Ipilimumab (anti-CTLA-4) je v dětské onkologii součástí studie fáze II v léčbě metastatického maligního melanomu a rezistentních solidních nádorů dětského věku po předchozím potvrzení léčebné odpovědi studie fáze I u 24 % pacientů s refrakterním/relabujícím nádorem. Aktuálně jsou otevřeny v USA a Evropě tři klinické studie fáze II u dětí s pokročilým maligním melanomem a v USA i jiných rezistentních nádorů

dětského věku. Pro všechny je limitem věk nad 12 let [4,8,10,13,16]. V ČR je ipilimumab dostupný pro děti a dospívající pod 18 let věku ve velmi přísně indikovaných případech dle paragrafu 16 zákona č. 48/1997 Sbírky ve vybraných dětských onkologických centrech (Praha, Brno).

V posledním roce je velká pozornost věnována protilátkám proti receptoru PD-1 (programmed death receptor-1) – plně humanizované mAb nivolumab, pembrolizumab a lambrolizumab. Cílem je zesílit protinádorovou odpověď T lymfocytů narušením interakce mezi inhibičním receptorem PD-1 na T lymfocytech a PD-L1 exprimovaným na nádorových buňkách. V dětské onkologii je v přípravě studie fáze I a II u progredujících dětských typů nádorů exprimujících PD-L1 [4,8,9]. V ČR je anti-PD-1 mAb pembrolizumab dostupný pouze ve velmi přísně indikovaných případech v rámci specifického léčebného pro-

gramu ve vybraných dětských onkologických centrech (Praha, Brno).

Buněčná imunoterapie

a) Adoptivní T buněčná terapie (transfer *ex vivo* expandovaných tumor infiltrujících lymfocytů – TILs) zatím nenašel v dětské onkologii použití. Vysvětlením může být rozdíl v nádorovém mikroprostředí dětských nádorů s nízkým počtem TILs [2].

V dětské onkologii je buněčná imunoterapie realizována především třemi způsoby:

b) Alogenní transplantace kmenových buněk hematopoiezy, GvL efekt

Představuje jednu z nejstarších metod buněčné imunoterapie v dětské onkologii v léčbě rezistentních/relabujících hematologických malignit. Graft versus leukemia (GvL) efekt zprostředkován dárcovskými cytotoxic-

kými T lymfocyty je typickým příkladem imunitní reakce, která dokáže eradikovat chemorezistentní leukemické buňky. GvL je závislý na typu leukemie (chronická myeloidní leukemie (CML) > akutní myeloidní leukemie (AML) > akutní lymfoblastická leukemie (ALL)), buněčnosti a množství T lymfocytů ve štěpu (T deplece štěpu je spojena s vyšším rizikem relapsu), přítomnosti reakce štěpu vůči hostiteli (graft versus host disease – GvHD), objemu nádoru u hostitele v čase převodu a správném načasování transplantace. Nejlepší GvL efekt je dosažen ve stadiu MRD [2,3,16].

Obdobnou metodou je infuze T lymfocytů dárce (donor lymphocyte infusion – DLI). V současnosti probíhají klinické studie s haploidentickou SCT s KIR-mismatched NK buňkami u dětských leukemií i solidních nádorů [2,3,10,16].

c) Protinádorové vakcíny

Imunologická tolerance indukovaná nádorovými antigeny není absolutní a lze ji překonat specifickou imunizací antigen prezentujícími buňkami (APC buňky). V dětské onkologii proběhla celá řada nerandomizovaných single arm klinických studií s použitím protinádorových vakcín u rekurentních solidních nádorů (rekurentní high-grade gliomy mozku, melanom, sarkomy měkkých tkání, neuroblastom vysokého rizika, Ewingův sarkom) se závěrem – podání je bezpečné, ale nádorové regrese bylo dosaženo pouze zřídka. Problematický je rovněž pomalý imunologický efekt vakcíny u proliferačně vysoce aktivních nádorů dětského věku. Optimální načasování podání protinádorové vakcíny je opět ve stadiu MRD po ukončení intenzivní léčby.

Nádorové vakcíny v dětské onkologii zatím nejsou součástí standardní léčby. Aktuálně probíhá v USA pod hlavičkou NCI 14 klinických pediatrických studií fáze I a II s použitím protinádorové vakcíny [2,4].

V ČR v současnosti proběhlo schválení SÚKL pediatrické pilotní klinické studie „Kombinovaná protinádorová terapie s autologní vakcínou z dendritických buněk produkujících interleu-

kin-12 u dětských a adolescentních pacientů s progredujícími, relabujícími nebo primárně metastatickými malignitami vysokého rizika“ Kliniky dětské onkologie LF MU a FN Brno.

d) CARs T lymfocyty

Velmi slibnou terapeutickou metodou je imunoterapie založená na T lymfocytech exprimujících CARs. Předběžné výsledky prokazují klinický terapeutický efekt CARs nejenom ve stadiu MRD, ale i při měřitelné nádorové mase.

Problémem při výrobě a následném použití CARs T lymfocytů v dětské onkologii je nízká incidence dětských nádorů, složitost a finanční náročnost přípravy, která vede k použití CARs pouze v několika specializovaných centrech v USA [4].

V dětské onkologii byly jako potenciální cíle identifikovány antigeny CD19 a GD-2. Klinická studie fáze I s použitím CD19-CARs u B-ALL refrakterní na standardní léčbu prokázala 66,7% dosažení kompletní remise, a u 60 % pacientů dokonce vymizela MRD. Další studie potvrdila dosažení remise až u 90 % pacientů. Rovněž byl potvrzen přechod CD19-CARs přes hematoencefalickou bariéru a vymizení CNS leukemické infiltrace [2,4,14].

Klinická studie fáze I s první generací CARs proti GD2 prokázala u 27 % těžce předléčených pacientů s neuroblastomem a aktivní nemocí dosažení kompletní remise [4].

V ČR je tento typ imunoterapie pro dětskou onkologii zatím nedostupný.

Kombinovaná imunoterapie

Fakt tzv. imunogenní buněčné smrti (immunogenic cell death – ICD) využívá stereotaktická radiochirurgie (SRS). Použití radioterapie a SRS jako imunomodulační metody podporuje fakt, že ozáření navodí v nádorovém mikroprostředí změny typické pro zánětlivé procesy (zvýšením exprese MHC I. třídy na nádorových buňkách se zvýší jejich rozpoznatelnost imunitním systémem). Poškození nádorových buněk vede ke zvýšené infiltraci nádorové tkáně efektorovými imunitními buňkami. Dochází k poškození endoteliálních buněk cév v nádoru a zvýšení permeability cévn

stěny, což vede ke hromadění efektorových T buněk [17].

Ve snaze o dosažení maximálního klinického efektu lze kromě radioterapie použít kombinaci imunoterapie s dalšími formami protinádorové léčby (kombinace/sekvenční podání různých typů imunoterapie, kombinace imunoterapie a chemoterapie, kombinace imunoterapie a cílené biologické léčby).

Aktivace vrozené imunity

Imunoterapie v podobě aktivace vrozené imunity je v dětské onkologii teprve v začátcích. V dospělé onkologii je nejdéle používaným způsobem aktivace vrozené imunity aplikace **BCG vakcín** u karcinomu močového měchýře. V dětské onkologii probíhá klinická studie fáze I s BCG a antiidiotypovou mAb A1G4 u progredujících neuroblastomů vysokého rizika [16].

MTP-PE (lipidový muramyl tripeptid fosfatyletanolamin, mifamurtid) aktivuje monocyty a makrofágy, jeho efekt tedy závisí na počtu makrofágů v nádoru. Podání MTP-PE u lokalizovaného osteosarkomu vedlo ke zlepšení pětiletého OS (53 % v ramenu s MTP-PE vs. 40 % v ramenu bez MTP-PE). Výsledky studie fáze III u osteosarkomu s plicními metastázami prokázaly prodloužení intervalu PFS, ale nebylo dosaženo statisticky významného prodloužení OS [3,16,18]. V ČR je dostupný pro pacienty s osteosarkomem dle paragrafu 16 zákona 48/1997 Sbírky.

Cytokiny a růstové faktory

Cytokiny hrají kritickou roli v regulaci imunitního systému – stimulují imunitní odpověď proti cizorodému antigenu a regulují odpověď nositele ve spektru od cytotoxické po imunotolerantní reakci.

a) Interferon α (IFN-α), především jeho pegylovaná forma, je v dětské onkologii součástí léčby devastujících progredujících hemangiomů, plexiformních neurofibromů u dětí s neurofibromatózou typu I. Je součástí standardní léčby 1. linie u maligního melanomu, obrovskobuněčného nádoru kostí nebo neuroendokrinních nádorů [3,4,16]. Rovněž je součástí imunoterapie relapsu Hodgkinova lymfomu po autologní HSCT.

Recentně vyhodnocené rameno s pegylovaným IFN- α v rámci studie EURAMOS nevedlo ke zlepšení výsledků u metastatického osteosarkomu.

b) Interleukin-2 (IL-2) nesplnil očekávaný efekt u dětských typů nádorů [3]. U neuroblastomu vysokého rizika po autologní SCT spolu s anti-GD-2 mAb a GM-CSF prokázal zlepšení a prodloužení PFS [13].

c) GM-CSF u akutních leukemií může zvyšovat senzitivitu blastů a tím zvyšovat cytotoxický efekt chemoterapie. Klinická studie s inhalací GM-CSF u plicních metastáz osteosarkomu nesplnila svá očekávání [3,16].

d) Tumor necrosis faktor α (TNF- α) – jistý efekt TNF- α je popsán u rekurentního metastatického Ewingova sarkomu, Wilmsova nádoru nebo sarkomů měkkých tkání. Použití v dětské onkologii limituje jeho systémová toxicita [3,4,16].

Závěr

Od prvního využití mechanismů imunitního systému v léčbě nádorů dětského věku (Coleyův toxin v roce 1922) uběhlo již 93 let. Současná protinádorová léčba dětských nádorů je sice efektivní ve většině případů, ale za vysokou cenu akutní toxicity a pozdních následků.

Význam imunoterapie v dětské onkologii kromě slibného terapeutického efektu potencuje její dobrá tolerance, absence pozdní toxicity a urychlení rekonstituce imunitního systému po absolvování standardní cytotoxické onkologické léčby. V dětské onkologii se standardní léčbou podaří dostat většinu nádorů do stadia MRD, kdy je efekt imunoterapie nejprokazatelnější. Proto klinické studie s použitím tzv. konsolidační imunoterapie, především u solidních dětských nádorů vysokého rizika, jsou v nejbližších letech nezbytné.

Literatura

1. Bajčiová V. Využití imunoterapie v dětské onkologii. *Onkolog* 2014; 9(1): 34–38.
2. Mackall CL, Merchant MS, Fry TJ. Immune-based therapies for childhood cancer. *Nat Rev Oncol* 2014; 11(12): 693–703. doi: 10.1038/nrclinonc.2014.177.
3. Mackall CL, Arcenci RJ. Immunotherapeutic targeting in children. *Medscape reference, Drugs, Disease and Procedures*, March 2012 [online]. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/991158-overview>.
4. Capitini CHM, Otto M, DeSantes B. Immunotherapy in pediatric malignancies: current status and future perspectives. *Future Oncol* 2014; 10(9): 1659–1678. doi: 10.2217/fon.14.62.
5. Galon J, Mlecnik B, Bindea G et al. Towards the introduction of the „immunoscore“ in the classification of malignant tumours. *J Pathol* 2014; 232(2): 199–209. doi: 10.1002/path.4287.
6. Haworth KB, Leddon JL, Chen CHZ et al. Going back to class I: MHC and immunotherapies for childhood cancer. *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62(4): 571–576. doi: 10.1002/pbc.25359.
7. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu V et al. Cancer genome landscape. *Science* 2013; 339(6127): 1546–1558. doi: 10.1126/science.1235122.
8. Marabelle A, Gray J. Tumor-targeted and immune-targeted monoclonal antibodies: going from passive to active immunotherapy. *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62(8): 1317–1325. doi: 10.1002/pbc.25508.
9. van Dam L, de Zwart VM, Meyer-Wentrup FA. The role of programmed cell death-1 (PD-1) and its ligands in pediatric cancer. *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62: 190–197. doi: 10.1002/pbc.25284.
10. Wayne AS, Capitini CHM, Mackall CL. Immunotherapy of childhood cancer: from biologic understanding to clinical application. *Curr Opin Pediatr* 2010; 22(1): 2–11. doi: 10.1097/MOP.0b013e3283350d3e.
11. Hatina J. Imunologie nádorů – současný stav a poznatky z 1. mezinárodní konference základní a klinické imunogenomiky. Část II – protinádorová imunoterapie. *Klin Onkol* 2005; 18(4): 126–133.
12. Eckschlager T. Má imunoterapie své místo v současné dětské onkologii? *Klin Onkol* 2003; 16 (Suppl 1): 125–126.
13. Grupp SA, Verneris M, Sondel PM et al. Immunotherapy for pediatric cancer. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14 (Suppl 1): 33–43. doi: 10.1016/j.bbmt.2007.10.014.
14. Suzuki M, Curran KJ, Cheung NK. Chimeric antigen receptors and bispecific antibodies to retarget T cells in pediatric oncology. *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62(8): 1326–1336. doi: 10.1002/pbc.25513.
15. Thomas DM. RANKL, denosumab, and giant cell tumor of bone. *Curr Opin Oncol* 2012; 24(4): 397–403. doi: 10.1097/CCO.0b013e328328354c129.
16. Capitini CHM, Mackall CL, Wayne AS. Immune-based therapeutics for pediatric cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2010; 10(2): 163–178. doi: 10.1517/14712590903431022.
17. Finkelstein SE, Tiimerman R, McBride WH et al. The confluence of stereotactic ablative radiotherapy and tumor immunology. *Clin Dev Immunol* 2011; 2011: 439752. doi: 10.1155/2011/439752.
18. Chou AJ, Kleinerman ES, Krailo MD et al. Addition of muramyl tripeptide to chemotherapy for patients with newly diagnosed metastatic osteosarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer* 2009; 115(22): 5339–5348. doi: 10.1002/cncr.24566.

Chimérický antigenní receptor T lymfocytů – genová terapie budoucnosti u nádorových onemocnění?

Chimeric Antigen Receptor T-cells – Gene Therapy of the Future for Malignant Diseases?

Šmída M.

CEITEC – Středoevropský technologický institut, MU, Brno

Souhrn

Chimérické antigenní receptory jsou syntetické, geneticky upravené receptory T lymfocytů. Jejich transfer do autologních T lymfocytů pacienta dokáže tyto lymfocyty cíleně naprogramovat proti specifickým antigenům vyskytujícím se na povrchu maligních buněk. Tento princip se v současnosti rozvinul jako potenciálně slibný přístup v terapii nejprve hematologických malignit a později i solidních nádorů. Byly vyvinuty různé strategie v designu chimérických antigenních receptorů a jejich transferu do T lymfocytů a zdá se, že tyto faktory mají velký dopad na aktivitu výsledných modifikovaných T lymfocytů a následně i na úspěšnost léčby. Jednotlivé proměnné v designu se v současnosti intenzivně testují v nespočetných klinických studiích. V tomto přehledu stručně popíši základní princip a strukturu chimérických antigenních receptorů a postup generování T lymfocytů nesoucích chimérický antigenní receptor.

Klíčová slova

chimérický antigenní receptor – CAR-T lymfocyty – genová terapie – imunoterapie – nádorová onemocnění

Summary

Chimeric antigen receptors are synthetic, genetically modified receptors of T-cells. The introduction of chimeric antigen receptors into autologous patient T-cells can redirect the lymphocytes to specific antigen targets on the surface of malignant cells. This has recently emerged as an intriguing therapy approach in both hematologic malignancies and later also in solid tumors. Various chimeric antigen receptor designs and manufacturing processes were developed and seem to have a strong impact on the activity of chimeric antigen receptor T-lymphocytes and thereby the therapy success. The individual variables are currently being tested in numerous clinical trials. In this review, I will briefly describe the principle, basic structure and construction of chimeric antigen receptor T-lymphocytes.

Key words

chimeric antigen receptor – CAR-T-cells – gene therapy – immunotherapy – neoplasms

Autor deklaruje, že v souvislosti s předmětem studie nemá žádné komerční zájmy.

The author declares he has no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Mgr. Michal Šmída, Ph.D.

CEITEC – Středoevropský technologický institut, MU
Kamenice 753/5

625 00 Brno

e-mail: michal.smida@ceitec.muni.cz

Obdrženo/Submitted: 1. 9. 2015

Přijato/Accepted: 16. 9. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20154544>

Vývoj chimérického antigenního receptoru

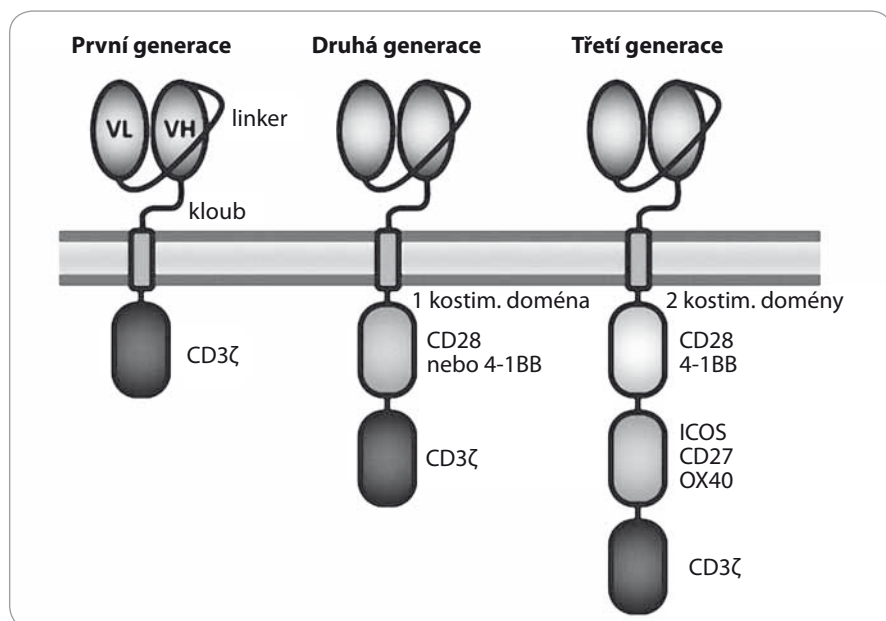
Imunoterapie nádorových onemocnění přitahuje již nějakou dobu pozornost vědců a lékařů, jelikož nabízí možnost dlouhotrvajících remisí a potenciálně kompletní zničení nemoci. Jednotlivé přístupy zahrnují např. adoptivní transfer nádor infiltrujících T lymfocytů spojený s jejich extrakcí a expanzí *ex vivo* nebo aplikace monoklonálních protilátek. Rutinně se aplikují (a v klinických studiích nadále testují) protilátky proti povrchovým antigenům specifickým pro nádorové buňky nebo protilátky blokující molekuly jako PD-1 nebo CTLA-4, jež se vyskytují na povrchu T lymfocytů a negativně regulují jejich aktivaci. Tyto metody se ovšem setkávají s řadou překážek, jako je náročnost kultivace nádor infiltrujících lymfocytů, tolerance imunitního systému vůči autoantigenům a nutnost prezentace antigenu v komplexu s hlavním histokompatibilním systémem (major histokompatibilitý complex – MHC).

Chimérický antigenní receptor (CAR) představuje kombinaci protilátky a T buňčného receptoru (T-cell receptor – TCR) [1,2]. Jde o spojení části protilátky vázající antigen s funkčními doménami

TCR signálních drah. CAR tak kombinuje v jedné molekule schopnost protilátek rozeznat a vázat antigen se schopností signálních domén aktivovat T lymfocyt [3,4]. CAR receptory jsou schopny na rozdíl od klasického TCR rozeznat a vázat molekuly v nativním stavu na povrchu cílových buněk [5]. Genetická modifikace autologních T lymfocytů pomocí CAR konstruktů tak umožňuje T lymfocytům vázat nádorově specifické povrchové antigeny nezávisle na procesování antigenu uvnitř buňky a prezentaci antigenu na MHC komplexu a překonává tak problém s MHC kompatibilitou a výše zmíněné překážky jiných imunoterapeutických postupů [6].

V průběhu vývoje CARs se zjistilo, že když se ke CAR receptoru připojí více signálních domén stimulujících T lymfocyty, lze dosáhnout větší efektivity takto modifikovaných T lymfocytů. První doménou přidanou ke CAR receptoru byla intracelulární část kostimulační molekuly CD28. Lymfocyty déle přežívají v periférii, ale ne dostatečně dlouho na to, aby mohly zabít všechny nádorové buňky. Teprve přidání další molekuly, CD137 (4-1BB), by mělo zajistit dostatečnou perzistenci *in vivo* a vyšší protinádorovou aktivitu [7,8].

Jako první byly CARs testovány na hematologických malignitách. Tyto mají několik výhod: 1. na rozdíl od většiny solidních nádorů je známá celá řada povrchových antigenů exprimovaných specificky na hematologických buňkách; 2. lze snadno monitorovat průběh léčby a odebírat hematologické nádorové buňky a 3. T lymfocyty přirozeně migrují do hematologických orgánů, jako je kostní dřeň či lymfatické uzliny. V současnosti se ovšem aplikace CAR-T lymfocytů rozšiřuje i na celou plejádu solidních nádorů. Proces výroby a aplikace CAR-T lymfocytů zahrnuje separaci T lymfocytů z krve pacienta a selekci požadované populace. Poté je do buněk vnesen vektor kódující CAR receptor pro příslušný povrchový nádorový antigen a takto geneticky upravené T lymfocyty jsou selektovány a expandovány do populace čítající biliony buněk. Ty jsou následně opět vpraveny do pacienta. Úspěšnost této terapie závisí především na míře exprese CAR receptoru, aktivitě CAR-T lymfocytů a délce jejich perzistence v krvi pacienta. Tyto parametry jsou ovlivňovány několika různými faktory, z nichž hlavní roli hrají pravděpodobně samotná struktura CAR receptoru a způsob jeho transferu do autologních T lymfocytů.



Obr. 1. Struktura chimérického antigenního receptoru (CAR).

Extracelulární část sestává z variabilní části lehkého (VL) a těžkého (VH) imunoglobulinového řetězce navzájem spojenými linkerem. Tato část je kloubem spojena s transmembránovou doménou. Jednotlivé generace CARs se liší přítomností různých signálních domén v intracelulární části receptoru.

Struktura chimérických antigenních receptorů

Extracelulární část CAR receptoru většinou představuje jednořetězcová variabilní část protilátky, konkrétně variabilní část lehkého plus variabilní část těžkého řetězce navzájem spojené linkerem (obr. 1). Tyto variabilní části pocházejí většinou z myších nebo humanizovaných protilátek, popř. jsou uměle syntetizovány a screenovány pomocí fágových knihoven [9]. Na rozdíl od klasického TCR, kde je specifita a aktivace T lymfocytu striktně dána úzkým rozsahem afinity TCR, CARs mají mnohem vyšší a širší rozmezí afinity zaručující vazbu na antigen, aniž by docházelo k nespecifické kros-reaktivitě. Z preklinických studií se zdá, že prostorová lokalizace vazebného epitopu má větší efekt na aktivitu CAR než rozdíly v jeho afinitě [10]. Také délka, flexibilita a původ kloubu mezi extracelulární a transmembránovou částí jsou důležité faktory pro

správnou aktivitu CAR [11–13]. V současnosti neexistují žádná obecná pravidla regulující design CAR proti cílovým molekulám, a je proto nutné testovat jednotlivé proměnné v designu empiricky. Doposud bylo vyvinuto několik generací CARs [3,4]. Jednotlivé generace CAR jsou zpravidla rozlišovány podle použitých intracelulárních signálních domén nutných pro aktivaci T lymfocytu. První generace CARs zahrnuje jako signální doménu pouze řetězec CD3 zeta. Druhá generace obsahuje navíc i jednu kostimulační doménu odvozenou buď od molekuly CD28, nebo 4-1BB. Třetí generace CARs obsahuje dvě kostimulační domény jako CD28 nebo 4-1BB plus doménu dalších kostimulačních molekul. Současné klinické studie se zabývají především testováním CARs druhé a třetí generace, které dosahují delší perzistence CAR-T lymfocytů v krvi pacienta a vyšší lymfocytární aktivity. Také transmembránová doména a kloub spojující tuto část s extracelulárním řetězcem mohou hrát důležitou roli při interakci s antigenem, tvorbě imunologické synapse a asociaci CAR s jinými proteiny důležitými pro tvorbu robustního signálu nutného pro plnou aktivaci buňky. Většinou se používá transmembránová část a kloub z molekuly CD8α nebo CD28. Ovšem byly testovány i různě modifikované klouby z FcR oblasti a bylo zjištěno, že jsou schopny vázat Fc receptory a aktivovat buňky vrozeného imunitního systému [11–13].

Produkce CAR-T lymfocytů

Důležitým aspektem při přípravě CAR-T lymfocytů je způsob bezpečného a účinného vložení CAR receptoru do autologních T lymfocytů. V současnosti je testováno několik různých metod pro vnesení CAR konstruktů do expandovaných T lymfocytů pacienta [14]. Každý z těchto systémů má své výhody a nevýhody, co se týče míry exprese CARs v buňkách, bezpečnosti systému a finanční náročnosti. Původně byla používána DNA transfekce, jelikož je to technika levná a neohrožuje riziko inzerční mutagenese jako v případě virové infekce. Na druhé straně ovšem dosahuje relativně nízké efektivity transferu genu, a proto vyžaduje dlouhodobou kulti-

vaci a selekci transfekovaných lymfocytů pomocí antibiotik. Dlouhodobá kultura přitom není prospěšná pro aktivitu a perzistenci transfekovaných buněk a vnesené geny pro rezistenci mohou navíc tvořit imunogenní produkty. Užití transpozonových vektorů obsahujících element pro integraci (např. tzv. Sleeping Beauty transpozon) může vést k účinnějšímu integrování transgenu [15–17]. Tento systém se nyní testuje v různých klinických studiích a zdá se, že vede k účinnějšímu transferu genu a jeho déle trvající expresi [18]. Nejčastěji užívaným systémem vnesení CAR konstruktů je infekce lymfocytů pomocí γ-retrovirů. Retroviry lze jednoduše připravit a navíc jsou schopny velmi účinně a permanentně transdukovat lymfocyty. Předběžné výsledky navíc ukazují, že z hlediska integrace do genomu je retrovirová infekce do primárních lidských lymfocytů bezpečná [19]. Nevýhodou retroviru může potenciálně být utlumení exprese CARs z důvodu utlumení LTR oblasti integrovaného retrovirového konstruktů. V jistém kontextu se toto ovšem může stát výhodou terapie. Pravděpodobně bezpečnější než retroviry z hlediska místa integrace je infekce pomocí lentivirových vektorů, které jsou také schopny efektivně a stabilně transdukovat T lymfocyty [20]. Použití specifických promotorů ve spojitosti s lentivirovými vektory dosahuje stabilní exprese CAR konstruktů na povrchu transdukovaných T lymfocytů a déle trvající perzistenci funkčních CAR-T lymfocytů *in vivo*.

Také způsoby kultivace T lymfocytů a její délka mohou být důležitým faktorem přispívajícím ke kvalitě konečného produktu CAR-T lymfocytu. Obvykle se používá expanze lymfocytů pomocí stimulace anti-TCR protilátkami plus podpurnými cytokiny, což udržuje centrální paměťový fenotyp T lymfocytů, nebo pomocí umělých antigen-prezentujících buněk [21,22]. Expandované CAR-T lymfocyty jsou poté vpraveny zpět do pacienta a je monitorována délka jejich perzistence v periférii, aktivita a progres nemoci.

Literatura

1. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as

- functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(24): 10024–10028.
- Irving BA, Weiss A. The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell* 1991; 64(5): 891–901.
- Cartellieri M, Bachmann M, Feldmann A et al. Chimeric antigen receptor-engineered T cells for immunotherapy of cancer. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010: 956304. doi: 10.1155/2010/956304.
- Maus MV, Grupp SA, Porter DL et al. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood* 2014; 123(17): 2625–2635. doi: 10.1182/blood-2013-11-492231.
- Eshhar Z, Waks T, Bendavid A et al. Functional expression of chimeric receptor genes in human T cells. *J Immunol Methods* 2001; 248(1–2): 67–76.
- Rossig C, Brenner MK. Genetic modification of T lymphocytes for adoptive immunotherapy. *Mol Ther* 2004; 10(1): 5–18.
- Milone MC, Fish JD, Carpenito C 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. doi: 10.1038/mt.2009.83.
- Carpenito C, Milone MC, Hassan R et al. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(9): 3360–3365. doi: 10.1073/pnas.0813101106.
- Sadelain M, Brentjens R, Riviere I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov* 2013; 3(4): 388–398. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0548.
- Haso W, Lee DW, Shah NN et al. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2013; 121(7): 1165–1174. doi: 10.1182/blood-2012-06-438002.
- Hudecek M, Lupo-Stanghellini MT, Kosasih PL et al. Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells. *Clin Cancer Res* 2013; 19(12): 3153–3164. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0330.
- Hombach A, Hombach AA, Abken H. Adoptive immunotherapy with genetically engineered T cells: modification of the IgG1 Fc_γ domain in the extracellular moiety of chimeric antigen receptors avoids 'off-target' activation and unintended initiation of an innate immune response. *Gene Ther* 2010; 17(10): 1206–1213. doi: 10.1038/gt.2010.91.
- Hombach A, Heuser C, Gerken M et al. T cell activation by recombinant FcεpsilonRI gamma-chain immune receptors: an extracellular spacer domain impairs antigen-dependent T cell activation but not antigen recognition. *Gene Ther* 2000; 7(12): 1067–1075.
- Kalos M, June CH. Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology. *Immunity* 2013; 39(1): 49–60. doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.002.
- Dupuy AJ, Akagi K, Largaespada DA et al. Mammalian mutagenesis using a highly mobile somatic Sleeping Beauty transposon system. *Nature* 2005; 436(7048): 221–226.
- Huang X, Wilber AC, Bao L et al. Stable gene transfer and expression in human primary T cells by the Sleeping Beauty transposon system. *Blood* 2006; 107(2): 483–491.
- Maiti SN, Huls H, Singh H et al. Sleeping beauty system to redirect T-cell specificity for human applications. *J Immunother* 2013; 36(2): 112–123. doi: 10.1097/JCI.0b013e3182811ce9.
- Singh H, Manuri PR, Olivares S et al. Redirecting specificity of T-cell populations for CD19 using the Sleeping Beauty system. *Cancer Res* 2008; 68(8): 2961–2971. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5600.

19. Scholler J, Brady TL, Binder-Scholl G et al. Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells. *Sci Transl Med* 2012; 4(132): 132ra53. doi: 10.1126/scitranslmed.3003761.
20. Biffi A, Bartolomea CC, Cesana D et al. Lentiviral vector common integration sites in preclinical models and a clinical trial reflect a benign integration bias and not oncogenic selection. *Blood* 2011; 117(20): 5332–5339. doi: 10.1182/blood-2010-09-306761.
21. Maus MV, Thomas AK, Leonard DG et al. Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB. *Nat Biotechnol* 2002; 20(2): 143–148.
22. Kaneko S, Mastaglio S, Bondanza A et al. IL-7 and IL-15 allow the generation of suicide gene-modified alloreactive self-renewing central memory human T lymphocytes. *Blood* 2009; 113(5): 1006–1015. doi: 10.1182/blood-2008-05-156059.

Význam imunogenní buněčné smrti v protinádorové imunitě

The Concept of Immunogenic Cell Death in Antitumor Immunity

Fučíková J., Bartůňková J., Špišek R.

Ústav imunologie, 2. LF UK a FN v Motole, Praha
Sotio a.s., Praha

Souhrn

Z imunologického hlediska lze buněčnou smrt nádorových buněk rozlišit na imunogenní a neimunogenní v závislosti na podnětu, který ji vyvolává. Imunogenní buněčná smrt na rozdíl od fyziologické apoptózy vede ke stimulaci imunitního systému pomocí molekul, které jsou označovány jako DAMPs (danger associated molecular pattern). V prvních hodinách imunogenní buněčné apoptózy dochází k rychlé translokaci chaperonového proteinu kalretikulinu a proteinů teplotního stresu 70 a 90 (heat-shock – HSP70 a HSP90) z endoplazmatického retikula na buněčný povrch. Následně dochází k aktivní sekreci molekuly adenosintrifosfátu a pasivnímu uvolnění nukleárního proteinu HMGB1 do extracelulárního prostoru. Společnou vlastností těchto molekul je aktivace buněk imunitního systému, zejména pak dendritických buněk, které se řadí mezi profesionální antigen prezentující buňky, které následně aktivují protinádorovou imunitní odpověď. Cílem tohoto souhrnného článku je popsat dosud známé induktory imunogenní buněčné smrti a jejich vliv na protinádorovou imunitní odpověď.

Klíčová slova

kalretikulin – dendritická buňka – imunogenní buněčná smrt – protinádorová imunitní odpověď

Summary

Cancer cell death can be immunogenic or nonimmunogenic depending on the initiating stimulus. The immunogenic characteristics of immunogenic cell death are mainly mediated by damage-associated molecular patterns represented by preapoptotic exposure of calreticulin and heat shock proteins (HSP70 and HSP90) from endoplasmic reticulum at the cell surface and active secretion of adenosintriphosphate. Other damage-associated molecular patterns are produced in late stage apoptosis as high mobility group box 1 protein (HMGB1) into the extracellular milieu. Such signals operate on various receptors expressed by antigen presenting cells, mainly by population of dendritic cells, to stimulate the activation of antigen specific T-cell response. In this review, we describe the current known immunogenic cell death inducers and their potential to activate antitumor immune response.

Key words

calreticulin – dendritic cell – immunogenic cell death – antitumor immune response

Práce byla podpořena granty IGA MZ ČR – NT 12402-5 a MZ ČR – RVO, FN v Motole 00064203.

This work was supported by grant IGA MH CZ – NT 12402-5 and MH CZ – DRO, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic 00064203.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



PharmDr. Jitka Fučíková, Ph.D.
Ústav imunologie
2. LF UK a FN v Motole
a Sotio a. s.
V Úvalu 84
150 06 Praha 5
e-mail: fucikova@sotio.com

Obdrženo/Submitted: 29. 7. 2015
Přijato/Accepted: 1. 10. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20154548>

Úvod

Nové poznatky v oblasti nádorové biologie ukazují, že imunitní systém je schopen rozpoznat neoplastické nádorové buňky a zničit je dříve, než se projeví jako klinicky závažné onemocnění. Složky imunity hrají důležitou roli i při léčbě klinicky detekovatelných nádorů a podporují účinek některých protinádorových léčiv [1]. Základním předpokladem pro rozpoznání nádorových buněk imunitním systémem je existence

nádorově specifických, resp. asociovaných antigenů. Ty mohou být v menší či větší míře exprimovány nádorovou buňkou a napomáhat její identifikaci buňkami imunitního systému [2]. Z experimentů je však známo, že nádory rostoucí v imunodeficitním jedinci jsou mnohem více imunogenní než nádory rostoucí u imunokompetentního jedince. Imunitní systém totiž vyvíjí na nádorové buňky neustálý selekční tlak, který vede k výběru variant transformovaných

buněk, které dokážou uniknout efektorovým mechanismům imunitního systému. Tato hypotéza se nazývá „cancer immune editing“, tj. editace nádoru imunitním systémem a popisuje tři odlišné úrovně boje imunitního systému proti nádorovým buňkám – eliminaci transformovaných buněk (elimination), ustavení rovnováhy mezi transformovanou buňkou a organizmem (equilibrium) a únik transformované buňky před kontrolou imunitním systémem (escape) [3].

Tab. 1. Induktory ICD I. a II. třídy v léčbě nádorových onemocnění, jejich hlavní imunogenní vlastnosti a vliv na imunitní systém.

Induktor ICD	Klinická aplikace	Produkce DAMP	Vztah k imunitnímu systému	Reference
induktor I. třídy				
mitoxanton antracykliny	leukemie, lymfomy, dětské nádory, karcinom vaječníků a prsu	pre-apoptotická exprese CRT , produkce ATP buňkami ve fázi časné apoptózy, pasivní uvolnění HMGB1	↑ infiltrace nádorového mikroprostředí CD8 T lymfocyty a γδ Th17 lymfocyty, ↑ produkce IFN-γ CD8 T lymfocyty	[9,14,16,18]
oxaliplatin	karcinom tlustého střeva a GITU	pre-apoptotická exprese CRT , aktivní sekce ATP a post-apoptotické uvolnění molekuly HMGB1	↑ exprese PD-L1 na povrchu plazmacytoidních DC	[6,21]
cyklofosfamid	leukemie, mnohočetný myelom, karcinom plic, prsu a varlat	pre-apoptotická exprese CRT , pasivní uvolnění HMGB1 ve fázi pozdní apoptózy	↓ infiltrace nádorového mikroprostředí Tregs, ↑ infiltrace DC a CD8 T lymfocyty	[23,24,27]
bortezomib	mnohočetný myelom	expres chaperonových proteinů CRT , HSP70 a HSP90 v procesu časné fáze apoptózy	↑ procento IFN-γ produkujících buněk, ↑ NK a CD8 buněčnou cytotoxicitu	[10,29,30]
UVC záření	příprava imuno-terapeutických vakcín	pre-apoptotická exprese CRT a HSP70 a produkce HMGB1	↑ procento IFN-γ produkujících CD8 T lymfocytů, ↑ cytotoxicity mediované NK buňkami	[31–33,36]
radioterapie	většina karcinomů	pre-apoptotická exprese CRT a HSP70 a uvolnění molekuly HMGB1 v pozdní fázi apoptózy	↑ infiltrace nádorového mikroprostředí aktivovanými DC, ↑ produkce IFN-γ T lymfocyty, ↑ infiltrace CD4 a CD8 T lymfocyty, ↓ infiltrace Tregs	[12,34,35,37]
vysoký hydrostatický tlak (HHP)	příprava imuno-terapeutických vakcín	pre-apoptotická exprese CRT , HSP70 a HSP90 , uvolnění ATP v časné fázi apoptózy, a uvolnění HMGB1 v pozdní fázi apoptózy	↑ aktivace DC, ↑ IFN-γ produkujících T lymfocytů (<i>in vitro</i>), ↓ procenta Tregs <i>in vitro</i>	[15,40]
induktor II. třídy				
fotodynamická terapie hypericinem	velké množství karcinomů	pre-apoptotická exprese CRT a HSP70 a uvolnění ATP v časné fázi apoptózy	↑ aktivace DC, ↑ produkce IL-1β ↑ NO a ↓ IL-10 populací DC, ↑ expanze CD4 a CD8 T lymfocytů	[11,17,41,42]
coxsackie virus B3	ve fázi výzkumu	expres CRT a sekrece ATP v časné fázi apoptózy	vliv na populaci NK buněk klíčových pro úspěch terapie	[43]

ICD – imunogenní buněčná smrt, DAMP – danger associated molecular pattern, CRT – kalretikulin, ATP – adenosintrifosfát, HMGB1 – high mobility group box 1, DC – dendritické buňky, Tregs – regulační T lymfocyty

V klinické praxi se nádory diagnostikují nejčastěji až ve fázi úniku. Imunitní systém přestane v této fázi detekovat nádorovou buňku jako cizího vetřelce, nebojuje s ní a dochází k progresi nádorového onemocnění. Ukazuje se, že řada klinicky používaných léčebných strategií působí částečně mechanismem zvyšování imunogenicity nádorových buněk. Nádorové buňky, které v důsledku účinku léčebných metod zahynou tzv. imunogenní buněčnou smrtí (immunogenic cell death – ICD), aktivují imunitní mechanismy, které tak přispívají k eliminaci nebo alespoň kontrole růstu nádoru i v jeho pokročilých stádiích.

Imunogenní buněčná smrt nádorových buněk

Z imunologického hlediska lze buněčnou smrt nádorových buněk rozlišit na imunogenní, kdy je buňka schopna indukovat specifickou imunitní odpověď, a tolerogenní, při které je naopak výsledkem tolerance k zabité buňce [4]. Apoptóza byla velice dlouho považována za imunologicky tichý typ buněčné smrti na rozdíl od nekrotické buněčné smrti. Nekróza byla označována za imunogenní, neboť při ní dochází k porušení plazmatické membrány a uvolnění buněčných komponent a prozánětlivých cytokinů. Toto dogma bylo v uplynulých 10 letech popřeno řadou prací popisujících význam imunogenní apoptózy navozené různými modalitami a upozorňujících na její význam v konceptu ICD (tab. 1) [5]. Z těchto prací vyplývá, že typ buněčné smrti neurčuje, zda jde o imunogenní smrt, rozhodující je typ podnětu, který buněčnou smrt zahájí [6]. ICD na rozdíl od fyziologické apoptózy vede ke stimulaci imunitního systému pomocí molekul, které jsou označovány jako DAMPs (danger associated molecular pattern). DAMPs mají za fyziologických podmínek řadu funkcí ovlivňujících metabolismus, proliferaci a komunikaci buněk [7]. Pokud se nádorová buňka dostane do stresového prostředí, jsou tyto molekuly exprimovány na buněčném povrchu nebo uvolňovány do mezibuněčného prostoru v nádorovém ložisku, kde aktivují různým způsobem rozličné složky imunity a obvykle indukují protinádorovou imunitní reakci [7,8]. V prv-

ních hodinách imunogenní buněčné apoptózy dochází k: **1.** rychlé translokaci chaperonového proteinu kalretikulinu (calreticulin – CRT) [9] a proteinů teplotního stresu 70 a 90 (heat-shock – HSP70 a HSP90) z endoplazmatického retikula (ER) na buněčný povrch [10]. Následně dochází k **2.** aktivní sekreci molekul ATP (adenosintrifosfát) [11] a **3.** pasivnímu uvolnění nukleárního proteinu HMGB1 (high mobility group box 1) [12] do extracelulárního prostoru. Společnou vlastností těchto molekul je aktivace buněk imunitního systému, zejména pak dendritických buněk (dendritic cells – DC), které se řadí mezi profesionální antigen prezentující buňky (antigen presenting cell – APC) [13]. Význam těchto molekul pro aktivaci imunitního systému byl prokázán na mnoha *in vitro* modelech nádorových buněk [11,14–16] a v *in vivo* myších imunizačních experimentech [17–19]. Řada preklinických a retrospektivních prací dokumentuje klinický význam DAMP molekul pro predikci prognózy pacientů s nádorovými chorobami [5]. Vyšší exprese DAMP molekul na nádorových buňkách nebo jejich vyšší koncentrace v nádorovém mikroprostředí jsou spojovány s lepší prognózou onemocnění.

Induktory imunogenní buněčné smrti

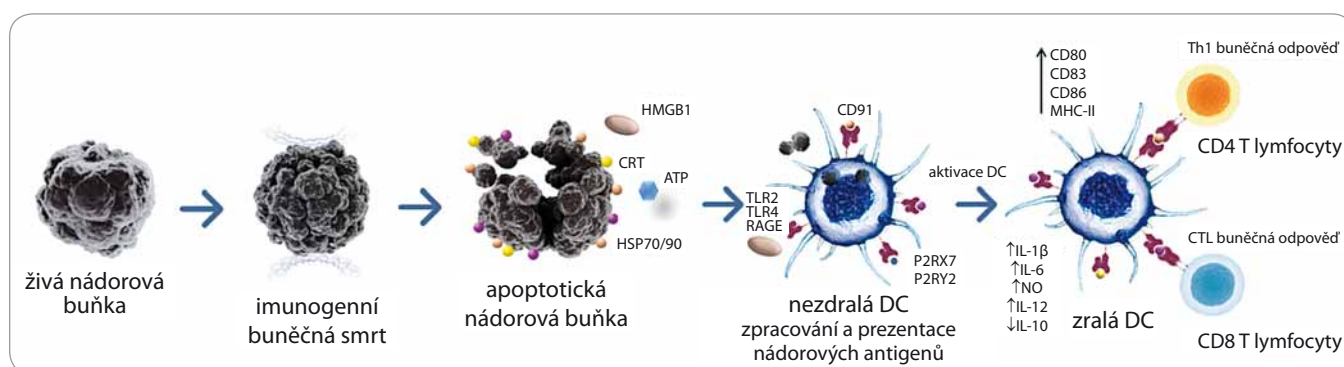
Jako první induktory ICD byly popsány v letech 2002–2006 chemoterapeutika mitoxantron, antracykliny (doxorubicin a idarubicin) [14,16] a radioterapie [12]. V současné době je identifikována skupina chemoterapeutik a fyzikálních modalit, jejichž společnou vlastností je indukovat imunogenní smrt nádorových buněk (tab. 1) [6]. Díky mnoha biologickým a chemickým odlišnostem těchto modalit vznikl nový systém klasifikace na induktory I. a II. třídy [17]. Induktory imunogenní smrti, které způsobují stres ER nepřímo přes cytozolické proteiny, proteiny plazmatické membrány a DNA replikaci jsou označovány jako induktory I. třídy [17]. Do této skupiny řadíme některá chemoterapeutika (mitoxantron, antracykliny, oxaliplatin a bortezomib) a fyzikální modalit (UVC záření, radioterapie a vysoký hydrostatický tlak). Naopak modalit, které

primárně indukují stres ER, jsou označovány jako induktory II. třídy a řadíme mezi ně zejména fotodynamickou terapii a některé onkolytické viry [17]. Společným rysem obou skupin induktorů je přímá (II. třída) či nepřímá (I. třída) aktivace stresu ER, díky které dochází k fosforylaci eukaryotického translačního iniciačního faktoru eIF2 α pomocí serin-threonin kinázy PERK. Následuje proteolýza proteinu BAP31 mediovaná kaspázou-8 a aktivace proapoptotických proteinů BAX a BAK. Následně je CRT transportován z ER do Golgiho aparátu a pomocí exocytózy přenesen na buněčný povrch [9]. Blokáce jakéhokoli proteinu v této dráze znemožní expresi CRT, zastaví ICD a redukuje imunitní odpověď navozenou imunogenní modalitou [9].

Induktory I. třídy

Antracykliny a mitoxantron

Antracykliny jsou více než 40 let používány v terapii nádorů dětského věku, leukemií, lymfomů a také v léčbě nádorů prsu a vaječníků. Do této skupiny látek řadíme zejména doxorubicin, idarubicin a mitoxantron [18]. Antracykliny se vyznačují mnoha cytostatickými a cytotoxickými vlastnostmi zprostředkovanými zejména interkalací DNA a inhibicí DNA topoizomerázy II vedoucí k apoptóze nádorových buněk. V uplynulých 10 letech se ukázalo, že právě tento typ buněčné smrti nese klíčové znaky imunogenní apoptózy zahrnující pre-apoptotickou expresi CRT [16], uvolnění molekuly ATP a HMGB1 ve fázi pozdní apoptózy [12]. Význam exprese a uvolnění těchto molekul byl ověřen v *in vivo* profylaktických imunizačních experimentech na myších modelech [12,16,19]. Exprese CRT na povrchu nádorových buněk po ošetření antracykliny předchází jakýmkoli morfologickým znakům apoptózy a objevuje se před vystavením samotného fosfatidylserinu [16]. Po rozpoznání CRT na povrchu nádorové buňky populací APC dojde k pohlcení nádorové buňky a aktivaci APC (zejména DC). Populace DC následně aktivuje T lymfocytární protinádorovou odpověď (obr. 1) [16]. Molekula ATP produkovaná v časně fázi apoptózy zesiluje migraci monocytů a makrofágů do nádorového ložiska [20]. Molekula



Obr. 1. Indukce protinádorové odpovědi imunogenní nádorovou buňkou.

Nádorová buňka ošetřená imunogenním induktorem I. či II. třídy exprimuje a uvolňuje molekuly souhrnně označované DAMPs v různých fázích apoptózy. Mezi zmíněné DAMPs se řadí CRT, HSP70 a HSP90, HMGB1 a ATP. Tyto molekuly se vážou na klíčové receptory na povrchu DC jako je TLR4 (pro HMGB1 a HSP70), P2RX7/P2RY2 (pro ATP) a CD91 (pro CRT a HSPs). Pomocí těchto interakcí dochází k intenzivní fagocytóze nádorových buněk a fenotypické (zvýšení exprese kostimulačních a povrchových molekul např. CD80, CD83, CD86 a HLA-DR) a funkční aktivaci populace DC (produkce cytokinů IL-12, IL-6 a IL-1 β). Maturované DC exprimují nádorově specifické antigeny na povrchu MHC molekul I. a II. třídy a indukují vznik protinádorově specifických CD4 a CD8 T lymfocytů. Upraveno a převzato: Sotio.com.

DC – dendritické buňky, CTL – cytotoxický T lymfocyt

ATP dále vazbou na purinergní receptor P2RX7 na povrchu DC způsobí jejich maturaci díky aktivaci NALP3 inflamazomu. Aktivovaná DC následně produkuje cytokin IL-1 β nezbytný pro aktivaci antigen specifických T lymfocytů (obr. 1). V pozdních fázích apoptózy dochází k uvolňování molekuly HMGB1, která vazbou na TLR-4 receptor indukuje tzv. cross prezentaci nádorových antigenů DC [12].

Oxaliplatina

Oxaliplatina se řadí mezi platinová cytostatika. Chemicky reaktivní látky patří do této skupiny reagují s DNA, která se jejich působením štěpí, či dochází k pevnému spojení dvou řetězců DNA. Všechny tyto změny vedou k nesprávné funkci buňky, zástavě buněčného dělení a buněčné smrti. Vedle silného cytotoxického působení se oxaliplatina (na rozdíl od cisplatinu) vyznačuje schopností navozovat ICD, což bylo demonstrováno profylaktickou vakcinací na myších modelech [21]. ICD navozená tímto platinovým derivátem je charakterizována pre-apoptotickou expresí CRT, aktivní sekrecí ATP a post-apoptotickým uvolněním molekuly HMGB1 (tab. 1) [21]. Léčba oxaliplatinou vede ke zvýšení exprese HLA molekul I. třídy na povrchu nádorových buněk, což napomáhá imunitnímu systému tyto buňky identifikovat a odstraňovat [22]. Z nedávno

publikované studie vyplývá, že *in vitro* aplikace oxaliplatinu zvyšuje expresi molekuly PD-L1 na povrchu plazmatoidních DC, které následně napomáhají T lymfocytární proliferaci a indukci protinádorové odpovědi.

Cyklofosfamid

Cyklofosfamid (CTX) je používán v terapii nádorových onemocnění od roku 1959, kdy byl schválen americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). V porovnání s ostatními chemoterapeutiky, které patří do skupiny DNA-alkylujících látek, CTX aktivuje imunitní systém a vykazuje antiangiogenní vlastnosti. Imunogenní vlastnosti CTX byly prokázány na imunokompetentních a nuda myších s mezoteliomem [23]. Pouze ve skupině imunokompetentních myší docházelo k regresi nádoru a ochraně proti živým nádorovým buňkám při preventivní vakcinaci. Imunogenní vlastnosti CTX jsou charakterizovány rychlou pre-apoptotickou expresí CRT a pasivním uvolněním molekuly HMGB1 (tab. 1) [17]. Fagocytóza nádorových buněk ošetřených CTX vede k fenotypické a funkční (produkce cytokinů IL-1 β , IL-6 a IL-12) aktivaci DC (obr. 1). Aplikace *in vivo* selektivně snižuje procento CD8 α^+ DC v sekundárních lymfoidních orgánech u myší, způsobuje expanzi DC v periferní krvi a zvyšuje infiltraci DC v nádorovém ložisku a ve spá-

dové lymfatické uzlině. Ve stejné studii bylo demonstrováno, že *in vitro* kultivace DC získaných z CTX léčených myší s populací regulačních T lymfocytů inhibuje jejich imunosupresivní vlastnosti a dochází k aktivaci protinádorové imunitní odpovědi [24]. Další klinicky významnou vlastností CTX je schopnost navodit lymfodepleci některých subpopulací lymfocytů. Metronomické dávky CTX (v dávce cca 50 mg/kg na myš; 100 mg/den na pacienta) navozují selektivní depleci regulačních T lymfocytů v periferní krvi, lymfoidní tkáni a nádorovém ložisku [25]. U pacientů léčených CTX je však situace komplexnější a publikovaná data nejsou jednotná: při léčbě CTX dochází pouze k nesignifikantnímu snížení procenta regulačních T lymfocytů v periferní krvi. V nádorovém mikroprostředí těchto pacientů bylo identifikováno zvýšené procento CD11c $^+$, CD68 $^+$ a CD8 $^+$ buněk a snížené procento CD25 $^+$ buněk [26]. Zároveň dochází během terapie CTX k produkci cytokinů stimulujících Th1 buněčnou odpověď v periferní krvi [27]. Tento fakt vysvětluje, proč u pacientů léčených CTX dochází k infiltraci CD8 T lymfocytů do nádorového ložiska. U léčených pacientů dochází naopak ke snížení hladiny cytokinů IL-10, TGF- β a NO v periferní krvi.

CTX patří mezi významné ICD induktory, který se vyznačuje mnoha imunomodu-

lačními vlastnostmi. Jeho efekt je však více než u jiných cytostatik závislý na dávce.

Bortezomib

Bortezomib, inhibitor proteazomu, byl schválen americkou FDA v roce 2003 pro léčbu pacientů s mnohočetným myelomem (Velcade). Proteazomální degradace hraje zásadní roli v proteínovém metabolismu buňky a podílí se na řízení buněčného cyklu, reparaci genomové DNA či mezibuněčné komunikaci. Pomocí tohoto děje jsou v buňce eliminovány chybně přepsané či nesprávně sestavené proteiny. Vazbou bortezomibu na podjednotku 26S proteazomu dochází k zástavě buněčného cyklu ve fázi G2/M vedoucí k apoptóze nádorových buněk. Imunogenní vlastnosti bortezomibu byly demonstrovány na myších léčených pomocí DC vakcíny pulzované nádorovými buňkami prsní žlázy ošetřenými bortezomibem. Takto léčené myši byly následně chráněny před formací transplantabilního nádoru [28]. Na základě těchto výsledků bylo později popsáno, že rozhodující roli v protinádorové imunitě aktivované bortezomibem má populace NK buněk a CD8 T lymfocytů [29]. Nádorové buňky ošetřené bortezomibem indukují aktivaci DC závislou na buněčném kontaktu a buněčné fagocytóze [10]. Tato stimulace je zprostředkována zejména díky expresi proteinů teplotního šoku (HSP70 a HSP90) a CRT na povrchu nádorových buněk po ošetření bortezomibem (tab. 1). Blokáce proteinů teplotního stresu a CRT pomocí specifických protilátek snižuje fenotypickou aktivaci DC pouze částečně. Naopak maturace DC je silně ovlivněna při použití protilátek proti CD91 receptoru či jeho down-regulací [30]. Aktivované DC následně indukují produkci IFN- γ protinádorově specifickými T lymfocyty [10].

Přes zmíněné pozitivní vlastnosti bortezomibu *in vitro* a *in vivo* je třeba zmínit, že přímá aplikace bortezomibu snižuje expresi MHC (major histocompatibility complex) molekul na povrchu DC [29] a snižuje životnost některých buněk imunitního systému (populací plazmacytoidních a myeloidních DC, aktivovaných T lymfocytů a DC derivovaných z monocytů), bez významného vlivu na populaci CD3 T lymfocytů.

UVC záření

Prozánětlivé působení UVC záření v kůži bylo poprvé zmíněno před 30 lety. Později byla popsána schopnost záření aktivovat ICD pomocí profylaktických imunizačních experimentů na imunokompetentních myších modelech [31]. V závislosti na použitém modelu UVC způsobuje jak apoptotickou, tak nekrotickou smrt nádorových buněk. Z popsaných DAMP molekul klíčových pro koncept ICD UVC indukuje pre-apoptickou expresi CRT a HSP70 a produkci HMGB1 (tab. 1). *In vitro* inkubace nádorových buněk ošetřených UVC s nezralými DC vede k intenzivní fagocytóze i v porovnání s nádorovými buňkami ošetřenými γ -iradiací. Tento proces vede k aktivaci DC, které indukují protinádorovou CD8T lymfocytární odpověď (obr. 1) [32]. Významnou roli v protinádorové imunitě aktivované UVC ošetřenými nádorovými buňkami hrají i NK buňky. Případná deplece NK buněk signifikantně snižuje cytotoxické vlastnosti splenocytů [31]. UVC přímo ovlivňuje produkci klíčových cytokinů pomocí aktivace NF- κ B a AP-1 signálních drah, což bylo demonstrováno v několika experimentálních studiích [33].

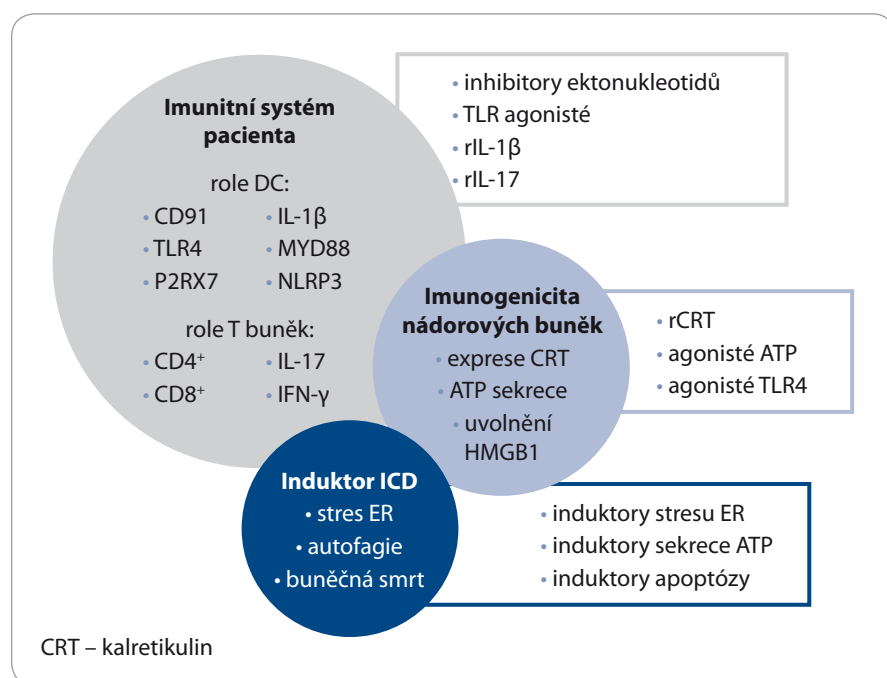
Radioterapie

Protinádorový účinek radioterapie je založený na porušení chemických vazeb mezi lipidovými membránami, proteiny a nukleovými bázemi DNA nádorových buněk. Vysoké dávky záření způsobují poškození DNA v rozsahu, které reparační mechanismy již nedokážou napravit, a dochází k aktivaci buněčné apoptózy. Vedle přímého vlivu radioterapie na nádorové buňky je třeba se zmínit o tzv. abskopálních (vzdálených) účincích. Mezi možné abskopální účinky radioterapie patří zpomalení růstu nádoru mediované T lymfocyty daleko od vlastního místa působení záření. Tento fenomén byl popsán u pacientů s rozličnými malignitami. Tento efekt může být vysvětlen imunogenními vlastnostmi záření, které byly prokázány *in vitro* u nádorových buněk, zároveň *in vivo* v myších modelech a v léčbě onkologických pacientů [34,35]. ICD indukovaná radioterapií je charakterizována pre-apoptickou expresí CRT a HSP70 a uvolněním

molekuly HMGB1 v pozdní fázi apoptózy (tab. 1) [36]. Lokální vysokodávková radioterapie vede k infiltraci nádorového ložiska aktivovanými DC [37]. Zároveň bylo popsáno, že DC pulzované buňkami melanomu ošetřenými zářením analogickým radioterapií jsou schopné indukovat T lymfocytární odpověď [38]. Toto tvrzení bylo doloženo *in vivo* v myších modelech, kde ozářené B16 (nádorová linie melanomu) nádorové buňky aplikované v imunizačních experimentech vedly k aktivaci IFN- γ produkujících splenocytů a imunitě proti živým nádorovým buňkám při profylaktické imunizaci. Z publikovaných výsledků vyplývá, že protinádorový efekt radioterapie je z části založen na T lymfocytární odpovědi. V souladu s tímto pozorováním jsou i výsledky studie, které ukazují, že ozářené nádorové buňky jsou ve větší míře rozpoznávány T lymfocyty *in vitro* a zvyšují účinnost adoptivní imunoterapie *in vivo* [39]. Radioterapie také snižuje procento regulačních T lymfocytů v periferní krvi, což je do velké míry závislé na dávce záření.

Vysoký hydrostatický tlak

Vysoký hydrostatický tlak (high hydrostatic pressure – HHP) v rozsahu 1–100 MPa je považován za fyziologický a působí reverzibilní morfologické změny buňky. Naopak hodnoty tlaku v rozmezí 150–250 MPa indukují buněčnou apoptózu jak u lidských, tak myších nádorových buněk. Nekrotická buněčná smrt je navozená HHP o hodnotách vyšších než 250 MPa [40]. Vlivem HHP dochází v nádorových buňkách k inhibici syntézy buněčných proteinů a zpomalení enzymatických funkcí. ICD navozená HHP byla nejprve popsána Gaiplem a spolupracovníky jako možná metoda ošetření nádorových buněk při výrobě protinádorové vakcíny [40]. Naše skupina v nedávno publikované studii identifikovala HHP jako induktor ICD u lidských nádorových buněk prostaty, ovarií a akutní myeloidní leukemie. Ošetření nádorových buněk HHP vede k rychlé translokaci chaperonových proteinů CRT, HSP70 a HSP90 na buněčný povrch a uvolnění molekuly ATP v prvních hodinách apoptózy. V pozdních fázích buněčné smrti dochází k uvol-



Obr. 2. Využití imunogenní buněčné smrti v konceptu protinádorové terapie a možné strategie navození imunogenní buněčné smrti *in vivo*.

ICD je závislá na kombinaci tří faktorů: 1. typu induktoru buněčné smrti, 2. imunitním systémem pacienta a 3. imunogenicitou nádorových buněk. Pouze adekvátní kombinace těchto tří parametrů navozuje optimální imunogenicitu nádorových buněk. Modalita, která nejsou schopné indukovat expresi CRT jako důsledek stresu ER, uvolnění ATP na základě aktivace autofagie a HMGB1 molekuly v průběhu sekundární nekrózy, nejsou schopné indukovat ICD. Z podobného důvodu nádorové buňky deficientní na mechanismus exprese CRT, sekrece ATP a HMGB1 nemohou podlehnout ICD. V takových případech je možné kompenzovat tyto nedostatky pomocí rozličných přístupů, jak ukazuje obrázek, např. aplikací induktorů stresu ER přímo do nádorového ložiska, rekombinantním (r)CRT, inhibitory ektonukleotidů, agonistů P2RX7, rIL-17 a rIL-1β. Na základě těchto výsledků může vzniknout protinádorová terapie šitá na míru konkrétnímu pacientovi, respektující typ daného nádorového mikroprostředí, benefit aplikované chemoterapie a imunitního systému léčného pacienta. Upraveno a převzato: Kroemer et al [5].

nění jaderného proteinu HMGB1 do okolí nádorové buňky. Expres a uvolnění zmíněných DAMP molekul má vliv na fenotypickou i funkční maturaci DC a indukcii protinádorové imunitní odpovědi, bez indukce imunosupresivní populace regulačních T lymfocytů (obr. 1) [15]. Imunogenicitu nádorových buněk ošetřených HHP *in vivo* je předmětem profylaktických a terapeutických experimentů na myších modelech. HHP není sice technicky možné použít přímo jako léčebnou modalitu, ale je možné tento postup využít pro standardizovanou přípravu imunogenních nádorových buněk. Z tohoto důvodu byl HHP implementován do výrobního protokolu imunoterapeutické vakcíny na bázi DC. HHP je používán k ošetření nádoro-

vých buněk, které slouží jako zdroj nádorových antigenů pro aktivaci DC [25]. V současné chvíli probíhá několik klinických studií fáze II a III u karcinomu prostaty, ovarii a plic, které využívají tento výrobní postup pro zhotovení individuálního léčivého přípravku DCVAC.

Induktory II. třídy

Fotodynamická terapie

Fotodynamická terapie (PDT) představuje léčebnou metodu založenou na akumulaci fotosenzitivní látky v nádorových buňkách a její aktivaci světlem určitého spektra vedoucí k produkci reaktivních kyslíkových radikálů (reactive oxygen species – ROS). Právě produkce ROS způsobí aktivaci buněčné apoptózy v místě nádorové buňky, kde došlo k na-

hromadění fotosenzitivní látky. Fotodynamická terapie aktivovaná hypericinem patří mezi induktory ICD II. třídy. Hypericin je primárně akumulován v oblasti ER nádorových buněk a po aplikaci záření dochází k indukci stresu ER. Nádorové buňky ošetřené hyp-PDT jsou ve zvýšené míře fagocytovány DC a způsobují jejich aktivaci [41]. Populace zralých DC následně indukuje protinádorovou T lymfocytární odpověď [41]. Takto ošetřené nádorové buňky exprimují CRT, HSP70 a aktivně sekretují ATP. Zároveň dochází k pasivnímu uvolnění HSPs do extracelulárního prostředí nádorových buněk [42]. V porovnání s ostatními popsány ICD induktory Hyp-PDT indukuje vysoce účinnou ICD, která je charakterizována zejména 1. zvýšenou expresí pre-apoptotických DAMP molekul nádorovými buňkami v porovnání s radioterapií a chemoterapií; 2. translokací CRT nezávislou na dalších DAMP molekulách (např. ERp57), se kterými vytváří komplexy; 3. jednoduchým způsobem přenosu DAMPs z intracelulárních kompartmentů na buněčný povrch bez zapojení většího množství mediátorů buněčných drah [17]. Mezi další významné imunostimulační vlastnosti Hyp-PDT se řadí inhibice produkce cytokinů, které podporují proliferaci nádorových buněk, jako je TNF, IL-6 a GM-CSF. Hyp-PDT zároveň snižuje produkci metaloproteinázy-9 nádorovými buňkami, enzymu, který je zodpovědný za invazivitu nádorových buněk do okolních tkání. Na druhou stranu však léčba Hyp-PDT způsobuje nejen poškození nádorových buněk, ale také nevratné změny stromatu a buněk imunitního systému v celém nádorovém mikroprostředí.

Coxsackie viry B3

Coxsackie viry CVB3 patří do skupiny RNA onkolytických virů, které se replikují v cytosolu hostitelských buněk, kde způsobují nezvratné změny metabolismu, homeostázy a způsobují buněčnou smrt. Produkce proteinů virových obalů hostitelskou buňkou vyvolává stres ER, díky čemuž dochází k indukci imunogenní apoptózy. Vlivem CVB3 virů dochází ke zvýšení imunogenicity nádorového mikroprostředí, zejména díky zvýšení angiogeneze a infiltrací

CD8 T lymfocytů. CVB3 viry indukují expresi CRT a sekreci ATP v časně fázi apoptózy, v pozdních fázích apoptózy sice dochází k uvolnění HMGB1 z jádra do cytosolu, nedojde však k jeho uvolnění do extracelulárního prostoru (tab. 1). Analýza nádorů izolovaných z nude myši po inkubaci s CVB3 viry prokázala akumulaci makrofágů, DC buněk, granulocytů a NK buněk. Přítomnost granulocytů a NK buněk je klíčová pro úspěšnou léčbu pomocí CVB3 virů. Schopnost způsobit imunogenní smrt nádorové buňky a aktivovat imunitní systém je připisována i jiným onkolytickým virům [43].

Shrnutí

ICD nádorových buněk nepochybně hraje úlohu v aktivaci mechanismů protinádorové imunity. V současné chvíli však stále chybí detailní identifikace vlivu induktorů buněčné smrti na imunitní systém *in vivo*. Používané léčebné strategie ovlivňují současně jak nádorovou buňku, tak i buňky imunitního systému. Tyto složité interakce a jejich konečný efekt jsou závislé na druhu nádoru, jeho stadiu, použité léčebné strategii i individuální reaktivitě konkrétního pacienta. Klinicky zajímavou otázkou otevřenou pro další vědeckou práci představuje role konceptu ICD v identifikaci nových biomarkerů predikujících odpověď pacientů na protinádorovou léčbu. Z tohoto důvodu je třeba data získaná převážně v *in vitro* pokusech a *in vivo* zvířecích modelech ověřit v klinických studiích, charakterizovat roli jednotlivých DAMPs u rozličných malignit a snažit se najít korelaci s klinickým průběhem onemocnění markerů ICD. Na základě těchto výsledků pak může vzniknout protinádorová terapie šitá na míru konkrétnímu pacientovi, respektující typ daného nádorového mikroprostředí, benefit aplikované terapie a individuální reaktivitu imunitního systému léčeného pacienta (obr. 2).

Literatura

- Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(4): 298–306. doi: 10.1038/nrc3245.
- Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(10): 715–727.
- Mittal D, Coutin MM, Schreiber RD et al. New insights into cancer immunoediting and its three component phases – elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol* 2014; 27: 16–25. doi: 10.1016/j.coi.2014.01.004.
- Green DR, Ferguson T, Zitvogel L et al. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(5): 353–363. doi: 10.1038/nri2545.
- Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O et al. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol* 2013; 31: 51–72. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-100008.
- Dudek AM, Garg AD, Krysko DV et al. Inducers of immunogenic cancer cell death. *Cytokine Growth Factor Rev* 2013; 24(4): 319–333. doi: 10.1016/j.cytogfr.2013.01.005.
- Garg AD, Nowis D, Golab J et al. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1805(1): 53–71. doi: 10.1016/j.bbcan.2009.08.003.
- Garg AD, Dudek AM, Agostinis P. Cancer immunogenicity, danger signals, and DAMPs: what, when, and how? *Biofactors* 2013; 39(4): 355–367. doi: 10.1002/biof.1125.
- Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U et al. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J* 2009; 28(5): 578–590. doi: 10.1038/emboj.2009.1.
- Spisek R, Charalambous A, Mazumder A et al. Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications. *Blood* 2007; 109(11): 4839–4845.
- Garg AD, Krysko DV, Verfaillie T et al. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *EMBO J* 2012; 31(5): 1062–1079. doi: 10.1038/emboj.2011.497.
- Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A et al. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol Rev* 2007; 220: 47–59.
- Krysko DV, Vandenabeele P. From regulation of dying cell engulfment to development of anti-cancer therapy. *Cell Death Differ* 2008; 15(1): 29–38.
- Fucikova J, Kralikova P, Fialova A et al. Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response. *Cancer Res* 2011; 71(14): 4821–4833. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0950.
- Fucikova J, Moserova I, Truxova I et al. High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells. *Int J Cancer* 2014; 135(5): 1165–1177. doi: 10.1002/ijc.28766.
- Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 2007; 13(1): 54–61.
- Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A et al. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(12): 860–875. doi: 10.1038/nrc3380.
- Apetoh L, Mignot G, Panaretakis T et al. Immunogenicity of anthracyclines: moving towards more personalized medicine. *Trends Mol Med* 2008; 14(4): 141–151. doi: 10.1016/j.molmed.2008.02.002.
- Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ et al. Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* 2011; 334(6062): 1573–1577. doi: 10.1126/science.1208347.
- Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 2009; 461(7261): 282–286. doi: 10.1038/nature08296.
- Tesniere A, Schlemmer F, Boige V et al. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene* 2010; 29(4): 482–491. doi: 10.1038/onc.2009.356.
- Liu WM, Fowler DW, Smith P et al. Pre-treatment with chemotherapy can enhance the antigenicity and immunogenicity of tumours by promoting adaptive immune responses. *Br J Cancer* 2010; 102(1): 115–123. doi: 10.1038/sj.bjc.6605465.
- Schiavoni G, Sisti A, Valentini M et al. Cyclophosphamide synergizes with type I interferons through systemic dendritic cell reactivation and induction of immunogenic tumor apoptosis. *Cancer Res* 2011; 71(3): 768–778. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2788.
- Nakahara T, Uchi H, Lesokhin AM et al. Cyclophosphamide enhances immunity by modulating the balance of dendritic cell subsets in lymphoid organs. *Blood* 2010; 115(22): 4384–4392. doi: 10.1182/blood-2009-11-251231.
- Podrazil M, Horvath R, Becht E et al. Phase I/II clinical trial of dendritic-cell based immunotherapy (DCVAC/PCa) combined with chemotherapy in patients with metastatic, castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget* 2015; 6(20): 18192–18205.
- Audia S, Nicolas A, Cathelin D et al. Increase of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with metastatic carcinoma: a phase I clinical trial using cyclophosphamide and immunotherapy to eliminate CD4+CD25+ T lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 2007; 150(3): 523–530.
- Matar P, Rozados VR, Gervasoni SI et al. Th2/Th1 switch induced by a single low dose of cyclophosphamide in a rat metastatic lymphoma model. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 50(11): 588–596.
- Demaria S, Santori FR, Ng B et al. Select forms of tumor cell apoptosis induce dendritic cell maturation. *J Leukoc Biol* 2005; 77(3): 361–368.
- Schumacher LY, Vo DD, Garban HJ et al. Immunosenescence of tumor cells to dendritic cell-activated immune responses with the proteasome inhibitor bortezomib (PS-341, Velcade). *J Immunol* 2006; 176(8): 4757–4765.
- Cirone M, Di Renzo L, Lotti LV et al. Primary effusion lymphoma cell death induced by bortezomib and AG 490 activates dendritic cells through CD91. *PLoS One* 2012; 7(3): e31732. doi: 10.1371/journal.pone.0031732.
- Begovic M, Herberman R, Gorelik E. Increase in immunogenicity and sensitivity to natural cell-mediated cytotoxicity following *in vitro* exposure of MCA105 tumor cells to ultraviolet radiation. *Cancer Res* 1991; 51(19): 5153–5159.
- Brusa D, Garetto S, Chiorino G et al. Post-apoptotic tumors are more palatable to dendritic cells and enhance their antigen cross-presentation activity. *Vaccine* 2008; 26(50): 6422–6432. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.08.063.
- Wu S, Tan M, Hu Y et al. Ultraviolet light activates NFκB through translational inhibition of IκBα synthesis. *J Biol Chem* 2004; 279(33): 34898–34902.
- Ma Y, Conforti R, Aymeric L et al. How to improve the immunogenicity of chemotherapy and radiotherapy. *Cancer Metastasis Rev* 2011; 30(1): 71–82. doi: 10.1007/s10555-011-9283-2.
- Hodge JW, Ardiani A, Farsaci B et al. The tipping point for combination therapy: cancer vaccines with radiation, chemotherapy, or targeted small molecule inhibitors. *Semin Oncol* 2012; 39(3): 323–339. doi: 10.1053/j.seminoncol.2012.02.006.
- Obeid M, Panaretakis T, Joza N et al. Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2007; 14(10): 1848–1850.
- Huang J, Wang Y, Guo J et al. Radiation-induced apoptosis along with local and systemic cytokine elaboration is associated with DC plus radiotherapy-mediated renal cell tumor regression. *Clin Immunol* 2007; 123(3): 298–310.
- Strome SE, Voss S, Wilcox R et al. Strategies for antigen loading of dendritic cells to enhance the antitumor immune response. *Cancer Res* 2002; 62(6): 1884–1889.

39. Garnett CT, Palena C, Chakraborty M et al. Sublethal irradiation of human tumor cells modulates phenotype resulting in enhanced killing by cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 2004; 64(21): 7985–7994.
40. Weiss EM, Meister S, Janko C et al. High hydrostatic pressure treatment generates inactivated mammalian tumor cells with immunogenic features. *J Immunotoxicol* 2010; 7(3): 194–204. doi: 10.3109/15476911003657414.
41. Garg AD, Krysko DV, Vandenabeele P et al. Hypericin-based photodynamic therapy induces surface exposure of damage-associated molecular patterns like HSP70 and calreticulin. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61(2): 215–221. doi: 10.1007/s00262-011-1184-2.
42. Garg AD, Krysko DV, Vandenabeele P et al. DAMPs and PDT-mediated photo-oxidative stress: exploring the unknown. *Photochem Photobiol Sci* 2011; 10(5): 670–680. doi: 10.1039/c0pp00294a.
43. Coffin RS. From virotherapy to oncolytic immunotherapy: where are we now? *Curr Opin Virol* 2015; 13: 93–100. doi: 10.1016/j.coviro.2015.06.005.

Význam imunitního systému a možnosti imunoterapie u maligního melanomu

Importance of the Immune System and Immunotherapeutic Options in Malignant Melanoma

Krajsová I.

Dermatovenerologická klinika 1. LF UK a VFN v Praze

Souhrn

V posledních několika letech došlo k významným změnám v léčbě metastazujícího melanomu. Byly objeveny nové léčebné postupy využívající inhibice kontrolních bodů imunity k podpoře protinádorové imunitní reakce. Nejnovější výsledky studií s anti-CTLA-4 a anti-PD-1 monoklonálními protilátkami ukazují na schopnost imunoterapie významně prodloužit dobu přežití bez progresu a celkové přežití u pacientů s metastazujícím melanomem v porovnání s chemoterapií i dalšími léčebnými metodami. Článek je zaměřen na účinnost a bezpečnost těchto léčebných postupů a možné biomarkery léčebné odpovědi.

Klíčová slova

maligní melanom – imunoterapie – ipilimumab – nivolumab – pembrolizumab – kombinovaná imunoterapie – biomarkery

Summary

Over the past several years, many important changes in the treatment of metastatic melanoma have occurred. New treatment options have been discovered to exploit inhibition of immune checkpoints for promotion of antitumor immune response. Recent results of clinical studies with anti-CTLA-4 and anti-PD-1 monoclonal antibodies show the ability of immunotherapy to extend progression-free survival and overall survival in patients with metastatic melanoma when compared to chemotherapy and other therapeutic methods. This article focuses on efficacy and safety of these immunotherapeutic approaches and considered biomarkers of tumor response.

Key words

malignant melanoma – immunotherapy – ipilimumab – nivolumab – pembrolizumab – combined immunotherapy – biomarkers

Prohlašuji, že v souvislosti s výše uvedeným příspěvkem, jehož jsem autorem, mám střet zájmů s níže vypsányými společnostmi: BMS, MSD, Novartis a Roche (honoraria za konzultace a přednáškovou činnost).

I declare that, in connection with the above mentioned contribution, which I am an author, I have a conflict of interest with the following companies: BMS, MSD, Novartis and Roche (consultations and lectures honorarias).

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



MUDr. Ivana Krajsová, MBA
Dermatovenerologická klinika
1. LF UK a VFN v Praze
U Nemocnice 2
128 08 Praha 2
e-mail: krajsova@vfn.cz

Obdrženo/Submitted: 24. 7. 2015

Přijato/Accepted: 10. 9. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20154556>

Úvod

Melanom vzniká maligní transformací melanocytů, buněk neurální lišty, které v průběhu vývoje osídlují zejména bazální vrstvu epidermis a vlasových folikulů, ale některé cestují i dále do oblasti sliznic zažívacího, urogenitálního i dýchacího traktu. Melanocyty je možné prokázat i v různých strukturách oka, zejména v choroidee, nebo ucha, v kochle. Jednoznačně nejčastější klinickou variantou je primárně kožní melanom, ale vzhledem k uvedenému rozšíření melanocytů je nutné počítat i s možností jeho primárního vzniku mimo oblast kůže. Přesná příčina vzniku melanomu nebyla dosud prokázána, ale v etiologii melanomu hraje nezanedbatelnou roli ultrafialové (UV) záření vyvolávající typické pyrimidinové mutace a světlý kožní fototyp s převahou tvorby feomelaninu, který se podílí na vzniku kyslíkových radikálů v kůži. Transformace melanocytů v nádorové buňky je komplexní proces vznikající postupně celou řadou molekulárních odchylek, jako jsou genetické mutace a amplifikace onkogenů vedoucí k nekontrolovanému buněčnému růstu, angiogenezi a úniku z imunitního dohledu hostitele [1].

Primárním úkolem imunitního systému je ochrana před infekcí, ale již před mnoha lety bylo prokázáno, že je schopný reagovat i proti nádorovým buňkám. Základním rysem imunitního systému je schopnost rozlišit buňky těla vlastní a buňky těla cizí, tedy patogenní. Rozpoznání nádorových buněk, jako by byly cizí, je ale pro imunitní systém obtížnější, protože primárně vznikají z vlastních buněk, jsou obklopeny a maskovány autoantigeny a své „cizorodé“ antigeny umí dokonale skrýt. Význam imunitního systému při rozvoji melanomu je odvozován z různých pozorování. Melanom je imunogenní nádor s typickými diferenciačními antigeny jako MART-1, gp100, tyrozináza, tyrozinázový protein 1 a 2 (TRP1, TRP2), MAGE A3, NY-ESO-1. Průkaz celulární i humorální imunity proti uvedeným antigenům naznačuje, že imunitní systém je schopný rozpoznat tyto antigeny jako cizí. Na důležitou roli imunitního systému ukazují dále často pozorované parciální i kompletní spontánní regrese pri-

márního melanomu nebo průkaz tumor infiltrujících lymfocytů, kdy jejich množství a distribuce korespondují s příznivějším průběhem onemocnění. Také nemocní v imunosupresi, ať již iatrogenní, nebo vyvolané probíhajícími onemocněními mají vyšší riziko vzniku melanomu.

Na druhou stranu ale může dojít k rozvoji melanomu i u imunokompetentních, zcela zdravých jedinců. Za jednu z příčin je považována schopnost nádorových buněk produkovat imunosupresorické a proapoptotické faktory, které přímo v místě nádoru brání imunitnímu systému v jejich rozpoznání a blokují funkci cytotoxických T lymfocytů. Nádorové buňky mohou vydávat signály, které mění efektorové T lymfocyty v tolerantní T lymfocyty, které ještě navíc mohou podporovat lokální imunosupresi. Jedním z klíčových imunosupresorických faktorů jsou T regulační lymfocyty (Treg). Průkaz CD4⁺, CD25⁺, FOXP3⁺ Treg u melanomů v radiální fázi růstu naznačuje, že tyto buňky mohou navozovat imunitní toleranci v časných fázích vývoje melanomu [2].

Dalším s imunitou souvisejícím faktorem, který se může podílet na vzniku různých nádorů včetně melanomu, je chronický zánět. Ten podporuje iniciaci nádorů zvýšením četnosti DNA mutací i produkcí kyslíkových a dusíkových radikálů, které zase vyvolávají DNA instabilitu a její poškození. Aktivace tkáňových reparačních mechanismů pak indukuje proliferaci premaligních buněk a posiluje jejich přežívání. Intenzivní expozice kůže slunečnímu UVA i UVB záření vyvolává spálení kůže, tedy zánět, který pak spolu s dalšími účinky UV záření může podporovat rozvoj všech kožních nádorů včetně melanomu [3]. Stav imunitního systému hraje při vzniku melanomu jednu z velmi významných rolí. Melanom má na svém povrchu řadu antigenů, přesto dokáže často uniknout imunitnímu dohledu hostitele. Nádorové buňky jsou vybaveny četnými inhibičními mechanismy, které při interakci melanomu s T infiltrujícími lymfocyty mohou imunitní reakci blokovat, nádorové buňky se stanou pro imunitní systém neviditelné, vzniká nádorová tolerance [4]. Úkolem protinádorové imunoterapie je jednak zvýšení exprese či

prezentace nádorových antigenů a jednak modulace imunitního systému tak, aby byl schopen účinně reagovat proti nádorovým buňkám.

Imunoterapie melanomu

Již před desítkami let bylo prokázáno, že na různé formy imunoterapie odpovídá stabilně 10–30 % nemocných s metastazujícím melanomem [5]. Stále je ale obtížné zjistit, co způsobuje, že právě tyto nemocní na imunoterapii reagují. Na průběhu onemocnění, jeho progresi či regresi se velmi pravděpodobně stejnou měrou podílejí biologické vlastnosti nádoru a imunitní systém hostitele. Mezi mnoho let ověřované a rozvíjené imunoterapeutické postupy u metastazujícího melanomu patří různé typy nádorových vakcín, cytokinů i adoptivní imunoterapie. Žádná z těchto metod ale neprokázala takovou účinnost, která by našla uplatnění i v běžné klinické praxi, a nebudou proto předmětem tohoto sdělení.

Pochopení principů interakce mezi imunitním systémem a nádorovými buňkami vedlo v posledních letech k identifikaci řady klíčových molekul, které tento proces ovlivňují, a umožnilo významný rozvoj nových imunoterapeutických postupů. Jedním ze záměrů současné protinádorové imunoterapie je přerušení nádorové tolerance a restaurace přirozené funkce cytotoxických T lymfocytů s využitím monoklonálních protilátek (monoclonal antibodies – MoAb). Imunomodulační MoAb mohou být zaměřené na různé cíle v imunitním systému a jejich úkolem je vyvolat novou nebo odbrzdit z různých důvodů pouze dočasně zablokovanou imunitní reakci. Mohou být namířené proti inhibičním receptorům exprimovaným na aktivovaných T lymfocytech, jako jsou např. CTLA-4 (cytotoxický T-lymfocytární antigen-4) a PD-1 (programmed death-1) receptory či proti ligandům PD-1 receptoru PD-L1 (programmed death ligand-1) a PD-L2 (programmed death ligand-2). Zkouší se MoAb proti KIR receptorům (killer cell immunoglobulin like receptor) NK buněk nebo monoklonální protilátky, které aktivují kostimulační receptory na povrchu imunitních efektorových buněk, jako jsou

TNF (tumour necrosis factor) receptory označované OX40, CD137, GITR, či MoAb neutralizující imunosupresivní faktory uvolňované nádorovým mikroprostředím, jako je TGF- β 1 (transforming growth factor β 1) [6]. Do klinické praxe již byly na základě výsledků klinických studií u metastazujícího melanomu zavedeny MoAb proti CTLA-4 (ipilimumab) a proti PD-1 (pembrolizumab a nivolumab).

Anti-CTLA-4

CTLA-4 je jedna z klíčových molekul adaptivní imunitní odpovědi. Za fyziologického stavu je jejím úkolem ztlumit probíhající T lymfocytární reakci, funguje jako zpětnovazební negativní regulátor imunitní odpovědi. CTLA-4 brání nadměrné imunitní reakci, chrání před vznikem autoimunity, ale umožňuje vznik nádorové tolerance. Zablokování CTLA-4 ruší jeho inhibiční účinky, udržuje aktivitu T lymfocytů a tím i jejich případnou protinádorovou reakci. Zdá se, že blokáda CTLA-4 aktivuje i T lymfocyty, které jsou schopné reagovat proti vlastním antigenům nebo potlačovat Treg kontrolující za fyziologických okolností autoreaktivní efektorové T lymfocyty. To může být jedním z důvodů autoimunitních reakcí provázejících inhibici CTLA-4 [7]. V léčbě melanomu se zkoušely dvě MoAb namířené proti CTLA-4 – ipilimumab a tremelimumab, ale v současné době přešel do dalšího klinického využití pouze ipilimumab.

Ipilimumab

Ipilimumab je plně humánní IgG1 MoAb proti inhibičnímu receptoru CTLA-4 exprimovanému na aktivovaných cytotoxických T lymfocytech, který byl zkoušen u mnoha různých typů nádorů včetně melanomu. První studie fáze I a II, které hodnotily různé dávkování ipilimumabu i možnosti kombinací s vakcínami, dakarbazinem (DTIC) nebo cytokiny, naznačily jeho účinnost v léčbě metastazujícího melanomu i bezpečnost uvedených kombinací. Snížené renální funkce nebo hepatální dysfunkce neovlivňují významně farmakokinetiku ipilimumabu, stejně tak jako věk, pohlaví či pozitivita protilátek proti ipilimumabu [8].

Zásadní pro další klinické využití ipilimumabu byly dvě opakovaně citované studie – MDX010-20 a CA184-024. První z nich, registrační studie fáze III, jako první v historii léčby metastazujícího melanomu prokázala statisticky významnou účinnost ipilimumabu v prodloužení celkového přežití (overall survival – OS). Do studie bylo zařazeno 676 nemocných s metastazujícím melanomem, u kterých selhala minimálně jedna předchozí léčba. Trojramenná studie porovnávala účinnost monoterapie ipilimumabem v dávce 3 mg/kg proti kombinované léčbě ipilimumabem s gp100 vakcínou (ipilimumab + glykoprotein) či proti monoterapii gp100 vakcínou. Ipilimumab byl podáván ve třítydenních intervalech, celkem čtyři dávky. Při prvním hodnocení a mediánu sledování 20 měsíců byl medián OS 10,0 a 10,1 měsíce u pacientů léčených kombinací ipilimumab + glykoprotein a monoterapií ipilimumabem, zatímco u nemocných léčených samotnou gp100 vakcínou byl medián OS pouze 6,4 měsíce [9]. Rozdíl byl statisticky významný. Četnost léčebných odpovědí (response rate – RR) byla sice pouze 10,9 %, ale 60 % odpovědí přetrvávalo déle než dva roky [9]. Výsledky byly, na rozdíl od všech předchozích studií, natolik přesvědčivé, že na jejich základě byl ipilimumab v roce 2010 schválen FDA (Food and Drug Administration) a následně i EMA (European Medicines Agency) ve 2. linii léčby metastazujícího inoperabilního melanomu.

Do druhé studie označované CA184-024 byli zařazováni nemocní, kteří dosud nebyli pro metastazující melanom léčeni. Jednalo se o dvouramennou studii hodnotící účinnost ipilimumabu v dávce 10 mg/kg v kombinaci s DTIC proti monoterapii DTIC. Při kombinované léčbě došlo ke 24% snížení rizika progresie onemocnění a medián OS byl 11,2 měsíce u kombinace proti 9,1 měsíce při monoterapii DTIC [10]. Na rozdíl od předchozí studie byla léčba podávána do progresu či neúnosné toxicity léčby, ale po pěti letech byla přežívajícím nemocným nabídnuta možnost ukončení léčby. Výsledky této studie byly pro FDA i EMA základem pro schválení ipilimumabu i v 1. linii léčby metastazujícího melanomu. Následné sledování nemoc-

ných ve studii prokázalo, že dosažené léčebné odpovědi přetrvávají mnoho měsíců i let, čtyři roky po zahájení léčby přežívalo téměř 20 % pacientů [11].

Také řada dalších studií fáze II a III potvrdila účinnost ipilimumabu v léčbě metastazujícího melanomu charakterizovanou nižší četností léčebných odpovědí na úrovni 10–15 %, ale velmi dlouhou dobou jejich trvání. Pacienti, kteří na léčbu ipilimumabem zareagují, mají vysokou šanci na mnohaleté přežití. V současné době je FDA i EMA schválen ipilimumab pro 1. a 2. linii léčby metastazujícího melanomu. Aplikuje se v 90 min trvající nitrožilní infuzi v dávce 3 mg/kg celkem čtyřikrát v třítydenních intervalech. Objevují se první práce naznačující, že by doba aplikace mohla být zkrácena na 30 min [12].

Mechanismus účinku ipilimumabu je odlišný od principu chemoterapie a vzhledem k tomu je možné pozorovat i rozdílné typy léčebných odpovědí. Doba potřebná pro nastolení protinádorové imunitní odpovědi je delší než doba potřebná k přímému cytotoxickému účinku, a proto se odpovědi objevují většinou významně později. Popisovány jsou minimálně čtyři rozdílné typy léčebných odpovědí. Je to jednak typická částečná (partial remission – PR) či kompletní (complete remission – CR) odpověď jako u chemoterapie, nebo pouze velmi pomalé a nepatrné zmenšování nádoru hodnocené jako stabilizace onemocnění (stable disease – SD), která ale následně v odstupu mnoha týdnů či měsíců může přecházet v PR či CR. Výjimkou ale nejsou ani zcela atypické odpovědi, kdy ke zmenšení nádoru dochází až po jeho přechodném zvětšení, které imituje progresi onemocnění, nebo zmenšování celkové masy nádoru při současném vzniku nových ložisek. Hodnocení léčebných odpovědí v mnoha ipilimumabových studiích ukázalo na nutnost zavedení nových hodnotících kritérií – irRC (immune related response criteria), která na rozdíl od klasických RECIST nebo WHO kritérií berou v úvahu i uvedenou dynamiku odpovědí při léčbě ipilimumabem [13].

Nežádoucí účinky (NÚ) léčby jsou podmíněny také mechanismem účinku ipilimumabu. Potlačení inhibiční funkce

CTLA-4 receptoru znamená kromě zvýšené protinádorové aktivity také zvýšené riziko vzniku autoimunitních reakcí. Imunitně podmíněné NÚ dominují v toxicitě této léčby, a označují se proto jako irAEs (immune related adverse events). Jejich četnost i intenzita se zvyšuje s dávkou ipilimumabu. Při použití schváleného dávkování 3 mg/kg se objevují irAEs asi u 60 % nemocných, ale pouze u 10–15 % z nich se jedná o závažné NÚ stupně 3–4. Mezi nejčastější patří kožní toxicita v podobě generalizovaného pruritu nebo makulopapulózního exantému či vznik vitiliga. Nejzávažnější je gastrointestinální (GI) toxicita projevující se průjmovitou stolicí a v těžších případech kolitidou. Hepatotoxicitu se projevuje často pouze elevací transamináz či bilirubinu, bez klinických příznaků. Typickým NÚ při léčbě ipilimumabem je také endokrinní toxicita projevující se buď autoimunní thyreoiditidou, nebo hypofyzitidou. Lékem volby všech typů NÚ jsou kortikoidy, při závažnosti stupně 3–4 v dávkách 1–2 mg/kg. U endokrinní toxicity bývá nezbytná trvalá hormonální substituce. Základem úspěchu léčby NÚ je její včasné zahájení [14].

Anti-PD-1 a PD-L1

Imuno-onkologická léčba se snaží posílit nebo oživit vrozenou schopnost imunitního systému rozpoznávat cizorodé antigeny a za takové lze považovat i nádorové buňky. Další možností, jak potencevat imunitní systém, je inhibice PD-1 receptoru. Na rozdíl od CTLA-4 ovlivňuje PD-1 spíše pozdější efektorovou fázi imunitní reakce [15]. Zvýšenou expresi PD-1 receptoru na T lymfocytech vyvolává dlouhodobá zvýšená expozice cizorodým antigenům, např. při chronicky probíhajících infekcích nebo u nádorových onemocnění. Expresí ligandů pro PD-1 (označované PD-L1 a PD-L2) je indukována zánětlivými cytokiny, zejména INF- γ . PD-L1 bývá detekován na mnoha typech buněk, včetně nádorových, kde se předpokládá, že zvýšenou expresi vyvolává onkogenní signalizace. Po vazbě PD-1 s ligandem PD-L1 dochází ke spuštění inhibičního signálu, jehož výsledkem je anergie T lymfocytů a zabíjení protinádorové imunitní reakce. Expresí PD-L1 bývá pozorována

u řady nádorů včetně melanomu a je považována za jeden z mechanismů, kterými nádor uniká z dosahu imunitní kontroly, a současně často provází zvýšenou tumorigenezi a invazivitu nádorů. Zabíjení vazby mezi PD-1 a PD-L1 oživuje imunitní reakce v oblasti nádoru např. tím, že obnovuje aktivitu TILs (tumor infiltrating lymphocytes) buněk [16].

Nejčastěji zkoušenými monoklonálními protilátkami proti PD-1 receptoru jsou v současné době nivolumab a pembrolizumab, které již obdržely schválení FDA pro léčbu melanomu, a pidilizumab.

Nivolumab

Nivolumab je plně humánní IgG4 monoklonální protilátka proti PD-1 receptoru selektivně blokující jeho vazbu s PD-L1 a PD-L2 ligandy. Klinické studie fáze I byly zahájeny již v roce 2006 a jejich výsledky naznačovaly dobrou účinnost v léčbě různých solidních nádorů včetně melanomu a nižší toxicitu než při léčbě ipilimumabem nebo chemoterapií. Základem byla studie fáze I, ve které byl nivolumab podáván v několika dávkách (0,1–0,3–1,0–3,0–10 mg/kg) pacientům s různými typy nádorů, převážně se jednalo o melanom, plicní karcinom a renální karcinom. Objektivní léčebné odpovědi (overall response rate – ORR) byly popsány u 28 % nemocných a v případě použití dávky 3 mg/kg u 41 % pacientů. Nivolumab byl dobře tolerován, nejčastějšími NÚ byly únava, průjem, kožní toxicita, nechutenství a pneumonitida [17]. V roce 2014 byly publikovány výsledky dlouhodobého sledování pacientů s melanomem, kteří byli léčeni nivolumabem každé dva týdny po dobu 96 týdnů. Základním cílem bylo hodnocení OS, délka trvání léčebné odpovědi po ukončení léčby a dlouhodobá bezpečnost. Medián OS byl 16,8 měsíce a jeden rok přežívalo 62 % nemocných, dva roky 43 % pacientů. U 31 % nemocných byla patrná ORR s mediánem trvání 2 roky. Léčebné odpovědi pokračovaly i po ukončení léčby v rozmezí 16–56 týdnů. Nebyla pozorována nečekaná toxicita ani kumulativní toxicita a NÚ se v naprosté většině případů objevovaly v prvních šesti měsících léčby [18]. Účinnost nivolumabu byla

porovnána také s účinností chemoterapie. V letošním roce byly publikovány výsledky studie CheckMate 037. Do této studie bylo zařazeno 631 nemocných, kteří progredovali po léčbě ipilimumabem a pokud měli pozitivní *BRAF* mutaci, i po léčbě *BRAF* inhibitory. Jednalo se tedy o léčbu min. 2. linie. Nemocní byli randomizováni v poměru 2 : 1 na nivolumab nebo chemoterapii, jejíž výběr byl na zvážení ošetřujícího lékaře. Hlavními stratifikačními kritérii byly stav *BRAF* mutace, exprese PD-L1 nádorovými buňkami a odpověď na předchozí léčbu ipilimumabem. Primárními cíli studie byla četnost ORR a OS, s hodnocením v době, kdy prvních 120 pacientů léčených nivolumabem bylo sledováno min. 24 týdnů. ORR byly popsány u 31,7 % nemocných léčených nivolumabem proti 10,6 % pacientů ve skupině s chemoterapií. Medián doby do odpovědi byl 2,1 měsíce u nivolumabu a 3,5 měsíce u chemoterapie. Medián doby trvání ORR nebyl u nivolumabu dosažen a u chemoterapie byl 3,6 měsíce. Při porovnávání ORR podle stratifikačních kritérií nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly ani podle *BRAF* pozitivity či negativity, ani podle odpovědi na předchozí léčbu ipilimumabem. Překvapivě nebyl statisticky významný rozdíl v ORR ani podle exprese PD-L1 nádorem. Nicméně u nemocných s pozitivními PD-L1 melanomy bylo popsáno 44 % ORR proti pouhým 20 % u negativních PD-L1 nádorů. Nebyla pozorována žádná nečekaná toxicita nivolumabu [19]. Nivolumab prokazuje významně vyšší účinnost proti chemoterapii i v 1. linii léčby, jak ukazují výsledky studie publikované v letošním roce v New England Journal of Medicine. Do studie bylo zařazeno 418 pacientů s metastazujícím melanomem, kteří nebyli dosud léčeni a měli negativní *BRAF* mutaci. Primárním cílem studie bylo OS. Po prvním roce přežívalo 72,9 % nemocných léčených nivolumabem proti 42,1 % léčeným DTIC (HR 0,42; 95% CI 0,25–0,73; $p < 0,001$). Medián přežití bez progresu (progression-free survival – PFS) byl 5,1 měsíce u nivolumabu proti 2,2 měsíce u chemoterapie (HR 0,43; 95% CI 0,34–0,56; $p < 0,001$) a ORR byla 40,0 % ve skupině s nivoluma-

bem proti 13,9 % ve skupině s DTIC. Nejčastějšími NÚ byly únava, svědění kůže a nauzea. NÚ stupně 3–4 byly popsány u 11,7 % nemocných léčených nivolumabem a u 17,6 pacientů léčených DTIC [20]. Účinnost nivolumabu není závislá na stavu *BRAF* mutace. Ukazuje to retrospektivní analýza čtyř studií, do kterých bylo zařazeno 440 pacientů s metastazujícím melanomem. Všichni měli vyšetřenou *BRAF* mutaci a byli léčeni různými dávkami nivolumabu. Výsledky naznačují, že účinnost nivolumabu nebyla ovlivněna ani stavem *BRAF* mutace, ani předchozí léčbou *BRAF* inhibitory nebo ipilimumabem [21].

Pembrolizumab

Pembrolizumab je vysoce selektivní humanizovaná IgG4 monoklonální protilátka proti PD-1 receptoru. Zásadní pro klinické využití tohoto léku byly výsledky studie fáze I publikované v roce 2014. V této studii byli léčeni nemocní, u kterých došlo k progresi melanomu po minimálně dvou dávkách ipilimumabu. Byla porovnávána účinnost pembrolizumabu v dávce 2 mg/kg každé tři týdny proti 10 mg/kg každé tři týdny. Léčba byla podávána do progresu či toxicity. Primárním cílem studie byla ORR hodnocená podle RECIST kritérií nezávislou komisí. V době hodnocení byl medián sledování 8 měsíců. ORR byla u obou dávek 26 % a nelišila se ani toxicita, kdy nejčastějšími NÚ byla únava, svědění kůže a kožní exantém. Výsledky potvrdily účinnost pembrolizumabu v léčbě metastazujícího melanomu a byly základem pro jeho schválení FDA [22]. V další publikované studii byla porovnávána účinnost pembrolizumabu s ipilimumabem v léčbě metastazujícího melanomu. Pacienti, celkem bylo zařazeno 834 nemocných, byli randomizováni do tří ramen, na léčbu pembrolizumabem v dávce 10 mg/kg v intervalu dvou nebo tří týdnů anebo na léčbu ipilimumabem v dávce 3 mg/kg celkem čtyřikrát v třítydenních intervalech. Primárním cílem studie bylo hodnocení PFS a OS. Při první interim analýze bylo prokázáno, že obě dávky pembrolizumabu významně prodlužují PFS, odhadovaný medián PFS byl 5,5 a 4,1 měsíce u pembrolizumabu a 2,8 měsíce u ipilimumabu. Odhado-

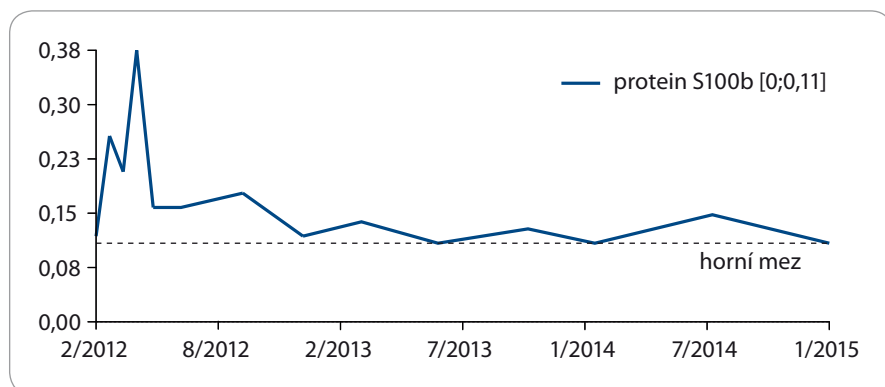
vané jednorroční OS bylo, při min. 12měsíčním sledování všech pacientů, 74,1 a 68,4 % pro nemocné léčené pembrolizumabem a 58,2 % pro pacienty léčené ipilimumabem. Medián OS nebyl dosažen v žádné skupině. Četnost léčebných odpovědí dosáhla 33,7 a 32,9 % u pembrolizumabu a 11,9 % u ipilimumabu. Z toho CR byly u 5,0, 6,1 a 1,4 %. Převažujícími NÚ byly opět únava, průjemy a kožní toxicita. Studie prokázala, že pembrolizumab je schopný prodloužit PFS i OS a že má nižší toxicitu než ipilimumab [23]. Stejně jako u nivolumabu byla i u pembrolizumabu porovnávána jeho účinnost s chemoterapií. První výsledky studie KEYNOTE-002 byly publikovány v červnu letošního roku. Do studie bylo zařazeno 540 pacientů s metastazujícím melanomem, u kterých selhala předchozí léčba ipilimumabem a v případě positivity *BRAF* mutace i léčba *BRAF* inhibitory. Nemocní byli randomizováni do tří ramen, pembrolizumab v dávce 2 mg/kg nebo 10 mg/kg každé tři týdny a dále chemoterapie podle zvažování ošetřujícího lékaře. Hlavními stratifikačními kritérii byl celkový stav pacienta, hodnota LDH a stav *BRAF* mutace. V současné době byl již uzavřen nábor pacientů do studie, ale pokračuje sledování i případná aplikace léčby. Předběžné výsledky ukazují, že PFS bylo u nemocných léčených pembrolizumabem proti chemoterapii významně zlepšeno, jak při dávce 2 mg/kg (HR 0,57; 95% CI 0,45–0,73; $p < 0,0001$), tak při dávce 10 mg/kg (95% CI 0,50, 0,39–0,64; $p < 0,0001$). Byla též potvrzena nižší toxicita proti chemoterapii a nebyly zaznamenány žádné neočekávané NÚ [24].

Nivolumab i pembrolizumab jsou účinné monoklonální protilátky proti PD-1 receptoru vyvolávající vyšší četnost léčebných odpovědí než inhibice CTLA-4 a menší toxicitu. Obě jsou v současné době schváleny FDA i EMA pro léčbu metastazujícího melanomu.

Kombinovaná imunoterapie

Inhibice CTLA-4 se projevuje převážně v časných stadiích aktivace T lymfocytů, inhibice PD-1 ovlivňuje T lymfocyty zejména v efektorové fázi, v mikroprostředí nádoru. Rozdílnost oblastí působení těchto MoAb naznačuje jejich

možné komplementární účinky. První klinický experiment s kombinací ipilimumabu a nivolumabu v léčbě melanomu proběhl již v roce 2009, kdy se ověřovaly různé dávky obou preparátů. Z 53 tehdy léčených pacientů byla pozorována CR u pěti a PR u 16 nemocných. Překvapující byla rychlá léčebná odpověď se zmenšením nádorových mas o ≥ 80 % i dlouhá doba trvání odpovědi [25]. Na základě těchto výsledků pak byly naprojektovány další studie fáze III s kombinací nivolumab a ipilimumab. Velmi slibné výsledky přinesla studie Checkmate 067, v které byla porovnávána účinnost kombinované léčby nivolumab + ipilimumab proti monoterapii nivolumabem a monoterapii ipilimumabem. Do studie bylo zařazeno 945 dosud neléčených pacientů s metastazujícím melanomem. Medián PFS při kombinaci nivolumab + ipilimumab dosáhl 11,5 měsíce proti 2,9 měsíce u monoterapie ipilimumabem (HR 0,42) a 6,9 měsíce při monoterapii nivolumabem (HR 0,57). Pacienti, kteří měli pozitivní expresi ligandu PD-L1 na nádorových buňkách, měli medián PFS 14 měsíců jak u kombinované léčby, tak při monoterapii nivolumabem, při monoterapii ipilimumabem byl u těchto nemocných medián PFS 3,9 měsíce. Trochu překvapivě bylo u pacientů s nádory PD-L1 negativními léčenými kombinací nivolumab + ipilimumab delší PFS – 11,2 měsíce proti pouze 5,3 měsíce při monoterapii nivolumabem. Výsledky naznačují, že kombinovaná léčba je významně účinnější proti monoterapii anti-CTLA-4 i proti monoterapii anti-PD-1. Vyšší je ale také toxicita, NÚ stupně 3–4 byly pozorovány u 55 % nemocných léčených kombinací nivolumab + ipilimumab, u 16,3 % léčených nivolumabem a u 27,3 % léčených ipilimumabem. Na hodnocení OS je zatím příliš brzy, první data budou dostupná pravděpodobně v průběhu příštího roku [26]. Také další studie publikovaná v letošním roce porovnávala účinnost kombinované léčby ipilimumab + nivolumab proti monoterapii ipilimumabem. Randomizováno bylo 142 nemocných s dosud neléčeným metastazujícím melanomem se známým stavem *BRAF* mutace. Primárním



Graf 1. Pokles hodnoty S100 proteinu při CR melanomu po léčbě ipilimumabem. CR trvá již tři roky.

CR – kompletní remise

cílem studie byla četnost léčebných odpovědí u BRAF negativních pacientů. K ORR došlo u 61 % nemocných léčebných kombinací a u 22 % byla pozorována CR onemocnění. U pacientů léčebných monoterapií ipilimumabem bylo dosaženo 11 % ORR a u žádného nemocného nedošlo k CR. Ve skupině s kombinovanou léčbou nebylo zatím dosaženo mediánu PFS, u pacientů léčených ipilimumabem byl 4,4 měsíce. V žádné skupině nebylo dosaženo mediánu doby trvání RR. Podobné výsledky byly pozorovány i u nemocných s pozitivní BRAF mutací, nezdá se tedy, že by BRAF mutace ovlivňovala účinnost imunoterapie. Neobjevily se žádné neočekávané NÚ léčby, stupeň 3–4 byl popsán u 54 % pacientů ve skupině s kombinací a u 24 % nemocných léčených ipilimumabem. ORR i PFS jsou signifikantně vyšší u nemocných léčených kombinací nivolumab + ipilimumab proti monoterapii ipilimumabem a i přes vyšší toxicitu je léčbu možné považovat za bezpečnou [27]. Kombinovanou imunoterapii využívající inhibice dvou významných kontrolních bodů imunity CTLA-4 a PD-1 tak můžeme považovat za velmi perspektivní a účinnou léčbu, jejíž využití v klinické praxi je jistě netrpělivě očekáváno.

V současné době je ale u melanomu komerčně dostupný pouze ipilimumab, nyní již v 1. i 2. linii léčby inoperabilního metastazujícího melanomu a velmi brzy budou pravděpodobně dostupné též anti-PD-1 protilátky pembrolizumab a nivolumab, u kterých ale zatím ne-

jsou známá indikační omezení úhrady v ČR.

Biomarkery léčebné odpovědi na imunoterapii

Biomarkery jsou biologické molekuly, které můžeme identifikovat ve tkáních, v krvi nebo v jiných tělních tekutinách jako indikátory nějaké klinicky významné situace. Využívají se pro určení přesnější diagnózy a prognózy onemocnění, odhadu pravděpodobné doby OS, určení účinnosti léčby nebo pro kontrolu jejího průběhu. Biomarkery můžeme rozdělovat na diagnostické, prognostické, zástupné a prediktivní. Za diagnostické biomarkery u melanomu jsou považovány zejména tkáňové biomarkery, jako je S100 protein, HMB 45 nebo Melan A. Prognostické biomarkery korelují s přirozeným průběhem, progresí nebo agresivitou onemocnění. Mohou ukazovat na riziko recidivy i naznačovat pravděpodobnou dobu OS. Využívají se, mimo jiné, pro stratifikaci pacientů v klinických studiích. U melanomu jsou za nejvýznamnější považovány tloušťka nádoru v mm (Breslow), přítomnost ulcerace a hodnota laktátdehydrogenázy (LDH) v séru. Zástupné biomarkery mohou být využívány pro sledování účinnosti léčby, u melanomu můžeme v některých případech považovat za zástupný biomarker hladinu S100 proteinu v séru (graf 1). Význam prediktivních biomarkerů spočívá v určování odpovědi na danou léčbu. Ideální je jejich znalost a dostupnost ještě před zahájením léčby, protože určují, nakolik bude

zvolená léčba účinná. Typickým příkladem je vyšetření BRAF mutace u melanomu. Pozitivita BRAF mutace označuje nemocné, kteří budou profitovat z léčby BRAF inhibitory, a naopak – pokud není BRAF mutace v nádoru prokázána, víme, že léčba BRAF inhibitory nebude účinná a nemá smysl ji podávat. Stav BRAF mutace ale neovlivňuje účinnost imunoterapie. Všechny dosavadní práce ukazují, že na imunoterapii odpovídají bez významného rozdílu pacienti BRAF pozitivní i negativní.

Existují tedy prediktivní markery léčebné odpovědi na imunoterapii?

V současné době probíhá na tomto poli intenzivní výzkum, protože dosud nebyla objevena jednoznačná imunologická nebo nádorová charakteristika, která by byla schopná determinovat odpověď na imunologickou léčbu. Byla ale popsána řada změn v různých imunologických markerech, které jsou pozorovány v průběhu imunoterapie a jsou spojeny s účinnější kontrolou onemocnění i zlepšením OS. V roce 2006 byly publikovány výsledky studie sledující NÚ adjuvantně podávaného INF- α u pacientů s pokročilým melanomem. Na souboru 200 léčených pacientů bylo prokázáno, že vznik autoimunitních reakcí v průběhu podávání INF- α je spojen se statisticky významným prodloužením RFS (relaps-free survival) i OS [28]. Nejčastěji pozorovanými projevy byly autoimunitní tyreoiditida a vitiligo. Bohužel ale dosud nejsme schopni ještě před zahájením léčby INF- α zjistit, u kterého pacienta vyvolá léčba vznik autoimunity, nejedná se tedy o prediktivní, ale pouze o zástupný či prognostický biomarker.

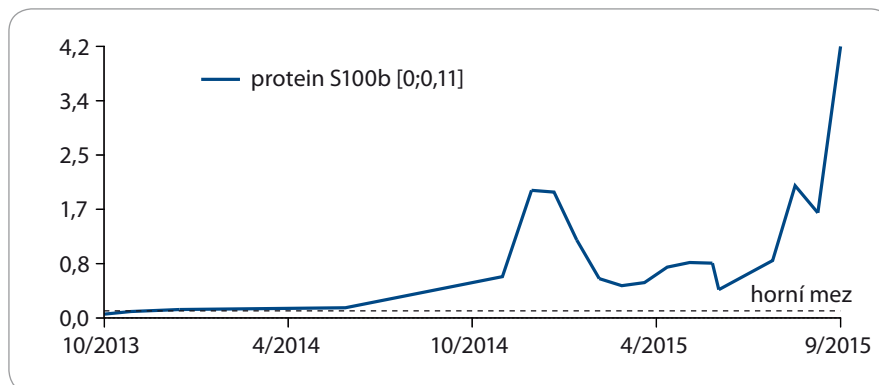
Imunoterapie metastazujícího melanomu inhibitory CTLA-4 vyvolává 15–20 % ORR. Kontrola onemocnění se stabilizací choroby bývá popisována přibližně u 30 % pacientů. Snaha zvýšit četnost léčebných odpovědí a docílit jejich dlouhé doby trvání u co nejvyššího počtu pacientů vyžaduje objevení takových biomarkerů, které by mohly předem určit léčebný účinek a současně by pomohly vybrat jen ty pacienty, kteří budou z léčby nejvíce profitovat.

Stejně jako v případě adjuvantní imunoterapie INF- α neznáme dosud jednoznačné prediktivní markery léčebné

odpovědi na imunoterapii anti-CTLA-4 či anti-PD-1 MoAb. Za nepříznivý prognostický marker je možné považovat elevaci LDH a CRP (C reaktivní protein) již před léčbou nebo jejich zvyšování v průběhu léčby. Stejně tak se u některých nemocných spolu s progresí onemocnění zvyšuje hladina S100 proteinu v séru (graf 2). Elevaci těchto biomarkerů můžeme považovat za známku vyšší závažnosti nebo progresi onemocnění, jedná se ale o prognostické či zastupné ukazatele, nemůžeme je objektivně hodnotit jako prediktivní markery léčebné odpovědi. Nadějně se zdálo hodnocení absolutního počtu lymfocytů v periferní krvi před a v průběhu léčby ipilimumabem [29]. Hodnoty ALC (absolute lymphocyte count) $> 1\,000\ \mu\text{L}$ označovaly nemocné se statisticky významně delším OS, než měli pacienti s ALC $< 1\,000\ \mu\text{L}$, a to jak před zahájením léčby, tak po první i druhé dávce ipilimumabu. Další podobné práce již ale takových jednoznačných výsledků nedosáhly.

Významnou roli by též mohlo hrát mikroprostředí nádoru. Zvýšená exprese Foxp3 a IDO (indoleamine dioxygenase) prokázána v biopsiích z nádoru před zahájením léčby ipilimumabem bývá spojena s vyšší účinností léčby. Zdá se tedy, podobně jako bylo pozorováno při léčbě IL-2, že nádory s výraznou zánětlivou lymfocytární infiltrací lépe odpovídají na léčbu ipilimumabem [30]. Na druhou stranu tento nádorový infiltrát není schopen sám o sobě nádor zlikvidovat, jedním z důvodů může být, že převažují negativní imunitní regulační faktory v důsledku chronicky probíhajícího zánětu.

Expres PD-L1 nádorem je významný, ale přesto zatím ne zcela dostatečný prediktivní biomarker odpovědi na terapeutickou blokádu PD-1. Nádory exprimující receptor PD-L1 odpovídají na léčbu častěji, ale odpovědi je možné pozorovat i u PD-L1 negativních nádorů. Nevýhodou je také omezená možnost vyšetření exprese PD-L1 nádorem, např. při biopsické nedostupnosti metastáz a dále heterogenní exprese PD-L1, která se kromě nádorových buněk nachází také na infiltrujících lymfocytech, monocitech nebo makrofágách.



Graf 2. Vzestup hladiny S100 proteinu korelující s progresí melanomu.

Identifikace biomarkerů označujících subpopulace pacientů nebo nádorů, které budou odpovídat na imunoterapii, je zásadní jak pro pochopení mechanismu účinku imunoterapie, tak pro vývoj nových imunoterapeutických kombinací. Účinnost inhibitorů CTLA-4 a PD-1 kolísá mezi různými typy nádorů i u jednotlivých pacientů a odhadnout předem odpověď je obtížné. Probíhá intenzivní výzkum, ale stále není jasné, jaké metody pro hodnocení interakce imunitního systému a nádoru použít, jak měřit imunitní odpověď nebo které buňky můžeme považovat pro léčebnou odpověď za nejvýznamnější, zda CD3^+ , CD4^+ , CD8^+ , Tregs, MDSC, nebo např. poměr $\text{CD8}^+/\text{FoxP3}$? Nevíme přesně, jak odpověď měřit, protože interpretace jednotlivých vyšetřovacích metod je velmi obtížná. Není také stále jasné, zda bude stačit jeden biomarker, nebo jich bude potřeba více. Odpovědi na tyto otázky musí přinést až další klinické studie.

Závěr

Pokrok v pochopení role imunitního systému při vzniku a progresi nádorů a identifikace významných kontrolních bodů imunity znamenaly nečekaný rozvoj imunoterapie jako velmi účinné léčebné metody u řady nádorů včetně melanomu. Pacienti s metastazujícím melanomem, jejichž pravděpodobná doba OS se pohybovala na úrovni týdnů nebo několika měsíců, mají nyní díky imunoterapii šanci na dlouhodobé OS. Zavedení anti-PD-1 protilátek a jejich kombinace s anti-CTLA-4 významně prohlubuje léčebné odpovědi, zvyšuje jejich četnost a navozuje dlou-

hou dobu jejich trvání. Zvýšená účinnost kombinované léčby je provázena také vyšší toxicitou, která je ale při dodržování základních zásad léčby NÚ imunoterapie dobře a bez následků zvládnutelná. Stále však zůstává mnoho dalších úkolů. Jedním z nich je možnost využití imunoterapie v adjuvantní léčbě pokročilého, vysoce rizikového melanomu. První výsledky studie EORTC 18071 naznačují, že ipilimumab proti placebu významně prodlužuje RFS u pacientů po operaci melanomu stadia III. Medián RFS byl 26,1 měsíce při léčbě ipilimumabem proti 17,1 měsíce ve skupině s placebem (HR 0,75; 95% CI 0,64–0,90; $p = 0,0013$). V následujícím období se očekávají výsledky hodnocení DMFS (distant metastasis free survival) a OS [31]. Zvýšená toxicita (u 52 % nemocných byla ukončena léčba předčasně pro NÚ) byla nejspíše způsobena použitým dávkováním 10 mg/kg. Pro budoucí adjuvantní studie bude jistě nutné zvážit dávku ipilimumabu i vzhledem k tomu, že v současné době se v léčbě metastazujícího melanomu používá dávka 3 mg/kg. Mezi další úkoly, které je nutné vyřešit, patří nalezení prediktivních biomarkerů léčebné odpovědi či ověření různých možností kombinace imunoterapie s cílenou léčbou BRAF a MEK inhibitory, cytokiny nebo chemoterapií.

Literatura

1. Sullivan RJ, Fisher DE. Understanding the biology of melanoma and therapeutic implications. *Hematol Oncol Clin North Am* 2014; 28(3): 437–453. doi: 10.1016/j.hoc.2014.02.007.
2. Shindo M, Yoshida Y. Regulatory T cells and skin tumors. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2010; 4(3): 249–254.

3. Aris M, Barrio MM, Mordoh J. Lessons from cancer immunoediting in cutaneous melanoma. *Clin Dev Immunol* 2012; 2012: 192719. doi: 10.1155/2012/192719.
4. Freeman-Keller M, Weber JS. Anti-programmed death receptor 1 immunotherapy in melanoma: rationale, evidence and clinical potential. *Ther Adv Med Oncol* 2015; 7(1): 12–21. doi: 10.1177/1758834014551747.
5. Rosenberg SA, Packard B, Aebbersold PM et al. Immunotherapy of patients with metastatic melanoma using tumor infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *N Engl J Med* 1988; 319(25): 1676–1680.
6. Galluzzi L, Vacchelli E, Pedro PJ et al. Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget* 2014; 5(24): 12472–12508.
7. Luke JJ, Ott PA. PD-1 pathway inhibitors: the next generation of immunotherapy for advanced melanoma. *Oncotarget* 2014; 6(6): 3479–3492.
8. Trinh VA, Hagen B. Ipilimumab for advanced melanoma. *J Oncol Pharm Practice* 2012; 19(3): 195–201. doi: 10.1177/1078155212459100.
9. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363(8): 711–723. doi: 10.1056/NEJMoa1003466.
10. Robert C, Thomas L, Bondarenko I et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2011; 364(26): 2517–2526. doi: 10.1056/NEJMoa1104621.
11. Wolchok JD, Hodi FS, Weber JS et al. Development of ipilimumab: a novel immunotherapeutic approach for the treatment of advanced melanoma. *Ann N Y Acad Sci* 2013; 1291: 1–13. doi: 10.1111/nyas.12180.
12. Momtaz P, Park V, Panageas KS et al. Safety of infusing ipilimumab over 30 minutes. *J Clin Oncol* 2015; 33(30): 3454–3458. doi: 10.1200/JCO.2015.61.0030.
13. Wolchok JD, Hoos A, O'Day S et al. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clin Cancer Res* 2009; 15(23): 7412–7420. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1624.
14. Weber JS, Kähler KC, Hauschild A. Management of immune-related adverse events and kinetics of response with ipilimumab. *J Clin Oncol* 2012; 30(21): 2691–2697. doi: 10.1200/JCO.2012.41.6750.
15. Luke JJ, Ott PA. PD-1 pathway inhibitors: the next generation of immunotherapy for advanced melanoma. *Oncotarget* 2014; 6(6): 3479–3492.
16. Mahoney KM, Freeman GJ, McDermott DF. The next immune-checkpoint inhibitors: PD-1/PD-L1 blockade in melanoma. *Clin Ther* 2015; 37(4): 764–782. doi: 10.1016/j.clinthera.2015.02.018.
17. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR et al. Safety, activity and immune correlates of antiPD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012; 366(26): 2443–2454. doi: 10.1056/NEJMoa1200690.
18. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF et al. Survival durable tumor remission and long term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol* 2014; 32(10): 1020–1030. doi: 10.1200/JCO.2013.53.0105.
19. Weber SJ, D'Angelo SP, Minor D et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomized, controlled, open label phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16(4): 375–384. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70076-8.
20. Robert C, Long VG, Brady B et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med* 2015; 372(4): 320–330. doi: 10.1056/NEJMoa1412082.
21. Larkin J, Lao CD, Urba WJ et al. Efficacy and safety of nivolumab in patients with BRAF V600 mutant and BRAF wild-type advanced melanoma: a pooled analysis of 4 clinical trials. *JAMA Oncol* 2015; 1(4): 433–440. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.1184.
22. Robert C, Ribas A, Wolchok JD et al. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab refractory advanced melanoma: a randomized dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet* 2014; 384(9948): 1109–1117. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60958-2.
23. Robert C, Schachter J, Long VG et al. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2015; 372(26): 2521–2532. doi: 10.1056/NEJMoa1503093.
24. Ribas A, Puzanov I, Dummer R et al. Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (Keynote-002): a randomized, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16(8): 908–918. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00083-2.
25. Wolchok JD, Kluger H, Callahan H et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2013; 369(2): 122–133. doi: 10.1056/NEJMoa1302369.
26. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzales R et al. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med* 2015; 373(1): 23–34. doi: 10.1056/NEJMoa1504030.
27. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med* 2015; 372(21): 2006–2017. doi: 10.1056/NEJMoa1414428.
28. Gogas H, Ioannovich J, Dafni U et al. Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with Interferon alfa. *N Engl J Med* 2006; 354(7): 709–718.
29. Ku YG, Yuna J, Page DB et al. Single-institution experience with ipilimumab in advanced melanoma patients in the compassionate use setting. Lymphocyte count after 2 doses correlates with survival. *Cancer* 2010; 116(7): 1767–1775. doi: 10.1002/cncr.24951.
30. Mahoney MK, Atkins MB. Prognostic and predictive markers for the new immunotherapies. *Oncology* 2014; 28 (Suppl 3): 39–48.
31. Eggermont AM, Chiarion-Sileni V, Grob JJ et al. Adjuvant ipilimumab versus placebo after complete resection of high-risk stage III melanoma (EORTC 18071): a randomized double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16(5): 522–530. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70122-1.

Imunoterapie renálního karcinomu

Immunotherapy for Renal Cell Carcinoma

Büchler T.

Onkologická klinika 1. LF UK a Thomayerova nemocnice, Praha

Souhrn

Východiska: Renální karcinom je charakteristický chemo- a radiorezistencí. V posledním desetiletí se v systémové léčbě renálního karcinomu uplatnily léky zaměřené proti angiogenezi a intracelulární signalizaci. **Cíl:** Poskytnout přehled vývoje imunoterapie u renálního karcinomu s důrazem na poslední publikované výsledky, jichž bylo dosaženo s novou generací imunologických léků. **Závěr:** Již dlouho je známo, že u malého počtu pacientů může nespecifická imunoterapie vést k dlouhodobé kompletní remisi. Pokroky v imunologii vedly k obnovenému zájmu o využití protinádorové imunoterapie v léčbě metastatického renálního karcinomu. Nejlepších výsledků ve studiích fáze I a II dosahují monoklonální protilátky proti receptoru PD-1 a jeho ligandu. Studie srovnávající imunoterapii se standardní cílenou léčbou probíhají.

Klíčová slova

renální karcinom – imunologie – imunoterapie

Summary

Background: Renal cell carcinoma is characterised by chemo- and radioresistance. Although drugs targeting angiogenesis and intracellular signaling have become the mainstay of systemic therapy for renal cell carcinoma in the last decade, latest immunotherapeutic approaches have achieved promising results. **Aim:** To review the development of immunotherapy for renal cell carcinoma, especially the results of published studies using novel immunotherapeutic agents including checkpoint inhibitors. **Results:** It has long been known that nonspecific immunotherapy may result in long term complete remission in a small number of patients. Advances in immunology have led to the renewal of interest in the use of anticancer immunotherapy for metastatic renal cell carcinoma. Promising results in phase I and II studies have been achieved using monoclonal antibodies against PD-1 receptor and its ligand. Studies comparing immunotherapy to standard targeted therapies are ongoing.

Key words

renal cell carcinoma – immunology – immunotherapy

Práce byla podpořena grantem VES 2015 15-34678A Agentury pro zdravotnický výzkum České republiky.

Supported by grant VES 2015 15-34678A from the Agency for Healthcare Research, Ministry of Health, Czech Republic.

Autor deklaruje, že v souvislosti s předmětem studie nemá žádné komerční zájmy.

The author declares he has no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicinských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



doc. MUDr. Tomáš Büchler, Ph.D.

Onkologická klinika

1. LF UK a Thomayerova nemocnice

Vídeňská 800

140 59 Praha 4

e-mail: tomas.buchler@ftn.cz

Obdrženo/Submitted: 20. 7. 2015

Přijato/Accepted: 17. 8. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20154S64>

Úvod

Karcinom ledvin (renal cell carcinoma – RCC) tvoří asi 2–3 % všech maligních nádorů v dospělosti. V roce 2012 byla incidence nádoru ledviny 28,9 a mortalita 10,5 případu na 100 000 obyvatel [1,2]. Incidence RCC v ČR je z neznámých důvodů nejvyšší na světě. Histologicky se ve většině případů jedná o adenokarcinom, jehož nejčastějším podtypem je světlóbněčný adenokarcinom.

V patogenezi sporadických RCC hraje významnou roli snížení exprese nebo funkce proteinu Von-Hippel Lindau (VHL), které jsou způsobené inaktivační mutací nebo hypermetylací jeho promotoru. Dysfunkci VHL lze nalézt u 83 % všech případů RCC a u 88 % případů světlóbněčného RCC.

VHL se podílí na buněčné a tkáňové reakci na hypoxii. Za normálních podmínek při dostatku kyslíku je VHL součástí komplexu degradujícího HIF- α (hypoxia-inducible factor- α). Jeho mutace vede k nadměrné přítomnosti HIF- α a podobným metabolickým změnám, k jakým dochází během hypoxie. Výsledkem je vysoce vaskularizovaný nádor, stimulace invazivního růstu a metastazování. Zároveň dochází k expresi molekul, které lze využít v imunoterapii jako antigeny asociované s nádorem, např. karboanhydrázy IX (CA IX) (obr. 1).

Část z těchto následků zvýšené exprese HIF- α je zprostředkována molekulou VEGF (vascular endothelial growth factor) přes její receptor na povrchu nádorových buněk a buněk vaskulatury (endotelových buněk a pericytů). Méně je známo, že VEGF hraje i roli v imunologických procesech (tab. 1) [3,4]. Inhibitory dráhy VEGF působí jednak na nádorové

buňky (stimulují apoptózu a brání jejich proliferaci), jednak na buňky mikroprostředí nádoru (inhibice nádorové angiogeneze).

Podíl imunitního systému na jejich léčebném efektu ovšem nelze vyloučit vzhledem k imunosupresivní aktivitě VEGF.

Druhým hlavním cílem biologické léčby metastatického RCC (mRCC) je proteinová kináza mTOR (mammalian target of rapamycin), důležitá součást mnoha metabolických a signálních drah. mTOR hraje také roli v imunitě a inhibitory mTOR byly původně vyvinuty k prevenci odvrhnutí štěpu při orgánových transplantacích. Inhibice signalizace mTOR zvyšuje aktivitu protinádorových paměťových lymfocytů, ale zároveň i aktivitu regulačních T lymfocytů [5]. Zatím není známo, nakolik se imunologické procesy podílejí na protinádorovém efektu inhibitorů mTOR.

Metody

Vyhledávání v PubMed bylo provedeno pomocí klíčových slov *immunotherapy AND (renal cell carcinoma)*. Další odkazy na zdrojové publikace byly získány prohlednutím referencí relevantních původních a přehledových článků. Odkazy na práce prezentované na odborných symposiích ASCO (American Society of Medical Oncology) a ESMO (European Society for Medical Oncology) byly získány z databází Google Scholar a ASCO Abstracts.

Výsledky a diskuze

Nespecifické

imunoterapeutické postupy

Spontánní regrese renálního karcinomu

Spontánní regrese metastáz RCC je raritní jev, který je nicméně dobře zdoku-

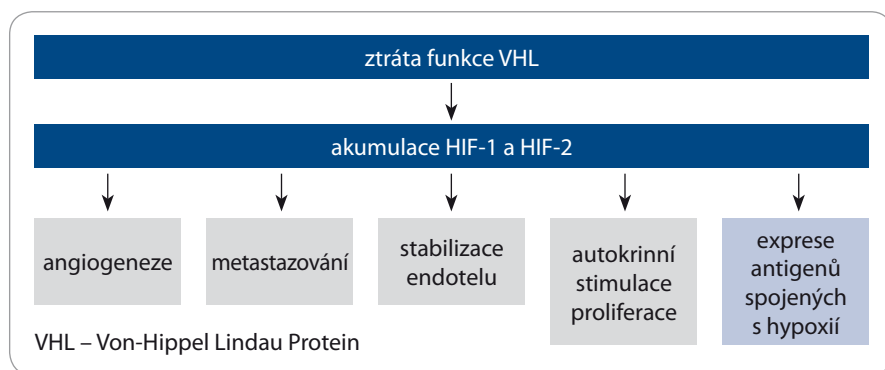
mentovaný v řadě publikovaných kauzistik. Spontánní regrese mohou být následkem protinádorových imunitních procesů, i když přímé důkazy chybí. Předpokládá se, že ke spontánní regresi může dojít u 1 % případů mRCC, zejména u nádorů světlóbněčné histologie. Spontánní regrese u mRCC bývají dlouhodobé. Není známo, zda je možné tyto procesy podpořit podáním cílených (nebo jiných) léků [6–8].

Léčba cytokiny

Imunoterapie cytokiny interferon α (IFN- α) a interleukin-2 (IL-2) se v léčbě mRCC používala od 80. let 20. století. Zatímco nízké dávky cytokinů prodlužovaly přežití pacientů s příznivými prognostickými faktory, neměly kurativní potenciál. Terapie vysokodávkovaným IL-2 však u malé části nemocných s mRCC navodila dlouhodobé kompletní remise („vyléčení“). Širší využití těchto léčebných postupů v praxi narazilo na absenci prediktivních faktorů pro úspěšnou léčbu a vysokou morbiditu a mortalitu spojenou s léčbou.

V době nástupu cílené léčby proti VEGFR a mTOR byla léčba cytokiny v podstatě opuštěna, kromě jejich indikace v kombinaci s monoklonální protilátkou proti VEGF bevacizumabem.

Nedostatečný účinek nespecifické imunoterapie se nyní přikládá příliš široké aktivaci imunitního systému, u něhož se projeví, a mohou dokonce dominovat i pronádorové imunologické mechanismy jako zvýšení frekvence regulačních



Obr. 1. Následky ztráty funkce VHL u renálního karcinomu

Tab. 1. Mechanizmy, jimiž může VEGF přispívat k imunodeficienci navozené nádorem negativní regulace prezentace antigenů dendritickými buňkami [4].

Následky zvýšené koncentrace VEGF v nádorovém mikroprostředí

- inhibice maturace dendritických buněk
- indukce apoptózy CD8⁺ T lymfocytů
- indukce aktivity T regulačních lymfocytů
- navození změn endotelu zabraňujících infiltraci nádoru lymfocyty

Tab. 2. Výsledky studií s protilátkami proti PD-1, PD-L1 a CTLA-4 u mRCC – uvedené jsou jen studie s vyšším počtem zařazených pacientů umožňující získat představu o klinické účinnosti terapie.

Studie	Populace pacientů	Cílová molekula	Režim	Počet pacientů	Celkové přežití	Jiné výsledky/ /komentář
Yang et al, 2007 [15] (fáze II)	pacienti předléčení IL-2	CTLA-4	ipilimumab úvodní dávka 3 mg/kg a poté 1 mg/kg à 3 týdny nebo 3 mg/kg à 3 týdny	61 (21 + 40)		ORR 10 % (6/61) 33 % pacientů závažná imunologická toxicita
Brahmer et al, 2012 [16] (fáze I)	pacienti s pokročilým nádorem	PD-L1	BMS-936559 10 mg/kg à 2 týdny v 6týdenním cyklu do max. 16 cyklů	17		ORR 12 % 41 % pacientů SD delší 6 měsíců
McDermott et al, 2014 [17] (fáze I)	pacienti s pokročilým nádorem	PD-L1	MPDL3280A à 3 týdny v dávkách 3–20 mg/kg	69 (58 hodnotitelných)		ORR 14 % medián délky odpovědi 54 týdnů
Plimack et al, 2015 [18] a Motzer, 2015 [14] (randomizovaná studie fáze II)	pacienti předléčení anti-VEGF léčbou a po ≤ 3 systémových terapiích	PD-1	nivolumab 0,3 mg/kg	59	18,5 měsíce	mPFS 2,7 měsíce
			nivolumab 2 mg/kg	54	25,5 měsíce	mPFS 4,0 měsíce
			nivolumab 10 mg/kg	54	24,8 měsíce	mPFS 4,2 měsíce
Hammers et al, 2015 [19] (fáze I, CheckMate 016)	pacienti s pokročilým nádorem	PD-1 a CTLA-4	nivolumab 3mg/kg + + ipilimumab 1mg/kg	47		ORR 38 % mPFS 30,3 týdne toxicita stupeň 3–4 34 %
			nivolumab 1mg/kg + + ipilimumab 3mg/kg	47		ORR 43 % mPFS 36,0 týdne toxicita stupeň 3–4 64 %
Choueiri et al, 2015 [20] (fáze I)	pacienti s pokročilým nádorem	PD-1	nivolumab 0,3, 2 nebo 10 mg/kg	91, z toho 56 dostupných biopsií: 18 PD-L1+, 38 PD-L1-	1leté přežití 71 % obě skupiny 2leté přežití 64 % PD-L1+ 48 % PD-L1-	
Sznol et al, 2015 [21] (fáze Ib)	pacienti s pokročilým nádorem	PD-L1	bevacizumab 15 mg/kg podán v 1. cyklu D1, dále podáván bevacizumab s MPDL3280A 20 mg/kg à 3 týdny	12		ORR 40 %

mRCC – metastatický renální karcinom, CTLA-4 – cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, IL-2 – interleukin-2, PD-1 – programmed death-1, PD-L1 – programmed death-1 ligand, ORR – celkové procento odpovědi, tj. součet celkových a částečných odpovědí, mPFS – medián přežití bez progresu

T lymfocytů a snížení frekvence cirkulujících myeloidních a plazmocytoidních dendritických buněk [9,10].

Transplantace alogenních hematopoietických buněk

Pro léčbu metastatických solidních nádorů lze využít reakci štěpu proti nádoru (graft vs. tumor effect) po alogenní transplantaci krvetvorných buněk. Klinické studie byly prováděny zejména u nemocných s melanomem a karcinomem ledviny. Ve studii pub-

likované Carvallem et al z 19 pacientů s mRCC po selhání cytokinové léčby dosáhli čtyři nemocní kompletní remise [11]. Všechny odpovědi nastaly u pacientů se světlobuněčným mRCC. Střední doba do nástupu nádorové regrese byla pět měsíců od nemyeloablativní transplantace. Pravděpodobnost regrese nádoru bylo vyšší u nemocných, u nichž bylo možné vysadit imunosupresivní medikaci (cyklosporin A), a těch, kteří dosáhli kompletního dárcovského chimerizmu.

Imunoterapie expandovanými lymfocyty infiltrujícími nádor

Lymfocyty infiltrující nádor (tumor-infiltrating lymphocytes – TIL) jsou heterogenní populací. Jejich část reaguje s nádorovými antigeny. U RCC proběhla dokonce randomizovaná studie, v níž se TIL získané z resekátu neselektivně expandovaly ex vivo pomocí IL-2 s následnou reinfuzí pacientům. Do této studie bylo zařazeno 178 pacientů. Nemocní v kontrolní skupině dostali placebovou infuzi, v obou ranenech byl kromě toho

aplikován IL-2 ve středních dávkách. Podání TIL ovšem nezlepšilo přežívání, ani nepřineslo zmenšení nádoru oproti kontrolní léčbě IL-2 samotným [12]. Tato imunoterapeutická strategie byla tudíž opuštěna. Dnes jsme schopni populaci TIL přesně analyzovat a víme, že podíl pronádorově působících typů lymfocytů může být i vyšší než podíl lymfocytů protinádorových, a může se dokonce zvýšit expanzí *ex vivo*.

Nové imunoterapeutické postupy

Terapie zaměřená na receptor PD-1

Programmed death-1 (PD-1) je receptor nacházející se na cytotoxických T lymfocytech. Jeho vazba s ligandem PD-L1 exprimovaným (kromě jiného) nádorovými buňkami RCC inhibuje protinádorovou celulórní imunitní odpověď. Inhibice T lymfocytů zprostředkovaná receptorem PD-1 je jedním z hlavních mechanismů imunologického úniku nádorových buněk.

U RCC byla prokázána spojitost mezi vysokou expresí PD-L1 nádorovými buňkami, přítomností cirkulujících PD-1(+) lymfocytů a pokročilým stadiem nádoru. Prerušení interakce PD-1 a PD-L1 je možné pomocí monoklonálních protilátek proti jedné nebo druhé uvedené molekule a jeho následkem je u části pacientů obnovení protinádorové imunity [13].

Dosud největší studie u RCC byla publikována v roce 2014. Pacienti s mRCC a progresí po cílené léčbě zaměřené proti VEGF (34 % z těchto pacientů bylo předléčeno i inhibitory mTOR) dostali v této studii fáze II nivolumab, plně humanizovanou monoklonální protilátku proti PD-1, ve třech různých dávkových schématech (0,3, 2 nebo 10 mg/kg intravenózně 3 týdny). Přežití bez progresce (progression-free survival – PFS) dosáhlo v těchto skupinách 2,7, 4,0 a 4,2 měsíce; celkové přežití (overall survival – OS: 18,2, 25,5 a 24,7 měsíce). OS dosahující až dva roky v této skupině pacientů svědčí pro účinnost této léčby. Terapie fungovala o něco lépe v podskupině nemocných s expresí PD-L1 nad 5 %, kteří tvořili asi čtvrtinu souboru [14].

Další zajímavou molekulou je MPDL-3280A, modifikovaná humánní monoklonální protilátka typu IgG1 proti

PD-L1 s odstraněnou funkcí Fc domény. Tato molekula zabraňuje vazbě PD-L1 na inhibiční receptory PD-1 a CD80 (B7.1) na aktivovaných T lymfocytech. MPDL3280A se zkouší i v kombinaci s bevacizumabem. Přehled těchto a dalších publikovaných nebo prezentovaných výsledků studií fáze I a II je uveden v tab. 2.

Zcela novou informací z července 2015 je skutečnost, že studie fáze III CheckMate 025 srovnávající nivolumab s everolimem u nemocných s progresí na léčbě anti-VEGF preparáty byla předčasně zastavena, protože pacienti léčení nivolumabem (3 mg/kg) měli lepší OS než pacienti léčení everolimem v kontrolním rameni. Do této randomizované studie bylo zařazeno 821 pacientů. Definitivní výsledky ještě nebyly publikovány ani prezentovány na konferencích, lze však předpokládat, že povedou ke změně standardu léčby mRCC.

Zda bude exprese PD-L1 prediktivním markerem u mRCC, je zatím otázkou. Zatímco výsledky anti-PD-1 léčby jsou o něco lepší u pacientů s PD-L1 pozitivními nádory, prospěch z léčby zřejmě mají i ostatní nemocní. Navíc stanovení exprese PD-L1 je metodologicky nedostatečně zvládnuto – např. u standardních fixovaných preparátů v parafínu dochází k postupné degradaci tohoto markeru.

Protilátky proti CTLA-4

Inhibiční receptor CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) má klíčovou úlohu v periferní toleranci T buněk pro antigeny asociované s nádorem. Blokáda CTLA-4 vede k obnovení protinádorové reaktivity imunitního systému a regresi nádorů u některých pacientů.

Protilátka proti CTLA-4 ipilimumab je zaměřená zejména proti regulačním T lymfocytům a již dnes je standardem v terapii melanomu. U mRCC výsledky zatím nelze hodnotit jako slibné – ve studii fáze II dosáhlo parciální regrese jen 10 % pacientů (6 ze 61), ale až u 33 % nemocných se vyskytla imunitní toxicita stupňů 2–4 a dva pacienti zemřeli na střevní perforaci [15].

Vysoká toxicita byla zaznamenána i ve studii kombinující anti-PD-1 protilátku nivolumab s ipilimumabem (tab. 2) [17].

Protinádorové vakcíny

Ve studii fáze II byla prováděna aktivní imunizace pomocí dendritických buněk naložených mRNA amplifikovanou z nádoru pacienta (preparát nazvaný AGS-003). Vakcína byla podávána souběžně s TKI sunitinibem. U 21 pacientů bylo dosaženo mediánu PFS 11,2 měsíce a mediánu OS 30,2 měsíce, což převyšuje výsledky obvykle dosahované se samotným sunitinibem. Aktivita AGS-003-specifických cytotoxických T lymfocytů korelovala s lepším OS. Toxicita vakcíny byla mírná – kožní reakce v místě podání, dočasná bolestivost lokálních lymfatických uzlin a chřipkovité potíže [22].

Monoklonální protilátky

proti antigenům asociovaným s nádorem

Girentuximab je chimérická monoklonální protilátka typu IgG1 proti CA IX, molekule spojené s hypoxií nebo také s dysregulací hypoxických drah, k níž dochází u RCC. Ve studii fáze III nazvané ARISER zkoumali Belldgrun et al adjuvantní léčbu girentuximabem u pacientů s vysoce rizikovým, kompletně resekovaným RCC. Efekt léčby girentuximabem nebyl prokázán u všech pacientů, ale zjistilo se, že se stoupající antigenovou densitou CA IX se účinnost adjuvantní terapie touto molekulou zvyšuje. U nemocných s vysokou expresí CA IX (asi 17–33 % pacientů s RCC podle různých kritérií a věku) měla léčba klinicky i statisticky významný účinek s prodloužením doby do relapsu z 51 měsíců v ramenu s placebem na 74 měsíců v ramenu s aktivní léčbou. Pokud se výsledky potvrdí, půjde o první úspěšnou systémovou léčbu snižující riziko recurence RCC alespoň u části pacientů [23].

Závěr

RCC je považován za nádor dobře ovlivnitelný imunoterapií. Podílejí se na tom zejména změny imunofenotypu nádorových buněk následkem charakteristických mutací v drahách souvisejících s buněčnou reakcí na hypoxii. Nespecifická imunoterapie cytokiny vede u RCC jen k mírnému prodloužení doby přežití nemocných. Hlavní naděje se nyní upírá k novým typům imunoterapeutické léčby, zejména protilátkám proti

PD-1 a PD-L1. Podle předběžných výsledků klinické studie by se v blízké budoucnosti mohla stát jedna z těchto molekul, nivolumab, novým standardem terapie 2. linie. Probíhají další studie srovnávající imunoterapie se standardní cílenou léčbou u mRCC.

Literatura

1. Dušek L, Mužík J, Kubásek M et al. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [monograph on the Internet]. Masarykova univerzita, Česká republika; 2005 [cited 2015 June 29]. Dostupný z: <http://www.svod.cz>.
2. Dušek L, Mužík J, Malúšková D et al. Incidence a mortalita nádorových onemocnění v České republice. *Klin Onkol* 2014; 27(6): 406–423. doi: 10.14735/amko2014406.
3. Terme M, Colussi O, Marcheteau E et al. Modulation of immunity by antiangiogenic molecules in cancer. *Clin Dev Immunol* 2012; 2012: 492920. doi: 10.1155/2012/492920.
4. Shrimali RK, Yu Z, Theoret MR et al. Antiangiogenic agents can increase lymphocyte infiltration into tumor and enhance the effectiveness of adoptive immunotherapy of cancer. *Cancer Res* 2010; 70(15): 6171–6180. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0153.
5. Wang Y, Sparwasser T, Figlin R et al. Foxp3+ T cells inhibit antitumor immune memory modulated by mTOR inhibition. *Cancer Res* 2014; 74(8): 2217–2228. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2928.
6. Bumpus HC. The apparent disappearance of pulmonary metastasis in a case of hypernephroma following nephrectomy. *J Urol* 1928; 20: 185–191.
7. Melichar B, Vanecková J, Morávek P et al. Spontaneous regression of renal cell carcinoma lung metastases in a patient with psoriasis. *Acta Oncol* 2009; 48(6): 925–927. doi: 10.1080/02841860902882451.
8. Rothermundt CA, Omlin A, Gillesen S. Sunitinib withdrawal phenomenon or spontaneous regression in renal cell cancer. *Ann Oncol* 2009; 20(6): 1144–1146. doi: 10.1093/annonc/mdp239.
9. van der Vliet HJ, Koon HB, Yue SC et al. Effects of the administration of high-dose interleukin-2 on immunoregulatory cell subsets in patients with advanced melanoma and renal cell cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13(7): 2100–2108.
10. Ahmadzadeh M, Rosenberg SA. IL-2 administration increases CD4+ CD25(hi) Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients. *Blood* 2006; 107(6): 2409–2414.
11. Carvallo C, Childs R. Nonmyeloablative stem cell transplantation as immunotherapy for kidney cancer and other metastatic solid tumors. *Cytotechnology* 2003; 41(2–3): 197–206. doi: 10.1023/A:1024839225920.
12. Figlin RA, Thompson JA, Bukowski RM et al. Multicenter, randomized, phase III trial of CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes in combination with recombinant interleukin-2 in metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 1999; 17(8): 2521–2529.
13. Bedke J, Kruck S, Gakis G et al. Checkpoint modulation – a new way to direct the immune system against renal cell carcinoma. *Hum Vaccin Immunother* 2015; 11(5): 1201–1208. doi: 10.1080/21645515.2015.1016657.
14. Motzer RJ, Rini BI, McDermott DF et al. Nivolumab for metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol* 2015; 33(13): 1430–1437. doi: 10.1200/JCO.2014.59.0703.
15. Yang JC, Hughes M, Kammula U et al. Ipilimumab (anti-CTLA4 antibody) causes regression of metastatic renal cell cancer associated with enteritis and hypophysitis. *J Immunother* 2007; 30(8): 825–830.
16. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012; 366(26): 2455–2465. doi: 10.1056/NEJMoa1200694.
17. McDermott DF, Sznol M, Sosman JA et al. Immune correlates and long term follow up of a phase Ia study of MPDL3280A, an engineered PD-L1 antibody, in patients with metastatic renal cell carcinoma (mRCC). *Ann Oncol* 2014; 25 (Suppl 4): iv280.
18. Plimack ER, Hammers HJ, Rini BI. Updated survival results from a randomized, dose-ranging phase II study of nivolumab (NIVO) in metastatic renal cell carcinoma (mRCC). *J Clin Oncol* 2015; 33 (Suppl): abstr. 4553.
19. Hammers HJ, Plimack ER, Infante JR et al. Expanded cohort results from CheckMate 016: A phase I study of nivolumab in combination with ipilimumab in metastatic renal cell carcinoma (mRCC). *J Clin Oncol* 2015; 33 (Suppl): abstr. 4516.
20. Choueiri TK, Fishman NM, Escudier B. Immunomodulatory activity of nivolumab in metastatic renal cell carcinoma (mRCC): association of biomarkers with clinical outcomes. *J Clin Oncol* 2015; 33 (Suppl): abstr. 4500.
21. Sznol M, McDermott DF, Fields Jones S. Phase Ib evaluation of in combination with bevacizumab (bev) in patients (pts) with metastatic renal cell carcinoma (mRCC). *J Clin Oncol* 2015; 33 (Suppl 7): abstr. 410.
22. Amin A, Dudek AZ, Logan TF et al. Survival with AGS-003, an autologous dendritic cell-based immunotherapy, in combination with sunitinib in unfavorable risk patients with advanced renal cell carcinoma (RCC): phase 2 study results. *J Immunother Cancer* 2015; 3: 14. doi: 10.1186/s40425-015-0055-3.
23. Belldegrun AS, Chamie K, Kloepper P et al. ARISER: a randomized double blind phase III study to evaluate adjuvant cG250 treatment versus placebo in patients with high-risk ccRCC – results and implications for adjuvant clinical trials. *J Clin Oncol* 2013; 31 (Suppl): abstr. 4507.

Význam imunitního systému a možnosti imunoterapie u karcinomu prostaty

Role of the Immune System and Possibilities of Immunotherapy in Prostate Cancer

Kubáčková K.

Onkologická klinika 2. LF UK a FN v Motole, Praha

Souhrn

Imunoterapie je v posledních letech díky novým znalostem v oblasti nádorové imunity součástí intenzivního výzkumu jako možné další strategie protinádorové léčby. Sipuleucel-T je prvním a zatím jediným léčivým přípravkem imunitní terapie schválený regulačními lékovými agenturami v USA a v Evropě pro léčbu asymptomatického či minimálně symptomatického generalizovaného kastročně-refrakterního karcinomu prostaty. Jedná se o první přípravek autologní buněčné terapie. Tento článek dále podává stručný přehled nových přístupů protinádorové imunoterapie v klinickém vývoji.

Klíčová slova

karcinom prostaty – nádorová imunita – imunoterapie – nádorové vakcíny

Summary

In recent years, thanks to new advances in tumor immunology, immunotherapy became a part of intensive research as a novel strategy in cancer treatment. Sipuleucel-T is the first and only medicinal product approved by the regulatory agencies in the USA and Europe for the treatment of asymptomatic or minimal symptomatic castrate-refractory prostate cancer. It represents the first product of autologous cell therapy. This article gives a brief overview of new approaches in cancer immunotherapy in clinical development.

Key words

prostate cancer – cancer immunity – immunotherapy – anticancer vaccines

Tato práce byla podpořena projektem (Ministerstva zdravotnictví) koncepčního rozvoje výzkumné organizace 0064203 (FN MOTOL).

This article was supported by the project (of Ministry of Health) of conceptual development of research organization, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic 00064203.

Autorka prohlašuje konflikt zájmu: Sotio – spoluřešitel klinické studie.

The author declares conflicts of interest for Sotio (investigator).

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



MUDr. Kateřina Kubáčková

Onkologická klinika

2. LF UK a FN v Motole

V Úvalu 84

150 06 Praha

e-mail:

katerina.kubackova@fnmotol.cz

Obdrženo/Submitted: 18. 8. 2015

Přijato/Accepted: 16. 9. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20154569>

Východiska

Historie protinádorové imunoterapie začala před téměř 150 lety. Mladý americký chirurg Wiliam Coley na základě pozorování spontánní regrese sarkomů u nemocných s komplikujícím erysipelem aplikoval intratumorózně živé či inaktivované kmeny *Streptococcus pyogenes* a *Serratia marcescens* s cílem aktivace imunitního systému stimulací zánětlivých procesů vedoucích k destrukci nádorových buněk. Tento přístup byl záhy opuštěn ve víře v efektivnější chirurgickou léčbu a chemoterapii. Intravezikální aplikace kmene Calmette-Guérin u superficiálního karcinomu močového měchýře byla jedinou výjimkou klinické aktivní imunoterapie.

Lidská imunita je velmi dynamický a flexibilní systém. Komunikaci nádoru a imunity můžeme rozdělit do třech fází: eliminace, equilibrium (rovnováha mezi imunitním systémem a nádorem) a escape (únik pozornosti imunitního systému). Eliminace je stav, kdy imunitní systém rozezná nádorovou buňku jako cizí organismus a je ji schopen eliminovat. Tento proces je zajištěn prezentací nádorových antigenů na povrchu podskupiny bílých krvinek – antigen-prezentujících buněk (antigen presenting cells – APC) [1]. Nádorové antigeny mohou být specifické pro tumory, ale některé se vyskytují i za fyziologických podmínek, což může představovat překážku v buněčné terapii, kdy se imunitní systém obrátí proti vlastním zdravým strukturám. Nezralé APC vychytávají v průběhu své aktivace nádorové antigeny a prezentují je pomocí MHC (major histocompatibility complex) molekul na svém povrchu společně s dalšími kostimulačními molekulami, které napomáhají aktivaci cytotoxických T lymfocytů. Nejúčinnějšími APC jsou dendritické buňky. Imunitní systém může být aktivován i díky molekulám zvaným damage-associated molecular patterns – DAMP [2]. Tyto molekuly jsou uvolňovány či prezentovány na buněčném povrchu buňkami umírajícími, podléhajícími stresu či buňkami poškozenými. Apoptotické buňky v důsledku protinádorové léčby, jako je chemoterapie a radioterapie, představují také zdroje DAMP vedoucí k odpovědi imunitního systému způsobující tzv. imuno-

genní buněčnou smrt. Důležitým faktorem pro udržení rovnováhy imunitního systému jsou kontrolní mechanismy fungující podobně jako brzda u auta, zabráňující hyperaktivitě a reakci proti vlastnímu organismu. CTLA-4 představuje jednu z molekul zapojených do těchto mechanismů, jejíž aktivace v kontextu eliminace nádorů je nežádoucí, a v současné době máme možnosti, jak ji eliminovat (ipilimumab, tremelimumab) [3]. PD-1 (programmed death) je další negativní regulátor imunitní odpovědi, který po vazbě na svůj ligand (PD-L1 či PD-L2) utlumuje a vypíná imunitní odpověď. PD-L1 a PD-L2 se objevují v místě zánětlivé reakce a přispívají k periferní toleranci vlastních tkání. Tento mechanismus ochrany před imunitním atakem je využíván i nádory a ukazuje se, že některé nádory exprimující PD-L1 mají horší prognózu než nádory bez PD-L1 exprese. Blokádou PD-1 anti-PD-1 protilátkami (nivolumab, MK-3475) lze umožnit delší a silnější protinádorovou odpověď [4,5].

V určité fázi růstu nádoru dochází k jisté rovnováze mezi procesy eliminace a nádorového růstu – equilibrium. Při selhání obranných mechanismů nádory unikají (escape) kontrole. Mluvíme o tzv. teorii tří E [6].

Dalším přístupem aktivace imunitního systému může být eliminace supresorových T regulačních lymfocytů (Treg), jejichž základní funkcí je zabránit vzniku autoimunních onemocnění, ale jejich přítomnost u nádorových procesů je nežádoucí, jelikož tlumí protinádorové imunitní mechanismy [7]. V experimentu se používají k jejich eliminaci protilátky k jejich povrchovému znaku CD 25, v klinických podmínkách se k jejich eliminaci uplatňují nízké dávky cyklofosfamidů (metronomické podání). Bylo prokázáno, že nádor stimuluje různé zánětlivé mechanismy (STAT-3, NF-κB, cytokiny – IL-6, IL-17, IL-23, TNF-α), jejichž inhibicí by bylo možné antagonizovat progresi nádoru i zvýšit aktivitu imunitního systému.

Místo imunoterapie v léčbě karcinomu prostaty

Androgeny jsou hlavním růstovým faktorem pro karcinom prostaty. Proto také hormonální manipulace u generalizovaného onemocnění představuje ve formě

blokády androgenních receptorů a kastrčního přístupu 1. linií terapeutického přístupu. Touto léčbou jsme schopni držet nemoc po kontrolou v průměru 3–4 roky. U nemocných, kde tento přístup selhal kastrčně-refrakterní karcinom prostaty, je medián přežívání kolem 2 let. V posledních letech se možnosti léčby choroby v tomto stadiu značně rozšířily. Byly registrovány dva nové blokátory androgenních receptorů – abirateron a enzalutamid a nové cytostatikum kabazitaxel pro léčbu nemocných předléčených docetaxelem a radium-223 pro nemocné se symptomatickými kostními metastázami a přípravek imunoterapie sipuleucel-T.

Sipuleucel-T je prvním léčivým přípravkem autologní buněčné imunoterapie, který byl schválen lékovými regulačními agenturami pro léčbu nemocných s asymptomatickou či minimálně symptomatickou kastrčně-refrakterní chorobou. Je příkladem vskutku personalizované medicíny. Vyrábí se z autologních, tělu vlastních monocytů, které jsou získávány z periferní krve leukoerézou, dále jsou tyto buňky kultivované *ex vivo* s fúzním proteinem prostatické kyselý fosfatázy (acid phosphatase – ACP) a růstovým faktorem – cytokinem pro monocyty (granulocyte-monocyte colony stimulating factor – GM-CSF) [8]. Během tohoto procesu dochází k aktivaci APC a poté je tento produkt aplikován nemocným ve třech podáních ve formě podkožní injekce s dvoutýdenním intervalem. Cílem je aktivace a proliferace antigen specifických T lymfocytů proti ACP vedoucí k eliminaci nádorových buněk. Sipuleucel-T byl schválen na základě výsledků randomizované studie fáze III IMPACT [9]. V této studii bylo 512 nemocných randomizováno v poměru 2 : 1 do ramene s aktivní léčbou a kontrolou léčených placebem. Vstupním kritériem byl výborný celkový stav dle ECOG (0–1), absence viscerálních metastáz a během posledních 28 dnů nesměli nemocní dostávat žádnou jinou protinádorovou terapii. Tato studie splnila svůj primární cíl, prokázala prodloužení celkového přežití (overall survival – OS) o 4,1 měsíce. Překvapivě tento výsledek nebyl transformován do sekundárního cíle doby do progresu (progression-free survival – PFS) onemoc-

nění. Studiová medikace byla dobře tolerována, nejčastějšími nežádoucími účinky byly třesavka, teplota, bolesti hlavy a myalgie. Některé parametry imunologické odpovědi (aktivace a počet APC a celkový počet jaderných buněk) signifikantně korelovaly s délkou OS [10]. Léčba sipuleucelem-T byla nejúčinnější u nemocných se vstupními nízkými hladinami PSA, tedy u nemocných, kde lze předpokládat méně pokročilé onemocnění. Absence korelace dat o OS a PFS onemocnění ukazuje na nevhodnost použití klasických kritérií léčebných odpovědí u solidních nádorů (RECIST) založených na metrických faktorech pro hodnocení efektu imunoterapie, jejíž efekt může nastupovat s delší latencí. V důsledku imunitní léčby s následnou infiltrací tumoru imunokompetentními buňkami a následnému peritumoróznímu otoku může přechodně docházet i ke zvětšení nádorových lézí či se mohou manifestovat léze, které před léčbou nebyly grafickými metodami identifikované. Proto jsou v současné době v klinických studiích testována modifikovaná „immune-related“ RECIST kritéria [11]. Sipuleucel-T je indikován podle mezinárodních léčebných doporučení (NCCN, EAU) pro 1. linii léčby u asymptomatických či minimálně symptomatických kastročně-refrakterních nemocných. Tato terapie by měla předcházet podání abirataronu, který je podáván v kombinaci s kortikosteroidy, a zároveň můžeme touto sekvenční strategií rozšířit možnosti léčby. Sipuleucel-T byl také zkoušen v časnějších fázích choroby, u androgenně dependentní choroby s detekovatelnými hladinami PSA po prostatektomii. Léčba neměla vliv na čas do biochemického relapsu. Zároveň však bylo prokázáno 48% prodloužení zdvojevacího času po normalizaci hladin testosteronu.

Sipuleucel-T se zkouší také v neoadjuvantní indikaci před operací. Studie fáze II probíhá s kombinací s abirataronem a kortikosteroidy. První časná data ukazují, že kortikoidy nemají vliv na parametry reflektující účinnost imunoterapie (aktivita APC, hladiny cytokinů) [12].

Léčivé přípravky v klinickém zkoušení

Ve studii fáze II byla studována vakcína s rekombinantním virem vakcinie a viru

ptačích neštovic kódující PSA a trojici kostimulačních molekul T lymfocytů (B7-1, ICAM-1, LFA-3) [13]. Ve skupině nemocných s vyššími hodnotami antigenně specifických T lymfocytů (PSA) byl trend k delšímu OS a poklesu Treg. Nemocní léčení vakcínou žili o 8,5 měsíce déle a bylo u nich dosaženo 43% redukce rizika úmrtí v následných třech letech. V současné době probíhá klinická studie fáze III u asymptomatických či minimálně symptomatických nemocných s kastročně-refrakterním metastatickým karcinomem.

Mechanismus účinku DNA vakcín je založen na podávání DNA plazmidů kódujících nádorové antigeny podávané společně s růstovým faktorem GM-CSF [14]. Tato léčba vedla k prodloužení zdvojevacího poločasu a identifikaci antigenně specifických T lymfocytů [15].

Vakcíny cílící pouze na jeden antigen mohou snadněji podlehnout selektivním tlakům a nádorové buňky s více antigeny snadněji unikají imunitní odpovědi. Proto byla snaha vyvinout vakcíny s několika antigeny. Největší zkušenosti byly publikovány s vakcínou GVAC integrující dvě allogenní buněčné linie karcinomu prostaty (LNCaP a PC3). Studie fáze III byla předčasně ukončena na základě výsledku interimové analýzy, která neprokázala rozdíly v primárním cíli studie prodloužení přežívání u nemocných v kombinaci vakcíny s docetaxelem a prednisonem u kastročně-refrakterních pacientů [16].

Ipilimumab je monoklonální protilátka blokující CTLA-4, „brzdu“ obranných imunitních mechanismů. V současné době je registrována pro léčbu generalizovaného melanomu. Data z klinických studií fáze I/II u nemocných s kastročně-refrakterním karcinomem prostaty vedla k otevření studie fáze III. Studie srovnávající OS nemocných léčených po selhání docetaxelu radioterapií v kombinaci s ipilimumabem či placebem neprokázala rozdíl mezi oběma rameny. Výsledky studie zjišťující efekt ipilimumabu u chemoterapii nepředléčených pacientů ve srovnání s placebem nejsou zatím k dispozici.

V současné době probíhá studie fáze I v kombinaci se sipuleucelem-T.

Tremelimumab je další monoklonální protilátka CTLA-4, jejíž klinické zkoušení probíhá ve fázi I.

Expres PD-1 (programmed death-1) povrchových molekul T lymfocytů představuje další kontrolní inhibiční mechanismus.

V klinickém zkoušení se nachází několik monoklonálních protilátek vůči PD-1 v různých indikacích solidních nádorů. Dostupná data o kombinaci anti-PD-1 léčby s ipilimumabem nasvědčují možnému komplementárnímu efektu této kombinované léčby. U nemocných s karcinomem prostaty je popsána výrazně vyšší exprese PD-1. Data z časných fází klinické studie zatím neprokázala klinický benefit tohoto terapeutického přístupu.

V klinické studii fáze I byla zkoušena protilátka OX-40 cílená na povrchovou OX-40-kostimulační molekulu, která po aktivaci T lymfocytů zvyšuje přežívání a antitumorózní efekt T lymfocytů [17,18].

Imunoterapeutický přípravek na bázi dendritických buněk DCVAC/PCA vyvinutý v Ústavu imunologie 2. LF UK a FN v Motole (Praha) testuje nyní česká biotechnologická firma Sotio. Sotio sponzoruje čtyři studie fáze II v různých stádiích karcinomu prostaty. U pacientů s hormonálně-refrakterním onemocněním je přípravek podáván v kombinaci s chemoterapií ve fázi III. klinického hodnocení, které bylo zahájeno v roce 2014. Výsledky se očekávají kolem roku 2018. Recentně byly publikovány první výsledky fáze I/II u nemocných léčených v kombinaci s vakcínou u metastatického-kastročně refrakterního karcinomu prostaty. Medián OS byl 19 měsíců, což bylo o 8,2 měsíce déle než predikované přežití dle Halabiho normogramu. Kombinovaná léčba nebyla provázena žádnými závažnými nežádoucími příznaky a vedla ke snížení počtu Treg lymfocytů [19].

Závěr

V době personalizované cílené terapie je nutností maximální úsilí o identifikaci biomarkrů léčebné odpovědi či toxicity, které by nám pomáhaly určit skupinu nemocných majících maximální profit z léčby. Toto platí i pro imunoterapii.

V současné době však pro tuto perspektivní léčebnou strategii na rozdíl od jiných solidních nádorů (*RAS* mutace, *HER-2* exprese, *BRAF* mutace) nemáme validované biomarkery. Imunoterapie prožívá nyní svoji renesanci a v blízké době se jistě setkáme s dalšími léčebnými molekulami v indikaci léčby karcinomu prostaty v různých stádiích onemocnění.

Literatura

1. Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P et al. Tumor antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2014; 14(2): 135–146.
2. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A et al. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2012; 12(12): 860–862. doi: 10.1038/nrc3380.
3. McNeel DG, Smith HA, Eickhoff JC et al. Phase I trial of tremelimumab in combination with short-term androgen deprivation in patients with PSA-recurrent prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61(7): 1137–1147. doi: 10.1007/s00262-011-1193-1.
4. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012; 366(26): 2455–2465. doi: 10.1056/NEJMoa1200694.
5. Tang PA, Heng DY. Programmed death 1 pathway inhibition in metastatic renal cell cancer and prostate cancer. *Curr Oncol Rep* 2013; 15(2): 98–104. doi: 10.1007/s11912-012-0284-2.
6. Ogino S, Galon J, Fuchs CS et al. Cancer immunology – analysis of host and tumor factors for personalized medicine. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8(12): 711–719. doi: 10.1038/nrclinonc.2011.122.
7. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy: done of age. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 480(7378): 480–489. doi: 10.1038/nature10673.
8. Burch PA, Breen JK, Buckner JC et al. Primary tissue-specific cellular immunity in a phase I trial of autologous dendritic cells for prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6(6): 2175–2182.
9. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 2010; 363(5): 411–422. doi: 10.1056/NEJMoa1001294.
10. Sheikh NA, Petrylak D, Kantoff PW et al. Sipuleucel-T immune parameters correlate with survival: an analysis of the randomized phase 3 clinical trials in men with castration-resistant prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2013; 62(1): 137–147. doi: 10.1007/s00262-012-1317-2.
11. Hoos A, Eggermont AM, Janetzki S et al. Improved endpoints for cancer immunotherapy trials. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102(18): 1388–1397. doi: 10.1093/jnci/djq310.
12. Fong L, Weinberg V, Chan SE et al. Neoadjuvant sipuleucel-T in localized prostate cancer: effects on immune cells within the prostate tumor microenvironment (abstract 2564). *ASCO annual meeting abstracts*. Accessed September 10, 2013.
13. Kantoff PW, Schuetz TJ, Blumenstein BA et al. Overall survival analysis of a phase II randomized controlled trial of a Poxviral-based PSA-targeted immunotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28(7): 1099–1105. doi: 10.1200/JCO.2009.25.0597.
14. Gulley JL, Arlen PM, Madan RA et al. Immunologic and prognostic factors associated with overall survival employing a poxviral-based PSA vaccine in metastatic castrate-resistant prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2010; 59(5): 663–674. doi: 10.1007/s00262-009-0782-8.
15. Small EJ, Reese DM, Um B et al. Therapy of advanced prostate cancer with granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res* 1999; 5(7): 1738–1744.
16. Higano C, Saad F, Somer B et al. A phase III trial of GVAX immunotherapy for prostate cancer vs. docetaxel plus prednisone in asymptomatic, castration-resistant prostate cancer (CRPC) (abstract LBA150). Presented at the Genitourinary Cancers Symposium. Orlando, Florida, February 26–28, 2009.
17. Cheng ML, Fong L. Beyond sipuleucel-T: immune approaches to treating prostate cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2014; 15(1): 115–126. doi: 10.1007/s11864-013-0267-z.
18. Schweizer MT, Drake CG. Immunotherapy for prostate cancer: recent developments and future challenges. *Cancer Metastasis Rev* 2014; 33(2–3): 641–655. doi: 10.1007/s10555-013-9479-8.
19. Podrazil M, Horvath R, Becht E et al. Phase I/II trial of dendritic-cell based immunotherapy (DCVAC/PCa) combined with chemotherapy in patients with metastatic, castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget* 2015; 6(20): 18192–18205.

Dosavadní zkušenosti a perspektivy imunoterapie bronchogenního karcinomu

Present Experience and Perspectives of Immunotherapy of Lung Cancer

Havel L.

Pneumologická klinika 1. LF UK a Thomayerova nemocnice, Praha

Souhrn

Karcinom plic je celosvětově nejčastější typ maligního procesu. Je také celosvětově nejčastější příčinou úmrtí na zhoubný nádor – poměr mortalita/incidence je 0,87. Trvalého vyléčení je dnes možné dosáhnout pouze v raných stádiích choroby chirurgickou resekcí, popřípadě radikální radioterapií. To však přichází do úvahy pouze u asi 20 % nemocných. Výsledky léčby loko-regionálně pokročilého nebo metastatického karcinomu plic zůstávají i přes všechny dosažené pokroky neuspokojivé. I přes vylepšení ozařovacích technik, i přes zavedení nových cytostatik a nových tříd molekulárně cílených protinádorových léčiv se daří dosáhnout dlouhodobé kontroly nádorového procesu jen u malé části nemocných. Imunoterapie je léčebná modalita, která pro boj s nádorem využívá schopností vlastního imunitního systému. V článku jsou shrnuty autorovy 17leté zkušenosti s různými typy imunoterapie. Pozornost bude věnována velkým studiím s protinádorovými vakcínami START a MAGRIT, a zejména studiím z nastupující éry „checkpoint inhibitorů“. Pokusíme se též nastínit možné nové směry ve vývoji imunoterapie a její kombinace se stávajícími léčebnými postupy.

Klíčová slova

karcinom plic – imunoterapie – vakcíny – blokátory kontrolních bodů imunitních reakcí – protein 1 programované buněčné smrti

Summary

Lung cancer is the most common cancer in the world. Lung cancer is also the most common cause of death caused by cancer worldwide with fatality rate (the overall ratio of mortality to incidence) of 0.87. Nowadays, cure can be achieved only in early disease stages using surgical resection or radical radiotherapy. This approach can be considered only in 20% of patients. Outcome of therapy of loco-regionally advanced or metastatic lung cancer are unsatisfactory. Despite improvement of radiotherapy techniques, despite introduction of new cytostatics and new targeted therapies, long-term disease control could be achieved only in minority of patients. Immunotherapy is a therapeutic approach which uses the immune system itself against cancer. This article is a summary of the authors' 17-year experience with different immunotherapeutic agents. It will be focused on big anti-cancer vaccines trials START and MAGRIT, and especially trials in the upcoming era of 'checkpoint inhibitors'. Future perspectives of immunotherapy and its combination of recent therapeutic approaches will be considered.

Key words

lung cancer – immunotherapy – vaccines – immune checkpoint inhibitors – programmed cell death protein 1

Autor deklaruje, že v souvislosti s předmětem studie nemá žádné komerční zájmy.

The author declares he has no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



MUDr. Libor Havel

Pneumologická klinika

1. LF UK a Thomayerova nemocnice

Vídeňská 800

140 59 Praha 4

e-mail: libor.havel@ftn.cz

Obdrženo/Submitted: 27. 7. 2015

Přijato/Accepted: 27. 10. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20154573>

Úvod

Dlouhodobě neuspokojivé výsledky v léčbě plicního karcinomu vedly ke snaze o rozšíření terapeutického spektra o léčiva s novými a doposud nevyužívanými mechanismy účinku. Po roce 2000 jsme byli svědky narůstající intenzity výzkumu na poli imunoterapie karcinomu plic. Následující text je stručným průřezem zkušeností s různými typy imunoterapií za posledních 17 let, jak probíhaly na tehdejší Plicní klinice Nemocnice Na Bulovce.

Protinádorové vakcíny

Vakcinační přístup byl vůbec první zkoušenou imunoterapeutickou modalitou. Byla testována celá řada vakcín u nejrozličnějších stadií nemalobuněčného (non-small cell lung cancer – NSCLC) i malobuněčného plicního karcinomu (small-cell lung cancer – SCLC).

Studie SILVA

BEC2 je myší IgG2b protilátka, která indukuje antiidiotypovou odpověď na GD3 – glykosfingolipid overexprimovaný na membránách buněk SCLC. Studie SILVA testovala vliv BEC2 v kombinaci s BCG vakcínou u limitované formy SCLC s příznivou odpovědí na indukční chemoradioterapii. Do této studie fáze III bylo zařazeno 515 nemocných, z toho 258 do kontrolního ramene a 257 do vakcinačního ramene. BEC2/BCG vakcína byla aplikována intradermálně pětkrát během 10 týdnů. Kontrolní rameno bylo pouze sledováno, placebo zde použito nebylo. Primárního cíle studie – prodloužení celkového přežití (overall survival – OS) – dosaženo nebylo. Medián OS od randomizace byl 16,3 měsíce v kontrolním rameni vs. 14,3 měsíce ve vakcinačním rameni ($p = 0,3$). Hlavním problémem spojeným s vakcinacemi byla lokální kožní toxicita, která byla přítomna u všech nemocných, nejčastěji v podobě obtížně se hojících kožních defektů. Dle mého soudu ji však lze spíše přičíst na vrub BCG komponenty [1].

Studie START

Studie START je studie fáze III cílená na inoperabilní IIIA/IIIB stadium NSCLC. Zařazení mohli být nemocní, kteří měli po indukční chemoradioterapii stabi-

zaci nemoci nebo objektivní léčebnou odpověď. Indukční léčba musela obsahovat alespoň dva cykly chemoterapie platinovým dubletem, dávka záření musela být alespoň 50 Gy. Zkoumanou látkou byl tecemotid cílený na nádorovými buňkami defektně exprimovaný mucin 1. Do studie bylo celkem zařazeno 1 513 nemocných (1 006 na tecemotid, 507 na placebo). OS byl 25,6 vs. 22,3 měsíce v placebo rameni (HR 0,88; CI 22,5–29,2; $p = 0,123$). Primárního cíle studie tedy dosaženo nebylo. Významný rozdíl v OS byl sledován pouze u nemocných léčených konkomitantní chemoradioterapií: 30,8 vs. 20,6 měsíce (HR 0,78; CI 0,64–0,95; $p = 0,016$). V sekvenčním rameni rozdíl v přežívání pozorován nebyl: 19,4 měsíce v rameni s tecemotidem vs. 24,6 měsíce v kontrolní skupině (HR 1,12; 95% CI 0,87–1,44; $p = 0,38$).

Přestože studie byla v primárním cíli OS negativní, na základě přesvědčivého rozdílu v celkovém přežívání v konkomitantním rameni byla naplánována a aktivována studie START 2. Ta měla zařazovat již pouze nemocné léčené konkomitantní chemoradioterapií. Tato studie však byla po necelém roce trvání na základě negativních dat ze souběžně probíhající stejně navržené studie japonské populace zastavena, což bylo pro všechny velké překvapení [2]. Je všeobecně známo, že se výsledky různých typů protinádorových léčeb u japonské populace liší od výsledků získaných na populaci kavkazské. Z toho důvodu se domnívám, že zastavení studie START 2 byla chyba. Samotná vakcinace byla velmi dobře snášena, počet aplikací u několika nemocných přesáhl 50. Extrémně dobrou snášenlivost dokládá skutečnost, že v praxi nešlo absolutně rozlišit, který z nemocných byl v zaslepené části studie léčen placebem a který tecemotidem [3].

Studie MAGRIT

Studie MAGRIT byla dosud největší celosvětově provedená vakcinační studie fáze III. Jejím cílem bylo zjistit, zda adjuvantní podání recMAGE-A3 + AS15 imunoterapeutika prodlužuje přežívání bez přítomnosti nemoci (disease-free survival – DFS) interval. Hlavním vstupním kritériem byl radikálně resekovaný karcinom plic IB–IIIA klinického stadia, který

byl MAGE-A3 pozitivní. Adjuvantní chemoterapie byla povolena. Z celkem 13 849 screenovaných nemocných mělo 4 210 pacientů MAGE-A3 pozitivní vzorek nádoru a 2 272 nemocných bylo randomizováno. Střední DFS byl 60,5 a 57,9 pro vakcinované, resp. placebo (HR 1,024; 95% CI 0,891–1,177; $p = 0,7379$). Výsledky studie byly pro odbornou veřejnost velkým zklamáním. Předpokládalo se, že nábor pouze předem selektovaných (MAGE-A3 pozitivních pacientů) přinese lepší výsledky. Snášenlivost byla velmi dobrá a opět bylo nemožné pro absenci nežádoucích účinků v praxi odlišit pacienty léčené vakcínou a placebem [4].

Studie FORTIS-M

Laktoferrin je přirozeně se vyskytující glykoprotein uplatňující se za normálních okolností v metabolismu železa. Talaktoferrin alfa je rekombinantní forma lidského laktoferinu produkovaná na kulturách *Aspergillus niger*. Talaktoferrin je po perorálním podání transponován v tenkém střevě do Peyerových plaků, kde urychluje zráním nezralých dendritických buněk transportujících nádorové antigeny. Studie FORTIS-M testovala, zda je u nemocných s pokročilým NSCLC talaktoferrin alfa účinnější než placebo, primárním cílem bylo OS. Zařazení mohli být nemocní po selhání nejméně dvou předchozích léčebných režimů, 57 % nemocných však bylo předléčeno více než třemi liniemi léčby. Léčba byla opět velmi dobře tolerována a v zaslepeném designu nešlo podle výskytu nežádoucích účinků nemocné léčené talaktoferrinem od nemocných v kontrolním rameni. Neprokázal se ale žádný efekt tohoto typu imunoterapie. Střední doba OS byla 7,66 měsíce u placeba a 7,49 měsíce v rameni s talaktoferrinem (HR 1,04; 95% CI 0,873–1,24; $p = 0,6602$) [5].

Blokátory kontrolních bodů imunitních reakcí

Jedním z mechanismů, kterým se maligní nádory snaží uniknout imunitnímu dozoru organismu hostitele, je navodit imunitní toleranci a tím se stát pro imunitní systém nedetekovatelnými. Toto provádí aktivací signálních drah, které organismy využívají za fyziologických podmínek k regulaci intenzity imunitní

odpovědi a k prevenci autoimunitního poškození zdravých tkání. Zde je tento mechanismus použit ve prospěch nádoru. Společným mechanismem účinku této lékové třídy je, že zablokováním receptorů těchto drah dojde k obnovení potlačené protinádorové imunity [6,7].

Anti-CTLA-4

Blokáda CTLA-4 s cílem zvýšit protinádorovou odpověď imunitního systému je zřejmě první v následné řadě blokátorů kontrolních bodů imunitních reakcí. Zatím byly testovány dvě látky – ticilimumab a ipilimumab.

Ticilimumab

Ticilimumab (nyní nazývaný tremelimumab) byl testován jako adjuvantní léčba u nemocných s pokročilým NSCLC, kteří neprogredovali po standardní léčbě platinovým dubletem. Primárního cíle – prodloužení přežití bez progresu (progression-free survival – PFS) po třech měsících léčby – nebylo dosaženo. V rameni s ticilimumabem byla zjištěna objektivní léčebná odpověď u 4,8 % pacientů. Toleranci léčby hodnotím z vlastního sledování jako velmi dobrou – nezaznamenali jsme žádný nežádoucí účinek typický pro tuto lékovou kategorii [8]. Na základě těchto negativních výsledků byl vývoj této protilátky na několik roků pozastaven. V současné době však byl klinický vývoj této molekuly obnoven. U NSCLC probíhá výzkum kombinace s anti-PD-L1 protilátkou MEDI 4736. Dále pak probíhají klinická zkoušení u maligního pleurálního mezoteliomu.

Ipilimumab

Ipilimumab je vůbec první CTLA-4 inhibitor zavedený do klinické praxe v léčbě solidních nádorů (konkrétně u maligního melanomu). Četnost výskytu mutací u epidermoidního a malobuněčného karcinomu, která se blíží frekvenci mutací u melanomu, byla teoretickým základem testování ipilimumabu u karcinomu plic.

CA184-156 byla dvojitě zaslepená studie fáze III testující účinnost ipilimumabu u extenzivní formy SCLC při standardní chemoterapii etoposid + cisplatin nebo karboplatina. Primárním cílem

bylo OS. Výsledky studie dosud nebyly publikovány.

CA184-104 byla sesterská studie fáze III testující účinnost ipilimumabu u pokročilého epidermoidního plicního karcinomu při standardní chemoterapii paclitaxel + karboplatina. Primárním cílem je OS nemocných. Studie doposud nebyla uzavřena.

V obou případech se jednalo o dvojitě zaslepenou, placebem kontrolovanou studii, takže bylo obtížné hodnotit kauzalitu nežádoucích účinků. Nicméně nežádoucí účinky, které by mohly být v souvislosti s nadměrnou aktivací imunitního systému, jsme zaznamenali. Jednalo se o případy kolitidy a endokrinopatií, s vesměs příznivou reakcí na imunosupresivní léčbu kortikosteroidy.

Anti-PD-1 a anti-PD-L1

Receptor programované buněčné smrti představuje v současnosti nejnadějnější cílovou strukturu v imunoterapii plicního karcinomu vůbec. Mechanismem účinku je inhibice primárně imunoinhibičního systému PD-1, čímž se dosáhne aktivace T lymfocytů a posílení protinádorové účinnosti imunitního systému. Přestože na našem pracovišti probíhalo více imunoterapeutických studií na bázi PD-1 blokády, reálně nejvíce zkušeností jsme získali ve studiích s protilátkou proti PD-1 nivolumabem.

Jednalo se o tři studie fáze III porovnávací monoterapii nivolumabem oproti standardní chemoterapii. Metodologicky se jednalo o open-label studie, což umožnilo lépe poznat specifika léčby touto novou molekulou. Zejména bylo díky odslepenému designu, kdy odpadá potíže s hodnocením kauzality, poznat diametrálně odlišný profil nežádoucích účinků. Nevídanou novinkou bylo i to, že při léčbě nivolumabem nemusí být radiologická progresie nemoci důvodem k ukončení léčby. Vychází to ze skutečnosti, že při tomto typu imunoterapie dochází k infiltraci nádorových lézí lymfocyty, což může vést k zvětšení těchto lézí. Pacient mohl tedy po dokumentované progresi v léčbě nivolumabem pokračovat, pokud je přítomen klinický benefit. Léčba se ukončovala až při pokračující progresi nádoru.

Podle dosavadních znalostí se zdá, že prokázaná PD-L1 exprese může být markerem účinnosti léčby. Ve studiích 017 a 057 nebyla PD-L1 pozitivita nutná k zařazení, a hodnotila se až retrospektivně. Do studie 026 však již byla PD-L1 pozitivita pro zařazení nezbytná.

CheckMate 017

Primárním cílem studie bylo zhodnotit OS nemocných s pokročilým epidermoidním plicním karcinomem po selhání předchozí chemoterapie založené na platině. Hodnotila se monoterapie anti-PD-1 protilátky nivolumab podávané v dávce 3 mg/kg à 2 týdny. V kontrolním rameni byla použita léčba docetaxelem 75 mg/m² à 3 týdny. Střední doba OS byla 9,2 měsíce v rameni s nivolumabem oproti 6,0 měsíce v kontrolním rameni (HR 0,59; 95% CI 0,44–0,79; $p < 0,001$). Překvapivé bylo, že nebyl zjištěn vztah mezi úrovní PD-L1 exprese na účinnost léčby. Z léčby nivolumabem měli prospěch i nemocní s nádory hodnocenými jako PD-L1 negativní.

Výsledky této studie byly předneseny na výročním zasedání ASCO 2015. Jednalo se o vůbec první důkaz superiority imunoterapie oproti klasické chemoterapii. Výsledky této studie byly podkladem registrace nivolumabu pro 2. linii léčby pokročilého epidermoidního karcinomu plic v USA i v EU [9].

CheckMate 057

CheckMate 057 byla paralelně probíhající, podobně designovaná studie jako studie CheckMate 017. Primárním cílem studie bylo zhodnotit OS nemocných s pokročilým neskvamózním plicním karcinomem po selhání předchozí chemoterapie založené na platině. Porovnávala se účinnost nivolumabu v dávce 3 mg/kg à 2 týdny oproti docetaxelu v dávce 75 mg/m² à 3 týdny. Výsledky této studie byly předneseny na výročním zasedání ASCO 2015. Střední doba přežití byla 12,2 měsíce v rameni s nivolumabem oproti 9,4 měsíce v kontrolním rameni (HR 0,73; 96% CI 0,59, 0,89; $p = 0,00155$). U pacientů s PD-L1 pozitivními nádory byla zjištěna vyšší účinnost léčby nivolumabem, v závislosti na stupni PD-L1 exprese. Tento rozdíl je nejspíše vysvětlitelný odlišnou etiopatogenezou.

genezí obou hlavních typů NSCLC, kdy chemickou karcinogenezí indukovaný epidermoidní karcinom s velkým množstvím mutací představuje díky své větší genetické odlišnosti pro T lymfocyty „lákavější cíl“ [10].

CheckMate 026

Tato studie sleduje účinnost nivolumabu oproti platinovému dubletu u PD-L1 pozitivních pacientů v 1. linii léčby. Jedná se o průlomový design, kdy je použita anti-PD-1 monoterapie v 1. linii léčby NSCLC. Primárním cílem studie je PFS. V případě progresu nemoci je možný crossover – přechod do druhého léčebného ramene. Nábor do studie je sice dokončen, u velké části nemocných však léčba dosud probíhá. Na výsledky studie a finální publikaci si tedy budeme muset ještě nějakou dobu počkat.

Výše popsané studie umožnily díky open-label designu dobře poznat povahu nežádoucích účinků. Jejich povaha je diametrálně odlišná od nežádoucích účinků myeloablativní chemoterapie a souvisí s aktivací imunitního systému. V naší praxi jsme zaznamenali v podstatě všechny doposud popisované nežádoucí účinky – kolitidy, hepatitidy, nefritidy, dermatitidy, hypofyzitidy, pneumonitidy. Pro běžnou praxi jsou nejzávažnější klinicky nápadné typy příhod, např. kolitidy s těžkými průjmy či pneumonitidy se závažnou dechovou nedostatečností. Tyto příhody, nejsou-li včas diagnostikovány a léčeny, mohou snadno skončit i fatálně. Na druhém pólu spektra se nacházejí příhody zpočátku klinicky nenápadné, které se projevují – alespoň v počátečních stádiích – pouze jako laboratorní abnormality, typicky hepatitida, endokrino-patie či nefritida. Nežádoucí účinky se mohou mezi sebou kombinovat, vyskytovat se současně či sekvenčně za sebou. Mohou vznikat i situace, kdy na pozadí příhody s klinicky zjevnými projevy probíhají další, méně nápadné au-

toimunitní příhody. Léčba těchto stavů spočívá v imunosupresivní léčbě vysokými dávkami kortikoidů, popř. infliximabem. Pro zvládnutí těchto stavů je klíčová zejména jejich včasná detekce a neodkladné zahájení imunosupresivní léčby. Její ukončování musí být prováděno postupným snižováním dávky kortikoidů v časovém horizontu 4–6 týdnů. Při rychlejším vysazování hrozí znovuvzplanutí autoimunitního zánětu. Po stabilizaci stavu nemocného je většinou možno v léčbě nivolumabem pokračovat. Pro zvládnutí těchto stavů byly vyvinuty diagnostické a terapeutické algoritmy, jejichž použití se nám v praxi významně osvědčilo.

Shrnutí a perspektivy budoucího vývoje

Imunoterapie se u plicního karcinomu zkoušela v nejrůznějších podobách po dlouhá léta a dosti uniformně s negativními výsledky. Toto mělo patrně výrazný vliv na formování obecného odborného povědomí jako o metodě neperspektivní a neúčinné. Rok 2015 však představuje milník v imunoterapii bronchogenního karcinomu. Pozitivní klinické studie dokladující prodloužení OS při použití nivolumabu ve srovnání se standardní chemoterapií v 2. linii léčby skvamózního i neskvamózního NSCLC představují zásadní změnu léčebného přístupu v této indikaci. Po maligním melanomu se karcinom plic stává v pořadí druhou malignitou, kde byla anti-PD-1 léčba registrována pro použití v klinické praxi.

V současnosti probíhá obrovské množství klinických studií hodnotících účinnost imunoterapie u NSCLC i SCLC. Testována je účinnost jak v 1., tak i ve vyšších liniích u metastatické nemoci. Testují se protilátky jak proti PD-1, tak proti PD-L1. V kombinaci s chemoradioterapií u III. klinického stadia se imunoterapie testuje jako udržovací léčba po dokončení standardní chemoradio-terapie. Jako součást adjuvantních léčebných postupů se testuje i u radikálně

operovaných nemocných. Sleduje se účinnost jako monoterapie, tak účinnost v kombinaci s chemoterapií či cílenými léčbami typu tyrozinkinázových inhibitorů u nemocných s EGFR či ALK mutacemi. Testují se i kombinace více imunoterapeutických agens (anti-PD-1 či anti-PD-L1 s CTLA-4 inhibitory). Pokud by byly výsledky stejně přesvědčivé jako dosavadní výsledky studií s nivolumabem, pak by zřejmě došlo k zcela zásadním změnám ve strategii léčby plicního karcinomu.

Literatura

1. Giaccone G, Debruyne C, Felip E et al. Phase III study of adjuvant vaccination with Bec2/bacille Calmette-Guerin in responding patients with limited-disease small-cell lung cancer (European Organisation for Research and Treatment of Cancer 08971-08971B; Silva Study). *J Clin Oncol* 2005; 23(28): 6854–6864.
2. Nokihara H, Katakami N, Hida T. Phase I/II study of tecemotide cancer immunotherapy for Japanese patients with unresectable stage III non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 2015; 33 (Suppl): abstr. 3036.
3. Butts C, Socinski MA, Mitchell PL et al. Tecemotide (L-BLP25) versus placebo after chemoradiotherapy for stage III non-small-cell lung cancer (START): a randomized, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015; 15(1): 59–68. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70510-2.
4. Vansteenkiste J, Byoung-Chul C, Vanakesa T et al. MAGRIT, a double-blind, placebo controlled phase III study to assess the efficacy of the recMAGE-A3 + AS15 cancer immunotherapeutic as adjuvant therapy in patients with resected MAGE-A3-positive non-small cell lung cancer. *Ann Oncol* 2014; 25 (Suppl 4): iv409.
5. Ramalingam S, Crawford J, Chang A et al. Talactoferrin alfa versus placebo in patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer (FORTIS-M trial). *Ann Oncol* 2013; 24(11): 2875–2880. doi:10.1093/annonc/mdt371.
6. Vesely MD. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* 2011; 29: 235–271. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101324.
7. Finn OJ. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Ann Oncol* 2012; 23 (Suppl 8): viii6–viii9. doi: 10.1093/annonc/mds256.
8. Zatloukal P, Heo DS, Park K et al. Randomized phase II clinical trial comparing tremelimumab (CP-675,206) with best supportive care (BSC) following first-line platinum-based therapy in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 2009; 27 (Suppl 15): abstr. 8071.
9. Brahmer J, Reckamp K, Baas P et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 373(2): 123–135. doi: 10.1056/NEJMoa1504627.
10. Paz-Ares L, Horn L, Borghaei H et al. Phase III, randomized trial (CheckMate 057) of nivolumab (NIVO) versus docetaxel (DOC) in advanced non-squamous cell (non-SQ) non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 2015; 33 (Suppl): abstr. LBA109.

Imunoterapie u bronchogenního karcinomu a její perspektivy

Immunotherapy of Bronchogenic Carcinoma and Its Perspectives

Koubková L.

Pneumologická klinika 2. LF UK a FN v Motole, Praha

Souhrn

Imunoterapie se stává další možnou alternativou v léčbě bronchogenního karcinomu. Jedná se o zcela odlišný způsob léčby nádorového onemocnění, který není zaměřený na samotný nádor, ale na imunitní systém. Povrchové antigeny přítomné na nádorových buňkách mohou být efektivním a specifickým léčebným cílem a strategie založená na protilátkách inhibujících kontrolní body imunitní reakce výrazně zlepšuje protinádorovou imunitní odpověď. Monoklonální protilátky blokující CTLA-4 (cytotoxický T lymfocytární antigen) a receptor PD-1 (protein programované buněčné smrti) a jeho ligand PD-L1 prokázaly klinickou účinnost a nivolumab (protilátka proti PD-1) byla schválena ve 2. linii léčby skvamózního nemalobuněčného karcinomu plic.

Klíčová slova

bronchogenní karcinom – vakcíny – kontrolní body imunitní reakce

Summary

Immunotherapy is becoming another possible alternative in the treatment of lung cancer. It is a completely different method of treating cancer which is not directed to the tumor itself, but to the immune system. Surface antigens present on tumor cells may be an effective and specific therapeutic targets and strategies based on antibodies inhibiting immune checkpoints significantly improves the anti-tumor immune response. Monoclonal antibody blocking CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen) and PD-1 receptor (protein programmed cell death) and its ligand PD-L1 showed clinical efficacy and nivolumab (anti-PD-1) was approved in 2nd line treatment squamous non-small cell lung cancer.

Key words

bronchogenic carcinoma – vaccines – immune checkpoints

Autorka deklaruje, že v souvislosti s předmětem studie nemá žádné komerční zájmy.

The author declares she has no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



MUDr. Leona Koubková

Pneumologická klinika

2. LF UK a FN v Motole

V Úvalu 84

150 06 Praha 5

e-mail: Leona.Koubkova@fnmotol.cz

Obdrženo/Submitted: 27. 7. 2015

Přijato/Accepted: 23. 10. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20154577>

Úvod

Bronchogenní karcinom je celosvětově onemocněním s vysokou incidencí a je nejčastější příčinou úmrtí ze všech zhoubných nádorů. V roce 2012 byla odhadována celosvětová incidence na 1,82 a mortalita na 1,6 milionu [1]. V době diagnózy se v 75–80 % případů jedná o onemocnění lokálně pokročilé či generalizované. Asi 85 % všech plicních karcinomů tvoří nemalobuněčný karcinom plic (non-small cell lung cancer – NSCLC). Navzdory léčebným snahám, při nepřítomnosti aktivujících EGFR mutací či ALK translokace je při konvenční chemoterapii průměrná doba přežití (overall survival – OS) 8–10 měsíců, pětileté OS je odhadováno na 4 %.

Imunoterapie nabízí zcela odlišný způsob léčby nádorového onemocnění, který není zaměřený na samotný nádor, ale na imunitní systém.

Vakcíny

Před několika lety jako možnost protinádorové imunoterapie u NSCLC byly testovány vakcíny. Například studie fáze III MAGRIT byla zaměřena na **MAGE-A3** (melanoma-specific antigen A3), ve které byla vakcína podávána pacientům po radikální resekci NSCLC stadia IB, II a IIIA po adjuvantní chemoterapii, jejichž nádor byl MAGE-A3 pozi-

tivní [2]. V 3/2014 však bylo oznámeno, že studie nesplnila svůj primární cíl, prodloužení doby bez progresu (progression-free survival – PFS) nemoci v porovnání s placebem, a byla proto ukončena. Ve studii fáze III START dostávali pacienti lipoproteinovou vakcínu **L-BLP25 (Tecemotide)**, která indukuje imunitní odpověď na nádorové buňky exprimující MUC1 (mucinous glycoprotein-1 antigen) [3]. Vakcína byla podávána po konkomitantní či sekvenční chemoradioterapii, jestliže nebyla prokázána progresse onemocnění. Studie neprokázala signifikantní zlepšení OS, ale léčebný efekt byl patrný v podskupině s konkomitantní chemoradioterapií, kde bylo dosaženo zlepšení OS o 10,2 měsíce. V 9/2014 byl vzhledem k negativním výsledkům studie prováděné v Japonsku program vývoje Tecemotidu zastaven.

Neuspokojivé výsledky protinádorových vakcín mají řadu příčin. Jedna z nich je heterogenita cílových antigenů. Imunitní reakce proti jednomu antigenu postihne pouze část buněk.

Stěží mohou ovlivnit nádory pokročilé, imunitou tolerované, s vysoce heterogenní skladbou svých antigenů a obtížným průnikem tak vysokého počtu T buněk do nádoru. Rovněž kontrolní body imunitní reakce mohou inhibovat odpověď T buněk na tyto vakcíny a v bu-

doucnu se může jako výhodná ukázat kombinace těchto dvou léčebných modalit.

Jako další možnost se jeví vakcíny s využitím dendritických buněk zejména v kombinaci s jinou protinádorovou léčbou.

Blokáda kontrolních bodů imunitní reakce

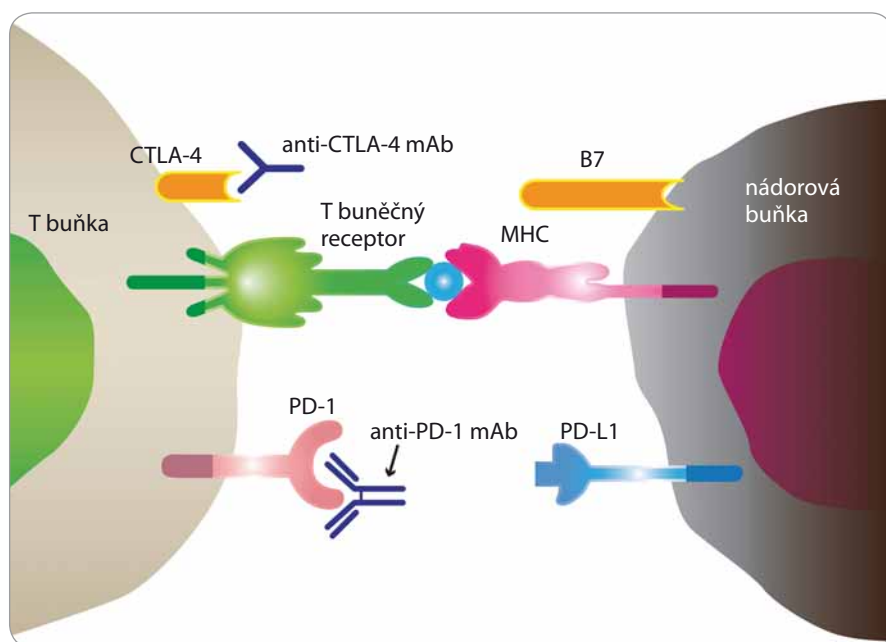
S poznáním kontrolních bodů imunitní reakce opět stoupl i zájem o imunoterapii NSCLC (obr. 1). Molekula CTLA-4 byla identifikována v roce 1987 francouzskými vědci. Jedná se o proteinový receptor na povrchu T buněk. Ale až v roce 2010 byly uveřejněny povzbudivé výsledky s anti-CTLA-4 protilátkou u metastatického melanomu. Molekula PD-1 byla popsána japonskými biologů počátkem 90. let minulého století. Monoklonální protilátky blokující CTLA-4 a receptor PD-1 a jeho ligand PD-L1 prokázaly klinickou účinnost ve studiích časně fáze a nyní probíhá celá řada studií u NSCLC i malobuněčného karcinomu plic (small-cell lung cancer – SCLC). Nivolumab (protilátka proti PD-1) byla schválena ve 2. linii léčby skvamózního NSCLC.

Anti-PD-1 protilátky

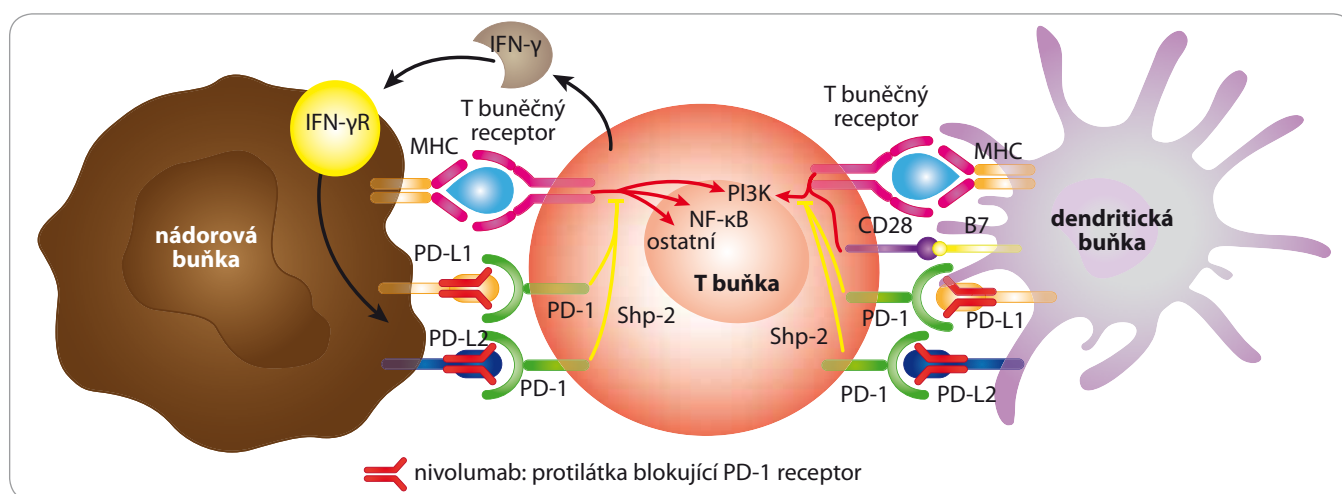
Nivolumab

Nivolumab je plně humanizovaná IgG4 monoklonální protilátka proti PD-1 (obr. 2). V 12/2014 byl schválen FDA v USA pro léčbu inoperabilního či metastatického melanomu.

Ve studii fáze III CheckMate 017 byl nivolumab vs. docetaxel podáván 272 pacientům s pokročilým skvamózním NSCLC, kteří progredovali po předchozí léčbě platinovým dubletem. Nivolumab byl podáván v dávce 3 mg/kg každé dva týdny, docetaxel 75 mg/kg každé tři týdny. Primárním cílem studie bylo OS, sekundárním PFS a objektivní odpověď (objective response rate – ORR), efektivnost PD-L1 exprese (testování PD-L1 však nebylo podmínkou pro zařazení do studie). Studie splnila svůj primární cíl, OS byl statisticky významně lepší v rameni s nivolumabem (9,2 vs. 6,0 měsíce; HR 0,59; 95% CI 0,44–0,79; $p = 0,00025$), rovněž PFS byly lepší v rameni s nivolumabem (HR 0,62),



Obr. 1. Kontrolní body imunitní reakce CTLA-4 a PD-1.



Obr. 2. Mechanismus účinku nivolumabu.

ORR v rameni s nivolumabem byl 20 %, s docetaxelem 9 %. S léčbou spojené nežádoucí účinky stupně 3–4 se v rameni s nivolumabem vyskytly v 7 %, s docetaxelem v 55 %, nebylo zaznamenáno žádné úmrtí v souvislosti s léčbou nivolumabem. Expres PD-L1 nebyla prognostickým ani prediktivním faktorem účinnosti (tab. 1) [4].

Na základě výsledku této studie byl nivolumab v 3/2015 schválen FDA pro léčbu pokročilého skvamózního NSCLC s progresí po léčbě platinovým dubletem.

Ve studii fáze III CheckMate 057 dostalo 582 pacientů s dříve léčeným pokročilým non-skvamózním NSCLC nivolumab 3 mg/kg každé dva týdny nebo docetaxel 75 mg/kg každé tři týdny. Nivolumab prokázal statisticky lepší OS (HR 0,73; 96% CI 0,59, 0,89; $p = 0,00155$) a ORR (19,2 vs. 12,4 %; $p = 0,0235$) ve srovnání s docetaxelem. Navíc doba trvání odpovědi byla signifikantně delší v rameni s nivolumabem (17,2 měsíce) než v rameni s docetaxelem (5,6 měsíce). Expres PD-L1 byla spojena s větší účinností nivolumabu a ukázala se jako jasný prediktivní faktor. S léčbou spojené nežádoucí účinky stupně 3–4 se v rameni s nivolumabem vyskytly v 10,5 %, s docetaxelem v 53,7 %, nebylo zaznamenáno žádné úmrtí v souvislosti s léčbou nivolumabem (tab. 2) [5].

Na letošním ASCO byla rovněž prezentována studie fáze I hodnotící účinnost a bezpečnost nivolumabu v mo-

Tab. 1. Studie fáze III CheckMate 017.

	NIVO (n = 135)	DOC (n = 137)
medián OS, měsíce (95% CI)	9,2 (7,3, 13,3)	6,0 (5,1, 7,3)
1leté OS, % (95% CI)	42 (34, 50)	24 (17, 31)
střední doba trvání odpovědi, měsíce (rozsah)	nebylo dosaženo (2,9–20,5+)	8,4 (1,4 ± 15,2+)
medián PFS, měsíce (95% CI)	3,5 (2,1, 4,9)	2,8 (2,1, 3,5)
1leté PFS, % (95% CI)	21 (14, 28)	6 (3, 12)

PD-1 exprese	NIVO (n)	DOC (n)	OS HR (95% CI)
≥ 1 %	63	56	0,69 (0,45, 1,05)
< 1 %	54	52	0,58 (0,37, 0,92)
≥ 5 %	42	39	0,53 (0,31, 0,89)
< 5 %	75	69	0,70 (0,47, 1,02)
≥ 10 %	36	33	0,50 (0,28, 0,89)
< 10 %	81	75	0,70 (0,48, 1,01)

OS – celkové přežití, PFS – přežití bez progresse

Tab. 2. Studie fáze III CheckMate 057.

Účinnost opatření	NIVO (n = 292)	DOC (n = 290)
medián OS, měsíce (95% CI)	12,2 (9,7, 15,0)	9,4 (8,0, 10,7)
1leté OS, % (95% CI)	50,5 (44,6, 56,1)	39,0 (33,3, 44,6)
střední doba trvání odpovědi, měsíce (95% CI)	17,1 (8,4–není odhadnutelný)	5,6 (4,4–7,0)
medián PFS, měsíce (95% CI)	2,3 (2,2, 3,3)	4,2 (3,4, 4,9)
1leté PFS, % (95% CI)	18,5 (14,1, 23,4)	8,1 (5,1, 12,0)

OS – celkové přežití, PFS – přežití bez progresse

noterapii v 1. linii léčby NSCLC stadia IIIB/IV. Byl podán 52 pacientům se skvamózním i non-skvamózním NSCLC, ORR byl 23 % (včetně čtyř kompletních odpovědí), medián OS byl 22,6 měsíce. Na léčbu odpověděli pacienti PD-L1 pozitivní i negativní, přičemž ORR byl vyšší u pacientů PD-L1 pozitivních [5]. Probíhá studie fáze III s nivolumabem vs. chemoterapie v 1. linii léčby u NSCLC stadia IV [6].

Ve studii fáze I/II CA209-032 [6] byl nivolumab podán samostatně nebo v kombinaci s ipilimumabem pacientům s recidivujícím SCLC. Pacienti nebyli selektováni podle stavu PD-L1. ORR při léčbě nivolumabem byl 15 % a při kombinaci s ipilimumabem 25 %, byly zaznamenány i dlouhodobé odpovědi, léčba byla dobře tolerována. Budou prezentovány aktualizované údaje o bezpečnosti, klinické účinnosti a analýze biomarkerů [7].

Probíhá ještě řada dalších studií s nivolumabem u NSCLC i SCLC.

MK-3475, pembrolizumab

MK-3475, pembrolizumab, je další plně humanizovaná IgG4 monoklonální protilátka proti PD-1. V 9/2014 byl schválen FDA v USA pro léčbu pokročilého melanomu pod obchodním názvem Keytruda®.

V 4/2015 byly publikovány výsledky studie fáze I KEYNOTE-001. Pembrolizumab v dávce 2 mg nebo 10 mg/kg každé tři týdny nebo 10 mg/kg každé tři týdny dostávalo 495 pacientů dříve léčených či bez předchozí léčby. ORR byl 19,4 %, medián OS byl 12 měsíců. Při expresi PD-L1 alespoň 50 % nádorových buněk byl ORR 45,2 %, medián OS nebyl dosažen. Léčba byla dobře tolerována, méně než 10 % pacientů mělo s léčbou spojené nežádoucí účinky stupně 3–4. Bylo zaznamenáno jedno úmrtí na pneumonitidu [8].

Je ukončen nábor pacientů do studie fáze II/III se dvěma dávkami MK-3475 vs. docetaxel u předléčených pacientů s NSCLC, kteří mají prokázanou pozitivitu PD-L1. Probíhají studie fáze III KEYNOTE-042 a KEYNOTE-024 porovnávající MK-3475 s chemoterapií na bázi platiny u dříve neléčených pacientů s pokročilým NSCLC. Probíhají nebo jsou plánované i další studie s léčbou pem-

bolizumabem v kombinaci s bevacizumabem, inhibitory tyrozinkinázy či ipilimumabem.

Anti-PD-L1 protilátka MPDL3280A, atezolizumab

MPDL3280A, atezolizumab, je protilátka namířená proti PD-L1. V roce 2013 byly prezentovány výsledky studie fáze I u předléčených pacientů s NSCLC. Výrazně lepší léčebná odpověď byla u pacientů s vysokou expresí PD-L1. Srovnatelné jsou výsledky u skvamózních a non-skvamózních NSCLC. Na letošním ASCO byla prezentována studie fáze II POPLAR porovnávající MPDL3280A s docetaxelem ve 2. a 3. linii léčby. Slibné výsledky korelovaly s PD-L1 expresí na tumor infiltrujících imunitních buňkách a/nebo nádorových buňkách [9]. Probíhají další studie včetně studií v 1. linii léčby u pacientů s PD-L1 pozitivním lokálně pokročilým nebo metastazujícím NSCLC. V plánu je i hodnocení kombinace s bevacizumabem ve studii fáze I.

MEDI4736

MEDI4736 je další humanizovaná IgG1 protilátka, která se váže na ligand PD-L1. Byla testována ve studii fáze I, probíhají studie fáze II a III, také v kombinaci s tremelimumabem (anti-CTLA-4 protilátka), v plánu je zahájení studie s adjuvantním podáním MEDI4736 u kompletně resektovaného NSCLC.

BMS-936559

BMS-936559 monoklonální protilátka proti PD-L1, která ve studiích fáze I prokázala aktivitu u řady solidních nádorů včetně NSCLC.

Anti-CTLA-4 protilátka Ipilimumab

Ipilimumab je humanizovaná IgG1 anti-CTLA-4 monoklonální protilátka, která působí jako selektivní inhibitor CTLA-4, antigenu asociovaného s cytotoxickými T lymfocyty. Prokázala již svou účinnost u pacientů s pokročilým melanomem (v roce 2011 FDA schválila ipilimumab pro léčbu inoperabilního nebo metastatického melanomu).

Ve studii fáze II u pokročilého NSCLC prokázala zlepšení intervalu PFS při podání s chemoterapií carboplatina + pacli-

taxel. Očekávají se výsledky studie fáze III u pokročilého skvamózního NSCLC porovnávající carboplatinu + paclitaxel + placebo s carboplatinou + paclitaxelem + ipilimumabem. Rovněž probíhá i studie u SCLC.

Tremelimumab

Tremelimumab je humanizovaná IgG2 anti-CTLA-4 monoklonální protilátka. V současné době probíhá studie fáze Ib/II u pokročilého NSCLC v kombinaci s MEDI4736 (anti-PD-L1 protilátka) a gefitinibem a také u mezoteliomu pleury.

Diskuze

Výsledky studií ukazují, že imunitní odpověď může být rychlá a dlouhotrvající. Jednou aktivovaná protinádorová imunitní odpověď může mít potenciál dalšího pokračování, což naznačuje, že by nemuselo dojít k rozvoji sekundární rezistence, která je patrná u většiny protinádorové léčby. Ani tato léčba však není vhodná pro všechny pacienty. Ve studiích časně fáze u pacientů těžce předléčených byly zaznamenány odpovědi asi ve 20 %, což jsou povzbudivé výsledky v porovnání s odpovědí na standardní cytotoxickou léčbu u těchto pacientů, u nichž se odpověď pohybuje mezi 5 a 10 %. Rovněž povzbuzující v těchto studiích byla délka trvání odpovědi, která byla u některých pacientů jeden rok i více. Stále není objasněna otázka prediktivních biomarkerů. Míra exprese PD-L1 se zatím jeví jako nejspolehlivější prediktor pro odpověď na léčbu určitými inhibitory. Ukazuje se také, že exprese PD-L1 se může měnit během života nádoru a léčby. Rovněž nejsou známy klinické charakteristiky, které by nám pomohly vybrat vhodnou populaci pacientů pro tuto léčbu, i když odpovědi se zdají být vyšší u kuřáků, u kterých je onemocnění spojeno s vyšším výskytem mutací a vyšším počtem nádorových antigenů, a nádor by tak mohl být lépe rozeznán imunitním systémem.

Při imunoterapii musíme počítat s tím, že nástup účinku může být opožděný, neboť aktivace imunitního systému může trvat řádově týdny až měsíce. Počáteční indukovaná zánětlivá odpověď může vést i k dočasnému zvětšení

lézí či k objevení se nových lézí, které mohou později regredovat. To vše je impulzem k tvorbě nových kritérií hodnocení léčebné odpovědi, tzv. imune-related response kriteria.

Dle publikovaných studií je tato léčba poměrně dobře tolerovaná, nežádoucí účinky bývají nejčastěji lehkého stupně (1–2). Nejčastěji se vyskytovala únava, snížení apetitu, průjem, nauzea, zácpa, kašel a dušnost, elevace jaterních enzymů, vyrážka, svědění. Musíme počítat i s výskytem toxicity na autoimunním podkladě, jako je pneumonitida, hepatitida, abnormality funkce štítné žlázy, kolidita. Tyto se však vyskytovaly vzácně. Imunitně zprostředkované nežádoucí účinky odpovídaly na léčbu kortikosteroidy.

Závěr

Ještě před několika lety byla efektivní imunoterapie bronchogenního karcinomu považována za nemožnou. Nyní ji již máme k dispozici a u některých pacientů překonává standardní léčbu jak

v efektivnosti, tak v kvalitě jejich života. V 3/2015 schválila FDA v USA nivolumab v léčbě 2. linie pokročilého skvamózního karcinomu a v 7/2015 byl schválen i v EU. V ČR je nyní dostupný v rámci specifického léčebného programu. Stále však zůstává řada nezodpovězených otázek. Je nutné objasnění prediktivních biomarkerů vedoucích k lepšímu výběru pacientů, kteří budou mít z imunoterapie prospěch. Dále pak otázka správného načasování imunoterapie, kombinace s konvenční léčbou, léčbou cílenou či kombinace jednotlivých imunoterapeutických modalit. Probíhají proto desítky studií, které by v budoucnosti měly pomoci tyto otázky objasnit.

Literatura

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M et al (eds). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [monograph on the Internet]. Lyon: International Agency for Research on Cancer. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
2. Vansteenkiste J, Zielinski M, Linder A et al. Adjuvant MAGE-A3 immunotherapy in resected non-small-cell lung cancer: phase II randomized study results. *J Clin Oncol* 2013; 31(19): 2396–2403. doi: 10.1200/JCO.2012.43.7103.

3. Butts CA, Socinski MA, Mitchell P et al. START: a phase III study of L-BLP25 cancer immunotherapy for unresectable stage III non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2013; 31 (Suppl): abstr. 7500.
4. Spigel DR, Reckamp KL, Rizvi NA et al. A phase III study (CheckMate 017) of nivolumab (NIVO; anti-programmed death-1 [PD-1]) vs docetaxel (DOC) in previously treated advanced or metastatic squamous (SQ) cell non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 2015; 33 (Suppl): abstr. 8009.
5. Paz-Ares L, Horn L, Borghaei H et al. Phase III, randomized trial (CheckMate 057) of nivolumab (NIVO) versus docetaxel (DOC) in advanced non-squamous cell (non-SQ) non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 2015; 33 (Suppl): abstr. LBA109.
6. Gettinger SN, Hellmann MD, Shepherd FA et al. First-line monotherapy with nivolumab (NIVO; anti-programmed death-1[PD-1]) in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): safety, efficacy and correlation of outcomes with PD-1 ligand (PD-L1) expression. *J Clin Oncol* 2015; 33 (Suppl): abstr. 8025.
7. Antonia SJ, Bendell JC, Tailor MH et al. Phase I/II study of nivolumab with or without ipilimumab for treatment of recurrent small cell lung cancer (SCLC): CA209-032. *J Clin Oncol* 2015; 33 (Suppl): abstr. 7503.
8. Garon EB, Rizvi NA, Hui R et al. KEYNOTE-001 Investigators. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 372(21): 2018–2028. doi: 10.1056/NEJMoa1501824.
9. Spira AI, Park K, Mazières J et al. Efficacy, safety and predictive biomarker results from a randomized phase II study comparing MPDL3280A vs docetaxel in 2L/3L NSCLC (POPLAR). *J Clin Oncol* 2015; 33 (Suppl): abstr. 8010.

Immunoscore a jeho prediktivní hodnota u kolorektálního karcinomu

Immunoscore and Its Predictive Value for Colorectal Cancer

Závadová E.¹, Špaček J.¹, Vočka M.¹, Konopásek B.¹, Fučíková T.², Netíková I.^{1,3,4}, Dundr P.⁵, Skálová H.⁵, Petruželka L.¹

¹ Onkologická klinika 1. LF UK a VFN v Praze

² Ústav imunologie a mikrobiologie, 1. LF UK a VFN v Praze

³ Oddělení klinické farmakologie a farmacie, VFN v Praze

⁴ Farmakologický ústav, 1. LF UK a VFN v Praze

⁵ Ústav patologie, 1. LF UK a VFN v Praze

Souhrn

Data z recentních studií ukazují, že klasifikace imunitního systému (immunoscore) u pacientů s nádorovým onemocněním má v některých případech větší prognostický význam než TNM klasifikace. Délka přežití pacientů s určitou diagnózou se stejnou TNM klasifikační hodnotou může být značně odlišná. Metoda immunoscore kvantifikuje a detekuje jednotlivé typy imunitních buněk v nádorové tkáni pacienta, kde rovněž určuje hustotu jejich infiltrace a jejich lokalizaci. V současné době se v rámci multicentrické mezinárodní spolupráce 23 center ze 17 zemí (včetně našeho pracoviště) hodnotí immunoscore u více než 7 000 pacientů s kolorektálním karcinomem z hlediska nádorového mikroprostředí se zaměřením na prezenci imunitních buněk v nádorové tkáni a v blízkosti nádoru. Výsledky metody immunoscore se dávají do korelace s těmito parametry: 1. odpovědi pacientů na léčbu, 2. mírou progresu, prognózou jejich onemocnění a dalšími imunitními parametry. Ukazuje se, že TNM klasifikace a invazivita tumoru je statisticky závislá na imunitní reakci pacienta (existuje inverzní korelace mezi hustotou infiltrace CD 8⁺, CD 3⁺ lymfocyty a rozsahem tumoru). Vysoké hustoty T lymfocytů (CD8⁺, CD3⁺) v centru a v invazivním okraji primárního tumoru jsou spojeny s delším obdobím bezpříznakového přežívání, celkového přežívání, nižším rizikem relapsu i menší pravděpodobností vzniku metastáz. Cílem projektu je zavést immunoscore do rutinní diagnostiky.

Klíčová slova

immunoscore – TNM – VEGF – TGF-β – CD3⁺ lymfocyty – CD8⁺ lymfocyty

Summary

Recent studies suggest that immune-classification (immunoscore) in cancer patients has a prognostic value in some cases that seems to be superior to the AJCC/UICC TNM classification. The clinical outcome can vary significantly among patients with a particular diagnosis within the same TNM stage. Immunoscore methodology quantifies and detects different types of immune cells in tumor tissue, and also determines the density of their infiltration and localization at the tumor site. Currently within an international collaboration of 23 centers in 17 countries (including our department), immunoscore is being evaluated in more than 7,000 colorectal cancer patients in terms of the tumor microenvironment, focusing on the presence of immune cells both in the tumor tissue and the tumor invasive margin. Immunoscore results are assessed in correlation with: 1. patient's response to the treatment, 2. rate of progression, disease prognosis and other immune parameters. It appears that the TNM classification and tumor invasiveness is statistically dependent on the immune response of the patient (there is an inverse correlation between the density of the infiltration of CD 8⁺, CD3⁺ lymphocytes and the tumor stage). High densities of T-lymphocytes (CD8⁺, CD3⁺) both in the core and the invasive margin of the primary tumor are associated with longer-term asymptomatic survival, overall survival, lower risk of relapse and reduced likelihood of metastases. The project of the international collaboration aims to introduce immunoscore in routine diagnostics.

Key words

immunoscore – TNM – VEGF – TGF-β – CD3⁺ lymphocytes – CD8⁺ lymphocytes

Práce byla podpořena AZV ČR 15-28188A, Ligy proti rakovině a PRVOUK-P-27/LF1/1.

This project was supported by AZV CR 15-28188A, the League Against Cancer and PRVOUK-P-27/LF1/1.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



MUDr. Eva Závadová

Onkologická klinika

1. LF UK a VFN

U Nemocnice 2

128 08 Praha

e-mail: EZavadova@seznam.cz

Obdrženo/Submitted: 4. 8. 2015

Přijato/Accepted: 13. 9. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20154S82>

Úvod

Nádorová onemocnění jsou komplexní a dynamická onemocnění, která jsou charakterizována specifickými rysy. Typickými znaky těchto onemocnění jsou nepřetržitá proliferativní signalizace, vyvinutí mechanismů odolávajících buněčné smrti, indukce neoangiogeneze, invazivní růst, zakládání metastatických ložisek, změna energetického metabolismu, inhibice imunitního systému, a tím i omezení následné destrukce nádoru efektorovými buňkami imunitního systému [1,2]. V průběhu vzniku a rozvoje nádorového onemocnění dochází k četným interakcím mezi nádorovými buňkami a imunitním systémem pacienta, ať již lokálně v místě nádorového bujení, nebo vzdáleně cestou různých mediátorů a cytokinů. Nedostatečná imunitní odpověď často koreluje se špatnou prognózou a významně ovlivňuje výsledky léčby [3,4]. Některé tyto deficity či defekty mohou být vrozené, nicméně i nádorové buňky produkují celou řadu faktorů, které suprimují imunitní systém ve snaze uniknout imunitní odpovědi. Mezi nejdůležitější únikové mechanismy patří tvorba imunosupresivních faktorů, produkce neoangiogenetických faktorů a rezistence nádorových buněk k apoptotickým stimulům [5].

Nové způsoby klasifikace nádorového onemocnění využívající informace z nádorového mikroprostředí

Popis významu a současného použití TNM klasifikace v managementu kolorektálního karcinomu

Nejrozšířenějším klasifikačním systémem pro posouzení rozsahu nádoru je TNM klasifikace. S větším rozsahem tumoru je vyšší riziko, že nádorové buňky získají schopnost invadovat cévy a zakládat vzdálené metastázy. TNM klasifikace se užívá již více než 80 let a je velmi užitečná v odhadování prognózy u pacientů s různými druhy nádorového onemocnění [6,7]. TNM klasifikace byla po celou tuto dobu upravována a optimalizována. V roce 2009 provedla the Union for International Cancer Control 7. edici směrnice TNM klasifikace. Přecizní, stabilní a mezinárodně schválený

klasifikační systém je esenciální pro globální úspěch v boji s nádorovým onemocněním. Hlavním záměrem by mělo být poskytnutí informace o prognóze onemocnění a na základě této informace i rozhodnutí o individuálním léčebném záměru. V denní praxi a směrnici má TNM klasifikace přímý dopad v rozhodovacím terapeutickém procesu. Změny v TNM klasifikaci by měly značný vliv na péči o onkologické pacienty a volenou terapii, kterou by byli léčeni. Tento klasifikační systém sice úspěšně prověřil čas, ale přesto neposkytuje lékařům kompletní prediktivní hodnotu pro zhodnocení prognózy pacientů. Klinický výsledek léčby se může u pacientů se stejnou TNM klasifikační hodnotou významně lišit [8]. Někteří pacienti mohou v pokročilém stadiu onemocnění setrvat roky se stabilizací nemoci. Oproti tomu se setkáváme se skupinou pacientů stadia I a II, kdy dochází k relapsu a následně rychlé progresi onemocnění [9].

Přiblížení problematiky nádorového mikroprostředí

Prediktivní přesnost tradiční TNM klasifikace vychází z teorie, že progresi onemocnění je autonomním procesem nádorových buněk. TNM klasifikace se zaměřuje výhradně na nádorové buňky a opomíjí efekt imunitního systému pacienta [10]. Fenotyp tumoru není určen pouze jeho epiteliální komponentou, ale také nádorovým mikroprostředím, které se skládá nejen z vlastních nádorových buněk, ale i z ostatních buněk asociovaných s nádorem. Mezi takové buňky patří především imunitní buňky zánětlivého infiltrátu. Vlivem chemotaktického gradientu nádorového mikroprostředí jsou přitahovány T lymfocyty, dendritické buňky, granulocyty, makrofágy i NK buňky [11]. Zdá se, že nejefektivnější při eradikaci tumoru jsou takzvané CD8 cytotoxické lymfocyty, které jsou schopny nádorovou buňku usmrtit. Význam dalších buněk imunitní reakce není v nádorovém mikroprostředí zcela jasný – nádorové mikroprostředí určované interferony, interleukiny a zvláště chemokiny má klíčový význam pro charakter zánětlivé reakce a funkce imunitních buněk může být v tomto prostředí jiná než v periferní krvi. Pro-

gnostická hodnota TNM klasifikace nebyla nikdy překonána jinými metodami, jako např. imunohistochemií nádorových markerů, průtokovou cytometrií či genetickými vyšetřeními. Ukázalo se však, že analýza specifického typu intratumorální imunitní odpovědi překonala TNM klasifikaci [12,13]. Nádorová progresi nyní musí být považována za výsledek ztráty rovnováhy mezi invazivním nádorovým procesem a obranným systémem pacienta, který se skládá převážně z buněk imunitního systému.

Metoda immunoscore

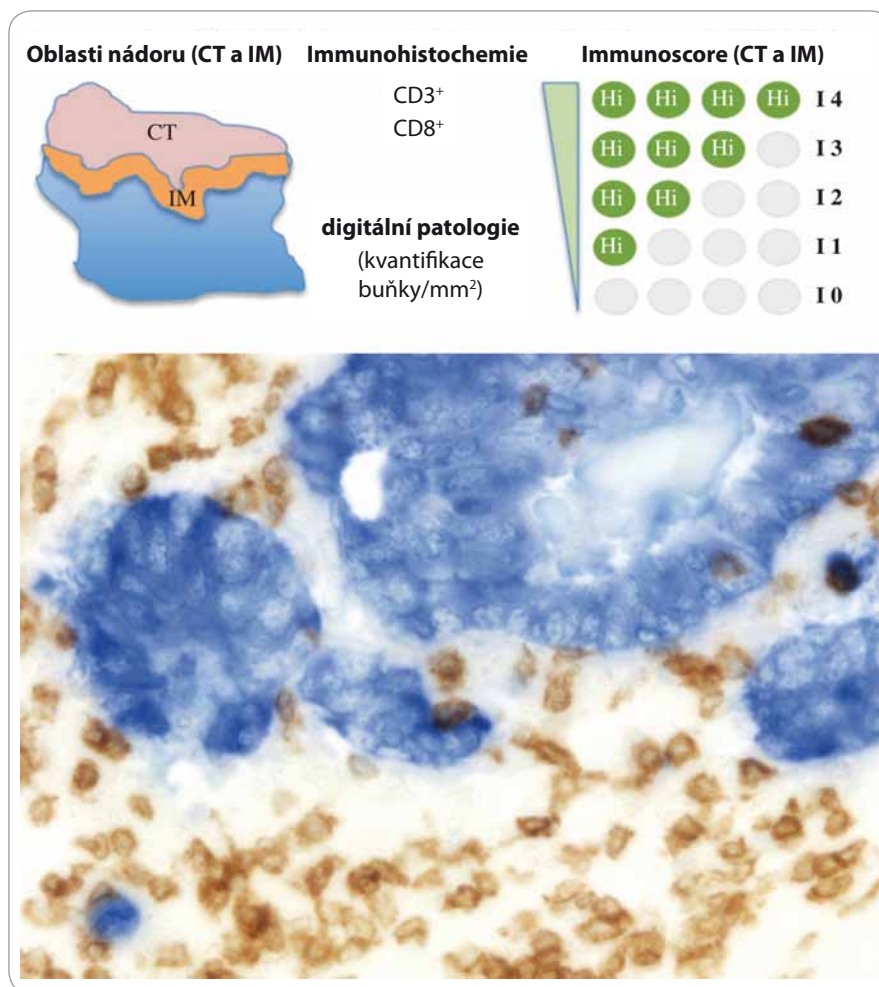
Četná data z rozsáhlých kohort pacientů s kolorektálním karcinomem demonstrovala, že počet, typ a lokalizace imunitních buněk infiltrujících primární nádor má prognostický význam pro celkové bezpříznakové přežití a celkové přežití [12–14]. Imunoklasifikace nádorů byla navržena na základě metody immunoscore. Metoda je pro zpřesnění predikce prognózy a klinického výstupu pacientů prováděna kvantifikací dvou lymfocytárních populací (CD3⁺/CD8⁺) v centru a invazivním okraji nádorové tkáně. CD3⁺ je membránový glykoprotein specifický pro všechny subpopulace T lymfocytů. CD8⁺ lymfocyty (efektorové lymfocyty) jsou potom buňky imunitního systému, které jsou schopné za pomoci cytotoxických mechanismů perforiny a granzymy uskutečnit lýzu nádorové buňky. Jedná se o finální článek exekutivního řetězce specifické, protinádorové buněčné imunity. K destrukci nádorové buňky buněčnou imunitou jsou však esenciální antigen prezentující buňky [11].

Immunoscore se pravděpodobně bude týkat i dalších nádorových onemocnění [15,16]. Bylo prokázáno, že přítomnost tumor infiltrujících lymfocytů u pacientek s karcinomem prsu vykazuje u raných stadií Her 2 pozitivních pacientů benefit z léčby trastuzumabem. Mohou sloužit rovněž jako prediktivní marker léčebné odpovědi na neoadjuvantní terapii u triple negativních a Her 2 pozitivních pacientů s karcinomem prsu. Prediktivní efekt tumor infiltrujících lymfocytů byl značný zejména u pacientů léčených karboplatinou [17–19]. Rovněž bylo potvrzeno, že míra infiltrace tumor infiltrujícími lym-

focyty je pozitivním prediktivním faktorem pro léčebnou odpověď na neoadjuvantní terapii u pacientek s karcinomem prsu [15]. U pacientek s karcinomem endometria jsou snížené počty intraepiteliálních CD3⁺ tumor infiltrujících lymfocytů spojeny s pokročilým stadiem onemocnění a špatnou prognózou. Počty intraepiteliálních CD3⁺ tumor infiltrujících lymfocytů jsou nezávislým prediktorem přežívání pacientek s karcinomem endometria [16].

Data nastřádaná z posledních studií onkologických pacientů ukazují, že klasifikace imunitního systému (immunoscore) má v některých případech větší prognostický význam než TNM klasifikace. TNM klasifikace navíc nepredikuje odpověď pacienta na léčbu (délka přežití pacientů se stejnou TNM klasifikační hodnotou může být značně odlišná). Metoda immunoscore kvantifikuje a detekuje jednotlivé typy imunitních buněk v nádorové tkáni pacienta, kde rovněž určuje hustotu jejich infiltrace a jejich lokalizaci. Ukazuje se, že TNM klasifikace a invazivita tumoru je statisticky závislá na imunitní reakci pacienta (existuje inverzní korelace mezi densitou CD8⁺ a stagingem tumoru). Vysoké koncentrace density T lymfocytů (CD8⁺) v centru i invazivním okraji primárního tumoru jsou asociovány s delším obdobím bezpříznakového přežívání, celkového přežívání, nižším rizikem relapsu i menší pravděpodobností vzniku metastáz. Prognostický význam přítomnosti T buněčné populace (CD8⁺) byl potvrzen, a to i při zohlednění stadia, počtu lymfatických uzlin a zavedených molekulárních nádorových biomarkerů, včetně mikrosatelitové instability (MSI), *BRAF* mutací a LINE-1 hypometylací [20,21]. Existuje i asociace mezi mikrosatelitovou instabilitou a infiltrací buňkami imunitního systému [22]. Tumory s přítomnou MSI častěji obsahují intraepiteliální T lymfocyty v reakci na expresi nových antigenů na svém povrchu [23], což pravděpodobně vede k lepší prognóze těchto pacientů.

Immunoscore nabízí hodnocení od 0 (nízká infiltrace buněk imunitního systému v obou oblastech) do 4 (vysoká infiltrace buněk imunitního systému v obou oblastech) (obr. 1). Vyšetření má dvě výhody: 1. zdá se, že immunoscore je silným prognostickým faktorem pře-



Obr. 1. Definice a metodologie immunoscore (horní část); imunohistochemické barvení CD3⁺ a CD8⁺ buněk ve tkáni kolorektálního karcinomu (dolní část) [1].

CT – nádorové centrum, IM – invazivní okraj

žívání bez onemocnění a celkové přežití, 2. má biologický význam (reakce adaptivní imunity na přítomnost nádoru) a nabízí se jako nástroj nebo potenciální cíl pro terapii včetně imunoterapie [23–26]. Vzhledem k pravděpodobně shodnému charakteru imunitní kontroly nádorů je znalost stavu imunitního systému jako prognostického faktoru důležitým doplňkem standardní klasifikace [27,28]. Pro posouzení významu immunoscore v klinické praxi a zhodnocení prognostického významu byla zahájena prospektivní multicentrická studie s 600 pacienty léčenými v sedmi francouzských nemocnicích pro kolorektální karcinom léčený primárně chirurgicky. Ve snaze podpořit využití immunoscore v rutinní klinické praxi bylo iniciováno celosvětové konsorcium s podporou Society of Immunotherapy of Cancer [28].

Několik tisíc nádorových vzorků je v současné době analyzováno ve 23 centrech po celém světě. V ČR projekt koordinuje Onkologická klinika 1. LF UK a VFN v Praze. Byla vybrána dvě nejjednodušší membránová barvení CD3 a CD8 měřená v centru tumoru a v oblasti invazivního lemu. Přesná kvantifikace je v současné době prováděna v rozsahu standardizovaného řezu pomocí jednotného počítačového softwaru (Definiens software).

Cílem tohoto projektu je:

1. prokázat uskutečnitelnost a reprodukovatelnost immunoscore,
2. validovat prognostickou sílu immunoscore u pacientů s kolorektálním karcinomem stadia I–III,
3. demonstrovat užitečnost immunoscore a identifikovat pacienty stadia II s vysokým rizikem recidivy.

Předpokládá se, že tato snaha povede k začlenění immunoscore jako nové součásti klasifikace nádoru doplňující standardní TNM klasifikaci. Výsledky immunoscore by měly lépe odpovídat prognóze pacientů s kolorektálním karcinomem. Měly by lépe identifikovat pacienty s vysokým rizikem rekurence [26] a pomáhat předvídat a stratifikovat pacienty, kteří budou profitovat z adjuvantní terapie [27–29].

Závěr

Hodnocení množství a typu tumor infiltrujících buněk se zdá být vhodným doplněním standardní TNM klasifikace, a to zejména při rozhodování o adjuvantní terapii. Klinický význam multicentrického projektu Immunoscore monitorujícího míru infiltrace CD3⁺ a CD8⁺ T lymfocytů v centru a v invazivním okraji nádoru bude pravděpodobně brzy potvrzen a začleněn do rutinního použití.

Literatura

1. Galon J, Mlecnik B, Bindea G et al. Towards the introduction of the 'immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol* 2014; 232(2): 199–209. doi: 10.1002/path.4287.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
3. Matsumura Y, Kobayashi T, Ichihama K et al. Selective expansion of foxp3-positive regulatory T cells and immunosuppression by suppressors of cytokine signaling 3-deficient dendritic cells. *J Immunol* 2007; 179(4): 2170–2179.
4. Bates GJ, Fox SB, Han C et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol* 2006; 24(34): 5373–5380.
5. Logan-Collins JM, Lowy AM, Robinson-Smith TM et al. VEGF expression predicts survival in patients with peritoneal surface metastases from mucinous adenocarcinoma of the appendix and colon. *Ann Surg Oncol* 2008; 15(3): 738–744.
6. Locker GY, Hamilton S, Harris J et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24(33): 5313–5327.
7. Weitz J, Koch M, Debus J et al. Colorectal cancer. *Lancet* 2005; 365(9454): 153–165.
8. Nagtegaal ID, Quirke P, Schmol HJ. Has the new TNM classification for colorectal cancer improved care? *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 9(2): 119–123.
9. Mlecnik B, Bindea G, Pages F et al. Tumor immunosurveillance in human cancers. *Cancer Metastasis Rev* 2011; 30(1): 5–12. doi: 10.1007/s10555-011-9270-7.
10. Bindea G, Mlecnik B, Fridman WH et al. Natural immunity to cancer in humans. *Curr Opin Immunol* 2010; 22(2): 215–222. doi: 10.1016/j.coi.2010.02.006.
11. Kopecký J, Slovacek L, Priester P et al. Changes in immune reactivity in cancer patients. *Klin Onkol* 2012; 25(2): 97–102. doi: 10.14735/amko201297.
12. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313(5795): 1960–1964.
13. Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol* 2011; 29(6): 610–618. doi: 10.1200/JCO.2010.30.5425.
14. Pages F, Berger A, Camus M et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005; 353(25): 2654–2666.
15. Melichar B, Študentová H, Kalábová H et al. Predictive and prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with breast cancer treated with neoadjuvant systemic therapy. *Anticancer Res* 2014; 34(3): 1115–1125.
16. Čermáková P, Melichar B, Tomšová M et al. Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in patients with endometrial carcinoma. *Anticancer Res* 2014; 34(10): 5555–5561.
17. Denkert C, Loibl S, Noske A et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28(1): 105–113. doi: 10.1200/JCO.2009.23.7370.
18. Loi S, Sirtaine N, Piette F et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol* 2013; 31(7): 860–867. doi: 10.1200/JCO.2011.41.0902.
19. Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8(3): 151–160. doi: 10.1038/nrclinonc.2010.223.
20. Nosh K, Baba Y, Tanaka N et al. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer and prognosis: cohort study and literature review. *J Pathol* 2010; 222(4): 350–366. doi: 10.1002/path.2774.
21. Ogino S, Nosh K, Irahara N et al. Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. *Clin Cancer Res* 2009; 15(20): 6412–6420. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1438.
22. Guidoboni M, Gafa R, Viel A et al. Microsatellite instability and high content of activated cytotoxic lymphocytes identify colon cancer patients with a favorable prognosis. *Am J Pathol* 2001; 159(1): 297–304.
23. Tougeron D, Fauquembergue E, Rouquette A et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancers with microsatellite instability are correlated with the number and spectrum of frameshift mutations. *Mod Pathol* 2009; 22(9): 1186–1195. doi: 10.1038/modpathol.2009.80.
24. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012; 366(26): 2455–2465. doi: 10.1056/NEJMoa1200694.
25. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363(8): 711–723. doi: 10.1056/NEJMoa1003466.
26. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012; 366(26): 2443–2454. doi: 10.1056/NEJMoa1200690.
27. Galon J, Pages F, Marincola FM et al. Cancer classification using the ImmunScore: a worldwide task force. *J Transl Med* 2012; 10: 205. doi: 10.1186/1479-5876-10-205.
28. Galon J, Pages F, Marincola FM et al. The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. *J Transl Med* 2012; 10: 1. doi: 10.1186/1479-5876-10-1.
29. Väyrynen JP, Vornanen JO, Sajanti S et al. An improved image analysis method for cell counting lends credibility to the prognostic significance of T cells in colorectal cancer. *Virchows Arch* 2012; 460(5): 455–465. doi: 10.1007/s00428-012-1232-0.

Imunitní systém u pacientů s nádory hlavy a krku

Immune System in Patients with Head and Neck Carcinoma

Partlová S.^{1,2}, Bouček J.³, Kloudová K.^{1,2}, Zábrodský M.³, Špišek R.^{1,2}, Fialová A.²

¹ Sotio a.s., Praha

² Ústav imunologie, 2. LF UK a FN v Motole, Praha

³ Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN v Motole, Praha

Souhrn

V posledních několika letech se významně změnil pohled na biologickou podstatu nádorů v oblasti hlavy a krku. Klasickými prokázanými rizikovými faktory nádorů v oblasti hlavy a krku jsou kouření a konzumace alkoholu, resp. jejich kombinace. Pacienti s nádory vzniklými na podkladě této etiologie se pohybují ve vyšších věkových skupinách, nejčastěji v pátém a šestém decéniu. Dále byla v posledních přibližně 15 letech prokázána souvislost s infekcí lidským papillomavirem (HPV), který je dnes považován za jeden z nejvýznamnějších rizikových faktorů, zejména pro karcinom orofaryngu. HPV pozitivní nádory orofaryngu jsou spojeny s významně lepší prognózou onemocnění. Výzkumná i klinická data ukazují, že HPV pozitivní a negativní nádory lze v mnoha ohledech považovat za dvě rozdílné entity a dosud není zcela objasněno, jaké faktory jsou klíčové pro lepší prognózu HPV pozitivní nádorů. Jedním z důležitých faktorů, který se podílí na rozdílné prognóze, může být charakter imunitní reakce. Tento článek shrnuje současné poznatky o různých aspektech protinádorové imunitní reakce u HPV pozitivních a negativních nádorů. Současné studie udávají, že téměř u všech HPV pozitivních pacientů byly detekovány významné počty HPV specifických T lymfocytů, v nádorové tkáni. I navzdory tomu však dochází k rozvoji nádoru, což může být způsobeno abnormalitami v antigenní prezentaci, dysfunkcemi T lymfocytů či přítomností různých populací imunosupresivních buněk. Imunologický profil HPV pozitivních, resp. HPV negativních nádorů v oblasti hlavy a krku přesto jednoznačně koreluje s terapeutickými výsledky a HPV specifická imunitní odpověď má pravděpodobně zásadní význam při lepší odpovědi HPV pozitivních pacientů na konvenční léčbu. Diskutujeme také vyvíjené postupy HPV specifické protinádorové imunoterapie, které jsou nyní ve fázi klinických zkoušek.

Klíčová slova

nádory hlavy a krku – lidský papillomavirus – imunitní systém – T lymfocyty – imunoterapie

Práce byla podpořena IGA MZ ČR č. NT 11542, FN Motol – grant č. 00064203 a dále grant SVV 266513, UNCE 204013 a PRVOUK 27-1.

This study was supported by grant Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health No. NT 11542, FH Motol – grant No. 00064203 and by grants SVV 266513, UNCE 204013 and PRVOUK 27-1.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Mgr. Simona Partlová

Sotio a. s.

Jankovcova 1518/2

170 00 Praha 7

e-mail: partlova@sotio.com

Obdrženo/Submitted: 31. 7. 2015

Přijato/Accepted: 22. 8. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20154S86>

Summary

The insight into the biological nature of head and neck squamous cell carcinoma has evolved significantly in the last few years. Tobacco use and alcohol consumption are proven risk factors of head and neck squamous cell carcinoma. Cancer patients possessing such a tumor are generally elderly, mostly in fifth or sixth decade of life. In addition, significant association of head and neck squamous cell carcinoma with infection by human papillomavirus (HPV) was proven. HPV is now considered to be one of the most important risk factors, particularly for oropharyngeal carcinoma. HPV-positive tumors of oropharynx are associated with significantly better prognosis. Experimental and clinical data indicate that HPV-positive and HPV-negative tumors can be considered as two different entities and it has not been clarified which factors are crucial for better prognosis of HPV-positive tumors. The character of immune reaction, which contributes to distinct prognosis, may be one of the important factors. This review summarizes current knowledge concerning various aspects of anti-tumor immune responses in HPV-positive and HPV-negative tumors. Recent studies have shown that a broad repertoire of tumor-infiltrating HPV-specific T-cells is detectable in almost all patients with HPV-positive tumors. Despite this, there is a development of tumor, which may be facilitated by abnormalities in antigen processing, T-cell dysfunction or prevalence of immunosuppressive cells. Nonetheless, the immunologic profile of HPV-positive vs. HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma is associated with better outcome, and HPV-specific immune response is suggested to play an essential role in the better response to conventional therapy of HPV-positive patients. We also discuss HPV-specific antitumor immunotherapy approaches, which are now tested in clinical trials.

Key words

head and neck cancer – human papillomavirus – immune system – T-lymphocytes – immunotherapy

Úvod

V posledních několika letech se velmi významně změnil pohled na biologickou podstatu celé řady onkologických onemocnění, nádory v oblasti hlavy a krku nevyjímaje, na podkladě přibývajících informací z oblasti molekulární genetiky, biologie a imunologie [1]. Některé z těchto znalostí se již přímo uplatnily v klinické praxi, některé vykazují slibný potenciál do budoucnosti.

Nádory hlavy a krku jsou šestou nejčastější skupinou onkologických onemocnění, zahrnující celou řadu histologických typů malignit, ale ve zhruba 95 % jsou zastoupeny dlaždicobuněčné karcinomy (head and neck squamous cell carcinoma – HNSCC) [2]. Celosvětově se udává incidence mezi 550 000 a 600 000 případů za rok [3], z nichž nejpočetnější jsou nádory orofaryngu, hrtanu a dutiny ústní. Zhruba 300 000 pacientů každoročně v souvislosti s tímto onemocněním zemře. Klasickými prokázanými rizikovými faktory HNSCC je kouření a konzumace alkoholu, resp. jejich kombinace. Pacienti s nádory vzniklými na podkladě této etiologie se pohybují ve vyšších věkových skupinách, nejčastěji v pátém a šestém decéniu [4]. Incidence nádorů podmíněných kouřením a/i alkoholem pomalu klesá. U nádorů orofaryngu byla v posledních přibližně 15 letech prokázána souvislost s infekcí lidským papillomavirem (HPV), který je dnes považován za jeden

z nejvýznamnějších rizikových faktorů. Zastoupení HPV asociovaných nádorů roste relativně i absolutně a v této souvislosti je používán termín „epidemie“ šířící se zejména ve skupině mladších pacientů, mužů bílé pleti, nekuřáků [4]. Je známo více než 100 kmenů HPV, karcinomy v oblasti hlavy a krku jsou způsobeny zejména HPV 16, který je dnes považován za primární příčinu většiny spinocelulárních karcinomů tonzily v Evropě a v Severní Americe.

HPV

Infekce lidským papillovirem je sexuálně přenosné onemocnění postihující cervix, orofarynx, vulvu, konečník a penis. Význam HPV pro ano-genitální nádory byl znám již poměrně dlouho, v onkologii hlavy a krku se ale souvislost prokazuje až v posledních přibližně 15 letech [5,6]. Více než 130 typů HPV se dle maligního potenciálu rozděluje na low- a high-risk typy, asi 15 z nich vykazuje onkogenní potenciál. U orofaryngeálních karcinomů dominuje HPV 16. Více než 50 % nádorů tonzil a kořene jazyka je prokazatelně způsobeno přítomností HPV (literární údaje se pohybují v rozmezí od 10 do 90 %) [7]. V Evropě je procento orofaryngeálních nádorů způsobených HPV nejvyšší ve Skandinávii (až 90 %), naopak v zemích s vysokým zastoupením kuřáků v populaci, např. v Itálii, je nižší než 20 % [7]. Rutinní HPV detekce u nádorů orofa-

ryngu je součástí moderních klinických doporučených postupů. Nejvyšší prognostická významnost byla prokázána pro detekci transkripčně aktivní virové infekce pomocí HPV mRNA (nejčastěji HPV 16 E6 mRNA) [8]. K detekci HPV je možné použít celou řadu dalších laboratorních technik, pro spolehlivé stanovení by mělo být kombinováno více metod. V současnosti je používáno klasické PCR k detekci HPV DNA, RT-PCR kvantifikující virovou nálož nebo detekující transkripčně aktivní virovou infekci pomocí E6/E7 mRNA, typově specifická DNA *in situ* hybridizace, detekce sérových protilátek proti virovým onkoproteinům E6/E7 nebo imunohistochemická detekce p16 (inhibitoru cyclin-dependentní kinázy p16ink4a, tumor supresorového proteinu). PCR detekce HPV DNA v kombinaci s imunohistochemickou detekcí p16 (velmi silně korelující s HPV statutem) nebo s detekcí HPV specifických E6/E7 protilátek jsou dnes doporučovány jako možné standardy pro určení orofaryngeálních nádorů asociovaných s HPV infekcí [9].

Genetické rozdíly HNSCC různých etiologií

Rozdílná etiologie se promítá i do nejčastěji detekovaných genetických mutací a změněných signálních drah. Velký posun znamenalo zavedení techniky whole-exome sequencing, první práce u HNSCC byla publikována

v roce 2011 [10]. Expozice klasickým karcinogenům, jako jsou kouření a alkohol, vede k postupnému hromadění genetických změn. Téměř vždy je u této skupiny nádorů mutován gen *TP53*, který kóduje p53 protein, onkosupresorový protein, někdy nazývaný „strážce genomu“. Za fyziologických podmínek se jeho množství začíná zvyšovat v odpovědi na stresové stimuly nebo v případě poškození DNA. Nahromadění vede k zastavení buněčného cyklu umožňující DNA opravu nebo spustí apoptotickou signalizační kaskádu. Většina mutací *TP53* je tzv. missense mutace, kdy vzniká stabilní protein, ale s poškozenou vazebnou strukturou. Je prokázána korelace vyššího výskytu mutací *TP53* a snížení celkového přežívání, zvýšení procenta lokoregionálních rekurencí a snížení citlivosti na terapii [11,12]. Druhý nejčastěji mutovaný tumor supresorový gen u HPV negativních HNSCC je *CDKN2A* (gen pro inhibitor cyklin-dependentní kinázy 2A), poškozený u zhruba 10–12 % nádorů. Jeho dva alternativní sestřiham vzniklé proteiny (p14ARF a p16INK4A) negativně ovlivňují funkci p53, zasahují do regulace buněčného cyklu a stimulují růstovou progresi nádorových buněk.

Naopak u HPV pozitivních nádorů je spektrum nacházených genetických změn podstatně menší. Postihuje zejména PIK3CA (katalytická podjednotka phosphatidylinositol 3-kinázy [13], jehož mutaci nacházíme jen u 6–21 % HNSCC. PIK3 je součástí signalizační dráhy aktivované vazbou ligandu na povrchový membránový receptor, např. pro EGFR (receptor pro epidermální růstový faktor). EGFR je overexprimován až u 90 % HNSCC [14] a je v přímé korelaci s větším množstvím lokálních rekurencí a horším celkovým přežitím pacientů. Množství mutovaného PI3K přímo koreluje s vyšším stagingem HNSCC, potencuje buněčný růst, proliferaci a inhibuje apoptózu. Další genetickou změnou nacházenou zejména v HPV pozitivních HNSCC je mutace *TRAF3* (TNF receptor-associated factor 3), který je součástí přirozené i specifické protivirové imunitní reakce (HPV, EBV, HIV) a jehož inaktivace vede ke zvýšení NF- κ B signalizace a inhibici apoptózy. Poslední

častou genetickou změnou u HPV+ HNSCC je amplifikace genu *E2F1*, transkripčního faktoru aktivujícího buněčný cyklus.

Biologické rozdíly

Biologická odlišnost HPV pozitivních a negativních HNSCC funkčně odráží genetickou podstatu a spočívá zejména ve zvýšené degradaci p53, inaktivaci dráhy pRb (retinoblastomový protein) a v upregulaci p16. Nefunkčnost onkosupresorového proteinu p53 v druhém kontrolním bodu buněčného cyklu (ve fázi G2) je prokázána u většiny HNSCC, molekulární podstata této poruchy se však liší. Na rozdíl od HPV negativních HNSCC, která je téměř vždy podmíněna mutací genu, u HPV pozitivních je naopak p53 vázán virovým onkoproteinem E6, a tím je spuštěna jeho degradace. Buněčný cyklus se tak nezastaví v druhém kontrolním bodě, nemůže proběhnout oprava DNA a nemůže ani dojít ke spuštění apoptózy mediované p53. Regulace buněčného cyklu v prvním kontrolním bodě (v přechodu mezi fází G1 a S) je naopak narušena prostřednictvím pRb a cyklinu D1. HPV pozitivní nádory orofaryngu vykazují aktivaci buněčného cyklu transkripčním faktorem E2F, který je za fyziologických podmínek vázán na Rb. Poté, co virový E7 onkoprotein vytvoří komplexy s níže fosforylovanou formou onkosupresorového proteinu pRb, dojde ke snížení hladiny Rb a jeho uvolnění z vazby na E2F. Uvolněný E2F aktivuje cyklin E a CDK2 (cyklin dependentní kinázu 2). Je tak umožněn přechod z G1 do S fáze buněčného cyklu. Zpětně je indukovaná overexprese *CDKN2A* genu, který kóduje p16 a p14. Za normálních okolností p16 inhibuje cyklin D1 a CDK1/6 (které fyziologicky fosforylují pRb uvolňují E2F) a zablokuje buněčný cyklus. V případě HPV infikovaných buněk je ale pRb inaktivován v komplexu s E7 a nemůže již buněčný cyklus negativně ovlivňovat vazbou s E2F [15].

Klinický význam HPV

Přestože HPV velmi silně zasahuje a ovlivňuje buněčný cyklus, nádory vykazující vysokou aktivitu HPV mají lepší prognózu než nádory s nízkým virovým

loadem nebo ty, které jsou HPV negativní. Pacienti s HPV pozitivními nádory, přestože mají častěji metastatické postižení regionálních lymfatických uzlin, a tedy pokročilejší stadia, lépe odpovídají na chemoterapii, radioterapii i chirurgickou léčbu. Klinická odpověď je podmíněna aktivací imunitního systému proti HPV antigenům [16], tedy nikoliv odlišností v samotném biologickém chování HPV pozitivních a HPV negativních nádorových buněk [17].

Zatím není ale zodpovězena otázka, proč u menší části pacientů HPV vyvolá chronickou infekci a následně nádorové onemocnění, přestože většina populace se s HPV infekcí během života setká, ale imunitní systém ji efektivně eliminuje a neumožní žádné dlouhodobé obtíže.

Imunitní systém u pacientů s nádory hlavy a krku

Únikové mechanismy HNSCC nádorových buněk

Pro rozvoj onemocnění je zřejmě velmi důležité, že nádorové buňky mohou postupně vyvinout strategie, kterými dokáží uniknout dohledu imunitního systému. Nádorové buňky HNSCC tyto mechanismy využívají, i když se jedná o značně heterogenní skupinu nádorů. Více než u poloviny nádorů hlavy a krku byla popsána úniková strategie způsobená sníženou expresí nebo úplnou ztrátou lidského leukocytárního antigenu I. třídy (HLA I) a/nebo narušení mechanismu antigenní prezentace, které jsou nezbytné pro zahájení účinné protinádorové odpovědi založené na cytotoxických T lymfocytech [18]. Dalším z možných mechanismů způsobujících nedostatečnou imunitní odpověď je schopnost HNSCC nádorů potlačit expresi B7 kostimulačních molekul (CD80 a CD86). Nízká exprese kostimulačních molekul znamená, že nádorové buňky nemohou samy o sobě aktivovat protinádorovou imunitní odpověď, především T lymfocyty. Výzkum posledních let navíc ukázal, že nádorové buňky jsou schopné do nádorové tkáně aktivně atrahovat různé populace imunosupresivních buněk. Imunosupresivní buňky aktivně a velmi účinně potlačují protinádoro-

vou imunitní reakci, a „chrání“ tedy nádorovou tkáň před útokem imunitního systému. Patří mezi ně především regulační T lymfocyty (Treg), myeloidní supresorové buňky (MDSC) nebo nádorové makrofágy (TAM) [19]. V neposlední řadě dochází díky expresi inhibičních molekul (FasL, PD-L1 a PD-L2), jež byly prokázány na nádorových buňkách, k apoptóze či utlumení aktivovaných cytotoxických lymfocytů a uvolnění inhibičních faktorů do nádorového mikroprostředí [20].

T lymfocyty a jejich vliv na prognózu pacientů s nádory hlavy a krku

Ačkoliv se protinádorové imunitní odpovědi účastní různé populace imunitních buněk, v současnosti se přikládá největší význam různým populacím efektorových T lymfocytů, které jsou považovány za buňky mající klíčovou roli v obraně proti nádorům.

Mnoho studií zaměřených na analýzu zastoupení lymfocytů infiltrujících nádorovou tkáň (tumor-infiltrating lymphocytes – TILs) u pacientů s různými typy nádorových onemocnění, včetně HNSCC, prokázalo jasnou souvislost výskytu TILs (především CD3⁺ T lymfocytů, CD8⁺ cytotoxických lymfocytů a CD45^{RO+} paměťových T buněk) s delším přežíváním pacientů [21]. Při bližším zkoumání T lymfocytů u pacientů v pokročilém stadiu onemocnění HNSCC Reichert et al [22] navíc ukázali, že nízká exprese či úplná ztráta ζ řetězce v CD3⁺ T lymfocytech, který má klíčovou roli pro přenos signálu do buňky, predikuje horší prognózu, než je tomu u pacientů, kteří mají expresi ζ řetězce normální. Důležitost ζ řetězce byla potvrzena i dalšími studiemi, ve které cirkulující CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocyty a NK buňky vykazovaly nižší expresi tohoto řetězce na lymfocytech v krvi pacientů s HNSCC v porovnání se zdravými kontrolami. Navíc pacienti s agresivními nádory a ti, kteří v posledních dvou letech prodělali relaps onemocnění, exprimovali nejnižší hladiny řetězce ζ [23]. Z výsledků Hoffmanna et al [24] dále vyplývá, že se dysfunkce imunitních buněk pacientů s HNSCC v pozdních stádiích onemocnění netýká pouze nádorového mikroprostředí, ale také periferní krve.

U pacientů s pokročilým onemocněním byly oproti zdravým kontrolám v periferní krvi pozorovány jak funkční defekty lymfocytů, tak signifikantně vyšší podíl lymfocytů, které spontánně podléhaly apoptóze.

Na rozdíl od CD8⁺ T lymfocytů není prognostický význam dalších populací imunitních buněk, jako jsou B lymfocyty, NK buňky, MDSC, makrofágy a populace pomocných T lymfocytů (Th2, Th17, Treg) zcela konzistentní a liší se na základě typu nádoru či jeho stadia [21]. U nádorů hlavy a krku byl již dříve popsán prognostický význam různých populací CD4⁺ T lymfocytů (jako jsou CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD69⁺ a CD4⁺FoxP3⁺ T buňky), které infiltrují nádorovou tkáň [25]. S lepší prognózou byly spojovány vysoké hladiny CD4⁺CD69⁺ buněk a zajímavé je, že vysoké počty CD4⁺FoxP3⁺ T lymfocytů pozitivně korelovaly s lepší lokoregionální kontrolou pacientů [25]. Přítomnost FoxP3⁺ T lymfocytů v nádorové tkáni u pacientů s nazofaryngeálním karcinomem navíc korelovala s delším přežíváním a celkovým bezpříznakovým přežitím [26]. Výsledky studie Straussově et al [27] dále ukázaly, že populace CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ Treg izolovaná z nádorové tkáně je schopna inhibovat proliferaci CD4⁺CD25⁻ T lymfocytů, přičemž tento efekt není závislý na buněčném kontaktu, nýbrž na produkci cytokinů IL-10 a TGF- β . Úloha Th17 lymfocytů byla již dříve velmi dobře popsána v souvislosti s autoimunitními onemocněními, nicméně jejich funkce v nádorech, včetně nádorů hlavy a krku, stále není zcela jasná. Část studií se přiklání k názoru, že je přítomnost Th17 lymfocytů v nádorové tkáni pro pacienta prospěšná, neboť zesiluje protinádorovou imunitní odpověď. Jiné studie naopak tvrdí, že Th17 buňky napomáhají nádorové angiogenezi, čímž umožňují nádoru růst a šířit se do vzdálenějších míst [21,28]. Pro objasnění významu Th17 buněk u pacientů s HNSCC je nyní potřeba další výzkum, který by byl zaměřen na bližší prozkoumání mechanismů, kterými tyto buňky působí v nádorovém mikroprostředí, či jakým způsobem může naopak nádorové prostředí ovlivňovat jejich vznik nebo zastoupení.

Potenciální vliv HPV na imunitní systém HNSCC pacientů

Únikové mechanismy a HPV

Ve většině případů jsou buňky infikované HPV spontánně eliminovány imunitním systémem. Virus HPV však vyvinul řadu mechanismů, kterými je schopen lidský imunitní systém obejít a vyvolat perzistující infekci, nezbytnou pro vznik nádorového onemocnění. HPV infikuje keratinocyty, které exprimují virové proteiny pouze minimálně, a tak buňky infikované virem nejsou lyzovány. Díky tomu neposkytuje HPV imunitnímu systému hostitele tzv. signály nebezpečí, které jsou k zahájení účinné imunitní odpovědi zásadní. Vzhledem k tomu, že nedochází k lýze buňky, neuvolňují se tak ani prozánětlivé cytokiny, které jsou důležitou složkou při aktivaci a migraci dendritických buněk. Virus HPV se navíc nešíří krví, takže je imunitnímu systému vystaveno pouze malé množství replikujícího se viru, a ten se tak pro pacientův imunitní systém stává téměř neviditelným. Dalšími z možných únikových mechanismů je schopnost HPV onkoproteinů vyhnout se účinkům interferonu typu I, který je v protivirové imunitě klíčovou složkou [29], či schopnost virového E6 onkoproteinu blokovat diferenciaci monocytů do příslušných antigen prezentujících buněk [30]. HPV dokáže také potlačit expresi hlavního histokompatibilního komplexu třídy I nebo transportéru pro antigenní peptidy (TAP) [29]. Tyto změny dále snižují prezentaci virových peptidů na povrchu nádorových buněk. Z výsledků Kanodia et al [29] navíc vyplývá, že virus HPV dokáže modulovat produkci chemokinů (potlačit expresi MCP-1, omezit uvolňování IL-8 nebo CCL20) a prozánětlivých cytokinů (snížit expresi IL-18) či inhibovat Th1 odpověď posunem od Th1 směrem k Th2 odpovědi.

Virus HPV a imunitní systém

Virus HPV infikuje epiteliální tkáň a jeho životní cyklus je tak závislý na diferenciaci epitelu hostitele. Na rozdíl od mukózního epitelu, který se nachází na ostatních místech běžně infikovaných virem HPV 16 (cervix, anogenitální oblast), je v orofaryngu dlaždicový epitel ve velmi těsném vztahu k lymfatické tkáni,

která má klíčovou imunologickou funkci v obraně proti patogenům vstupujícím do těla z vnějšího prostředí. Je tedy pravděpodobné, že imunitní odpověď v orofaryngu namířená proti HPV bude odlišná od imunitní reakce probíhající na jiných místech v organismu.

Přestože se ukázalo, že HPV pozitivní pacienti odpovídají lépe na standardní léčbu kombinující chirurgický zákrok s radio- a chemoterapií, HPV pozitivní nádorové linie byly k ozáření s cisplatině rezistentnější v porovnání s HPV negativními buňkami *in vitro*. Nicméně v *in vivo* pokusech na imunokompetentních myších se naopak prokázalo, že HPV pozitivní nádory byly k radio- a chemoterapii citlivější. Zajímavé je, že ani radioterapie ani cisplatina nedokázaly vyléčit imunokompromitované myši, což přispívá k pochopení, že u HPV pozitivních pacientů hraje zásadní roli imunitní systém [17]. I přesto, že nedávno publikované výsledky Kimpla et al [31] dokazují zvýšenou citlivost HPV pozitivních nádorových linií k ozáření, tato zjištění nevysvětlují, proč mají lepší prognózu také HPV pozitivní pacienti léčení pouze chirurgickým zákrokem.

Z dosavadních výsledků vyplývá, že je nezbytné důkladně porozumět vzájemné souhře mezi adaptivním imunitním systémem, HPV a nádorovým mikroprostředím, a to obzvláště v souvislosti s vývojem nových léčebných postupů založených na aktivaci protinádorové imunitní reakce. Kromě toho se studium specifické imunity ukázalo být významným prognostickým nástrojem u různých typů nádorů, a dokonce se uvažuje, že by u některých nádorových onemocnění mohlo být relevantnějším nástrojem než v současné době využívaný „staging“ nádorů [32].

Vliv specifické imunity na vznik a progresi nádorů asociovaných s HPV – Imunoprofilování jako prognostický nástroj?

Efaktorové T lymfocyty a jejich prognostický význam

Role specifické imunity v rozvoji neoplazií je stále kontroverzní. Nicméně studie prováděné na imunokompetentních myších, včetně myších modelů s orofaryngeálním karcinomem,

dokazují zásadní význam specifické imunity v obraně proti nádorům a potlačení nádorového růstu [17]. Také klinická data ukazují, že k rozvoji nádorů dochází častěji u imunosuprimovaných pacientů [33]. Zvýšená incidence HPV a s ním asociovaných nádorů byla pozorována např. u HIV pozitivních pacientů a pacientů po transplantacích [34]. Bylo prokázáno, že infiltrující lymfocyty potlačují růst nádorů a jejich přítomnost je asociovaná s lepší prognózou pacientů s různými typy nádorů [35].

V současné době existuje několik prací, které se zabývají analýzou imunitního systému v souvislosti s HPV a s ohledem na celkové přežití či prognózu pacienta. Aby dokázali posoudit klinický význam adaptivní imunity na pacientovu prognózu, analyzovali Wansom et al [36] periferní krev HNSCC pacientů, v níž detekovali zvýšený výskyt CD8⁺ T buněk a nižší poměr CD4⁺/CD8⁺ T buněk u HPV 16 pozitivních pacientů ve srovnání s HPV negativními nádory. Procento CD8⁺ T lymfocytů se příliš nelišilo mezi skupinami kuřáků a nekuřáků, což přispívá k hypotéze, že jsou rozdíly v zastoupení CD8⁺ T buněk připisovány spíše HPV infekci než kouření. Vzhledem k tomu, že přítomnost CD8⁺ T lymfocytů predikovala lepší odpověď na léčbu než samotný HPV status, dalo by se říci, že by cirkulující CD8⁺ T lymfocyty mohly sloužit jako prognostický faktor a posílením adaptivní imunity by bylo pravděpodobně možné pozitivně ovlivnit prognózu HPV 16 pozitivních pacientů. V další studii byl zjištěn vyšší výskyt paměťových efektorových a efektorových T buněk (oproti naivním a paměťovým centrálním T buňkám) u HPV pozitivních nádorů ve srovnání s HPV negativními nádory [37]. Podobných výsledků bylo dosaženo na úrovni genové exprese, kdy většina HPV pozitivních vzorků vykazovala profil odpovídající silné specifické imunitní odpovědi v porovnání s HPV negativními vzorky, kde převažovala přirozená imunita. Tato genová analýza se také ukázala být účinnějším prognostickým faktorem než HPV status samotný [38].

V rámci lepšího porozumění lokální imunitní odpovědi se některé studie zabývaly analýzou imunitních buněk v ná-

dorech *in situ*. Ve většině případů jsou imunitní buňky v nádoru detekovány pomocí imunohistochemických metod (IHC), jejichž výhodou je určení přesné lokalizace buněk. Nevýhodou však je, že nevypovídá nic o jejich funkčnosti či aktuálním stavu. Fakt, že je výskyt CD8⁺ T lymfocytů považován za pozitivní prognostický marker, potvrdila u pacientů s HNSCC také data Nasmana et al [39], z jejichž výsledků vyplývá, že infiltrace nádoru CD8⁺ T lymfocyty a vysoký podíl CD8⁺/FoxP3⁺ T buněk pozitivně koreluje s klinickým stavem HPV pozitivních i HPV negativních pacientů. Jak již bylo popsáno výše, Wansom et al [36] detekovali zvýšené hladiny cirkulujících CD8⁺ T lymfocytů v krvi HPV pozitivních pacientů. Pokud ale použili IHC značení vzorků nádorové tkáně, neviděli žádné rozdíly s ohledem na HPV status.

Analýza populací imunitních buněk v nádoru pomocí průtokové cytometrie ukázala výrazně vyšší zastoupení leukocytů, a to zejména CD8⁺ T lymfocytů, u HPV pozitivních pacientů. Zajímavé také je, že tyto CD8⁺ T buňky v HPV pozitivních nádorech měly navíc schopnost produkovat signifikantně vyšší hladiny IFN- γ a IL-17 v porovnání s HPV negativními vzorky. U ostatních populací T buněk, jako jsou Th1 buňky, Treg, či Th17 buňky, nebyly pozorovány výrazné rozdíly mezi HPV pozitivními a negativními nádory [40].

Skupina Badoualové et al [41] pozorovala významně delší celkové přežití HPV pozitivních pacientů, jejichž nádory byly silně infiltrovány PD-1⁺CD4⁺ a PD-1⁺CD8⁺ T lymfocyty. Již dříve bylo publikováno, že exprese PD-1 receptoru na T buňkách je spojována jak s aktivovaným, tak i s takzvaným vyčerpaným fenotypem T buněk [42]. Badoualová et al [41] překvapivě zjistili, že PD-1⁺ T lymfocyty infiltrující HPV pozitivní nádory exprimují výrazně vyšší hladiny aktivčních markerů HLA-DR a CD38, a nejde tudíž o vyčerpané buňky, jak autoři původně předpokládali.

V současné době stále nejsou k dispozici studie, které by se zabývaly detailní analýzou funkce CD8⁺ T lymfocytů u HNSCC pacientů. Je potřeba získat více informací o nádorových a virových antigenech, které infiltrující CD8⁺ T lym-

focyty rozpoznávají, a poznat tak cíle imunitní odpovědi, které jsou důležité pro růst a přežívání nádorových buněk. To povede k vývoji cílených postupů protinádorové imunoterapie. Nejen kvantitativní, ale také kvalitativní analýza imunitních buněk v nádoru bude tedy zásadní pro identifikaci nových, klinicky relevantních prognostických faktorů.

Treg a jejich prognostický význam

Treg patří mezi $CD4^+$ buňky, jejichž hlavní funkcí je potlačovat potenciálně nebezpečné autoreaktivní T lymfocyty, které unikly centrální toleranci v thymu. Tím brání vzniku autoimunitních onemocnění, nastolují periferní toleranci a udržují imunitní homeostázu. Většina vědeckých skupin zaměřujících se na analýzu nádorových $CD4^+$ T lymfocytů jako potenciálního prognostického markeru se zabývá také studiem Treg. Zdá se, že se úloha Treg v nádorové imunologii liší v závislosti na typu a etiologii nádoru. Na jednu stranu Treg potlačují imunitní odpověď proti nádorové tkáni a vysoké hladiny Treg jsou často spojovány se špatnou prognózou pacientů s různými nádorovými onemocněními [43]. Na druhou stranu byla přítomnost Treg popsána jako pozitivní prognostický marker např. u kolorektálního karcinomu či lymfomů [44,45]. Zvýšené hladiny Treg byly popsány také v nádorové tkáni a periferní krvi pacientek s cervikálním karcinomem a jejich zastoupení navíc korelovalo s klinickým stavem pacientek. Pokud však byly Treg z periferní krve HPV 16 pozitivní pacientek *in vitro* depletovány, došlo k zesílení $CD4^+$ T buněčné odpovědi vůči E6 a E7 peptidům [46]. Úloha Treg u pacientů s nádory hlavy a krku není zcela jednoznačná. Některé studie ukazují pozitivní korelaci vysokého zastoupení Treg v nádoru s lokoregionální kontrolou nádorového růstu [25]. Tuto hypotézu také podporují výsledky dalších skupin, ve kterých zastoupení Treg pozitivně koreluje s celkovým přežitím pacientů [47]. V současné době se však velký význam přikládá stanovení poměru Treg a cytotoxických $CD8^+$ T lymfocytů. Data Nasmana et al [39] uvádějí, že pacienti s nádory infiltrovanými vysokým počtem $CD8^+$ T lymfocytů a s vysokým podílem $CD8^+/Treg$

měli delší celkové přežití, a to jak ve skupině HPV pozitivních, tak HPV negativních pacientů. Zajímavá je také studie Boučka et al [48], v níž autoři prokázali, že vysoké hladiny Treg v periferní krvi v době diagnózy mohou predikovat časnou recidivu onemocnění.

Systémová a lokální T buněčná HPV specifická odpověď u pacientů s HNSCC

Systémová odpověď

Vzhledem k tomu, že nádorové buňky infikované virem HPV mohou na svém povrchu exprimovat antigeny odvozené z E6 a E7 onkoproteinů, nabízí se otázka možnosti detekce specifických T lymfocytů namířených proti těmto antigenům. Ukázalo se, že $CD4^+$ a $CD8^+$ T buňky specifické k HPV 16 jsou skutečně častěji detekovány v periferní krvi pacientů, kteří jsou HPV pozitivní, oproti HPV negativním či zdravým kontrolám [49]. Například Heusinkveld et al [49] testovali mononukleární buňky periferní krve (peripheral blood mononuclear cells – PBMC) pacientů na přítomnost T lymfocytů specifických k peptidům derivovaným z HPV 16 onkoproteinů. U 7 z 11 (63,6 %) HPV pozitivních pacientů detekovali specifickou HPV odpověď, na rozdíl od HPV negativních pacientů, kde jich odpovídalo pouze 7 z 28 (25 %). Avšak pouze u 5 ze 17 pacientů byla proliferační aktivita lymfocytů doprovázena produkcí IFN- γ a překvapivě čtyři z těchto pěti nádorů byly HPV negativní. Podobně Albers nebo Hoffmann et al [16,50] detekovali vyšší hladiny HPV 16 E7 specifických T lymfocytů u HPV pozitivních pacientů ve srovnání s HPV negativními nádory a zdravými kontrolami.

Lokální odpověď

Heusinkveld et al [49] dále studovali lokální odpověď vyvolanou přímo v nádorové tkáni a metastatické uzlině, přičemž specifickou T odpověď zjistili skoro u všech pacientů s HPV pozitivními nádory, ale nebyli schopni ji detekovat u žádného z HPV negativních pacientů. Vzhledem k tomu, že systémovou odpověď detekovali pouze u některých pacientů, je evidentní, že analýza pouze samotných PBMC není dostačující a je nutné sledovat především lokální imunitní odpověď přímo v nádoru. Při bližší

analýze HPV 16 specifické T buněčné odpovědi se ukázalo, že sestávala z repertoáru $CD4^+$ pomocných T lymfocytů typu 1 a 2, $CD4^+$ Treg a $CD8^+$ lymfocytů reagujících vůči některým HPV 16 E6 a E7 epitopům. T lymfocyty z nádoru navíc produkovaly spektrum Th1 a Th2 cytokinů, jako jsou IFN- γ , TNF- α , IL-4 a IL-5 [49].

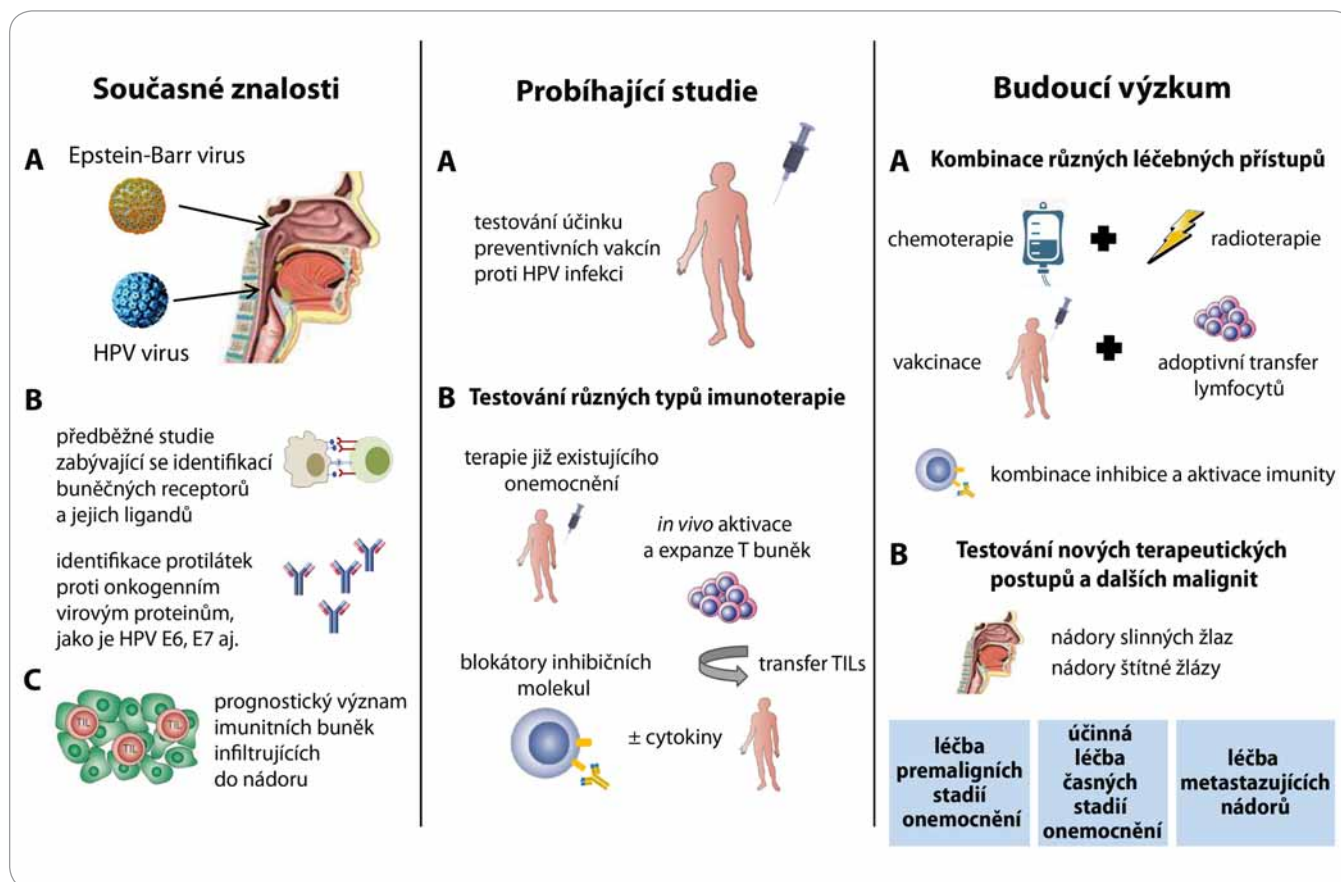
Možnosti imunoterapie pro HPV asociované nádory

V současné době probíhá výzkum mnoha různých druhů imunoterapií určených pro léčbu pacientů s nádory hlavy a krku. Výčet všech možných přístupů by přesahoval rámec tohoto přehledu, proto jsou zde uvedeny pouze některé názorné příklady (obr. 1).

Profylaktické typy vakcín jsou založeny na principu prevence vzniku virové infekce v epiteliálních buňkách pomocí protilátkové odpovědi, která je namířená proti virovým kapsidovým proteinům. Nicméně strategie tohoto typu nejsou účinné pro léčbu již probíhající infekce virem HPV nebo onemocnění asociovaných s touto infekcí. V těchto případech vyžaduje léčba aktivaci buněčné imunity, převážně $CD4^+$ a $CD8^+$ T lymfocytů, které dokáží rozpoznat a eliminovat buňky infikované virem.

Pro vývoj nových imunoterapeutických protokolů je nezbytné identifikovat antigeny, které by byly pro daný nádor specifické a které by určovaly specifitu požadované imunitní odpovědi. Virové onkoproteiny E6 a E7 by mohly být vhodným modelem nádorových antigenů z několika důvodů. Jednak jsou tyto virové proteiny pro tělo cizí, a tudíž více imunogenní v porovnání s proteiny těla vlastními, které jsou u nádorových buněk často mutovány (např. protein p53). Ale také jsou exprimovány všemi buňkami, které virus infikoval, a tudíž každým nádorem, který daný virus indukoval. Vzhledem k tomu, že jsou E6 a E7 proteiny vyžadovány pro vznik a zachování maligního fenotypu, jsou nepřetržitě exprimovány nádorovými buňkami a zdá se být nepravděpodobné, že by nádorové buňky tlumily jejich expresi za účelem vyhnout se imunitnímu systému [51].

Slibné výsledky přinesla II. fáze klinické studie testující přístup založený



Obr. 1. Možnosti imunoterapie a dalších léčebných postupů u pacientů s nádory hlavy a krku.

V současné době je již známa: A. role onkogenních virů HPV a EBV při vzniku nádorů orofaryngu a nazofaryngu; B. byly identifikovány imunologické markery na HNSCC a detekovány protilátky proti virovým antigenům; C. na základě těchto studií se uvažuje, že by imunitní buňky mohly sloužit jako prognostické markery předpovídající odpověď na klasickou terapii. V současné době probíhají studie: A. určující přínos profylaktických vakcín; B. probíhá testování jednotlivých imunoterapeutických přístupů, jako jsou terapeutické vakcinace, adoptivní transfer T lymfocytů či blokování inhibičních molekul. Budoucí výzkum bude zaměřen na: A. testování kombinací různých léčebných přístupů využívajících potenciální synergický efekt mezi imunoterapií a radio- a/nebo chemoterapií; B. vývoj nových postupů a využití imunoterapie i v dalších fázích onemocnění a pro jiné typy nádorů.

na podání vakcíny obsahující HPV 16 E6 a E7 peptidy ve Freundově adjuvans, která byla podávána pacientkám s vulvární intraepiteliální neoplazií (VIN). Po 12 měsících pozorovali autoři studie kompletní klinickou odpověď u 47 % pacientek, přičemž u všech se jednalo o T buněčnou odpověď indukovanou podáním vakcíny [52].

V současné době nejsou k dispozici data z klinických studií založených na principu HPV vakcín pro pacienty s nádory hlavy a krku. Nicméně právě probíhá hodnocení klinické studie fáze I pro pacienty v pokročilých stadiích onemocnění a po prokázání recidivy (vč. HNSCC pacientů) využívající terapii na principu adoptivního transferu, kde jsou PBMC *in vitro* stimulovány peptidy

E6 a E7 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00019110>).

Adoptivní transfer jako léčebný postup byl testován také u pacientů s pokročilým nazofaryngeálním karcinomem, který je známý tím, že exprimuje EBV (Epstein-Barr virus) antigeny. T lymfocyty, které rozpoznávaly EBV antigeny, byly aktivovány a expandovány pomocí autologních EBV transformovaných B buněk. Léčba byla pacienty dobře snášena, přičemž 60 % pacientů vykazovalo kontrolu progresu onemocnění [53]. Podobný přístup založený na přípravě T lymfocytů namířených proti nádoru byl popsán také u pacientů s HNSCC [54].

Aktivace a proliferace T lymfocytů vyvolané antigenem jsou regulované

mimo jiné také vazbou kostimulačních a inhibičních receptorů. Signalizace prostřednictvím receptorů ovlivňuje zahájení, průběh i celkový výsledek imunitní odpovědi. Pokud by na buňkách nebyly tyto inhibiční molekuly exprimovány, T lymfocyty by byly dlouhodobě aktivované, což by mohlo vést k poškození tkání či vzniku autoimunit. Nicméně v kontextu nádorové imunologie, kde probíhá specifická imunitní reakce proti nádorovým antigenům, představují inhibiční molekuly jednu z hlavních překážek, protože by mohlo dojít k navození tolerance vůči nádoru. Bylo vynaloženo mnoho úsilí na výzkum blokátorů těchto inhibičních molekul a jejich využití se dnes zdá být přínosem pro léčbu pacientů s různým ná-

dorovým onemocněním. Mezi dva nejznámější a nejstudovanější inhibiční T buněčné receptory patří CTLA-4 (cytotoxický T-lymphocyte-associated protein-4) a PD-1 (programmed cell death-1), od nichž odvozené monoklonální protilátky jsou v současné době již používány v klinické praxi.

Vzhledem k výsledkům současných terapeutických postupů a také faktu, že je konvenční léčba často spojována se značnými nežádoucími účinky, je potřeba soustředit pozornost na výzkum méně toxických a lépe cílených terapií. S narůstajícími znalostmi týkajícími se dysfunkcí imunitního systému pacientů s nádory hlavy a krku a také díky pokrokům v oblasti identifikace HNSCC nádorových antigenů se využití imunoterapie zdá být atraktivním léčebným přístupem snad již blízké budoucnosti.

Literatura

- Guo T, Califano JA. Molecular biology and immunology of head and neck cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2015; 24(3): 397–407. doi: 10.1016/j.soc.2015.03.002.
- Psyrrri A, Burtneš B, Harari PM et al. Head and neck cancer. *J Oncol* 2009; 2009: 358098. doi: 10.1155/2009/358098.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127(12): 2893–2917. doi: 10.1002/ijc.25516.
- Young D, Xiao CC, Murphy B et al. Increase in head and neck cancer in younger patients due to human papillomavirus (HPV). *Oral Oncol* 2015; 51(8): 727–730. doi: 10.1016/j.oraloncology.2015.03.015.
- D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2007; 356(19): 1944–1956.
- Tachezy R, Kozar J, Saláková M et al. HPV and other risk factors of oral cavity/oropharyngeal cancer in the Czech Republic. *Oral Dis* 2005; 11(3): 181–185.
- Marur S, D'Souza G, Westra WH et al. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol* 2010; 11(8): 781–789. doi: 10.1016/S1473-2045(10)70017-6.
- Kozar J, Tachezy R. What are the implications of human papillomavirus status in oropharyngeal tumors for clinical practice? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2014; 22(2): 90–94. doi: 10.1097/MOO.0000000000000030.
- Sepiashvili L, Bruce JP, Huang SH et al. Novel insights into head and neck cancer using next-generation „omic” technologies. *Cancer Res* 2015; 75(3): 480–486. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3124.
- Stransky N, Egloff AM, Tward AD et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* 2011; 333(6046): 1157–1160. doi: 10.1126/science.1208130.
- Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA et al. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2007; 357(25): 2552–2561.
- Skinner HD, Sandulache VC, Ow TJ et al. TP53 disruptive mutations lead to head and neck cancer treatment failure through inhibition of radiation-induced senescence. *Clin Cancer Res* 2012; 18(1): 290–300. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2260.
- Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* 2015; 517(7536): 576–582. doi: 10.1038/nature14129.
- Mrhalova M, Plzak J, Betka J et al. Epidermal growth factor receptor – its expression and copy numbers of EGFR gene in patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Neoplasma* 2005; 52(4): 338–343.
- Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(1): 9–22. doi: 10.1038/nrc2982.
- Albers A, Abe K, Hunt J et al. Antitumor activity of human papillomavirus type 16 E7-specific T cells against virally infected squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 2005; 65(23): 11146–11155.
- Spanos WC, Nowicki P, Lee DW et al. Immune response during therapy with cisplatin or radiation for human papillomavirus-related head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2009; 135(11): 1137–1146. doi: 10.1001/archoto.2009.159.
- Duray A, Demoulin S, Hubert P et al. Immune suppression in head and neck cancers: a review. *Clin Dev Immunol* 2010; 2010: 701657. doi: 10.1155/2010/701657.
- Allen CT, Judd NP, Bui JD et al. The clinical implications of antitumor immunity in head and neck cancer. *Laryngoscope* 2012; 122(1): 144–157. doi: 10.1002/lary.21913.
- Russell S, Angell T, Lechner M et al. Immune cell infiltration patterns and survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck Oncol* 2013; 5(3): 24.
- Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(4): 298–306. doi: 10.1038/nrc3245.
- Reichert TE, Day R, Wagner EM et al. Absent or low expression of the zeta chain in T cells at the tumor site correlates with poor survival in patients with oral carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58(23): 5344–5347.
- Kuss I, Saito T, Johnson JT et al. Clinical significance of decreased zeta chain expression in peripheral blood lymphocytes of patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5(2): 329–334.
- Hoffmann TK, Dworacki G, Tsukihito T et al. Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. *Clin Cancer Res* 2002; 8(8): 2553–2562.
- Badoual C, Hans S, Rodriguez J et al. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res* 2006; 12(2): 465–472.
- Zhang YL, Li J, Mo HY et al. Different subsets of tumor infiltrating lymphocytes correlate with NPC progression in different ways. *Mol Cancer* 2010; 9: 4. doi: 10.1186/1476-4598-9-4.
- Strauss L, Bergmann C, Szczepanski M et al. A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res* 2007; 13(15 Pt 1): 4345–4354.
- Kesselring R, Thiel A, Pries R et al. Human Th17 cells can be induced through head and neck cancer and have a functional impact on HNSCC development. *Br J Cancer* 2010; 103(8): 1245–1254. doi: 10.1038/sj.bjc.6605891.
- Kanodia S, Fahey LM, Kast WM. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; 7(1): 79–89.
- Iijima N, Goodwin EC, Dimaio D et al. High-risk human papillomavirus E6 inhibits monocyte differentiation to Langerhans cells. *Virology* 2013; 444(1–2): 257–262. doi: 10.1016/j.virol.2013.06.020.
- Kimple RJ, Harari PM, Torres AD et al. Development and characterization of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma tumorgrafts. *Clin Cancer Res* 2013; 19(4): 855–864. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2746.
- Galon J, Pagès F, Marincola FM et al. Cancer classification using the immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med* 2012; 10: 205. doi: 10.1186/1479-5876-10-205.
- Leiding JW, Holland SM. Warts and all: human papillomavirus in primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130(5): 1030–1048. doi: 10.1016/j.jaci.2012.07.049.
- Kreimer AR, Alberg AJ, Daniel R et al. Oral human papillomavirus infection in adults is associated with sexual behavior and HIV serostatus. *J Infect Dis* 2004; 189(4): 686–698.
- Kim ST, Jeong H, Woo OH et al. Tumor-infiltrating lymphocytes, tumor characteristics, and recurrence in patients with early breast cancer. *Am J Clin Oncol* 2013; 36(3): 224–231. doi: 10.1097/COC.0b013e3182467d90.
- Wansom D, Light E, Worden F et al. Correlation of cellular immunity with human papillomavirus 16 status and outcome in patients with advanced oropharyngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2010; 136(12): 1267–1273. doi: 10.1001/archoto.2010.211.
- Turksma AW, Bontjes HJ, van den Heuvel H et al. Effector memory T-cell frequencies in relation to tumour stage, location and HPV status in HNSCC patients. *Oral Dis* 2013; 19(6): 577–584. doi: 10.1111/odi.12037.
- Thurlow JK, Peña Murillo CL, Hunter KD et al. Spectral clustering of microarray data elucidates the roles of microenvironment remodeling and immune responses in survival of head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2010; 28(17): 2881–2888. doi: 10.1200/JCO.2009.24.8724.
- Nasman A, Romanitan M, Nordfors C et al. Tumor infiltrating CD8+ and Foxp3+ lymphocytes correlate to clinical outcome and human papillomavirus (HPV) status in tonsillar cancer. *PLoS One* 2012; 7(6): e38711. doi: 10.1371/journal.pone.0038711.
- Partlova S, Bouček J, Kloudová K et al. Distinct patterns of intratumoral immune cell infiltrates in patients with HPV-associated compared to non-virally induced head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology* 2015; 4(1): e965570.
- Badoual C, Hans S, Merillon N et al. PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer Res* 2013; 73(1): 128–138. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2606.
- Sauce D, Almeida JR, Larsen M et al. PD-1 expression on human CD8 T cells depends on both state of differentiation and activation status. *AIDS* 2007; 21(15): 2005–2013.
- Curiel TJ, Coukos G, Zou L et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; 10(9): 942–949.
- Salama P, Phillips M, Grieff F et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(2): 186–192. doi: 10.1200/JCO.2008.18.7229.
- Alvaro T, Lejeune M, Salvadó MT et al. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11(4): 1467–1473.
- Piersma SJ, Jordanova ES, van Poelgeest MI et al. High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. *Cancer Res* 2007; 67(1): 354–361.
- Bron L, Jandus C, Andrejic-Blant S et al. Prognostic value of arginase-II expression and regulatory T-cell infiltration in head and neck squamous cell carcinoma.

Int J Cancer 2013; 132(3): E85–E93. doi: 10.1002/ijc.27728.

48. Boucek J, Mrkvan T, Chovanec M et al. Regulatory T cells and their prognostic value for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. J Cell Mol Med 2010; 14(1–2): 426–433.

49. Heusinkveld M, Goedemans R, Briet RJ et al. Systemic and local human papillomavirus 16-specific T-cell immunity in patients with head and neck cancer. Int J Cancer 2012; 131(2): E74–E85. doi: 10.1002/ijc.26497.

50. Hoffmann TK, Arsov C, Schirlau K et al. T cells specific for HPV16 E7 epitopes in patients with squamous cell carcinoma of the oropharynx. Int J Cancer 2006; 118(8): 1984–1991.

51. Best SR, Niparko KJ, Pai SL. Biology of human papillomavirus infection and immune therapy for HPV-related head and neck cancers. Otolaryngol Clin North Am 2012; 45(4): 807–822. doi: 10.1016/j.otc.2012.04.005.

52. Kenter GG, Welters MJ, Valentijn AR et al. Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial

neoplasia. N Engl J Med 2009; 361(19): doi: 10.1056/NEJMoa0810097.

53. Comoli P, Pedrazzoli P, Maccario R et al. Cell therapy of stage IV nasopharyngeal carcinoma with autologous Epstein-Barr virus-targeted cytotoxic T lymphocytes. J Clin Oncol 2005; 23(35): 8942–8949.

54. Chang AE, Li Q, Jiang G et al. Generation of vaccine-primed lymphocytes for the treatment of head and neck cancer. Head Neck 2003; 25(3): 198–209.

Imunoterapie uroteliálního karcinomu močového měchýře – od BCG vakcín k cílené imunoterapii

Immunotherapy of Urothelial Carcinoma of the Bladder – from BCG Vaccines to Targeted Therapy

Matoušková M.

Urocentrum Praha

Souhrn

Zhoubné nádory močového měchýře postihují muže i ženy s vysokou prevalencí. Obvykle vycházejí z urotelu a více než 3/4 z nich bývají neinvazivní nádory močového měchýře. Základní léčebnou modalitu představuje transuretrální resekce tumoru. Její role je nezastupitelná při léčbě, ale i při stagingu nádorů močového měchýře. I u neinvazivních nádorů je standardem pokračovat lokální profylaxí s cílem snížení pravděpodobnosti rizika recidivy. Zatímco u nemocných s nízkým či středním rizikem bývá dostatečná lokální chemoprophylaxe, u vysoce rizikových neinvazivních nádorů preferujeme podání lokální imunoterapie pomocí *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) vakcíny. U pokročilých nádorů spočívá farmakologické ovlivnění v chemoterapii samostatně nebo v kombinaci s lokoregionální léčbou. Výsledky klinických studií dokládají účinnost nových přípravků z oblasti imunoterapie i pro pokročilé nádory močového měchýře.

Klíčová slova

nádory močového měchýře – imunoterapie – BCG vakcína – kontrolní body imunitní reakce

Summary

Bladder cancer has high prevalence in men and women. Bladder cancer usually originates from urothelium. More than 75% of cases are classified as non-muscle-invasive bladder cancer. Urothelial bladder carcinoma is usually managed by transurethral resection of the bladder tumor. Role of transurethral resection of the bladder tumor is also essential in bladder cancer staging. Local prophylaxis is used in non-muscle-invasive bladder cancer to reduce risk of recurrence. While local chemoprophylaxis is sufficient in low and middle risk patients, intravesical instillation of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) is preferred in high risk bladder cancer. Chemotherapy alone or in combination with locoregional treatment is used in advanced bladder cancer. New immunotherapy modalities have proven their efficacy in several clinical studies in advanced bladder cancer.

Key words

urothelial bladder cancer – immunotherapy – BCG vaccine – checkpoint inhibitor

Autorka deklaruje, že v souvislosti s předmětem studie nemá žádné komerční zájmy.

The author declares she has no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



MUDr. Michaela Matoušková

Urocentrum Praha

Karlovo náměstí 319/3

120 00 Praha 2

e-mail: matouskova@urocentrum.cz

Obdrženo/Submitted: 3. 9. 2015

Přijato/Accepted: 23. 10. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20154S95>

Úvod

Zhoubné nádory močového měchýře jsou 11. nejčastější malignitou na světě [1]. ČR se nachází na 5. místě s incidencí 25,5/100 000 obyvatel, mezi ženami pak na 3. místě. Incidence je přibližně čtyřnásobně vyšší u mužů než u žen. V mortalitě patří nádorům močového měchýře 14. místo ve světovém měřítku. ČR je pak na 19. místě [1]. V incidenci i mortalitě v Evropě vede Španělsko. V roce 2012 bylo diagnostikováno více než 130 000 nádorů močového měchýře ve světě, z toho 2 210 v ČR a přibližně 34 000 pacientů na nádor zemřelo [2,3].

Uroteliální karcinomy nacházíme ve více než 90 % všech nádorů močového měchýře. Přibližně 70 % z nich nepřečká vrstvu muscularis propria, tyto nádory jsou označovány jako neinvazivní nádory močového měchýře (non-muscle invasive bladder cancer – NMIBC), před lety jsme také hovořili o „povrchových nádorech měchýře“. Mezi NMIBC jsou zastoupeny kategorie Ta (70 %), T1 (20 %) a Tis (10 %). Standardní primární léč-

bou je stratifikovaná transuretrální resekce tumoru (transurethral resection of bladder – TURB). Kromě vlastního terapeutického výkonu je důležité provedení nezbytné i pro nádorový staging. Přes náležitě provedenou TURB je vysoké riziko recidiv (až 70 %), ale i vysoké riziko progresu (až 30 %) do invazivních forem [4]. Z hlediska rizika recidivy a progresu jsou tumory rozděleny do skupin s nízkým, středním a vysokým rizikem (tab. 1, 2). Pro výpočet se používá nejčastěji skórovací kalkulačka EORTC, dostupná na <http://www.eortc.be/tools/bladdercalculator/>. Podle míry rizika je postupováno při adjuvantní léčbě. U pacientů s nízkým rizikem jsou dostatečné endoskopické kontroly. U pacientů se středně rizikovými tumory je indikována další intravezikální chemoterapie nebo intravezikální imunoterapie *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) vakcínou. U pacientů s vysokým rizikem je optimální podání intravezikální imunoterapie BCG vakcínou a v případě selhání léčby BCG vakcínou nebo

její nedostupnosti může být navržena cystektomie [5].

Intravezikální léčba

Hledání cest, jak oddálit recidivu a progresi, vedlo k využití intravezikální léčby. Intravezikální profylaxe ke snížení recidiv začala být používána v 60. letech minulého století. Z cytotoxických látek jsou do dnešní doby v Evropě používány mitomycin C a farmorubicin, v USA ještě thiotepa. Z roku 1976 pochází první práce Moralese et al [6] s využitím BCG vakcíny u neinvazivních nádorů močového měchýře. Tato léčba se stala standardem v adjuvantní léčbě NMIBC. Při srovnání s cytotoxickými přípravky se zdá být účinnější v redukci recidiv, ale především ve snížení rizika progresu [7–9]. Při podání BCG vakcíny předpokládáme odpověď u 55–65 % papilárních nádorů a až 70–75 % karcinoma *in situ* (CIS), naopak u 30–45 % pacientů s NMIBC můžeme očekávat selhání BCG [7,10,11]. Přes kompletní odpověď je možné očekávat recidivu ve více než 50 % [8].

Instilace BCG vakcínou preferujeme u nemocných s vysokým rizikem recidivy a progresu a u nemocných s karcinoma *in situ*. U nízkého a středně rizikových tumorů upřednostňujeme spíše podání lokální chemoprofylaxe. Optimální léčebný režim při intravezikální imunoprofylaxi není stále jednoznačně určen. V současné době zahajujeme podání v indukčním režimu, který zahrnuje podání šesti dávek BCG vakcíny. Na indukční režim navazuje udržovací léčba v rozsahu 1–3 let. Od roku 2012 došlo k celosvětovému výpadku ve výrobě BCG vakcíny. Nedostatek vedl k alternativním řešením u NMIBC a podání BCG vakcíny výhradně v indukčním režimu. Podle dostupných informací se zdá, že výroba je obnovována a BCG vakcína bude znovu k dispozici nemocným s NMIBC.

Intravezikální léčba je spojena s celou řadou nežádoucích účinků. V současnosti podávaná cytostatika mají velkou molekulovou hmotnost a prakticky se nevstřebávají do cévního řečiště. Jejich nejčastějšími vedlejšími účinky jsou chemická cystitida a iritační příznaky s ní spojené. Při aplikaci BCG je nutné počítat nejen s lokálními příznaky (hematurie, chemická cystitida, sraš-

Tab. 1. Riziko recidivy neinvazivních nádorů močového měchýře podle EORTC [4].

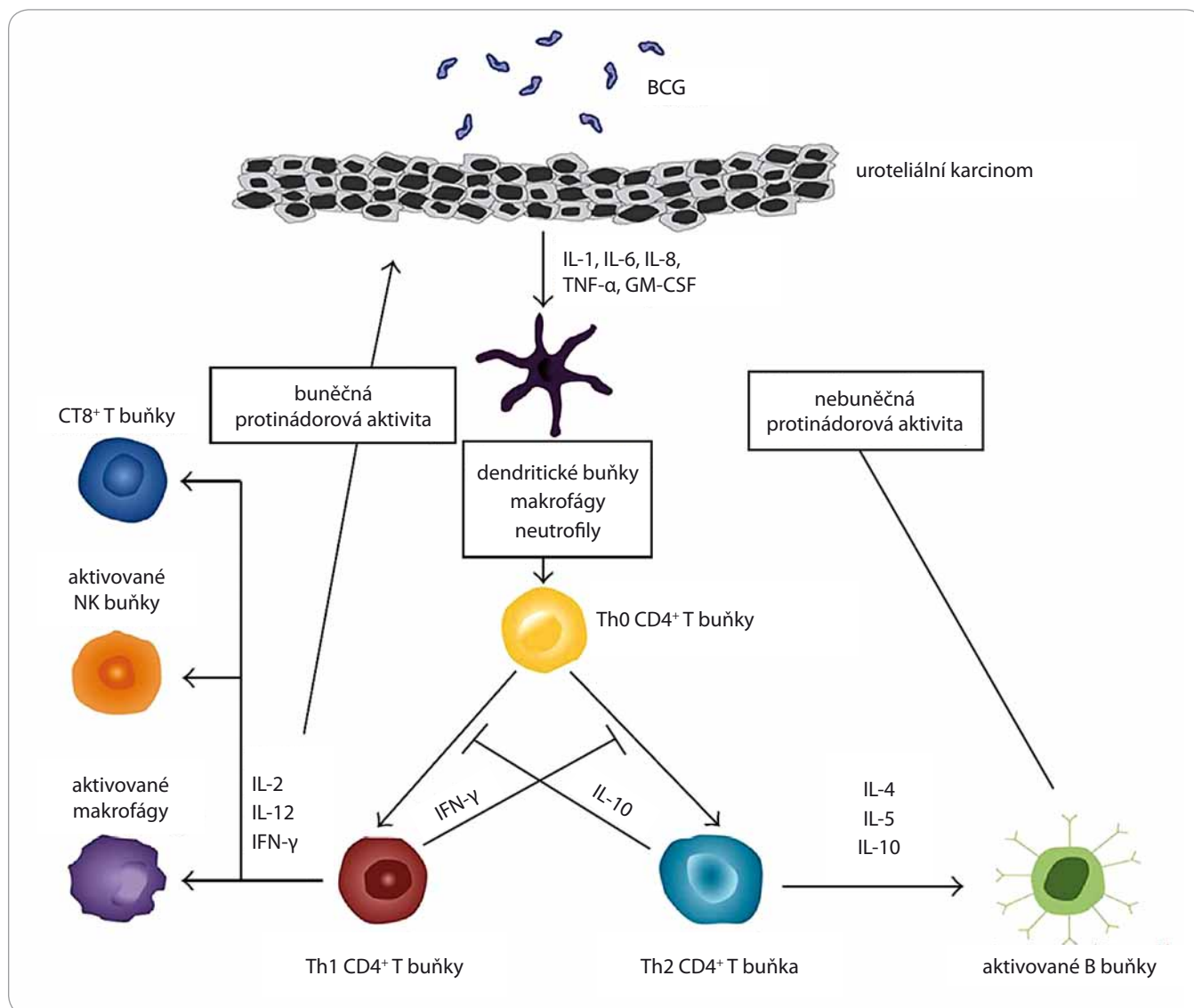
Skóre	Pravděpodobnost recidivy do roku (%)	Pravděpodobnost recidivy do 5 let (%)	Riziková skupina
0	15 (10–19)	31 (24–37)	LR
1–4	24 (21–25)	46 (42–49)	MR
5–9	38 (35–41)	62 (58–65)	
10–17	61 (55–67)	78 (73–84)	HR

LR – nádory s nízkým rizikem, MR – středně rizikové nádory, HR – nádory s vysokým rizikem

Tab. 2. Riziko progresu neinvazivních nádorů močového měchýře podle EORTC [4].

Skóre	Pravděpodobnost progresu do roku (%)	Pravděpodobnost progresu do 5 let (%)	Riziková skupina
0	0,2 (0–0,7)	0,8 (0–1,7)	LR
2–6	1 (0,4–1,6)	6 (5–8)	MR
7–13	5 (4–7)	17 (14–20)	HR
14–23	17 (10–24)	45 (35–55)	

LR – nádory s nízkým rizikem, MR – středně rizikové nádory, HR – nádory s vysokým rizikem



Obr. 1. Mechanismus účinku BCG vakcíny.

těly měchýř, obstrukce ureterů), ale i lokoregionálními (epididymitis, prostatitis, absces ledviny, pánevní lymfadenitida) a systémovými život ohrožujícími stavy. Systémové reakce zahrnují febrilní stavy, flu-like syndrom, alergické reakce, septické stavy, artralgie, cytopenie, BCG-itis či BCG hepatitis. Více než 20 % pacientů netoleruje podání BCG pro její nežádoucí účinky [9].

Pochopení mechanismu účinku BCG (obr. 1), přestože není ještě zcela vyčerpávajícím způsobem popsán, a jeho jasných limitací je rozhodující pro zlepšení účinnosti léčby. Po instilaci BCG dochází k vazbě BCG k fibronektinu exprimovaného urotemem. Tak se mykobakterie stávají součástí normálních i nádorově

změněných buněk. Důsledkem je aktivace urotelu s následnou zánětlivou reakcí močového měchýře [12]. Na povrchu urotheliálních buněk a antigen prezentujících buněk (antigen presenting cell – APC) je přítomný BCG antigen jako součást hlavního histokompatibilního komplexu (major histocompatibility complex – MHC) II. třídy, stimulující CD4⁺ T lymfocyty a indukující především T helper 1 (Th1) imunitní odpověď [13]. Tento komplex a robustní imunitní reakce navozená BCG dokazuje masivní krátkodobá sekrece cytokinů v moči, včetně interleukinů (IL)-1, IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, interferon-inducible protein (IP)-10, tumor necrosis factor α (TNF-α), granulocyte-monocyte colony

stimulating factor (GM-CSF) a interferon γ (IFN-γ) [14]. Ačkoliv úloha každého z cytokinů hrajících nějakou roli v léčbě urotheliálních nádorů není zcela jasná, je zřejmé, že Th1 cytokiny (např. IFN-γ, IL-2 a IL-12) jsou spojeny s BCG odpovědí, naopak Th2 cytokiny (např. IL-10 a IL-6) korelují se selháním BCG [15]. Do příchodu BCG léčby nebyla k dispozici data podporující udržovací režimy spočívající v sérii krátkodobé reindukční léčby ve třech měsíčních intervalech, tak jak je doporučována SWOG (Southwest Oncology Group) [16].

Další možností je použití **interferonu α2b**. Interferony jsou glykoproteiny izolované v 50. letech minulého století, ceněné pro své antivirové vlast-

nosti. Postupně byly izolovány tři typy IFN- α (současně je celou skupinou interferonů), IFN- β a IFN- γ . IFN- α a IFN- β jsou sdruženy jako typ I interferonů, naopak IFN- γ jako typ II. Receptor typ I IFN má dvě součásti, IFNAR-I a IFNAR-II, které postupně vážou a fosforylují JAK molekuly spouštějící kaskádu vedoucí k transkripci [17]. Rodina IFN- α vede ke stimulaci NK buněk, navozuje odpověď MHC třídy I a zvyšuje rozpoznání protilátek [18]. Protinádorové vlastnosti umožňuje přímý antiproliferační efekt a komplexní imunomodulační efekt [17]. Oba mohou být s výhodou uplatněny v léčbě nádorů močového měchýře. Dostupné v klinické praxi jsou IFN- α 2a a IFN- α 2b, více dat je k dispozici o IFN- α 2b, ať již samostatně, nebo v kombinaci s BCG, kde je popsáno synergní působení. Efekt BCG závisí na indukcii objemu Th1 cytokinového profilu a IFN- α 2b může potencovat Th1 imunitní odpověď [14]. Ačkoliv teoreticky je kombinace slibná, v klinické praxi jsou výstupy smíšené.

Po dlouhá léta byl uplatňován u IFN- α především jeho antiproliferační efekt. V menší míře navodí přímo apoptózu nádorových buněk. IFN- α nezávisle indukuje TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expresi UM-UC-12 uroteliálních nádorových buněk [18,19], která následně spouští apoptózu buněk s expresí příslušného receptoru. K buněčné smrti dochází v důsledku Fas-associated protein s FADD (death-domain) závislé na aktivaci DISC (death inducing signaling complex) a následnou aktivací kaspázy-8. IFN- α může stimulovat TARIL mRNA a aktivovat aktivní TRAIL protein neutrofilů a monocytů, tím indukuje apoptotickou aktivitu proti TRAIL senzitivním leukemickým buněčným liniím [18]. Apoptotický účinek IFN- α však není omezen pouze na TRAIL, spíše ovlivňuje kaspázu-8 jednak cestou závislou na receptoru pro buněčnou smrt, ale i cestou nezávislou. BCG, podobně jako IFN- α , prokázal, že indukuje TRAIL, a to koreluje s odpovědí pacientů na léčbu BCG. Zároveň to vyvolalo zájem o společný výzkum. Dalším přímým efektem IFN- α je zvýšení cytotoxicity CD4⁺ T lymfocytů a zvýšení rozpoznání antigenů zvýšenou expresí MHC třídy I [19–21]. Rovněž bylo popsáno přímé potlačení proliferace in-

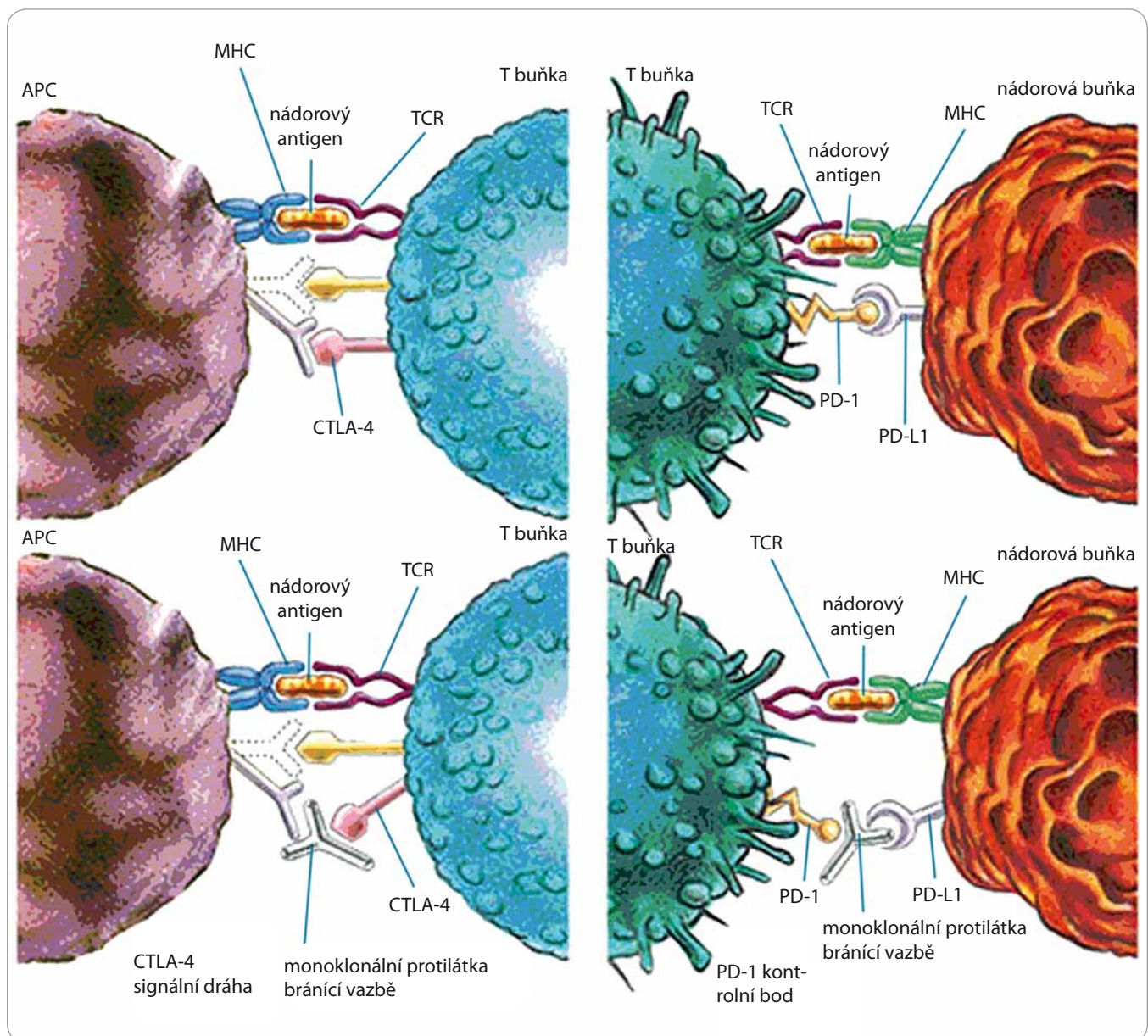
dukci tumor supresorových genů a inhibici nádorových onkogenů [19,22]. Bylo popsáno i významné snížení angiogeneze v lidském urotelu při a po léčbě IFN- α 2b, která následovala po transuretrální resekci povrchových nádorů močového měchýře [23].

Využití monoterapie IFN- α 2b v léčbě karcinomu močového měchýře bylo studováno několika skupinami. Glashan publikoval v roce 1990 data z randomizované kontrolované studie zkoumající režimy IFN- α 2b s vysokou (100×10^6 IU) a nízkou dávkou (10×10^6 IU) u pacientů s CIS [24]. Pacienti byli léčeni jednou týdně po dobu 12 týdnů a následně jednou měsíčně po dobu jednoho roku. Úplná odpověď byla sledována u 43 % pacientů ve skupině s vysokou dávkou a u 5 % pacientů ve skupině s nízkou dávkou. U pacientů ve skupině s vysokou dávkou, kteří dosáhli úplné odpovědi, bylo 90 % pacientů bez známek onemocnění po pouhých šesti měsících sledování. Hlavními nežádoucími účinky byl flu-like syndrom (8 % u nízké dávky a 17 % u vysoké dávky). Nevyskytovaly se ale iritační symptomy, které jsou často sledovány u léčby BCG. Když byli IFN- α 2b léčeni pacienti po selhání BCG léčby, u 8 z 12 pacientů došlo k rekurenci onemocnění po třech měsících sledování a pouze 1 z 12 pacientů byl bez známek onemocnění po 24 měsících [25]. Jak bylo již výše popsáno, antiproliferační a imunomodulační efekt IFN- α se nabízel pro kombinaci s BCG léčbou. Klinické využití kombinace IFN- α 2b a BCG bylo zpočátku zkoumáno u BCG refrakterních pacientů a následně i u BCG naivních pacientů [26–30].

Jinou možností je podání **interleukinu 2** (IL-2), jehož objev a popis byl jedním ze zásadních objevů na poli imunologie. Před jeho objevením existovalo přesvědčení, že lymfocyty jsou diferencovány a nejsou schopny další proliferace [31,32]. Od objevu faktu, že IL-2 zprostředkovává kontrolu růstu T lymfocytů v buněčných kulturách, byly dále odhaleny podrobnosti mechanismu jejich fungování. Relativně časně byl skutečně objeven, že IL-2 zvyšuje produkci cytotoxických lymfocytů, které jsou schopny navodit lýzu nádorových buněk, zatímco ušetří zdravé buňky. Tyto

IL-2 aktivované lymfocyty dostaly označení „lymphokine-activated killer“ (LAK) a vědci se domnívali, že hrají velkou roli v protinádorové imunitní reakci [33]. Dále bylo zjištěno, že IL-2 posiluje cytotoxickou aktivitu NK buněk a monocytů [34]. Dokonce bylo zjištěno, že IL-2 je důležitým faktorem pro aktivaci B lymfocytů [35]. Když byly popsány cytokinové profily CD4⁺ Th1 a Th2 lymfocytů, bylo zjevné, že IL-2 je cytokinem produkovaným převážně Th1 lymfocyty [36]. Právě cytotoxické protinádorové vlastnosti lymfocytů indukované IL-2 udělaly z IL-2 vhodnou látku pro imunologické ovlivnění nádorových onemocnění.

Zájem o využití IL-2 v karcinomu močového měchýře stoupl poté, co několik badatelů odhalilo zvýšené hladiny IL-2 (spolu s ostatními cytokiny) v moči pacientů léčených BCG, což naznačovalo imunomodulační účinek BCG [37]. Také bylo zdokumentováno zvýšení exprese receptoru pro IL-2 na T lymfocytech v moči u pacientů léčených BCG [38]. Zvýšené hladiny IL-2 v moči rovněž korelují s odpovědí na léčbu BCG. To podporuje domněnku, že Th1 cytokinový profil může souviset s příznivou odpovědí na BCG [14]. Dále také zvýšené hladiny IL-2 pozorované u pacientů s instilovaným BCG naznačují lokální a i systémovou imunitní odpověď na léčbu [39]. Výše popsané nálezy vedly k závěru, že IL-2 by se dal léčebně využít u karcinomu močového měchýře. Nicméně nepříznivý bezpečnostní profil systémově podávaného IL-2 vedl k jeho využití pouze jako léčby intravezikální. Zprávy o intravezikálním použití IL-2 odhalují významně příznivější bezpečnostní profil a prokazují i jistou míru účinnosti buď v monoterapii, či v kombinaci s BCG [40–43]. Den Otter et al podávali samotný IL-2 intravezikálně po nekompletní transuretrální resekci T1 papilárního uroteliálního karcinomu, grade I–II a prokázali regresí lézí u 8 z 10 pacientů [44]. Další výzkumy se zaměřily na vývoj rekombinantního kmene BCG, který by produkoval IL-2 [45,46]. Zvířecí modely, které tento postup využily, ukázaly, že kmeny BCG produkující IL-2 v porovnání s normálními kmeny BCG zvýšily produkci IFN- γ , vedly k příznivějšímu poměru IFN- γ vůči IL-4, vylepšily antigenspecifickou proli-



Obr. 2. Mechanizmy úniku buněk před kontrolou imunitního systému.

APC – antigen prezentující buňka, MHC – major histocompatibility complex, TCR – T buněčný receptor

feraci, zvýšily protinádorovou cytotoxicitu a vedly k Th1 cytokinovému profilu i u imunosuprimovaných či IL-4 transgenních myší (to jsou dvě podmínky, jež favorizují Th2 odpověď) [45,47]. Vzhledem k tomu, že IL-2 hraje zásadní roli v Th1 odpovědi, dozajista zůstane v oblasti zájmu pro imunoterapii karcinomu močového měchýře.

Nemalé naděje jsou vkládány i do IL-10 a IL-12. Další studie potvrzující účinnost jsou ale nezbytné. Nicméně již nyní se ukazuje velký potenciál monoklonální protilátky proti

IL-10R1 (anti-IL-10R1 mAb), která nejenže vykazuje místní kontrolu onemocnění, ale potenciálně může navodit systémovou imunomodulaci pro prevenci metastatického karcinomu měchýře.

Systémová léčba

Na rozdíl od neinvazivních nádorů, kde je podání BCG vakcíny již dlouho považováno za standardní postup, u pokročilých nádorů možnosti imunoterapie teprve hledají své místo. Do současné doby nebyla BCG vakcína jinou látkou překonána, ať se to týká schopnosti sní-

žit riziko recurence onemocnění, či progresu. Naopak limitujícím faktorem BCG vakcíny je bezpečnostní profil a možnost výskytu závažné toxicity. Navíc stále existuje skupina pacientů (kolem 30 %), kteří na léčbu BCG nezareagují a dojde u nich k progresi onemocnění v invazivní formu zasahující do detruzoru.

Diskutuje se o využití genové léčby, toll-like receptorů a agonistů, virové léčby, terapeutických vakcín, různých cytokinů či monoklonálních protilátek proti kontrolním bodům imunitní reakce (checkpoint inhibitors).

Léčba onkolytickými viry využívá modifikované viry, které způsobí sebe-destrukci nádorových buněk a tak navodí vyšší imunitní odpověď právě proti nádoru. Jedním z příkladů je např. CG0070, což je onkolytický adenovirus, který rovněž exprimuje imunitní odpověď stimulující cytokin GM-CSF. Ten dále zvyšuje protinádorovou imunitní reakci. V současné době probíhá studie fáze I/II, která zkoumá intravezikální podání CG0070 u pacientů s CIS močového měchýře či pacientů s NMIBC s CIS měchýře, u kterých selhala léčba BCG (NCT01438112).

Využití **terapeutických vakcín** je stále ve stadiu výzkumu. Tyto vakcíny jsou navrženy tak, aby vybudily imunitní odpověď organismu proti nádorově specifickým antigenům či s nádorem spojenými antigeny. Tím dojde k posílení útoku na nádorové buňky nesoucí tyto antigeny. V současné době běží několik studií, které aktivně nabírají pacienti. Jednou z terapeutických vakcín je **HS-410**, vakcína vyrobená z buněčných linií lidského karcinomu močového měchýře, které byly ozářeny a změněny tak, aby exprimovaly rozpustný gp96, to je chaperon, který předkládá více nádorových antigenů imunitnímu systému a tím podporuje imunitní odpověď. Další vakcínou ve fázi časného klinického výzkumu je např. **DEC-205-NY-ESO-1**. Tato vakcína může pomoci vytvořit imunitní odpověď proti nádorovým buňkám, které exprimují testikulární nádorový antigen (cancer-testis antigen) NY-ESO-1.

Cytokiny jsou molekuly, které pomáhají kontrolovat růst a aktivitu buněk zapojených v systémové imunitní odpovědi. Jejich kombinace s **monoklonálními protilátkami**, tedy molekulami, které působí na specifický antigen nádoru, může zvýšit aktivitu imunitního systému. Jedním z příkladů je **ALT-801** – fúzní produkt IL-2 a protilátky rozpoznávající peptidy na povrchu nádorové buňky. Dvě studie fáze I/II zkoušejí ALT-801 v kombinaci s gemcitabinem u pacientů NMIBC, u nichž selhala léčba BCG (NCT01625260), a v kombinaci s gemcitabinem a cisplatinou u pacientů s nádorem močového měchýře prorůstajícím do svaloviny (NCT01326871).

Asi nejbližší klinickému využití, díky úspěchům v jiných terapeutických oblastech, jsou **monoklonální protilátky proti kontrolním bodům imunitní reakce**. Plejáda genetických a epigenetických změn, která provází rozvoj nádorů, vytváří různorodou sadu antigenů, které imunitní systém využívá při rozpoznávání nádorových buněk od jejich normálních protějšků. V případě T lymfocytů je síla odpovědi, jež je spuštěna rozpoznáním antigenu receptorem T lymfocytů (T-cell receptor – TCR), a její kvalita závislá na rovnováze mezi kostimulačními a inhibičními signály, tj. kontrolními body imunitní reakce. V normálních podmínkách jsou tyto kontrolní body zásadní pro udržení imunitní odpovědi pod kontrolou, aby nepoškodila vlastní zdravé buňky. Kontrolní body jsou tedy zásadní v rozvoji autoimunity. Nádorové buňky naopak disponují řadou mechanismů, díky kterým dokážou uniknout kontrole imunitního systému (obr. 2). Sníženou produkcí kostimulačních molekul dochází k anergii T lymfocytů. Dalším výsledkem změny v apoptotické signální dráze je také inhibice indukce apoptózy. Naopak vyšší exprese inhibičních molekul, jako jsou CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4) nebo PD-1 (membránový protein programované buněčné smrti, programmed cell death-1) na T lymfocytech, vede k útlumu aktivace T lymfocytů a jejich anergizaci, což je právě přirozený mechanismus předcházející autoimunitnímu onemocnění.

V současné době jsou do praxe uváděny monoklonální protilátky proti inhibičním molekulám CTLA-4, PD-1 a PD-L1 (programmed cell death ligand 1). CTLA-4 je receptor na povrchu T lymfocytu. Pokud dojde k vazbě ligandu (CD80 nebo CD86) na CTLA-4 receptor při vazbě antigen prezentující buňky, dochází k potlačení imunitní reakce organismu (downregulace). Protilátky, které brání vazbě ligandu na CTLA-4 receptor, tedy brání zastavení protinádorové imunitní odpovědi. Dalšími molekulami, které umíme ovlivnit, jsou PD-1 a PD-L1. Signální dráha přes kontrolní bod PD-1 slouží jako jistá záložní dráha pro dráhu prostřednictvím CTLA-4. Pokud dojde k vazbě receptoru

PD-1 se svým ligandem (např. PD-L1), dojde rovněž k omezení imunitní odpovědi. Protilátky proti PD-1 tedy brání vazbě ligandu na tento receptor a tím zachovávají funkční protinádorovou imunitní odpověď prostřednictvím T lymfocytů. Nádorové buňky jsou také schopny vytvořit právě inhibiční molekuly PD-L1 a PD-L2. Protilátky proti těmto inhibičním molekulám tedy zabrání jejich vazbě na PD-1, a tím opět zachovávají funkční protinádorovou imunitní odpověď [48,49].

Následující protilátky jsou v současné době uvedeny na trh v různých indikacích či jsou blízko ke schválení. U všech probíhají i studie v léčbě karcinomu močového měchýře (tab. 3) [50].

Atezolizumab (MPDL3280A, Roche/Genentech) byl testován ve studii fáze I u pacientů s dříve léčeným metastatickým karcinomem močového měchýře (NCT01375842). Výsledky z této studie jsou slibné, když 43 % pacientů s PD-L1 IHC 2/3 dosáhlo objektivní odpovědi a u pacientů, kteří dosáhli odpovědi, byl přínos z léčby delší [51]. Další studie fáze II nedávno začala nabírat pacienty (NCT02108652). Atezolizumabu byl v červnu 2014 udělen „Breakthrough Therapy“ status americkým lékovým úřadem (FDA).

Nivolumab (Opdivo, BMS) je protilátka proti PD-1 a **ipilimumab** (Yervoy®, BMS) je protilátka proti CTLA-4 [52]. Obě jsou v současné době testovány ve studii fáze I/II u pacientů s různými nádory včetně nádorů močového měchýře (NCT01928394). Pacienti jsou randomizováni na léčbu nivolumabem samotným či v kombinaci s ipilimumabem.

Pembrolizumab (Keytruda®, MSD) je další protilátka proti PD-1. Pembrolizumab v monoterapii prokázal u PD-L1 pozitivního pokročilého karcinomu močového měchýře celkovou míru odpovědi 24 % (n = 7/29). U 10 % nemocných bylo dosaženo úplné odpovědi (3/29). V době analýzy trvala odpověď od 16+ do 40+ týdnů, když u šesti ze sedmi pacientů odpovídajících na léčbu léčba pokračovala [53].

Durvalumab (MEDI4736, MedImmune, AstraZeneca) je IgG1 lidská monoklonální protilátka proti receptoru PD-L1, která brání vazbě PD-L1 na

Tab. 3. Přehled klinických studií s imunimunoterapií v léčbě zhoubných nádorů močového měchýře (podle [50]).

Třída	Látka	Cíl	Fáze	Onemocnění	Studie
monoklonální protilátky proti kontrolním bodům imunitní reakce	MPDL3280A	PD-L1	II	2. linie mBC	NCT02302807
	pembrolizumab	PD-1	III	2. linie mBC	
	pembrolizumab/BCG	PD-1	I	NMIBC	NCT02324582
	nivolumab ± ipilimumab	PD-1 CTLA-4	I	2. linie mBC	NCT01928394
	nivolumab + cabozantinib ± ± ipilimumab	PD-L1 cMET/VEGFR2 CTLA-4	I	2. linie mBC	NCT02308943
	MEDI4736	PD-L1	I	2. linie mBC	NCT01693562
	AMP-514	PD-L1	I	2. linie mBC	NCT02013804
	MSB0010718C	PD-L1	I	2. linie mBC	NCT01943461
agonisté imunitní odpovědi	MGA271	B7-H3	I	2. linie mBC	NCT01391143
	MEDI6383	OX40	I	2. linie mBC	NCT02221960
vaccíny	MOXR0916	OX40	I	2. linie mBC	NCT02219724
	DN24-02	HER2/neu	II	adjuvance	NCT01353222
	AdHER2 DC	HER2/neu	I	adjuvance a 2. linie mBC	NCT01730118
	HS410	HSP gp96	I	NMIBC	NCT02010203
	PANVAC	CEA a MUC-1	I	NMIBC	NCT02015104
	MAGE-A3	MAGE-A3	II	adjuvance	NCT01435356
	DEC-205-NY-ESO-1 vakcína fúzním proteinem	NY-ESO-1	I	2. linie mBC	NCT01522820
adoptivní přenos T buněk	CAR	NY-ESO-1	II	2. linie mBC (NY-ESO pozitivní)	NCT01967823
	anti-MAGE-A3-DP4 TCR	MAGE-A3-DP4	I/II	2. linie mBC (MAGE-A3 ⁺)	NCT02111850

BCG – bacillus Calmette-Guerin, PD-1 – programed death-1, PD-L1 – programed death-ligand-1, HSP – heat shock protein, CAR – chimérický antigenní receptor, CTLA-4 – cytotoxický T lymfocytární antigen-4, NMIBC – neinvazivní nádor močového měchýře, mBC – metastatického karcinomu prsu, TCR – T buněčný receptor, DC – dendritická buňka

PD-1 a CD80. Durvalumab prokázal časovou (pět týdnů od zahájení) a dlouhodobější aktivitu (> 56 týdnů) u různých typů nádorů (karcinom močového měchýře hodnocen nebyl) [54]. Durvalumab je nyní zkoušen i u karcinomu močového měchýře v monoterapii či kombinaci s tremelimumabem (protilátka proti receptoru CTLA-4) vs. standardní chemoterapie (NCT02516241).

Závěr

Imunoterapie představuje jednu z možných modalit léčby zhoubných nádorových onemocnění. Její uplatnění v urologické onkologii je spojeno s relativně dlouhou tradicí. Přes příznivou odpověď je podání BCG u neinvazivních ná-

dorů močového měchýře u přibližně 30 % nemocných spojeno s rezistencí vůči léčbě a progresí nádorového onemocnění. Ve snaze zlepšit odpověď jsou připravovány a zkoušeny nové přípravky samostatně nebo v kombinaci se současnou imunologickou nebo cytotoxickou léčbou. Velmi slibné se zdají přípravky ze skupiny monoklonálních protilátek proti kontrolním bodům imunitní reakce. Na výsledky randomizovaných studií a event. začlenění nových přípravků do léčebného algoritmu budeme muset vyčkat.

Poděkování za připomínky MUDr. Evě Vernerové a MUDr. Milotovi z Ústavu imunologie 2. LF UK v Praze. MUDr. Milota se podílel rovněž na korektuře článku.

Literatura

1. Ferlay J, Bray F, Forman D et al. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC cancer base No. 10 [monograph on the Internet]. Lyon: International Agency for Research on Cancer 2010. Available from: www.iarc.fr/en/publications/eresources/cancerbases/index.php.
2. Globocan 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012 [online]. Lyon: International Agency for Research on Cancer 2015. Available from: www.globocan.iarc.fr.
3. Nádory močového měchýře – Epidemiologie a populační data ČR [online]. Masarykova univerzita, Brno, 2015. [citováno 30. září 2015]. Dostupné z: www.uroweb.cz/index.php?pg=dg-nadory-mocoveho-mechyre-epidemiologie-ceska-republika-vyvoj-incidence-mortality
4. Babjuk M, Böhle A, Burger M et al. Guidelines on non-muscle-invasive bladder cancer (Ta, T1 and CIS), limited update March 2015 [monograph on the Internet]. European Association of Urology 2015. Available from: <http://uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-Guidelines-Non-muscle-invasive-Bladder-Cancer-2015-v1.pdf>.

5. Zhoubný novotvar močového měchýře (C67) [online]. Modrá kniha. [citováno 30. září 2015]. Dostupné z: www.linkos.cz/informace-pro-praxi/modra-kniha/22-zhoubny-novotvar-mocoveho-mechyre-c67/.
6. Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol* 1976; 116(2): 180–183.
7. Lamm DL, Blumenstein BA, Crawford ED et al. A randomized trial of intravesical doxorubicin and immunotherapy with bacille Calmette-Guerin for transitional-cell carcinoma of the bladder. *N Engl J Med* 1991; 325(17): 1205–1209.
8. Malmström PU, Wijkström H, Lundholm C et al. 5-year follow-up of a randomized prospective study comparing mitomycin C and bacillus Calmette-Guerin in patients with superficial bladder carcinoma. *J Urol* 1999; 161(4): 1124–1127.
9. van der Meijden AP, Sylvester RJ, Oosterlinck W et al. Maintenance bacillus Calmette-Guerin for Ta T1 bladder tumors is not associated with increased toxicity: results from a European organisation for research and treatment of cancer genito-urinary group phase III trial. *Eur Urol* 2003; 44(4): 429–434.
10. Morales A, Ottenhof P, Emerson L. Treatment of residual, non-infiltrating bladder cancer with bacillus Calmette-Guerin. *J Urol* 1981; 125(5): 649–651.
11. Hall MC, Chang SS, Dalbagni G et al. Guideline for the management of nonmuscle invasive bladder cancer (stages Ta, T1, and Tis): 2007 update. *J Urol* 2007; 178(6): 2314–2330.
12. Kavoussi R, Brown JE, Ritchey JK et al. Fibronectin-mediated Calmette-Guerin bacillus attachment to murine bladder mucosa. Requirement for the expression of an antitumor response. *J Clin Invest* 1990; 85(1): 62–67.
13. Zuiverloon TC, Nieuweboer AJ, Vékony H et al. Markers predicting response to bacillus Calmette-Guérin immunotherapy in high-risk bladder cancer patients: a systematic review. *Eur Urol* 2012; 61(1): 128–145. doi: 10.1016/j.eururo.2011.09.026.
14. Luo Y, Chen X, O'Donnell MA. Role of Th1 and Th2 cytokines in BCG-induced IFN- γ production: cytokine promotion and simulation of BCG effect. *Cytokine* 2003; 21(1): 17–26.
15. Saint F, Patard JJ, Maille P et al. Prognostic value of a T helper 1 urinary cytokine response after intravesical bacillus Calmette-Guerin treatment for superficial bladder cancer. *J Urol* 2002; 167(1): 364–367.
16. Lamm DL, Blumenstein BA, Crissman JD et al. Maintenance bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for recurrent Ta, T1 and carcinoma in situ transitional cell carcinoma of the bladder: a randomized Southwest Oncology Group study. *J Urol* 2000; 163(4): 1124–1129.
17. Jonasch E, Haluska FG. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *Oncologist* 2001; 6(1): 34–55.
18. Kamat AM, Lamm DL. Immunotherapy for bladder cancer. *Curr Urol Rep* 2001; 2(1): 62–69.
19. Belardelli F, Ferrantini M, Proietti E et al. Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13(2): 119–134.
20. Droller MJ, Gomolka D. Enhancement of natural cytotoxicity in lymphocytes from animals with carcinogen-induced bladder cancer. *J Urol* 1983; 129(3): 625–629.
21. Parronchi P, De Carli M, Manetti R et al. IL-4 and IFN (α and γ) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones. *J Immunol* 1992; 149(9): 2977–2983.
22. Slaton JW, Perrotte P, Inoue K et al. Interferon- α -mediated down-regulation of angiogenesis-related genes and therapy of bladder cancer are dependent on optimization of biological dose and schedule. *Clin Cancer Res* 1999; 5(10): 2726–2734.
23. Giannopoulos A, Adamakis I, Evangelou K et al. Interferon- α 2b reduces neo-microvascular density in the, normal' urothelium adjacent to the tumor after transurethral resection of superficial bladder carcinoma. *Onkologie* 2003; 26(2): 147–152.
24. Glashan RW. A randomized controlled study of intravesical α -2b-interferon in carcinoma in situ of the bladder. *J Urol* 1990; 144(3): 658–661.
25. Hudson MA, Ratliff TL. Failure of intravesical interferon- α 2b for the treatment of patients with superficial bladder cancer previously failing intravesical BCG therapy. *Urol Oncol* 1995; 1(3): 115–118.
26. Portillo J, Martin B, Hernandez R et al. Results at 43 months' follow-up of a double-blind, randomized, prospective clinical trial using intravesical interferon alpha-2b in the prophylaxis of stage pT1 transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 1997; 49(2): 187–190.
27. Gan YH, Zhang Y, Khoo HE et al. Antitumour immunity of bacillus Calmette-Guerin and interferon alpha in urine bladder cancer. *Eur J Cancer* 1999; 35(7): 1123–1129.
28. Luo Y, Chen X, Downs TM et al. IFN- α 2b enhances Th1 cytokine responses in bladder cancer patients receiving Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin immunotherapy. *J Immunol* 1999; 162(4): 2399–2405.
29. Lam JS, Benson MC, O'Donnell MA et al. Bacillus Calmette-Guérin plus interferon- α 2B intravesical therapy maintains an extended treatment plan for superficial bladder cancer with minimal toxicity. *Urol Oncol* 2003; 21(5): 354–360.
30. Nagabhushan TL, Maneval DC, Benedict WF et al. Enhancement of intravesical delivery with Syn3 potentiates interferon- α 2b gene therapy for superficial bladder cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007; 18(5–6): 389–394.
31. Gillis S, Smith KA. Long term culture of tumour specific cytotoxic T cells. *Nature* 1977; 268(5616): 154–156.
32. Di Sabato G, Chen DM, Erickson JW. Production by murine spleen cells of an activity stimulating the PHA responsiveness of thymus lymphocytes. *Cell Immunol* 1975; 17(2): 495–504.
33. Lotze MT, Grimm EA, Mazumder A. Lysis of fresh and cultured autologous tumor by human lymphocytes cultured in T-cell growth factor. *Cancer Res* 1981; 41(11): 4420–4425.
34. Henney CS, Kuribayashi K, Kern DE et al. Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature* 1981; 291(5813): 335–338.
35. Waldmann TA, Goldman CK, Robb RJ. Expression of interleukin 2 receptors on activated human B cells. *J Exp Med* 1984; 160(5): 1450–1466.
36. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136(7): 2348–2357.
37. De Reijke TM, De Boer EC, Kurth KH et al. Urinary interleukin-2 monitoring during prolonged bacillus Calmette-Guerin treatment: can it predict the optimal number of instillations? *J Urol* 1999; 161(1): 67–71.
38. De Boer EC, De Jong WH, Steerenberg PA et al. Leukocytes and cytokines in the urine of superficial bladder cancer patients after intravesical immunotherapy with bacillus Calmette-Guerin. *In Vivo* 1991; 5(6): 671–677.
39. Magno C, Melloni D, Galli A et al. The anti-tumor activity of bacillus Calmette-Guerin in bladder cancer is associated with an increase in the circulating level of interleukin-2. *Immunol Lett* 2002; 81(3): 235–238.
40. Merguerian PA, Donahue L, Cockett AT. Intraluminal interleukin 2 and bacillus Calmette-Guerin for treatment of bladder cancer: a preliminary report. *J Urol* 1987; 137(2): 216–219.
41. Huland E, Huland H. Local continuous high dose interleukin 2: a new therapeutic model for the treatment of advanced bladder carcinoma. *Cancer Res* 1989; 49(19): 5469–5474.
42. Cockett AT, Davis RS, Cos LR et al. Bacillus calmette-guerin and interleukin-2 for treatment of superficial bladder cancer. *J Urol* 1991; 146(3): 766–769.
43. Gomella LG, McGinnis DE, Lattime EC et al. Treatment of transitional cell carcinoma of the bladder with intravesical interleukin-2: a pilot study. *Cancer Biother* 1993; 8(3): 223–227.
44. Den Otter W, Dobrowolski Z, Bugajski A et al. Intravesical interleukin-2 in T1 papillary bladder carcinoma: regression of marker lesion in 8 of 10 patients. *J Urol* 1998; 159(4): 1183–1186.
45. O'Donnell MA, Aldovini A, Duda RB et al. Recombinant Mycobacterium bovis BCG secreting functional interleukin-2 enhances gamma interferon production by splenocytes. *Infect Immun* 1994; 62(6): 2508–2514.
46. Young SL, O'Donnell MA, Buchan GS. IL-2-secreting recombinant bacillus Calmette Guerin can overcome a type 2 immune response and corticosteroid-induced immunosuppression to elicit a type 1 immune response. *Int Immunol* 2002; 14(7): 793–800.
47. Zhang X, Shi X, Li J et al. Novel immunotherapy for metastatic bladder cancer using vaccine of human interleukin-2 surface-modified MB 49 cells. *Urology* 2011; 78(3): 722. doi: 10.1016/j.urol.2011.04.044.
48. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(4): 252–264. doi: 10.1038/nrc3239.
49. Finn OJ. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Ann Oncol* 2012; 23 (Suppl 8): viii6–viii9. doi: 10.1093/annonc/mds256.
50. Kim JW, Tomita Y, Trepel J et al. Emerging immunotherapies for bladder cancer. *Curr Opin Oncol* 2015; 27(3): 191–200. doi: 10.1097/CCO.0000000000000177.
51. Powels T, Eder JP, Fine GD et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature* 2014; 515(7528): 558–562. doi: 10.1038/nature13904.
52. Tarhini A, Lo E, Minor DR. Releasing the brake on the immune system: ipilimumab in melanoma and other tumors. *Cancer Biother Radiopharm* 2010; 25(6): 601–613. doi: 10.1089/cbr.2010.0865.
53. Plimack ER, Gupta S, Bellmunt J et al. A phase 1b study of pembrolizumab (Pembro; MK-3475) in patients (pts) with advanced urothelial tract cancer. *Ann Oncol* 2014; 25(5): 1–41. doi: 10.1093/annonc/mdu438.
54. Segal NH, Hamid O, Hwu W et al. A phase I multi-arm dose-expansion study of the anti-programmed cell death-ligand-1 (PD-L1) antibody MEDI4736: preliminary data. *Ann Oncol* 2014; 25 (Suppl 4): iv361–iv372. doi: 10.1093/annonc/mdu342.

Nežádoucí účinky moderní imunoterapie a jejich řešení v klinické praxi

Side-effects of Modern Immunotherapy and How to Solve Them in the Clinics

Lakomý R., Poprach A.

Klinika komplexní onkologické péče LF MU a Masarykův onkologický ústav, Brno
Oba autoři se na práci podíleli stejným dílem.

Souhrn

Východiska: Standardní léčba pokročilého maligního melanomu se v posledních letech mění. Paliativní chemoterapie je nahrazována efektivnější cílenou léčbou a moderní imunoterapií založenou na protilátkách proti kontrolním bodům imunitní reakce (tzv. checkpoint inhibitory). Dnes standardně používaný ipilimumab (anti-CTLA-4 protilátka) dokázal významně prodloužit celkové přežití a dosáhl dlouhodobé kontroly onemocnění u cca 20 % pacientů. K dalším perspektivním preparátům patří anti-PD-1 protilátky (nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab) a anti-PD-L1 protilátky. Unikátní mechanismus účinku je doprovázen novými typy imunitně podmíněných vedlejších příhod. **Cíl:** Shrnutí aktuálních poznatků o toxicitě protilátek proti kontrolním bodům imunitní reakce a návrh jejího řešení v běžné klinické praxi.

Klíčová slova

melanom – imunoterapie – ipilimumab – toxicita

Summary

Background: The standard treatment of advanced melanoma has been changing in recent years. Palliative chemotherapy is being replaced by more efficient targeted therapies and modern immunotherapies based on antibodies against checkpoints of the immune response (so-called checkpoint inhibitors). Today's standard ipilimumab (anti-CTLA-4 antibody) could significantly prolong overall survival and achieved long-term disease control in about 20% of patients. There are other perspective immune modulating agents, such as anti-PD-1 antibodies (nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab) and anti-PD-L1 antibodies. Unique mechanism of action is accompanied by new types of immune-related adverse events. **Aim:** The aim of the article is to summarize current knowledge about the toxicity of these antibodies and propose solutions in routine clinical practice.

Key words

melanoma – immunotherapy – ipilimumab – toxicity

Tato práce byla podpořena MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This study was supported by MZ CZ – RVO (MMCI, 00209805).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



MUDr. Radek Lakomý, Ph.D.

Klinika komplexní onkologické péče
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: lakomy@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 23. 6. 2015

Přijato/Accepted: 31. 7. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20154S103>

Úvod

Léčba založená na monoklonálních protilátkách proti kontrolním bodům imunitní reakce je dnes považována za průlomovou metodu v onkologii. Výsledky s anti-CTLA-4 (cytotoxický T lymfocytární antigen-4) protilátkou ipilimumabem u pokročilého maligního melanomu znamenaly doslova revoluci v protinádorové imunoterapii a byly impulzem pro vývoj nových protilátek zaměřených na další kontrolní molekuly (tzv. checkpointy) [1,2]. Z nich je nutné zmínit protilátku proti receptoru programované buněčné smrti (PD-1) – nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab a proti jeho ligandu (PD-L1) – BMS-936559 a MPDL3280A (atezolizumab) [3–7]. Výhodou výše uvedených preparátů je kromě jejich účinnosti také

jejich potenciální univerzálnost, což je zásadní pro široké využití u řady malignit. Vývoj a použití imunoterapie dosáhly zatím největších pokroků u pokročilého melanomu, ale v brzké době budeme podobně léčit i nemalobuněčný plicní karcinom a další nádory. Princip účinku checkpoint inhibitorů (anti-CTLA-4, anti-PD-1 a anti-PD-L1 protilátek) spočívá v blokádě inhibičních receptorů na buňkách imunitního systému nebo nádoru, a tím prolomení tolerance imunitního systému vůči nádoru. Ipilimumab působí spíše na „centrální úrovni“ v orgánech lymfatického systému. Zde, po prezentaci antigenů dendritickými buňkami, blokádu inhibičního CTLA-4 receptoru udržuje aktivaci T lymfocytů, ty pak putují do nádorové tkáně, kde plní svoji funkci. Protilátky bránící inhi-

biční interakci mezi PD-1 a PD-L1/L2 naopak sekundárně potencují efektorovou složku imunity „periferně“ přímo v nádorové tkáni. Prolomení tolerance vůči nádoru však může být doprovázeno i nežádoucím prolomením tolerance vůči „normálním tkáním“, což vede k vedlejším účinkům, které se svým charakterem blíží autoimunitním onemocněním – tzv. imunitně podmíněné vedlejší účinky (immune related adverse events – ir-AEs). Vzhledem k vysoké četnosti ir-AEs s rizikem rozvoje život ohrožujících komplikací je nezbytná dostatečná edukace pacienta a rodinných příslušníků. Nutná je také osvěta mezi lékaři prvního kontaktu (RZP, praktický lékař, internisté, neurologové, dermatologové), kteří se běžně s těmito novými léky nesetkávají. Byla vypracována do-

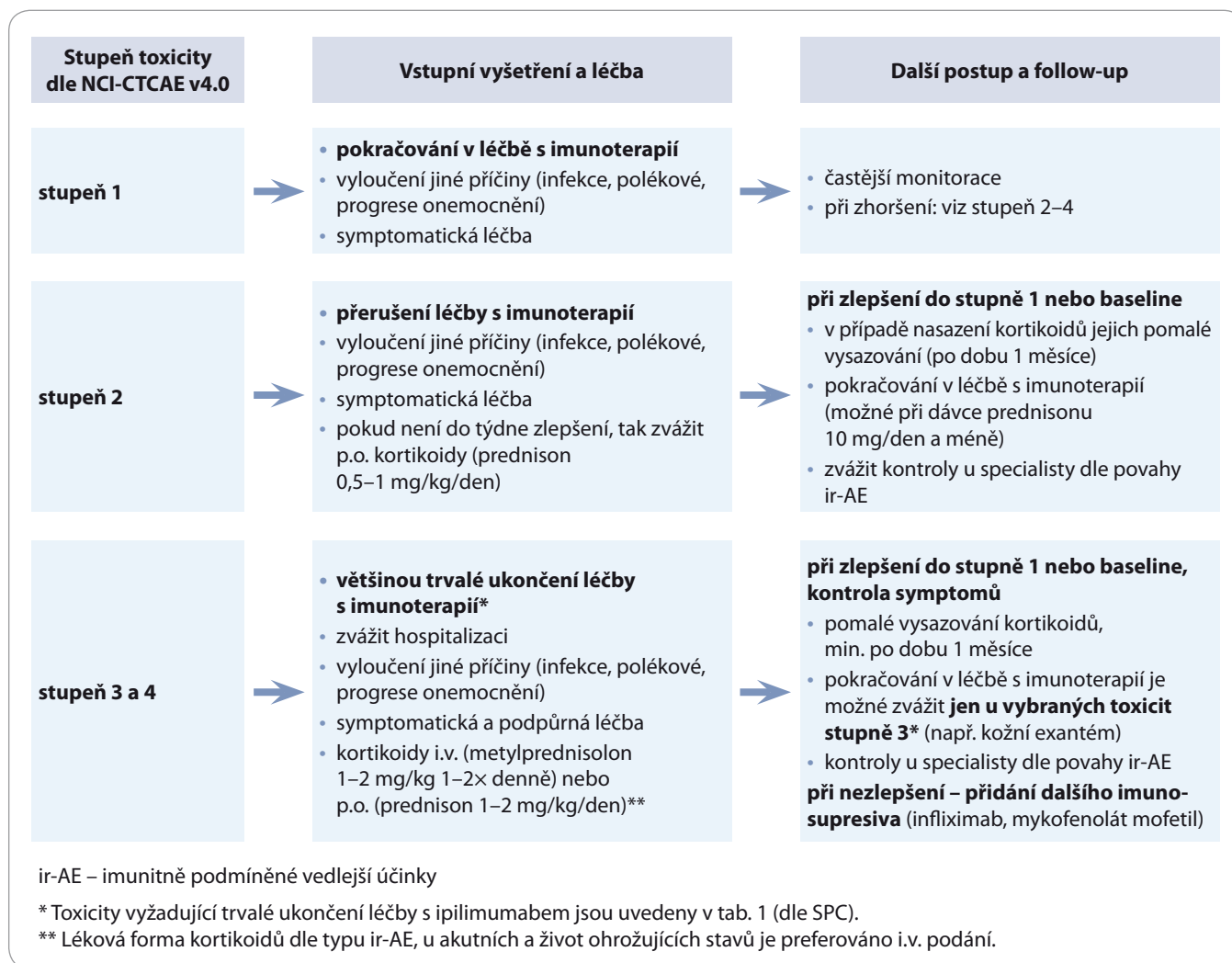


Schéma 1. Obecná doporučení pro řešení ir-AEs (immune-related adverse events).

poručení, jak při podezření na ir-AEs postupovat. Časně zahájení imunosupresivní léčby kortikosteroidy je zásadním krokem ke zvládnutí příhody, snížení morbidit a případně i mortality, obecný princip léčby ukazuje schéma 1. Pokud nejsou kortikoidy dostatečně účinné, tak se přidávají další imunosupresiva jako infliximab nebo mykofenolát mofetil. Kvůli překotnému vývoji protilátek a postupnému získávání zkušeností nejsou doporučení pro léčbu ir-AEs jednotná. Nejvíce zkušeností máme s ipilimumabem, proto se doporučení pro tento lék používají i u dalších checkpoint inhibitorů. Se získáváním dalších zkušeností s léčbou ir-AEs, vývojem nových protilátek a jejich kombinací (anti-CTLA-4 + anti-PD-1 protilátky) jsme svědky různých modifikací původních postupů.

Vedlejší účinky ipilimumabu

Četnost vedlejších účinků ipilimumabu je poměrně vysoká, v registrační studii s dávkou 3 mg/kg se pohybovala kolem 80–90 %. Naštěstí šlo ve většině případů o mírnou až střední toxicitu (stupeň 1 a 2). Závažná (stupeň 3) a život ohrožující toxicita (stupeň 4) dle NCI-CTCAE v3.0 (National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events version 3.0) byla zaznamenána u cca 20–25 % pacientů [1]. Aktuálně je ve studiích používána již nová klasifikace NCI-CTCAE v4.0 [8]. K vedlejším účinkům může dojít již v průběhu infuze nebo po ní (nevolnost, zvracení, teplota, bolesti a točení hlavy, vyrážka a svědění kůže), jde však o ojedinělé a ve většině případů nezávažné reakce. Obecně je doporučeno přerušit infuzi do ústupu potíží, případně podání antihistaminik nebo antipiretik a následně její opětovné spuštění s pomalejší rychlostí (přibližně poloviční) a monitorací pacienta [9]. Před další aplikací je vhodné zvážit premedikaci antihistaminiky a/nebo antipiretiky. Při vážné reakci 3. a 4. stupně (bronchospasmus, hypotenze, anafylaxe) je postup identický jako při jiných hypersenzitivních reakcích a je doporučeno trvalé ukončení léčby. Více obávané jsou však ir-AEs, které jsou nejčastější a rostou s dávkou. Při dávce 3 mg/kg se objevují až u 60 % pacientů, vážná ir-AE toxicita stupně 3 a 4 byla za-

znamenána u 10–15 % pacientů [1,10]. K nejčastějším ir-AEs patří kožní toxicita (vyrážka, svědění kůže), enterokolitida a průjemy, endokrinopatie (hypofyzitida, tyreoiditida) a elevace jaterních testů. Imunitní systém však může napadnout jakýkoliv orgán v těle (srdce, plíce, ledviny, nervový systém, oči, hematopoetický systém a další). Biopsie pak nejčastěji prokáže infiltraci tkáně T lymfocyty, případně neutrofilů [9]. Z časového hlediska můžeme nejdříve očekávat kožní toxicitu (po třech týdnech), následuje kolitida s průjemy (po pěti týdnech), pak jaterní toxicita (po 6–7 týdnech) a zpravidla poslední bývá endokrinopatie (po 7–8 týdnech od započetí léčby) [11]. Ir-AEs se ale mohou objevit i několik týdnů a měsíců po skončení léčby, na což se nesmí zapomínat. V dalším textu se budeme věnovat nejčastějším ir-AEs a jejich řešení.

Imunitně podmíněná kožní toxicita

Kožní toxicita patří k nejčastějším ir-AEs (40–45 %) a obvykle se vyskytuje jako první po 3. týdnu léčby s vrcholem v 6. týdnu [1,11]. Většinou jde o toxicitu stupně 1 (poškození < 10 % povrchu těla) nebo 2 (poškození mezi 10 a 30 % povrchu těla). Vážné toxicity (3. a 4. stupeň) jsou naštěstí vzácné, v registrační studii byly jen kolem 1–2 %. Obvyklým projevem jsou makulopapulózní exantém (20 %) a/nebo svědění kůže (25 %). Může se také objevit vitiligo, které se neléčí (pouze kosmetický problém), ale pacient musí být edukován o ochraně před UV zářením. Puchýře jsou už projevem vážné reakce. Steven-Johnsonův syndrom a toxická epidermální nekrolýza se vyskytují u < 1 % pacientů a jsou důvodem pro trvalé ukončení léčby.

Exantém 1. stupně léčíme lokálními kortikosteroidy (např. betametazon 0,1% krém), při současném svědění kůže je vhodné přidat perorální (p.o.) antihistaminika a pokračujeme v léčbě ipilimumabem. U exantému 2. stupně postupujeme stejně, jen další aplikaci ipilimumabu odložíme. Pokud nedojde ke zlepšení během 1–2 týdnů, tak přidáme p.o. kortikoidy (prednison 0,5–1 mg/kg/den) a konzultujeme stav s dermatologem. Po zlepšení do 1. stupně pokračujeme v léčbě ipilimu-

mabem [12]. Při exantému 3. stupně (poškození > 30 % tělesného povrchu) přerušujeme léčbu ipilimumabem, konzultujeme dermatologa, zvážíme hospitalizaci a kožní biopsii, zahájíme léčbu intravenózními (i.v.) kortikoidy (metylprednisolon 1–2 mg/kg/den) nebo p.o. kortikoidy (prednison 1–2 mg/kg/den). Po zlepšení toxicity do stupně 1 kortikoidy postupně vysazujeme, minimálně po dobu jednoho měsíce. Po úpravě exantému do 1. stupně můžeme pokračovat v léčbě ipilimumabem [12]. V případě život ohrožující toxicity (stupeň 4) je postup stejný jako u 3. stupně, ale preferujeme i.v. kortikoidy a léčba ipilimumabem je trvale ukončena. Ipilimumab se také trvale ukončuje při svědění kůže 3. stupně [13]. Algoritmus léčby kožní toxicity znázorňuje schéma 2.

Imunitně podmíněná kolitida a průjem

Průjem indukovaný ipilimumabem je druhou nejčastější autoimunitně podmíněnou vedlejší příhodou. Začíná se objevovat po 5. týdnu od započetí léčby. Při dávkování ipilimumabu 3 mg/kg se vyskytuje u cca 30 % pacientů, incidence stoupá s dávkou – 44 % při dávce 10 mg/kg i.v. [1,2,10]. Závažný průjem nebo kolitida 3. a 4. stupně se v případě dávky 3 mg/kg vyskytl asi u 5–8 % pacientů, u kolitidy bývá nejčastěji poškozen sestupný tračník [10]. Velkou hrozbou je pak možnost vzniku střevní perforace s potenciálně fatálními následky. U průjmu 1. stupně (do tří stolic nad běžný počet – baseline) je postup symptomatický. Dle potřeby je možné podat loperamid 2 mg p.o. à 4–6 hod, vyloučit mléko a projímavá jídla, dbát na dostatečnou hydrataci, pátat po jiných příčinách průjmu (jiné polékové, infekční, dietní), sledovat počet stolic, přítomnost krve a hlenu ve stolici, bolesti břicha [12]. V léčbě ipilimumabem při stabilním stavu můžeme pokračovat. Pokud dojde ke zhoršení do stupně 2 (4–6 stolic nad baseline), tak musí být léčba ipilimumabem přerušena, pátráme po příčinách, další opatření jsou stejná jako při toxicitě 1. stupně. Při průjmech s krví je doporučováno zvažení sigmoidoskopie k vyloučení současné kolitidy. Pokud dojde ke spontánní úpravě nebo zlep-

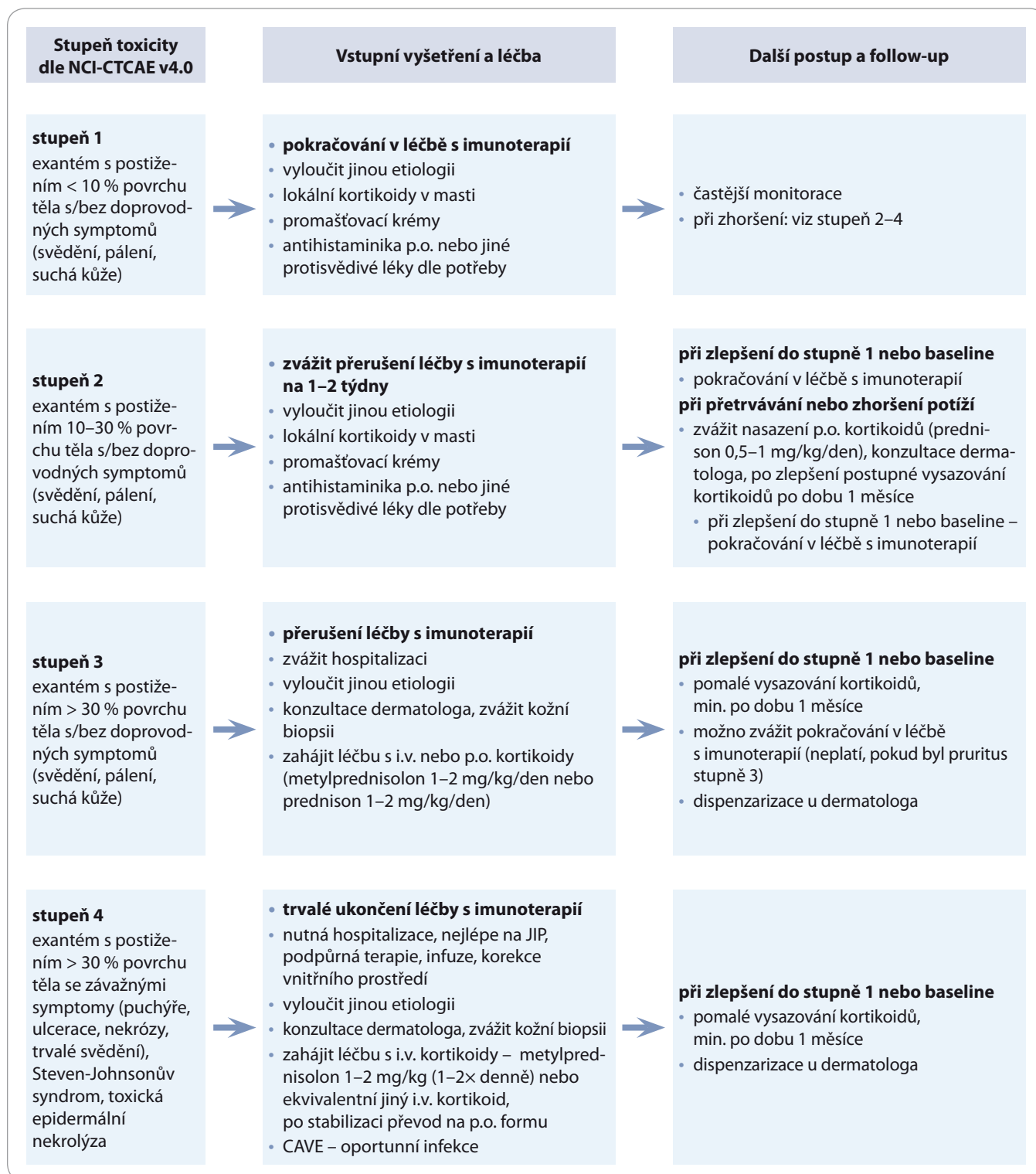


Schéma 2. Doporučený postup při výskytu imunitně podmíněné kožní toxicity (stupeň 1–4).

šení do 1. stupně toxicity, tak je možný návrat k ipilimumabu. Pokud ale průjem stupně 2 trvá i přes výše uvedená opatření více než 5–7 dní nebo se vrací, nebo je přítomna také kolitida dle sigmoideo-

skopie, tak přistupujeme k p.o. léčbě kortikoidy (prednison 1 mg/kg/den nebo ekvivalent) [9,13]. Po zlepšení stavu se léčba kortikoidy postupně vysazuje (min. 1 měsíc), po úpravě průjmu do

stupně 1 je možné pokračování v ipilimumabu. Pozor na rychlé vysazení kortikoidů, jinak hrozí riziko opětovného zhoršení potíží a nedostatečného efektu následné eskalované dávky kortikoidů.

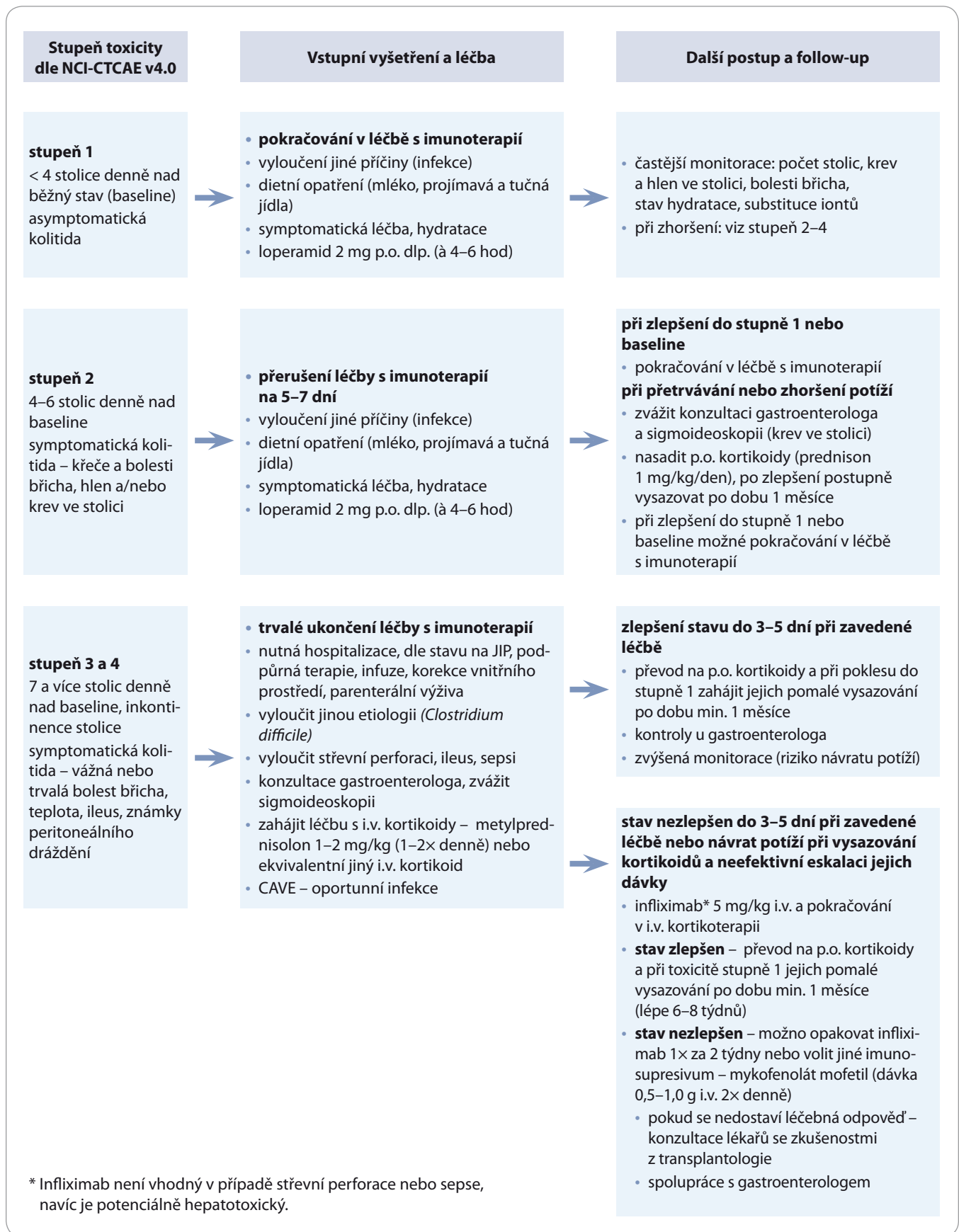


Schéma 3. Doporučený postup při výskytu imunitně podmíněné kolitidy a průjmu (stupeň 1–4).

Pacienti s průjmy 3. a 4. stupně (> 6 stolic nad baseline) a/nebo vážnou kolitidou trvale ukončují léčbu s ipilimumabem. V dané situaci je indikována hospitalizace, pátrání po jiných příčinách (*Clostridium difficile*), zvažení sigmoidoskopie, vyloučení perforace střeva s peritonitiidou, zahájení režimových opatření, kontroly vnitřního prostředí se substitucí iontů, parenterální podpůrná hydratace a výživa. V medikamentózní léčbě jsou jednoznačně preferovány i.v. kortikoidy (methylprednisolon 1–2 mg/kg 1–2krát denně). Po zlepšení stavu přecházíme na ekvivalentní p.o. kortikoid a při toxicitě 1. stupně zahájíme jeho postupné vysazování, opět minimálně po dobu jednoho měsíce. Pokud ale nedojde ke zlepšení symptomů do 3–5 dní po nasazení vysokých dávek i.v. kortikoidů nebo se při vysazování kortikoidů potíže vracejí a již na eskalované kortikoidy nereagují, tak je při absenci sepse indikována léčba infliximabem (monoklonální protilátka proti tumor nekrotizujícímu faktoru α) v dávce 5 mg/kg i.v. Infliximab je možno při nedostatečném efektu po dvou týdnech opakovat, případně podat ještě další imunosupresivum mykofenolát mofetil [9,11]. Pokud veškerá výše uvedená léčebná opatření selhávají, tak lze přistoupit k provedení ileostomie nebo v nejhorším případě ke kolektomii (neovlivnitelné krvácení, střevní perforace) [9]. Pokud se naopak stav po aplikaci infliximabu stabilizuje, tak léčba s kortikoidy pokračuje dále, s postupným pomalým vysazováním při poklesu do 1. stupně toxicity. U pacientů se závažnou kolitidou (ulcerace, krvácení) nebo nutností aplikace infliximabu je doporučováno kortikoidy vysazovat ještě pomaleji než obvykle, a to 6–8 týdnů. Podrobný algoritmus léčby uvádí schéma 3. Profylaktická aplikace p.o. kortikoidů (budesonid) neměla vliv na incidenci průjmů [14]. Dle dosud publikovaných výsledků se zdá, že imunosupresivní léčba kortikoidy nasazená v průběhu imunoterapie nemá zásadní vliv na léčebný efekt ipilimumabu [14,15].

Imunitně podmíněná hepatotoxicita

Jaterní toxicita způsobená ipilimumabem je sice vzácnější než předešlé imu-

nitně podmíněné nežádoucí účinky léčby, ale i tato představuje potenciálně život ohrožující příhodu. Nástup tohoto ir-AE obvykle přichází po 6. týdnu od zahájení léčby ipilimumabem, po 14. týdnu je již velmi vzácný [11]. Pokud se dodržují veškerá doporučení v diagnostice a léčbě, je prognóza pacientů s tímto typem ir-AE výborná, k úpravě jaterního souboru dochází obvykle velmi rychle po zahájení příslušné léčby – průměrně do dvou týdnů [16]. Ve studii 3. fáze s dávkou ipilimumabu 3 mg/kg u předlčených pacientů s diseminovaným či lokálně pokročilým inoperabilním maligním melanomem byl výskyt imunitně podmíněné jaterní toxicity všech stupňů zaznamenán max. u 4 % pacientů, stupeň 3 se vyskytl jen u 1,1 % pacientů a nebyl hlášen jediný případ jaterní toxicity stupně 4 [1]. V jiné studii III. fáze u nepředlčených pacientů s pokročilým maligním melanomem, kde se podával ipilimumab (10 mg/kg) + dakarbazin vs. dakarbazin + placebo, byl však výskyt jaterní toxicity mnohem vyšší v rameni s ipilimumabem. Hepatotoxicita jakéhokoliv stupně v tomto rameni byla zaznamenána u cca 29 % pacientů, 3. a 4. stupeň pak u více než 15 % pacientů [2]. Je otázkou, zda se na vyšší míře hepatotoxicity podílela kombinace ipilimumabu s dakarbazinem nebo vyšší dávka ipilimumabu. Určitou odpověď na tuto otázku poskytují data ze studie II. fáze, kdy vyšší dávka ipilimumabu byla spojena s vyšším výskytem jaterní toxicity [10,17]. V této studii se podával ipilimumab v dávce 10 mg/kg předlčeným pacientům s maligním melanomem (neresekeabilní III. nebo IV. stadium), hepatotoxicita všech stupňů se vyskytla u 9 % pacientů, stupeň 3 a 4 pak u 7,1 % z nich. Pacient s hepatotoxicitou může být asymptomatický (v laboratoři obvykle nacházíme elevaci ALT a/nebo AST a/nebo bilirubinu), často si však stěžuje na teploty, únavu, nevolnost, žloutenku, změnu barvy stolice či moče, někdy svědění kůže. Při vyšetření pacienta je nutný pečlivý odběr anamnézy k vyloučení jiné noxy – houby, alkohol, kontakt s chemikáliemi či vliv současné medikace (např. paracetamol a jiné). Při klinickém vyšetření může být patrná kromě ikteru také hepatomegalie, pacient je někdy schvá-

cený, klinický nález však může být i zcela negativní. Vždy je nutné u 2. a vyššího stupně hepatotoxicity vyloučit infekční příčinu, dále se odebírají protilátky proti nukleárnímu antigenu a proti mitochondriálnímu antigenu (ANA, SMA). Taktéž je nutné vyloučení progresu maligního onemocnění příslušnými zobrazovacími metodami. U 3. a 4. stupně toxicity se zvažuje jaterní biopsie (typickým nálezem pro hepatotoxicitu jsou infiltrace jaterního parenchymu T lymfocyty, někdy s nekrózou hepatocytů). Na schématu 4 jsou patrné algoritmy léčby a následného sledování pacientů s touto toxicitou, včetně možnosti návratu k ipilimumabu. Všeobecně platí, že pokud se vyskytne toxicita 4. stupně, tak se léčba ipilimumabem trvale ukončuje. U stupně 3 můžeme zvážit návrat k léčbě ipilimumabem, pokud nejsou hladiny AST a/nebo ALT vyšší než osminásobek horní hranice normy, u celkového bilirubinu pak pětinasobek horní hranice normy. U těchto pacientů se k ipilimumabu můžeme vrátit, pokud dojde k poklesu hladin AST či ALT nebo celkového bilirubinu do stupně 2 a méně. Zatím není zcela jasný názor, jak postupovat u současného zvýšení AST/ALT a celkového bilirubinu, zde je nutná velká opatrnost již u 2. stupně toxicity, která může být známkou vážnějšího poškození jater. V rámci zvládnutí tohoto specifického nežádoucího účinku je důležitá především mezioborová spolupráce (onkolog, gastroenterolog se zaměřením na transplantologii, rentgenolog a další), ostražitost při podávání této formy imunoterapie a koncentrace pacientů v příslušných centrech.

Imunitně podmíněná endokrinopatie

Podobně jako imunitně podmíněná hepatopatie se endokrinopatie vyskytuje méně často než kožní či gastrointestinální toxicita, ale opět představuje potenciálně život ohrožující stav. Záludnost endokrinopatií spočívá v pozdním nástupu (7–8 týdnů po zahájení léčby s ipilimumabem, nejvyšší výskyt mezi 12. a 24. týdnem), a na rozdíl od hepatotoxicity pravděpodobnost jejího výskytu s časem po léčbě neklesá, ale křivka má charakter platů [11]. V registrační studii s pokročilým melanomem s dávkou ipili-

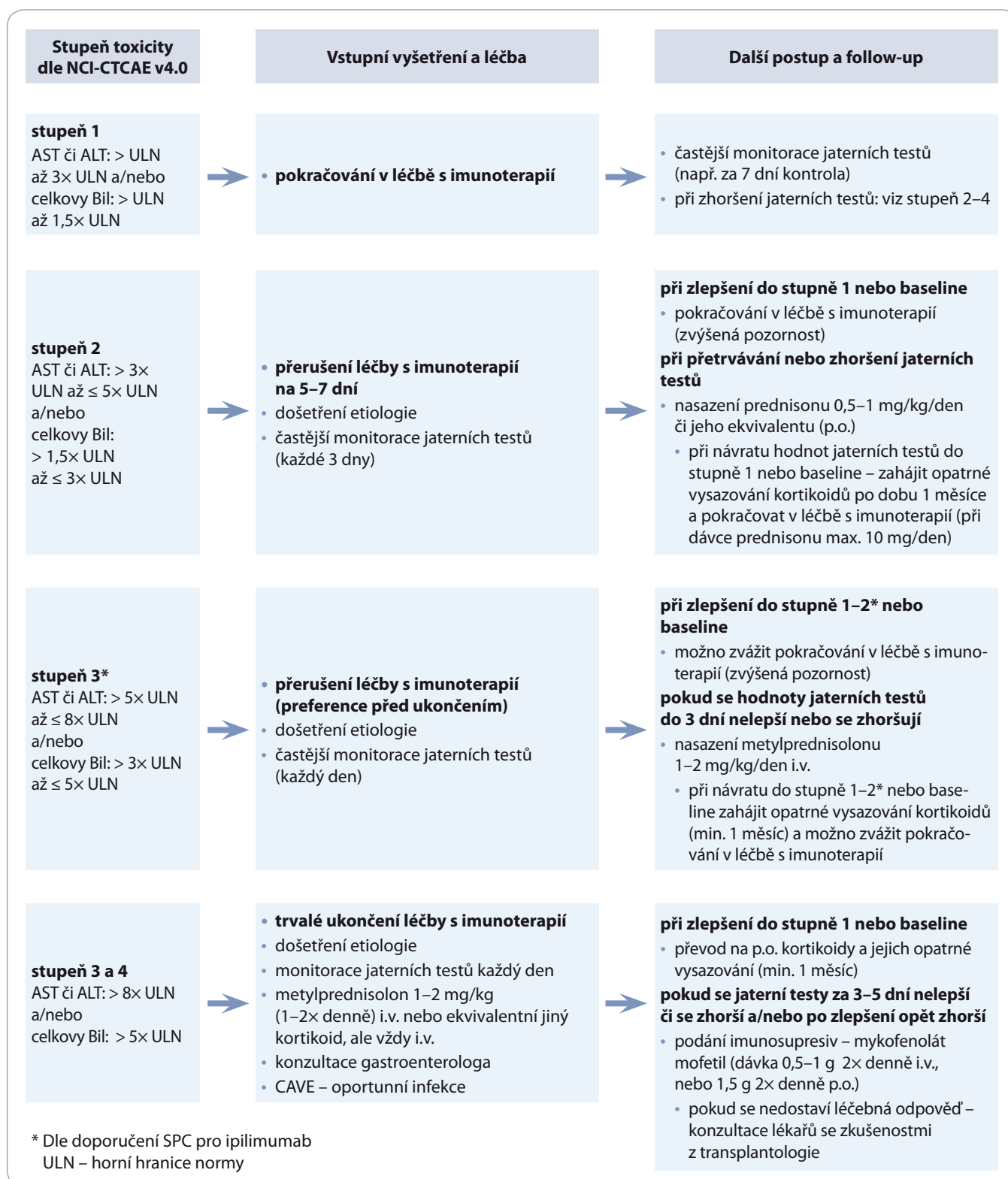


Schéma 4. Doporučený postup při výskytu imunitně podmíněné hepatotoxicity (stupeň 1–4).

mumabu 3 mg/kg se endokrinopatie vyskytla u přibližně 4–8 % pacientů s ipilimumabem v obou ramenech studie (všechny stupně), stupeň 3 pak jen u cca

2,3 % a stupeň 4 u 1,5 % pacientů [1]. Ve studii O'Day et al – předléčení pacienti s neoperabilním maligním melanomem III. nebo IV. stadia (ipilimu-

mab 10 mg/kg) – byla zaznamenána endokrinopatie všech stupňů u 5,8 % pacientů, 1,3 % pacientů mělo toxicitu 3. stupně, žádný pacient neměl toxicitu

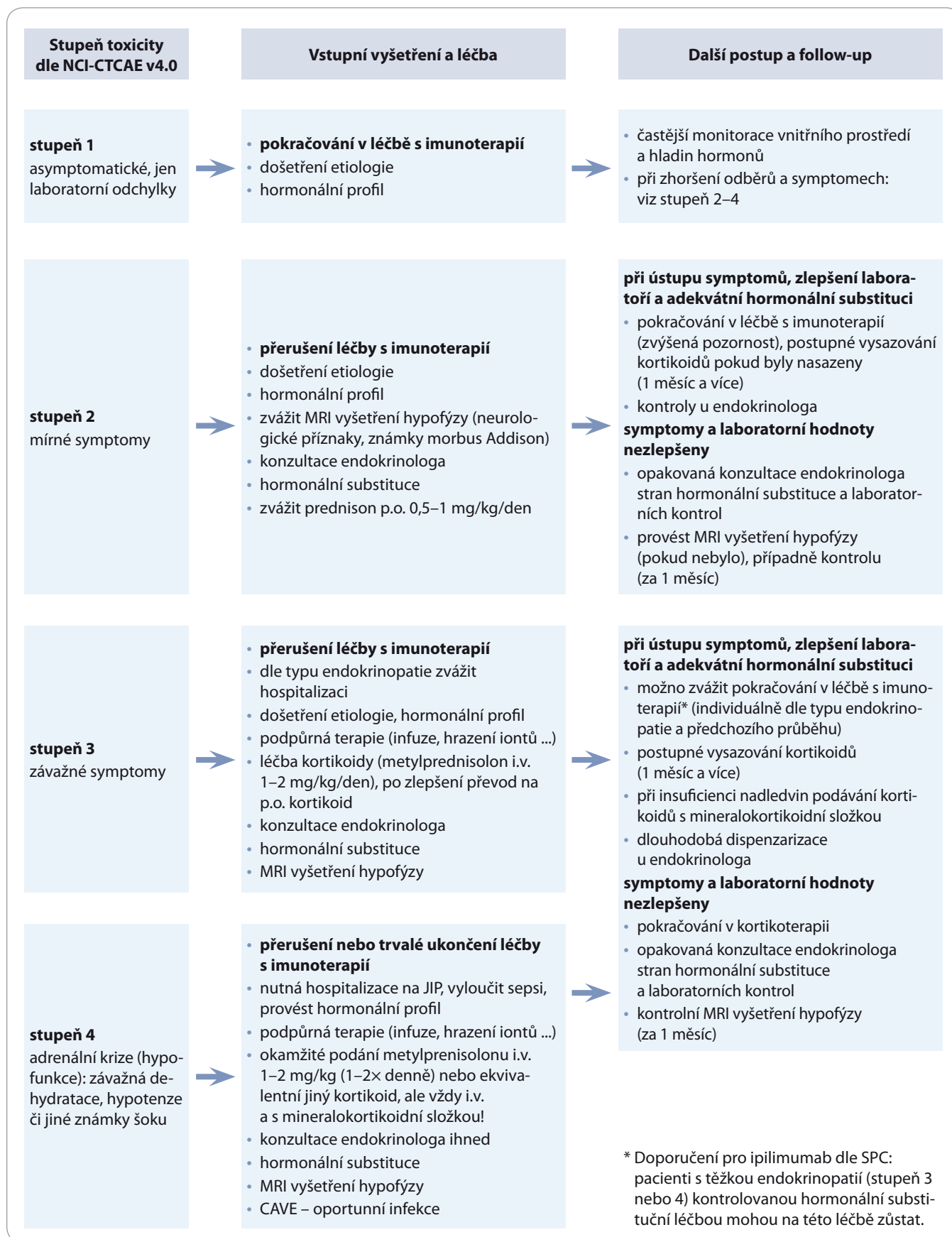


Schéma 5. Doporučený postup při výskytu imunitně podmíněné endokrinopatie (stupeň 1–4).

Tab. 1. Situace vyžadující trvalé ukončení ipilimumabu dle SPC [13].

Závažné nebo život ohrožující nežádoucí účinky	NCI-CTCAE v3 stupeň ^a
gastrointestinální závažné příznaky (bolest břicha, těžký průjem nebo významná změna v počtu stolic, krev ve stolici, gastrointestinální krvácení, gastrointestinální perforace)	průjem nebo kolitida stupně 3 nebo 4
jaterní výrazné zvýšení hladiny aspartát aminotransferázy (AST), alanin aminotransferázy (ALT) nebo celkového bilirubinu nebo příznaky hepatotoxicity	AST nebo ALT > 8× horní hranice normy nebo celkový bilirubin > 5× horní hranice normy
kůže život ohrožující kožní vyrážka (zahrnující Stevens-Johnsonův syndrom nebo toxickou epidermální nekrolýzu) nebo výrazně rozšířený pruritus interferující s aktivitami denního života nebo vyžadující lékařskou intervenci	vyrážka stupně 4 nebo pruritus stupně 3
neurologické nově vzniklá nebo zhoršující se těžká motorická nebo senzorická neuropatie	motorická nebo senzorická neuropatie stupně 3 nebo 4
jiné orgánové soustavy^b (např. nefritida, pneumonitida, pankreatitida, neinfekční myokarditida)	≥ stupeň 3 imunitně podmíněné reakce ^c ≥ stupeň 2 pro imunitně podmíněné poruchy oka, které NEREAGUJÍ na lokální imunosupresivní terapii

^a Stupně toxicity jsou v souladu s běžnými terminologickými kritérii nežádoucích účinků podle Národního institutu pro rakovinu (National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events). Verze 3.0 (NCI-CTCAE v3).

^b Jakékoliv jiné nežádoucí účinky, u nichž je prokázána imunitní souvislost nebo existuje na takovou souvislost podezření, by měly být hodnoceny podle CTCAE. Rozhodnutí o ukončení podávání přípravku ipilimumab je třeba provést podle závažnosti příhody.

^c Pacienti s těžkou endokrinopatií (stupeň 3 nebo 4) kontrolovanou hormonální substituční léčbou mohou na této léčbě zůstat.

4. stupně [17]. Z možných endokrinopatií jmenujme hypopituitarismus (s nebo bez hypofyzitidy), hypofunkci nadledvin, hypo- či hyperfunkci štítné žlázy a hypofunkci gonád. Při podezření na tento typ nežádoucího účinku opět odebíráme anamnézu (výskyt endokrinopatií v osobní a rodinné anamnéze), subjektivně si pacient může stěžovat na nespecifické příznaky: únava, slabosti, teploty, bolesti břicha, zvracení, průjemy, bolesti hlavy či poruchy číti. Klinicky jsou varovnými příznaky dehydratace, hypotenze nebo jiné známky nastupujícího syndromu systémové zánětlivé odpovědi. V laboratoři kromě základních odběrů vnitřního prostředí (často hyperkalemie, hyponatremie a hypoglykemie) a krevního obrazu provádíme screening endokrinopatií: odběr volného T3 a T4, TSH, protilátky proti tyreoidální peroxidáze – anti-TPO, dále ranní sérový kortizol, hladiny kortikotropinu (ACTH), u mužů pak hladinu testosteronu a u žen FSH a LH. V rámci diferenciální diagnostiky se zvažuje ACTH stimulační test. Ze zobrazovacích metod je indikováno MRI vyšetření mozku se zaměřením na oblast

hypofýzy a taktéž k vyloučení mozkových metastáz.

Na schématu 5 jsou pak schematicky znázorněny možné algoritmy léčby pacientů s endokrinopatií. Na tomto místě je však nutné podotknout, že jednotný konsensus léčby a monitorace není znám, v literatuře se některé údaje o léčbě tohoto nežádoucího účinku a možnostech návratu k léčbě ipilimumabem rozcházejí [11,16,18]. Prioritní jsou opakované konzultace a spolupráce s endokrinologem. Pokud je nutné podat kortikoidy (3. a 4. stupeň toxicity), tak preferujeme podání kortikoidů s mineralokortikoidní aktivitou a jejich vysazování musí být opět velmi pozvolné. Doba do vymizení obtíží pacienta a regresi změn na MRI vyšetření mozku může být delší než 20 týdnů. Nejsou výjimečné ani případy, kdy pacienti museli užívat hormonální substituci (nejčastěji hydrokortizonem či tyreoidálními hormony) celoživotně [11]. Porucha funkce štítné žlázy se může časem upravit, ale snížená produkce mineralokortikoidů, glukokortikoidů a hlavních hormonů může být trvalá. Spolupráce s endokrinologem je proto nutností.

Méně časté imunitně podmíněné vedlejší účinky

K dalším možným, ale vzácným (méně než 1 % případů) imunitně podmíněným nežádoucím účinkům ipilimumabu patří: meningitida, uveitida, pneumonitida, pankreatitida, perikarditida, myokarditida, nefritida, různé angiopatie, hemolytické anémie, trombocytopenie a další. Jednoznačné léčebné postupy nejsou známy, při výskytu těchto nežádoucích účinků se léčba řídí podobně jako při jiných autoimunitních onemocněních (kortikoidy představují první volbu v léčbě) (schéma 1). Obecně je toxicita 3. a 4. stupně důvodem k ukončení léčby ipilimumabem, podrobněji viz tab. 1 citující SPC [13].

Imunitně podmíněná neurologická toxicita

Neuropatie vznikající při léčbě ipilimumabem jsou málo časté, jejich incidence se pohybuje do 1 % a zpravidla se objevují už po 2. cyklu [12]. Může jít o poruchy na úrovni mozku i periferních nervů, se senzorickým nebo motorickým deficitem různého stupně. Byly popsány případy

aseptické meningitidy, optické neuritidy, myastenie gravis nebo Guillain-Barré syndromu [19]. Příznaky mohou být omyleně zaměňovány za neuropatii při jiných onemocněních, např. diabetu. Při výskytu nových neurologických potíží nebo zhoršení dřívějších je nutné konzultovat neurologa, pátrat také po jiných příčinách (mozkové metastázy) a vyloučit neuroinfekci. Imunitně podmíněná neurotoxická 2. stupně je léčena p.o. kortikoidy (prednison 1 mg/kg/den). Toxicitu 3. a 4. stupně léčíme v úvodu vysokými dávkami i.v. kortikoidů (metylprednisolon 1–2 mg/kg 1–2krát denně) a po zlepšení symptomů přecházíme na p.o. formu. Opět jako u jiných ir-AEs musí být vysazování kortikoidů pozvolné, min. 1 měsíc. V případě 3. a 4. stupně toxicity je léčba s ipilimumabem trvale ukončena.

Imunitně podmíněná oční toxicita

Nejčastěji se jedná o episkleritidu a uveitidu s incidencí < 1 %, se vznikem cca dva měsíce od započetí léčby. K základním symptomům patří bolest, pálení a zarudnutí očí, fotofobie, rozmazané vidění, snížená produkce slz. V úvodu je nutné konzultovat oftalmologa a vyloučit jinou příčinu. U 1. a 2. stupně toxicity situaci řešíme lokálními kortikoidy v očních kapkách (1% prednisolon). U toxicity 3. a 4. stupně jsou již nutné vysoké dávky systémových kortikoidů s pomalým vysazováním alespoň jeden měsíc. Definitivní ukončení ipilimumabu je opět indikováno u toxicity stupně 3 a 4 nebo u případů, kdy lokální kortikoidy nebyly dostatečně účinné [11].

Imunitně podmíněná plicní toxicita

U ipilimumabu se vyskytuje velmi zřídka, byly popsány případy sarkoidózy a pneumonie. Několik vážných případů pneumonitidy se objevilo ve studiích časně fáze s anti-PD-1 protilátkami, ojediněle s fatálním průběhem, zvláště u pacientů s nemalobuněčným plicním karcinomem [6,20,21]. Při klinických potížích (kašel, dušnost) je nutné provést RTG plic, případně CT vyšetření, vyloučit infekci, konzultovat pneumologa, zvážit bronchoskopii s laváží a/nebo plicní biopsii. Při podezření na ir-AE postupujeme podle obecných doporučení (schéma 1). Vyšší opatrnost je nutná již u 1. stupně toxicity a u 2. stupně neváhat s nasaze-

ním p.o. kortikoidů. Toxicita 3. a 4. stupně znamená trvalé ukončení léčby.

Imunitně podmíněná pankreatitida

a elevace pankreatických enzymů

Incidence akutní pankreatitidy s klinickými příznaky (bolesti břicha, nevolnost, zvracení) a elevací amylázy a lipázy je při léčbě ipilimumabem poměrně nízká (< 1,5 %) [11]. Častěji se ale jedná o asymptomatickou elevaci amylázy a lipázy, jejíž klinický význam není zcela jasný, každopádně vyžaduje zvýšenou opatrnost. Postupujeme podle obecných doporučení, p.o. kortikoidy u pankreatitidy 2. stupně (s klinickými příznaky), vysoké dávky i.v. kortikoidů a trvalé ukončení léčby u 3. a 4. stupně (schéma 1) [12,22].

Imunitně podmíněné

vedlejší účinky

u anti-PD-1/PD-L1 protilátek

Toxicita těchto protilátek je obecně menší než u ipilimumabu [4,6,7,20,23]. Vážná kožní toxicita stupně 3 a 4 se vyskytuje výjimečně (2 %). Také průjem 3. a 4. stupně je málo častý (1–2 %), podobně jako hepatotoxicita (do 3 %) a vážné endokrinopatie (< 1 %). Na rozdíl od ipilimumabu se ale častěji po anti-PD-1 protilátkách objevuje pneumonitida (< 5 %). Základem léčby vážné pneumonitidy jsou opět kortikoidy ve vysokých dávkách (metylprednisolon 2 mg/kg i.v. 1–2krát denně), případně infliximab. Další toxicity jsou spíše sporadické, je ale třeba s nimi počítat. Principy léčby ir-AEs po anti-PD-1/PD-L1 protilátkách jsou stejné jako u ipilimumabu.

Imunitně podmíněné

vedlejší účinky u kombinace

anti-PD-1 a anti-CTLA-4 protilátek

Podstatně vyšší četnost ir-AEs byla popsána ve studiích s kombinací anti-PD-1 a anti-CTLA-4 protilátkou (nivolumab + ipilimumab). Zde se výskyt vážných ir-AEs 3. a 4. stupně pohyboval kolem 50 %, s významným zastoupením gastrointestinální toxicity (15 %) a hepatotoxicity (19 %). Řada vážných toxicit však splňovala jen laboratorní kritéria NCI-CTCAE (např. elevace amylázy a lipázy bez klinických známek pankreatitidy). Při kombinaci se neobjevila žádná nová toxicita [5,23].

Checkpoint inhibitory u pacientů s autoimunitním onemocněním

I když dle souhrnu údajů o přípravku ipilimumab (SPC) není uvedena žádná kontraindikace kromě hypersenzitivity na léčivou nebo pomocnou látku, je vážné aktivní autoimunitní onemocnění obecně považováno za kontraindikaci k léčbě ipilimumabem [13]. U těchto pacientů však nejsou větší zkušenosti, protože byli primárně vyloučeni z klinických studií [1,2]. Aplikace ipilimumabu je spojována s vysokým rizikem zhoršení autoimunity s možnými fatálními následky. Již se ale objevují kazuistiky pacientů s vážnou a současně léčenou autoimunitou (sklerosis multiplex, seronegativní revmatoidní artritida), u kterých byla léčba ipilimumabem dobře tolerována [24]. Jde zatím o první zkušenosti, ze kterých nelze dělat závěry, a stále platí, že u pacientů s autoimunitním onemocněním v anamnéze se ipilimumab musí podávat s vysokou opatrností po zhodnocení potenciálního rizika a přínosu. Podobný problém se týká pacientů po orgánových transplantacích na chronické imunosupresivní léčbě či po prodělané hepatitidě B nebo C. I tyto pacienti byli vyloučeni z klinických studií s ipilimumabem a podobně jako u autoimunitních onemocnění kazuistická sdělení nepotvrzují obavy z vážnější toxicity ve srovnání s běžnou populací [25–27]. Přicházejí však nové léky s lepším profilem toxicity (anti-PD-1 a anti-PD-L1 protilátky). Je možné, že na základě nových poznatků s těmito léky dojde k přehodnocení původních doporučení.

Doporučení pro praxi

- Ir-AEs jsou časté vedlejší účinky checkpoint inhibitorů, mohou být potenciálně život ohrožující, není znám prediktivní biomarker pro výskyt ir-AEs. Nebyla potvrzena jednoznačná souvislost mezi výskytem a intenzitou ir-AEs a účinností imunoterapie (kromě vitiliga).
- K nejčastějším ir-AEs patří kožní toxicita (exantém, pruritus), GIT toxicita (průjem, kolitida), endokrinní toxicita (hypopituitarismus, hypofyzitida, hypotyreóza, insuficience nadledvin), jaterní toxicita (elevace transamináz, hepatitida), u anti-PD-1 protilátek

pneumonitida. K rozvoji ir-AE ale může dojít kdekoliv v těle [28,29].

- Ir-AEs mají dobře popsany počátek a délku trvání (kinetiku), ale mohou se vyskytnout i několik měsíců po léčbě (endokrinopatie), není znám bezpečný interval od ukončení léčby. U stejného pacienta se může rozvinout více ir-AEs.
- Incidence ir-AEs je vyšší u ipilimumabu (dávková závislost) ve srovnání s anti-PD-1/PD-L1 protilátkami. Ještě vyšší je u kombinace ipilimumabu a nivolumabu. Ústup toxicity u anti-PD-1/PD-L1 protilátek může být pomalejší, proto je doporučováno dlouhodobé sledování [30].
- Nezbytné jsou pravidelné laboratorní kontroly (krevní obraz, ionty, glykemie, jaterní testy, funkce ledvin, hormony štítné žlázy) před každou aplikací protilátky a v intervalech 6–12 týdnů po dobu prvních šesti měsíců po léčbě. Při výskytu únavy nebo nespecifických potíží navíc vyšetřujeme hladinu ACTH, ranního kortizolu a u mužů i testosteronu [30].
- Nepodceňovat ir-AEs. Důležité je časně zahájení imunosupresivní léčby s kortikoidy a jejich pomalé vysazování, řídit se aktuálními doporučeními, používat klasifikaci toxicity dle NCI-CTCAE. Při neúčinnosti kortikoidů přidáváme další imunosupresiva – infliximab, mykofenolát mofetil. Nebylo prokázáno, že by imunosupresivní léčba pro ir-AEs snižovala efekt imunoterapie.
- Pozor na zvýšené riziko oportunních infekcí při dlouhodobé imunosupresi (mykotické a virové infekce). Zvážit profylaxi pneumocystové pneumonie (cotrimoxazol).
- Ir-AEs stupně 3 a 4 většinou znamenají trvalé ukončení léčby s checkpoint inhibitory. U vybraných toxicit vysokého stupně je ale možno po jejich ústupu v imunoterapii pokračovat (např. exantém 3. stupně, endokrinopatie 3. a 4. stupně).
- Redukce dávky imunoterapie pro ir-AE není povolena, jen odklad. Maximální interval přerušení léčby pro ir-AE není pevně stanoven, obecně je akceptováno 12 týdnů od poslední dávky. Kortikoidy p.o. by měly být zcela nebo téměř vysazeny (prednison 10 mg/den a méně).

- Doporučení k léčbě ir-AEs jsou univerzální pro všechny checkpoint inhibitory, i když vycházejí především ze zkušeností z klinických studií s ipilimumabem. Lze očekávat úpravy na základě zkušeností s novými léky, jde o dynamický proces.
- Pro časnou diagnostiku a léčbu ir-AEs je nezbytná multioborová týmová spolupráce pod vedením onkologa (dermatolog, gastroenterolog, endokrinolog, neurolog a další).
- Spolupráce pacienta je základní kritérium při zahajování léčby, pro nespolupracujícího pacienta není léčba s checkpoint inhibitory vhodná.

Závěr

Úspěch ipilimumabu u pokročilého melanomu ukázal nové možnosti v léčbě nádorových onemocnění. Imunitně podmíněné vedlejší účinky a jejich vážné komplikace zpočátku vedly k velkým obavám a k rezervovanému postoji u řady onkologů. S postupným získáváním zkušeností jsme se naučili toxicitu řešit a při dodržování doporučených postupů je dnes léčba ipilimumabem bezpečná. S příchodem dalších protilátek a jejich kombinací se mohou objevit nové vedlejší účinky. Základem úspěšné léčby s checkpoint inhibitory je kromě erudovaného lékaře i edukovaný a spolupracující pacient. Při rozvoji vedlejších účinků je nezbytná multioborová spolupráce. Každé pracoviště, kde se podává moderní imunoterapie, by si mělo vybudovat tým specializovaných odborníků. Checkpoint inhibitory budou vzhledem k univerzálnímu mechanismu účinku časem používány k léčbě více malignit, čímž se výrazně zvýší počet pacientů s ir-AEs, na což musíme být připraveni.

Literatura

1. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363(8): 711–723. doi: 10.1056/NEJMoa1003466.
2. Robert C, Thomas L, Bondarenko I et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2011; 364(26): 2517–2526. doi: 10.1056/NEJMoa1104621.
3. Weber JS, D'Angelo SP, Minor D et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16(4): 375–384. doi: 10.1016/S1473-2045(15)70076-8.

4. Robert C, Long GV, Brady B et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med* 2015; 372(4): 320–330. doi: 10.1056/NEJMoa1412082.
5. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2013; 369(2): 122–133. doi: 10.1056/NEJMoa1302369.
6. Hamid O, Robert C, Daud A et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med* 2013; 369(2): 134–144. doi: 10.1056/NEJMoa1305133.
7. Robert C, Ribas A, Wolchok JD et al. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomized dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet* 2014; 384(9948): 1109–1117. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60958-2.
8. Cancer.gov [homepage on the Internet]. New York: National Cancer Institute. Common terminology criteria for adverse events (CTCAE) v4.0; c2014 [updated 2014 March 25; cited 2015 May 5]. Available from: http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/ctc.htm#ctc_40.
9. Fecher LA, Agarwala SS, Hodi FS et al. Ipilimumab and its toxicities: a multidisciplinary approach. *Oncologist* 2013; 18(6): 733–743. doi: 10.1634/theoncologist.2012-0483.
10. Wolchok JD, Neyns B, Linette G et al. Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomized, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. *Lancet Oncol* 2010; 11(2): 155–164. doi: 10.1016/S1473-2045(09)70334-1.
11. Weber JS, Kahler KC, Hauschild A. Management of immune-related adverse events and kinetics of response with ipilimumab. *J Clin Oncol* 2012; 30(21): 2691–2697. doi: 10.1200/JCO.2012.41.6750.
12. Schermerling RA. Toxicity of checkpoint inhibitors. *Chin Clin Oncol* 2014; 3(3): 31. doi: 10.3978/j.issn.2304-3865.2014.08.03.
13. Sukl.cz [homepage on the Internet]. State institute for drug control. Summary of product characteristics Yervoy; c2012 [updated 2012 March 15; cited 2015 May 5]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002213/WC500109299.pdf.
14. Weber J, Thompson JA, Hamid O et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II study comparing the tolerability and efficacy of ipilimumab administered with or without prophylactic budesonide in patients with unresectable stage III or IV melanoma. *Clin Cancer Res* 2009; 15(17): 5591–5598. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1024.
15. Harmankaya K, Erasim C, Koelblinger C et al. Continuous systemic corticosteroids do not affect the ongoing regression of metastatic melanoma for more than two years following ipilimumab therapy. *Med Oncol* 2011; 28(4): 1140–1144. doi: 10.1007/s12032-010-9606-0.
16. Della Vittoria Scarpatti G, Fusiello C, Perri F et al. Ipilimumab in the treatment of metastatic melanoma: management of adverse events. *Onco Targets Ther* 2014; 7: 203–209. doi: 10.2147/OTT.S57335.
17. O'Day SJ, Maio M, Chiarion-Sileni V et al. Efficacy and safety of ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a multicenter single-arm phase II study. *Ann Oncol* 2010; 21(8): 1712–1717. doi: 10.1093/annonc/mdq013.
18. Lemeche C, Arkenau HT. Novel treatments for metastatic cutaneous melanoma and the management of emergent toxicities. *Clin Med Insights Oncol* 2012; 6: 53–66. doi: 10.4137/CMO.S5855.
19. Wilgenhof S, Neyns B. Anti-CTLA-4 antibody-induced Guillain-Barré syndrome in a melanoma patient. *Ann Oncol* 2011; 22(4): 991–993. doi: 10.1093/annonc/mdr028.

20. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012; 366(26): 2443–2454. doi: 10.1056/NEJMoa1200690.
21. Langer CJ. Emerging immunotherapies in the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC): the role of immune checkpoint inhibitors. *Am J Clin Oncol* 2015; 38(4): 422–430. doi: 10.1097/JCO.0000000000000059.
22. Baurain JF, Smylie M, Ascierto PA et al. Outcomes of ipilimumab treatment-related adverse events in patients with metastatic melanoma (MM) who received systemic corticosteroids in a phase III trial. *J Clin Oncol* 2012; 30 (Suppl): abstr. 8539.
23. Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R et al. Efficacy and safety results from a phase III trial of nivolumab (NIVO) alone or combined with ipilimumab (IPI) versus IPI alone in treatment-naïve patients (pts) with advanced melanoma (MEL) (CheckMate 067). *J Clin Oncol* 2015; 33 (Suppl): abstr. LBA1.
24. Kyi C, Carvajal RD, Wolchok JD et al. Ipilimumab in patients with melanoma and autoimmune disease. *J Immunother Cancer* 2014; 2(1): 35. doi: 10.1186/s40425-014-0035-z.
25. Lipson EJ, Bodell MA, Kraus ES et al. Successful administration of ipilimumab to two kidney transplantation patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2014; 32(19): e69–e71. doi: 10.1200/JCO.2013.49.2314.
26. Ravi S, Spencer K, Ruisi M et al. Ipilimumab administration for advanced melanoma in patients with pre-existing Hepatitis B or C infection: a multicenter, retrospective case series. *J Immunother Cancer* 2014; 2(1): 33. doi: 10.1186/s40425-014-0033-1.
27. Sharma A, Thompson JA, Repaka A et al. Ipilimumab administration in patients with advanced melanoma and hepatitis B and C. *J Clin Oncol* 2013; 31(21): e370–e372. doi: 10.1200/JCO.2012.47.1946.
28. Kopecký J, Kubeček O, Trojanová P et al. Adverse effects of modern treatment of malignant melanoma and their treatment/management. *Klin Onkol* 2014; 27(6): 393–400. doi: 10.14735/amko2014393.
29. Kopecký J, Trojanová P, Kubeček O et al. Treatment possibilities of ipilimumab-induced thrombocytopenia – case study and literature review. *Jpn J Clin Oncol* 2015; 45(4): 381–384. doi: 10.1093/jjco/hyu222.
30. Weber JS, Yang JC, Atkins MB et al. Toxicities of immunotherapy for the practitioner. *J Clin Oncol* 2015; 33(18): 2092–2099. doi: 10.1200/JCO.2014.60.0379.

Terapeutický efekt a tolerance ipilimumabu u metastatického maligního melanomu v dětském věku – kazuistika

Therapeutic Effect and Tolerance of Ipilimumab in Metastatic Malignant Melanoma in Children – a Case Report

Bajčiová V.

Klinika dětské onkologie LF MU a FN Brno

Souhrn

Východiska: Maligní melanom je vzácný typ nádoru v dětské populaci. Příčiny vzniku často nejsou známy. Klinické příznaky jsou nespecifické, klinické chování a biologické znaky se liší od melanomu dospělé populace. Nejvýznamnějším prognostickým faktorem je rozsah nemoci. Pro lokalizovaný melanom je chirurgická resekce metodou volby, pokročilý a metastatický melanom patří mezi nevyléčitelné nemoci. Revoluční změny v léčbě melanomu přinesla protinádorová imunoterapie. **Kazuistika:** Presentujeme případ osmiletého chlapce s metastatickým maligním melanomem neznámého origa na základě mutace *TP53* (Li-Fraumeni syndrom). Absolvoval resekci metastázy a adjuvantní chemoterapii temozolomidem. Klinická remise byla dosažena na konci léčby. Dva roky od konce léčby byla potvrzena metastatická progresse do plic. Absolvoval imunoterapii ipilimumabem, dle našich informací jako první dítě mladší 12 let v Evropě. Celkem absolvoval indukční fázi a dvě reindukce ipilimumabu. Pro irAE (immune related adverse event) grade III byla další podání ipilimumabu s premedikací kortikoidy a antihistaminiky. Rozvinul rovněž asymptomatickou thyreoiditu. Nejlepší dokumentovaná odpověď byla stabilní nemoc. Celkový klinický stav byl excelentní. Po třech letech od první progresse dokumentována další masivní progresse v plicích, zahájil léčbu anti-PD-1 monoklonální protilátkou (pembrolizumab), ve které aktuálně pokračuje. Celkově pacient přežívá 74 měsíců. **Závěr:** Presentovaná kazuistika podporuje podání imunoterapie u dětských pacientů mladších 12 let. Léčebný efekt vedl k výraznému prodloužení celkového přežití, toxicita je akceptovatelná. Problémem zůstává výrazně limitovaný počet klinických pediatrických studií s imunoterapií.

Klíčová slova

maligní melanom – dětské nádory – imunoterapie

Autorka deklaruje, že v souvislosti s předmětem studie nemá žádné komerční zájmy.

The author declares she has no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



MUDr. Viera Bajčiová, CSc.

Klinika dětské onkologie

LF MU a FN Brno

Černopolní 9

625 00 Brno

e-mail: vbajciov@fnbrno.cz

Obdrženo/Submitted: 20. 8. 2015

Přijato/Accepted: 23. 10. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20154S115>

Summary

Background: Malignant melanoma is a rare malignancy in the pediatric population. Etiology is usually unknown. Clinical symptoms are non-specific, clinical behavior and biology features may differ from those in an adult population. The most important prognostic factor is spread of disease. Surgical resection is treatment of choice for localized melanoma. Advanced and metastatic melanoma is still an incurable disease.

Case: We are presenting an eight-year-old boy with metastatic malignant melanoma of unknown origin based on *TP53* mutation (Li-Fraumeni syndrome). He underwent surgery and adjuvant chemotherapy (temozolomide as single agent). Complete remission was achieved at the end of treatment. Two years after the end of therapy (and 31 months from diagnosis) he developed metastatic progression to the lungs. He has received immunotherapy with ipilimumab, according to our knowledge as the first child under the age of 12 in Europe. He completed three courses of ipilimumab, with irAE (immune related adverse event) grade III during the first course of anti CTLA-4. Therefore, further doses of ipilimumab were given with corticoids and antihistamines as premedication. Also, asymptomatic thyroiditis grade II has been confirmed. The best documented treatment response is stable disease. Performance status was excellent. Three years since the first progression, he developed further massive progression to the lungs. Second line immunotherapy with anti-PD-1 monoclonal antibody (pembrolizumab) is currently going on. So far, the overall survival of the patient is 74 months. **Conclusion:** The presented case study supports the administration of immunotherapy in children younger than 12 years. Therapeutic effect has led to significant overall survival with tolerable toxicity. The problem remains significantly limited number of pediatric clinical trials using immunotherapy.

Key words

malignant melanoma – childhood cancer – immunotherapy

Úvod

Maligní melanom patří mezi velmi vzácná maligní onemocnění v období dětství a dospívání, přesto je nejčastějším typem kožního zhoubného nádoru u mladých lidí. Ze všech kožních maligních melanomů v populaci tvoří pacienti mladší 20 let pouze 1,3–2 % [1].

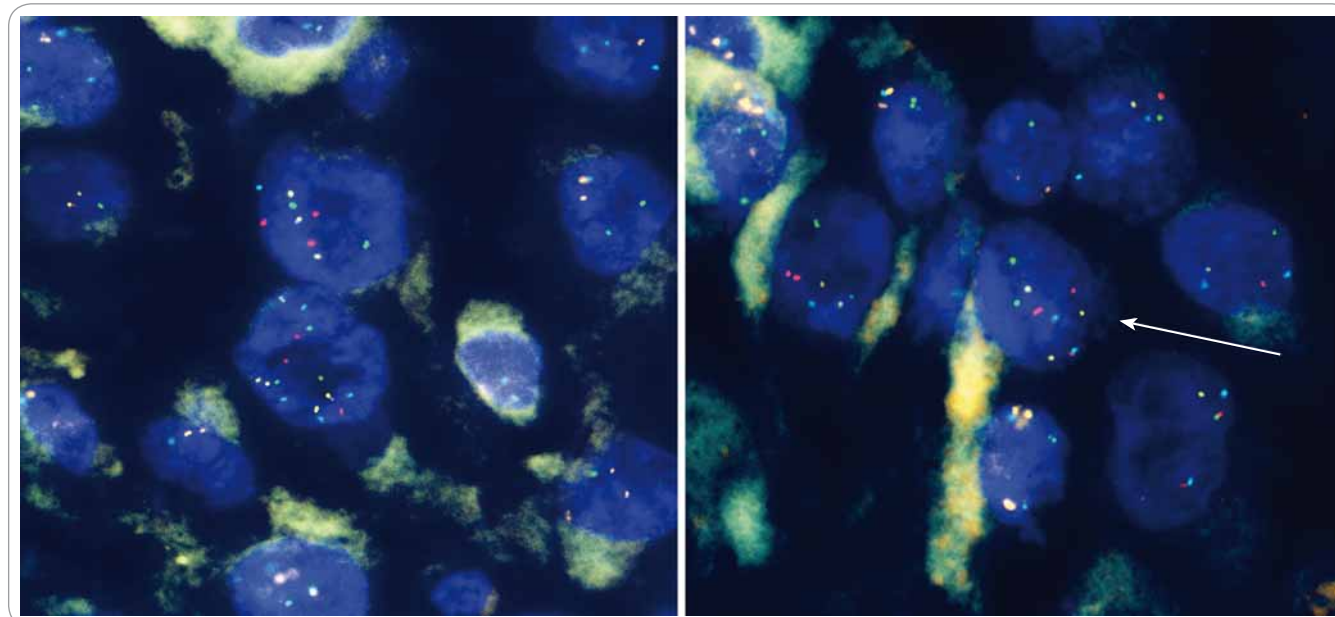
U mladé generace do 20 let věku je výrazná převaha výskytu melanomu u dívek, výjimkou jsou děti do pěti let věku, kde je maligní melanom častější u chlapců. Melanom je převážně lokalizován na horních a dolních končetinách

a na trupu, kdežto u malých chlapců dominuje výskyt na hlavě a krku.

Příčina vzniku kožního maligního melanomu v dětském věku není známá. Maligní transformace může vzniknout spontánně, navíc děti mají několik dalších predispozičních a rizikových faktorů (familiární výskyt, široké spektrum benigních pigmentových névů, genetické faktory, trauma či poruchy imunity). Většina maligních melanomů u prepubertálních dětí a dospívajících vzniká *de novo* u zdravých jedinců, kteří nemají žádný z uvedených rizikových faktorů [1–3].

Klinické příznaky melanomu nejsou specifické a existuje celá řada kožních lézí v dětském věku, které mohou imitovat maligní melanom (benigní pigmentový névus, dysplastický névus, atypický blue névus, hemangiom, pyogenní granulom, veruky, Spitzové névus atd.) [2,3].

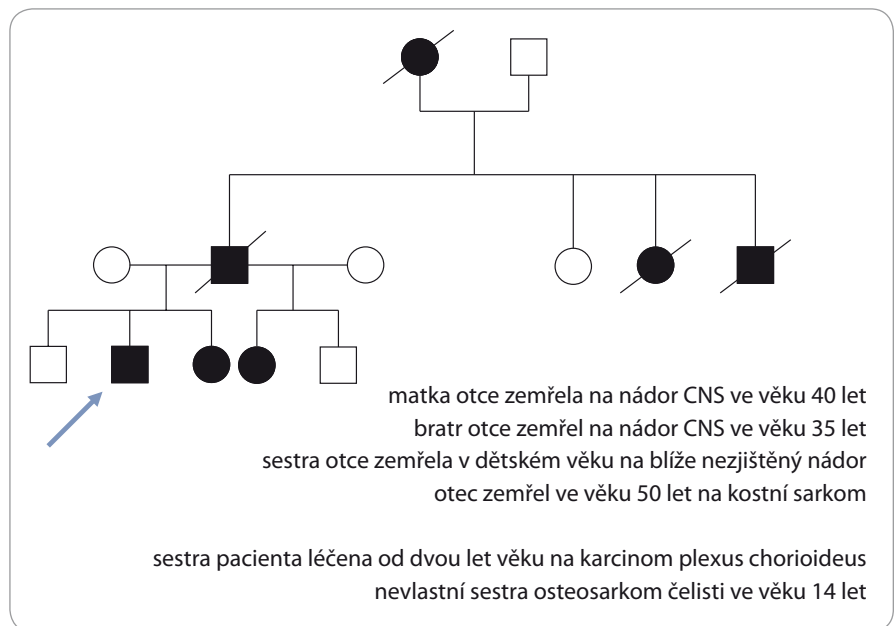
Diagnostika maligního melanomu u dětí a dospívajících je svízelná, protože vzhledem k vzácnému výskytu, absenci všeobecně známých rizikových faktorů, atypické prezentaci a spoustě pigmentových névů se většinou na tuto diagnózu nemyslí.



Obr. 1. Amplifikace genů *CCND1*, *RREB1*, *MYB* z tumoru.

Kazuistika

Chlapec ve věku osm let přichází na Klinikou dětské onkologie v červnu 2009 s klinickým nálezem lokalizované krční lymfadenopatie vpravo, bez systémových příznaků. Iniciálně proběhla exstirpace nejen zvětšené lymfatické uzliny, ale i přilehlých uzlin, velikost 45 × 40 × 15 mm. Histologie potvrdila metastázu maligního melanomu, tzv. animální typ, do lymfatické uzliny. Pouzdro uzliny bylo neporušené. Dalších šest uzlin bylo bez známek infiltrace. Melanom měl vysokou proliferaci s Ki-67 nad 50 %, bez angioinvasze. BRAF-V600E mutace nepotvrzena, hraniční amplifikace CCND1 (11q13) a MYB (6q13) (obr. 1). Sérové nádorové markery (LDH, NSE, S100B) byly negativní. Fototyp kůže I, na kůži několik drobných pigmentových névů v klidovém stadiu. Kompletní postoperační vyšetření včetně celotělového PET/CT bylo negativní, neodhalilo primum melanomu ani další metastatická ložiska. Stav byl hodnocen jako pTx N2b M0, klinické sta-

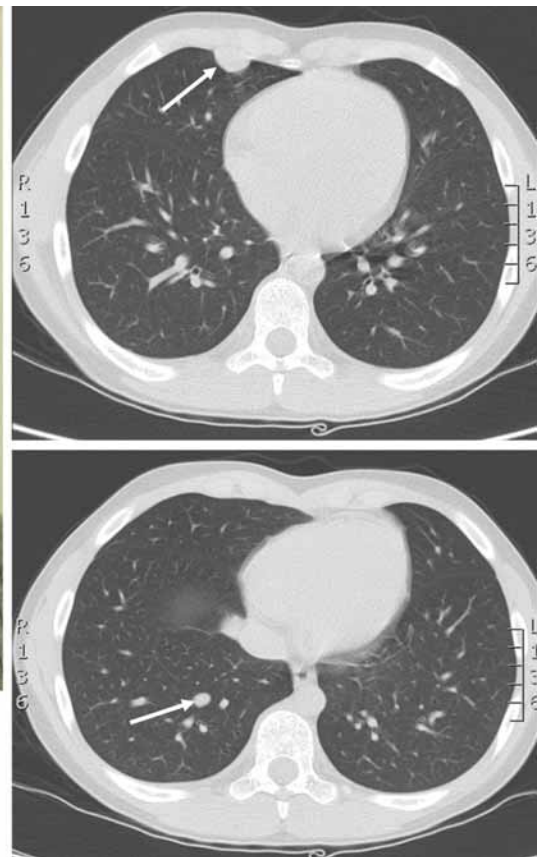
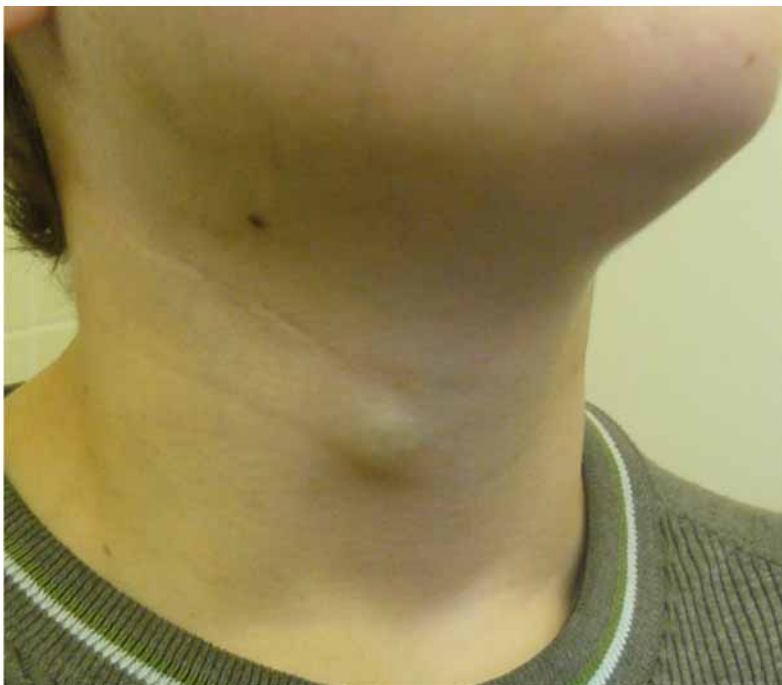


Obr. 2. Genealogram rodiny.

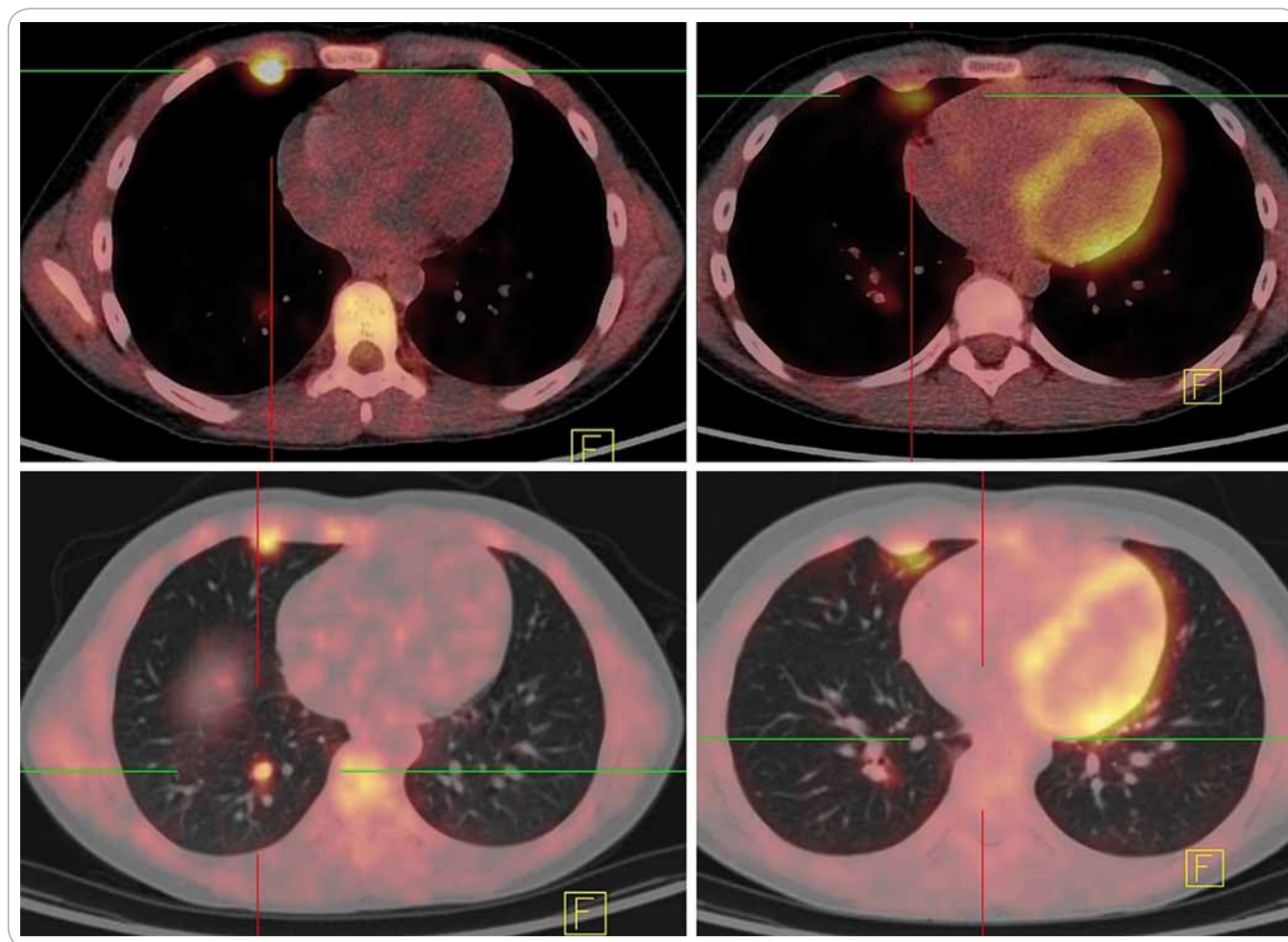
dium IIIC. Operací byla dosažena 1. kompletní klinická remise.

Možnou příčinu vzniku maligního melanomu u osmiletého chlapce na bázi ge-

netické predispozice objasňuje rodinná anamnéza s potvrzenou germinální mutací *TP53* genu a Li-Fraumeni syndromem ze strany otce pacienta (obr. 2).



Obr. 3. Lokální recidiva na krku, leden 2012.



Obr. 4. Nejlepší dosažená odpověď po 1. serii ipilimumabu.

Dle v tom čase platného pediatrického protokolu CCLG (Childrens Cancer and Leukemia Group) pro pokročilý maligní melanom po operaci pacient absolvoval chemoterapii temozolomidem $200 \text{ mg/m}^2 \times 5$ dní (6 bloků) s velmi dobrou tolerancí. Léčbu ukončil v prosinci 2009. Přesvětření potvrdilo trvání 1. kompletní remise.

Dva roky od ukončení léčby (leden 2012) byla zjištěna lokální recidiva na krku vpravo, mediastinální lymfangioida a mnohočetné bilaterální plicní metastázy (obr. 3).

Exstirpace podkožní metastázy na krku vpravo ($40 \times 20 \times 10 \text{ mm}$) potvrdila metastázu melanomu anamniálního typu výrazně produkující melanin. Osm regionálních lymfatických uzlin bylo bez známek infiltrace. Plicní metastázy byly operačně neřešitelné. Metastatická progresse byla 25 měsíců od ukončení léčby a 31 mě-

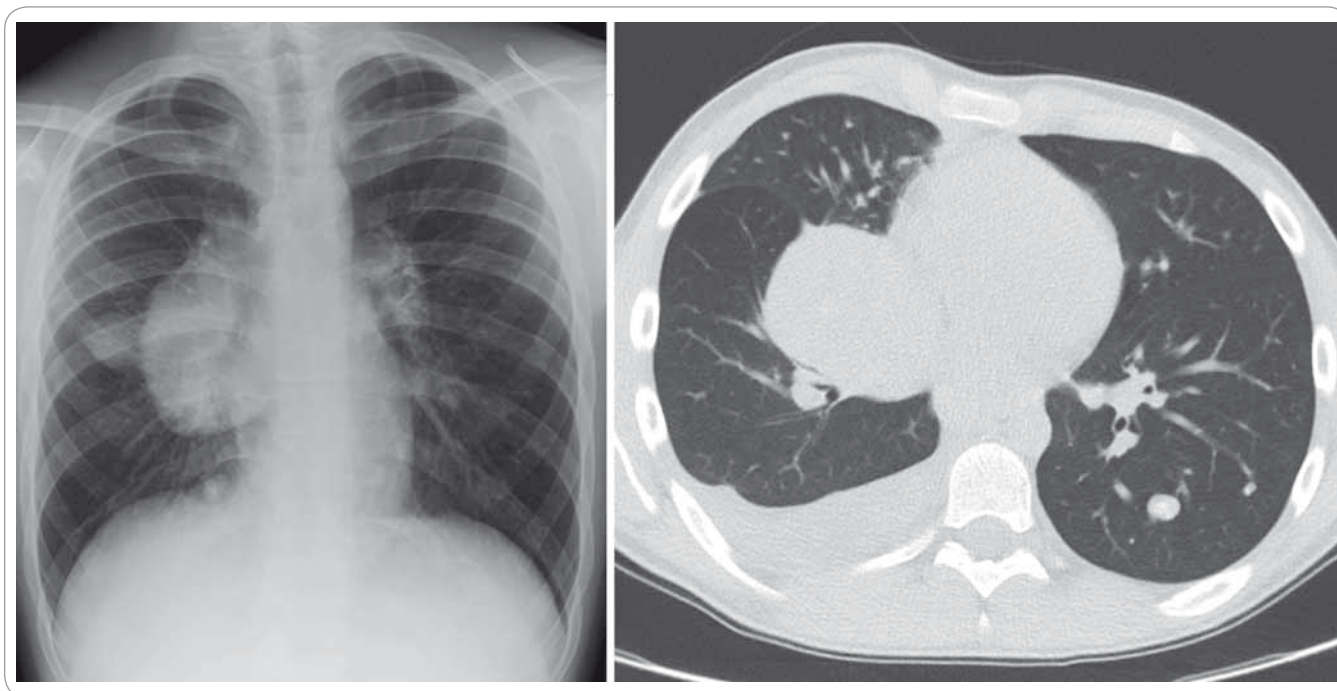
síců od diagnózy. Klinický stav pacienta byl excelentní, Lansky/Karnofsky 100. Po náročném jednání stran udělení výjimky pro věk pod 18 let (pacient měl v tom čase 11 let) s plátcí péče, SÚKL a centrem farmaceutické firmy v USA byla tato výjimka po 53 dnech jednání udělena a pacient byl zařazen do specifického léčebného programu jako první dítě v Evropě pod 12 let věku. V průběhu indukční fáze léčby 1. podání ipilimumabu proběhlo 20. 3. 2012 bez reakce. Při 2. podání pacient vyvinul hypersenzitivní reakci, třesavku, teplotu 38°C s přechodnou hypotenzí. Hodnoceno jako irAE (immune related adverse event) grade III. Další (3. a 4.) podání ipilimumabu v rámci indukce s premedikací antihistaminiky a kortikoidy proběhlo bez reakce. Indukční fázi léčby ukončil 23. 5. 2012.

Opakované kontrolní vyšetření prokazuje ústup lymfangioidy, na CT vyšetření

plícní metastázy velikostně stacionární, ale s postupným poklesem aktivity na 18 FDG PET scanu. Nejlepší dokumentovaná odpověď byla dosažena 24. týden od zahájení léčby ipilimumabem (obr. 4). Dle imunologických kritérií odpovědi na léčbu stav hodnocen jako stacionární (immune response stable disease – irSD).

Pro nárůst aktivity na PET a mírné zvětšení plicních ložisek melanomu na CT pacient absolvoval ještě dva reindukční bloky ipilimumabu s dobrou tolerancí (leden 2013 a duben 2014).

V průběhu léčby byly monitorovány možné „immune related“ nežádoucí účinky a funkce štítné žlázy. Pacient po celou dobu klinicky eutyreoidní, hormony a tyreoglobulin v normě. Na UZ vyšetření štítnice zachycena drobná hypoechogenní ložiska, stacionární v čase, vaskularizace žlázy v normě. Cytologické vyšetření prokázalo perifokální lymfo-



Obr. 5. Progrese v plicích, leden 2015.

cytární thyreoiditis grade II. Chlapec byl bez dalších známek autoimunitních nežádoucích reakcí.

V lednu 2015, po třech letech od první progrese, pacient přichází s teplotami do 39 °C, unavený, zchvácený, ve spádu léčen dvakrát antibiotiky pro bronchopneumonii. Na RTG plic a posléze celotělovém PET/CT byla nalezena masivní progrese plicních ložisek více vpravo (obr. 5). V laboratoři vzestup nádorových markerů (LDH, S100B, NSE) a paraneoplastická hyperkalcemie. Ostatní orgány jsou dle PET/CT nepostiženy. U pacienta indikujeme imunoterapii 2. linie, anti-PD-1 monoklonální protilátku pembrolizumab v rámci specifického léčebného programu. Rodina ale volí alternativní způsob léčby (miracle mineral supplement – MMS). V dubnu 2015 přichází ve zhoršeném klinickém stavu, dušný, s další plicní progresí a masivním pleurálním výpotkem vpravo. Vyžaduje oxygenoterapii, analgoterapii, drenáž dutiny hrudní. Výpotek byl stran maligních buněk cytologicky negativní. Pro další zhoršení stavu pacient absolvoval radioterapii na oblast plicních ložisek v dávce 30 Gy (obr. 6).

Léčbu pembrolizumabem zahájil v květnu 2015 s velmi dobrou tolerancí,

bez vedlejších nežádoucích reakcí. Pozitivní klinický efekt pozorován po 3. dávce pembrolizumabu (ústup systémových příznaků, teplot, výrazné únavy, kašle a dyspnoe). V současnosti pokračuje v léčbě pembrolizumabem bez známek toxicity, opět začal chodit do školy, Lansky/Karnofsky status 80. Celková doba přežití je 74 měsíců.

Diskuze

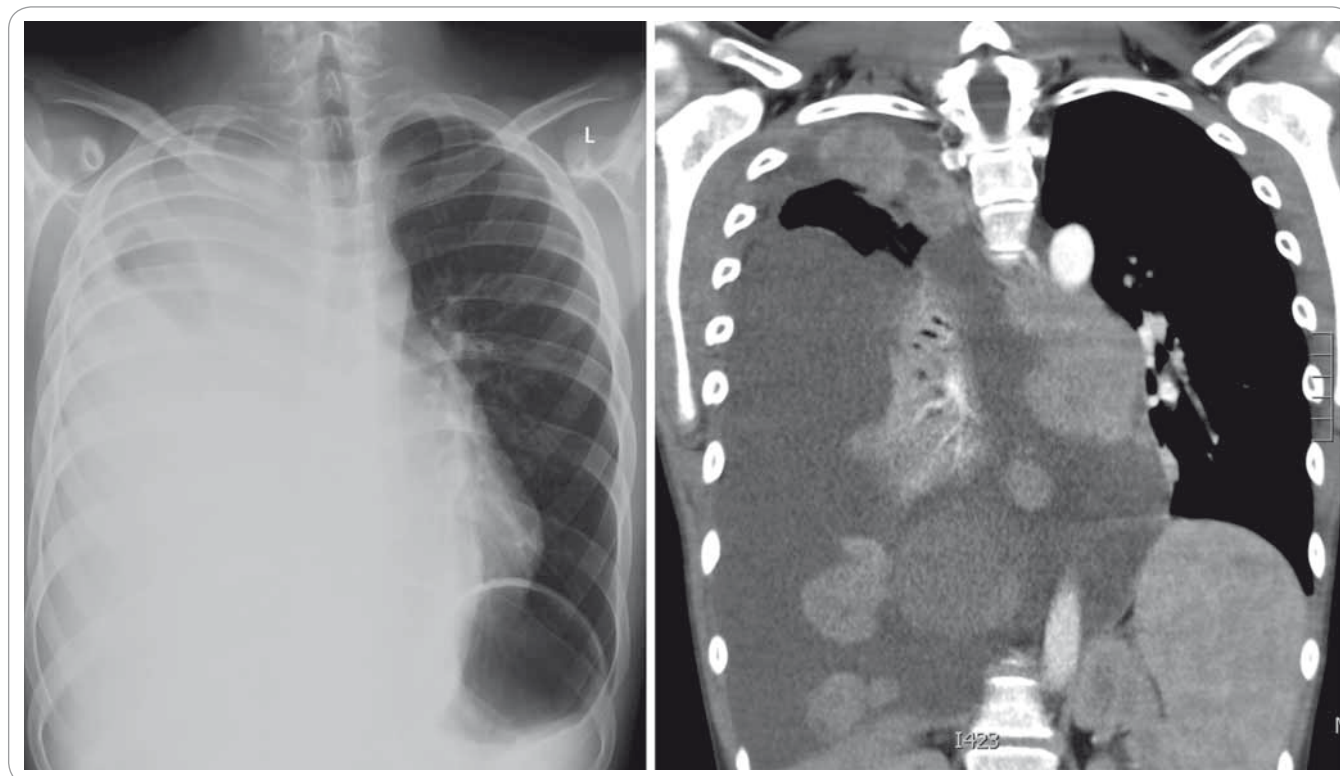
U maligního melanomu bez ohledu na věk výrazně platí závislost úspěšnosti léčby na časnosti zachytu. Diagnostika v dětském věku není tak snadná, jak by se mohlo zdát, protože u dětí diagnostiku komplikuje množství jiných pigmentových kožních lézí, všeobecně známé rizikové faktory a expozice UV záření nejsou v dětském věku tak v popředí jako u dospělé populace [2,4,5].

Prognóza maligního melanomu závisí od více faktorů. Mezi negativní prognostické faktory patří klinické faktory (věk < 2 roky, mužské pohlaví, extrakončetinová lokalizace a pokročilá nemoc), faktory patologické (typ melanomu, jeho tloušťka, pozitivní vaskulární invaze, přítomnost ulcerace, vysoká proliferativní aktivita, pozitivita sentinelové uzliny) a biologické faktory (fami-

liárně podmíněný melanom s prokázanou mutací genu *CDKN2A*, *BRAF-V600E* mutace) [1,2,6].

Lokalizovaný maligní melanom je chirurgická nemoc, odstranění iniciálních fází melanomu vede ke skutečnému vyléčení. Pokročilý a metastatický maligní melanom je chemorezistentní a stále patří mezi nevyléčitelné nemoci. Revoluční změny v léčbě pokročilého maligního melanomu přineslo použití moderní imunoterapie v podobě monoklonálních protilátek (anti-CTLA-4 monoklonální protilátka a anti-PD-1 monoklonální protilátka) a jejich kombinace. Ipilimumab, humánní anti-CTLA-4 protilátka, prokázala signifikantní prodloužení života u metastatického maligního melanomu [1,2,7–10]. Bohužel v čase onemocnění našeho pacienta byly všechny realizované klinické studie projektovány pouze pro dospělý věk s dolní věkovou hranicí 18 let a trvala absence pediatrické klinické studie s ipilimumabem, takže pro děti byla tato léčba prakticky nedostupná.

Maligní melanom je nádor s nejširším spektrem mutací signálních drah, a proto probíhá celá řada klinických studií s cílenou léčbou [1,7,11], bohužel existuje dosud pouze jediná klinická stu-



Obr. 6. Progrese v plicích a mediastinu, pleurální výpotek, duben 2015.

die pro BRAF-V600E pozitivní pokročilé melanomy s vemurafenibem v dětském věku. Prognózu maligního melanomu u dětí a dospívajících je přes všechny poznatky moderní onkologie obtížné predikovat. Nejvýznamnějším prognostickým faktorem nadále zůstává především rozsah nemoci. Deset let přežívá více než 85 % dětských pacientů s lokalizovaným maligním melanomem, ale pouze 10 % s pokročilým a metastatickým maligním melanomem [1,6,7].

Závěr

Diagnostika a léčba pediatrického maligního melanomu teoreticky není zásadně odlišná od postupů doporučených v dospělé onkologii, ovšem dosud je výrazný nepoměr mezi počtem klinických studií v dospělém věku a počtem pediatrických studií. Chybí případné snížení věkové hranice pro zařazení do studie moderní imunoterapie dospělého věku. Pacienti mladší 18 let nemají

stejný přístup k novým lékům jako dospělí pacienti, a proto jejich šance na přežití jsou výrazně menší jenom proto, že jsou mladší. V současnosti existují pro dětskou populaci pouze tři klinické pediatrické studie s ipilimumabem a jedna klinická studie s vemurafenibem. Dolní věkový limit pro pediatrické studie s ipilimumabem je 12 let. Prezentovaná kauzistika podporuje podání ipilimumabu u dětí mladších 12 let s dobrým terapeutickým efektem a akceptovatelnou toxicitou. Imunoterapie 2. linie (anti-PD-1 monoklonální protilátky) je nově dostupná v rámci specifického léčebného programu pro dětské pacienty s pokročilým maligním melanomem. Dosud trvá absence pediatrických klinických studií s cílenou léčbou a kombinovanou imunoterapií.

Literatura

1. Bajčiová V. Maligní melanom u dětí a adolescentů. *Onkologie* 2013; 7(2): 69–73.

2. Réguerre Y, Afrik MF, Fraïtag S et al. Melanoma in children: diagnosis and treatment specificities. *Bull Cancer* 2012; 99(9): 881–888. doi: 10.1684/bdc.2012.1628.
3. Cordero KM, Gustafson D, Frieden IJ et al. Pediatric melanoma: results of a large cohort study and proposal for modified ABCD detection criteria for children. *J Am Acad Dermatol* 2013; 66(2): 913–925. doi: 10.1016/j.jaad.2012.12.953.
4. Paradelo S, Fonseca E, Pit-Fernández S et al. Prognostic factors for melanoma in children and adolescents. *Cancer* 2010; 116(18): 4334–4344. doi: 10.1002/cncr.25222.
5. Livestro DP, Kaine EM, Michaelson JS et al. Melanoma in the young: differences and similarities with adult melanoma. *Cancer* 2007; 110(3): 614–624.
6. Neier M, Pappo A, Navid F. Management of melanomas in children and young adults. *J Ped Hematol Oncol* 2012; 34 (Suppl 2): S51–S54. doi: 10.1097/MPH.0b013e31824e3852.
7. Munzarová M. Ultrafialové záření, pigmentace a maligní melanom. *Klin Onkol* 1991; 4(4): 99–101.
8. Eckschlager T. Má imunoterapie své místo v současné dětské onkologii? *Klin Onkol* 2003; 16 (Suppl): 125–126.
9. Delyon J, Maio M, Lebbe C. The ipilimumab lesson in melanoma: achieving long-term survival. *Semin Oncol* 2015; 42(3): 387–401. doi: 10.1053/j.seminoncol.2015.02.005.
10. Homet Moreno B, Parisi G, Robert L et al. Anti-PD-1 therapy in melanoma. *Semin Oncol* 2015; 42(3): 466–473. doi: 10.1053/j.seminoncol.2015.02.008.
11. Liu LK, Colegio OR. Molecularly targeted therapies for melanoma. *Int J Dermatol* 2013; 52(5): 523–530. doi: 10.1111/j.1365-4632.2012.05829.x.

KLINICKÁ ONKOLOGIE

Časopis České onkologické společnosti a Slovenskej onkologickej spoločnosti
The Journal of the Czech and Slovak Oncological Societies

REDAKČNÍ RADA

Výkonná redakční rada (Brno)

vedoucí redaktor

doc. MUDr. Vuk Fait, CSc.

MUDr. Petr Čoupek
doc. MUDr. Lenka Foretová, Ph.D.
doc. MUDr. Martin Klabusay, Ph.D.

výkonný redaktor

doc. MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.

MUDr. Ivo Kocák, Ph.D.
MUDr. Jiří Novák
prof. MUDr. Aleš Rejthar, CSc.†

doc. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.
RNDr. Sabina Ševčíková, Ph.D.
prof. MUDr. Jan Žaloudík, CSc.

Širší redakční rada

prof. MUDr. Zdeněk Adam, CSc., Brno
MUDr. Otakar Bednařík, Brno
doc. MUDr. Tomáš Büchler, Ph.D., Praha
prof. MUDr. David Cibula, CSc., Praha
MUDr. Karel Cwiertka, Ph.D., Olomouc
doc. MUDr. Ladislav Dušek, Ph.D., Brno
prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc., Praha
doc. MUDr. David Felzl, Ph.D., Ostrava
doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D., Olomouc
prof. MUDr. Roman Hájek, CSc., Ostrava
prof. MUDr. Ľudovít Jurga, DrSc., Trnava
doc. MUDr. Juraj Kaušitz, CSc., Bratislava
prof. MUDr. Pavel Klener, DrSc., Praha
prof. MUDr. Ivan Koza, DrSc., Bratislava

assoc. prof. Jeong Eon Lee, M.D., Ph.D., Seoul
doc. MUDr. Jozef Madiak, CSc., Bratislava
prof. MUDr. Jiří Mayer, CSc., Brno
doc. MUDr. Michal Mego, Ph.D., Bratislava
prof. MUDr. Bohuslav Melichar, Ph.D., Olomouc
doc. MUDr. Beata Mladosičová, CSc., Bratislava
MUDr. Rudolf Nenutil, CSc., Brno
doc. MUDr. Jan Novotný, Ph.D., Praha
prof. MUDr. Dalibor Ondruš, DrSc., Bratislava
doc. RNDr. Martina Ondrušová, Ph.D., Bratislava
prof. Yeon Hee Park, M.D., Ph.D., Seoul
prof. MUDr. Luboš Petruželka, CSc., Praha
prof. RNDr. Šárka Pospíšilová, Ph.D., Brno
doc. MUDr. Luděk Pour, Ph.D., Brno

doc. MUDr. Igor Puzanov, Nashville
prof. MUDr. Lukáš Rob, CSc., Praha
prof. MUDr. Miroslav Ryska, CSc., Praha
prof. MUDr. Aleš Ryška, Ph.D., Hradec Králové
prof. MUDr. Jana Skříčková, CSc., Brno
prof. MUDr. Martin Smrčka, Ph.D., Brno
MUDr. Tomáš Svoboda, Ph.D., Plzeň
MUDr. Tomáš Šálek, Bratislava
prof. MUDr. Jaroslav Štěrba, Ph.D., Brno
doc. MUDr. Dalibor Valík, Ph.D., Brno
prof. MUDr. Anna Vašků, CSc., Brno
prof. MUDr. Jiří Vorlíček, CSc., dr. h. c., Brno
prof. MUDr. Rostislav Vyzula, CSc., Brno
doc. MUDr. Mária Wagnerová, CSc., Košice

Čestní členové redakční rady

prof. MUDr. Josef Bilder, CSc., Brno
prof. Sándor Eckhardt, Budapešť
prof. Jan Klasterský, Brusel

prof. MUDr. Josef Koutecký, DrSc., Praha
prof. RNDr. Jan Kovařík, DrSc., Brno
prof. MUDr. Zdeněk Mechl, CSc., Brno

MUDr. Jaroslav Němec, CSc., Brno
doc. MUDr. Ivan Pleško, DrSc., Bratislava
MUDr. Viliam Ujházy, DrSc., Bratislava

© Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, Praha 2015

KLINICKÁ ONKOLOGIE

Vydává Česká lékařská společnost J. E. Purkyně.

Registrační značka MK ČR 5158. ISSN 0862-495X. ISSN pro on-line přístup 1802-5307.

On-line verze je přístupná na adrese www.linkos.cz nebo www.klinickaonkologie.cz.

Časopis Klinická onkologie je uveden na Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik vydávaných v ČR, schváleném Radou pro výzkum a vývoj vlády ČR.

Nakladatel: Ambit Media, a.s., Klicperova 604/8, 150 00 Praha 5-Smíchov, tel./fax: +420 222 352 573/572.

Odpovědná redaktorka: Mgr. Simona Nováková, e-mail: simona.novakova@ambitmedia.cz.

Adresa redakce: Ambit Media, a.s., Media Hall, Bidláky 20, 639 00 Brno.

Grafická úprava: Karel Zlevor. Jazyková korektura: Mgr. Ivana Dachary.

Vychází 6krát ročně. Předplatné na rok 2015 činí 540 Kč (22 eur).

Informace o předplatném podává a objednávky předplatitelů přijímá: e-mail: předplatne@ambitmedia.cz.

Informace o podmínkách inzerce poskytuje a objednávky přijímá: Mgr. Blanka Turínová, e-mail: blanka.turinova@ambitmedia.cz, tel.: +420 724 811 983.

Rukopisy vkládejte do redakčního systému: <http://redakce.ambitmedia.cz/ko>; případné dotazy směřujte na e-mail klinickaonkologie@mou.cz

Redakce časopisu Klinická onkologie, Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno, e-mail: klinickaonkologie@mou.cz.

Pokyny pro autory naleznete na www.linkos.cz v sekci časopisu nebo na www.klinickaonkologie.cz.

Toto číslo vychází 15. 12. 2015.

