

# Historie imunoterapie – od Coley toxinů ke kontrolním bodům imunitní reakce

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

Říhová B.<sup>1\*</sup>, Šťastný M.<sup>2\*\*</sup>

<sup>1</sup> Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha

<sup>2</sup> 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 znovu. 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 20<sup>th</sup> 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.  
Václavská 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 – erysiplem – 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 efektivně „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 vystřídal období skepse. Novou nadějí 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<sup>+</sup> nebo CD8<sup>+</sup> 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 imunoonkoterapie 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 imunoterapii 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 imunoonkoterapie. 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 imunoonkoterapie postupně nahrazována déletrvajícím imunoonkoterapií aktivní, i když striktně oddělit jednu od druhé prakticky nelze. Výhody aktivní imunoonkoterapie jsou v tom, že je specifičtější, 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 imunoonkoterapeuticky 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 imunoonkoterapie 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 proliferčních signálů, 2. odolnost buněk k smrti, 3. indukce angiogenezy, 4. schopnost nesmrtelné replikovatelnosti, 5. aktivace invaze a metastáze a 6. schopnost vyhybat 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 produkovaný, 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 delecii, anergii nebo produkci indukovaných inhibičních T regulačních buněk (iTreg). Na protinádorové reakci se podílí cytotoxické CD8<sup>+</sup> efektorové T lymfocyty, CD4<sup>+</sup> 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 ligandů 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 delecii 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 adjuvans 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 adjuvans, v nepřítomnosti látek, které by podporovaly, nebo dokonce umožňovaly T buněčnou odpověď anebo pomáhaly při odstraňování imunopresivního prostředí nádoru. Profylaktické/preventivní vakcíny lze teoreticky připravit všude tam, kde je etiologické agens známo. 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 nepochopitelně 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<sup>+</sup> (pomocné T buňky, helper T-cell – Th) a efektorových CD8<sup>+</sup> (cytotoxické T lymfocyty – CTL) T lymfocytů. V praxi se to provádí tak, že monocyty 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 diferenciační 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 vyzrávají 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 zrání 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 kalretikulín 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. Kalretikulín 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 proaktivní 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<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> buněk a zvyšuje aktivitu Treg.

Inhibiční molekula PD-1 (CD279), která byla počátkem 90. let minulého století japonskými biologii 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 ligandu (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 ligandů 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 typuIDO (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- $\alpha$ .

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 proliferační 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 diversity 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 hmoty 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 a 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 immunoeediting: 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.0b013e3181fac48.
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 advanced 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.