

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.
Videňská 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).
- Diferenciační antigeny leukemických buněk, které jsou přítomny na normál-

ních buňkách vývojové řady leukocytů v těch diferenciačních 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 imunodeficience) 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 tkání 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 tkání 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 diferenciaci) zabít 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 vylití obsahu jejich cytoplazmatických cytotoxických granulí na kontaktovanou nádorovou buňku. Podobně působí i signalizace přes aktivační Fc receptor CD16. Ten interaguje s Fc částmi protilátkových 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 těmto pomocným buňkám předkládány zpravidla

prostřednictvím zralých dendritických buněk (viz níže).

T lymfocyty

K nejdůležitějším imunitním protinádorovým zbraním 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 závislémi 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 pohltní 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 roznašeny 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 štěrby 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

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. Mechanizmy 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

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

- Nádorové buňky jsou značně variabilní (vznik mutančních 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, cyklofosamid, 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 monocyty, jež se v nádorové tkáni přemění v makrofágy M2. Toho lze dosáhnout pomocí protilátek blokujících chemokin (chemotaktický cytokin) CCL2 produkovaný nádorovými buňkami, který vábí monocyty. 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

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 organizmu 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 cyto- statikem 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

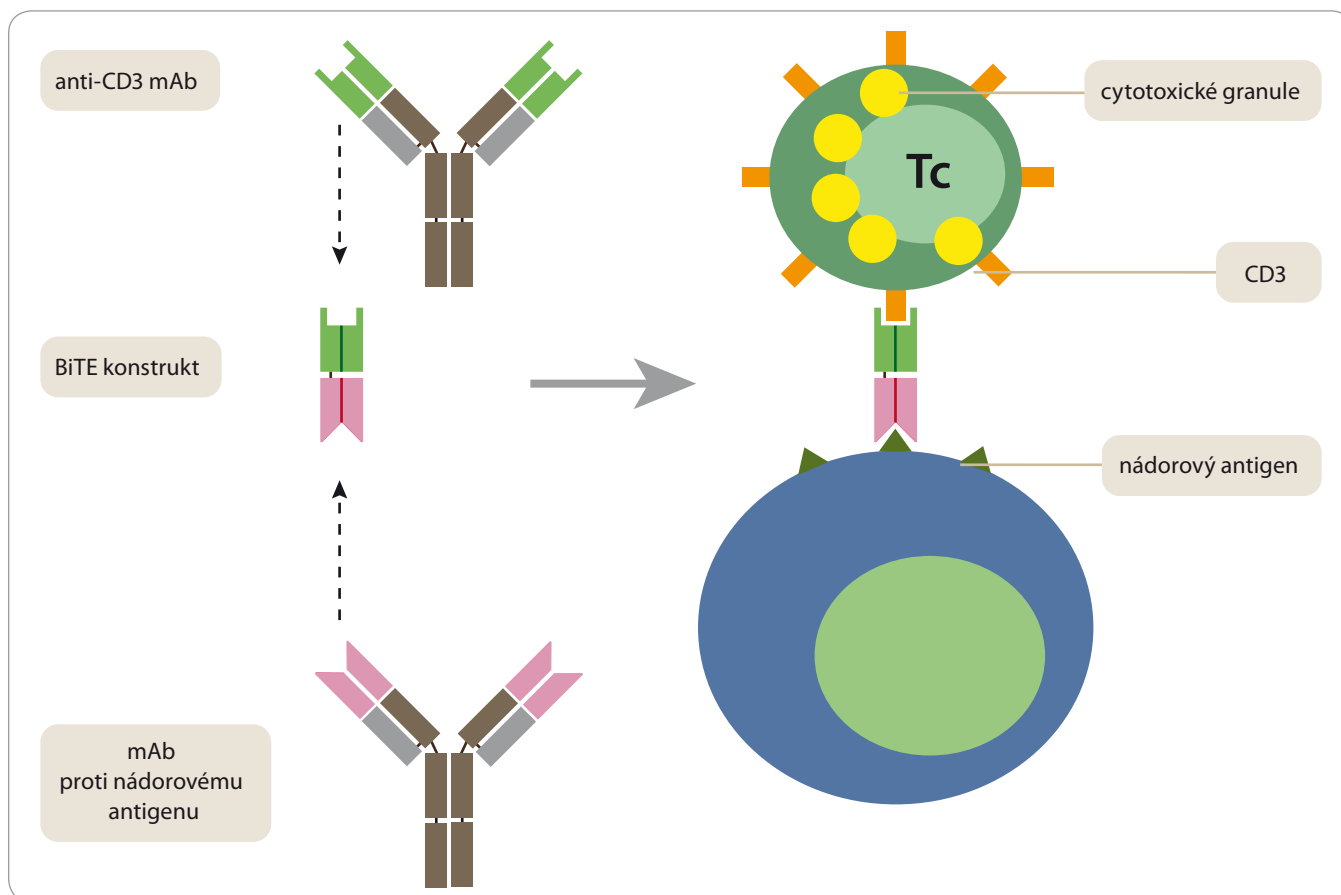
Jako neobyčejně perspektivní se v poslední době jeví použití monoklonálních protilátek blokujících tlumivé receptory T lymfocytů, především CTLA-4 a PD-1. Tento přístup vede k „odblokování“ nádorově specifických T lymfocytů a výraznému zvýšení jejich protinádorové aktivity. Schváleny, resp. v pokročilých 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.

lymfocytům 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 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGGS). 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

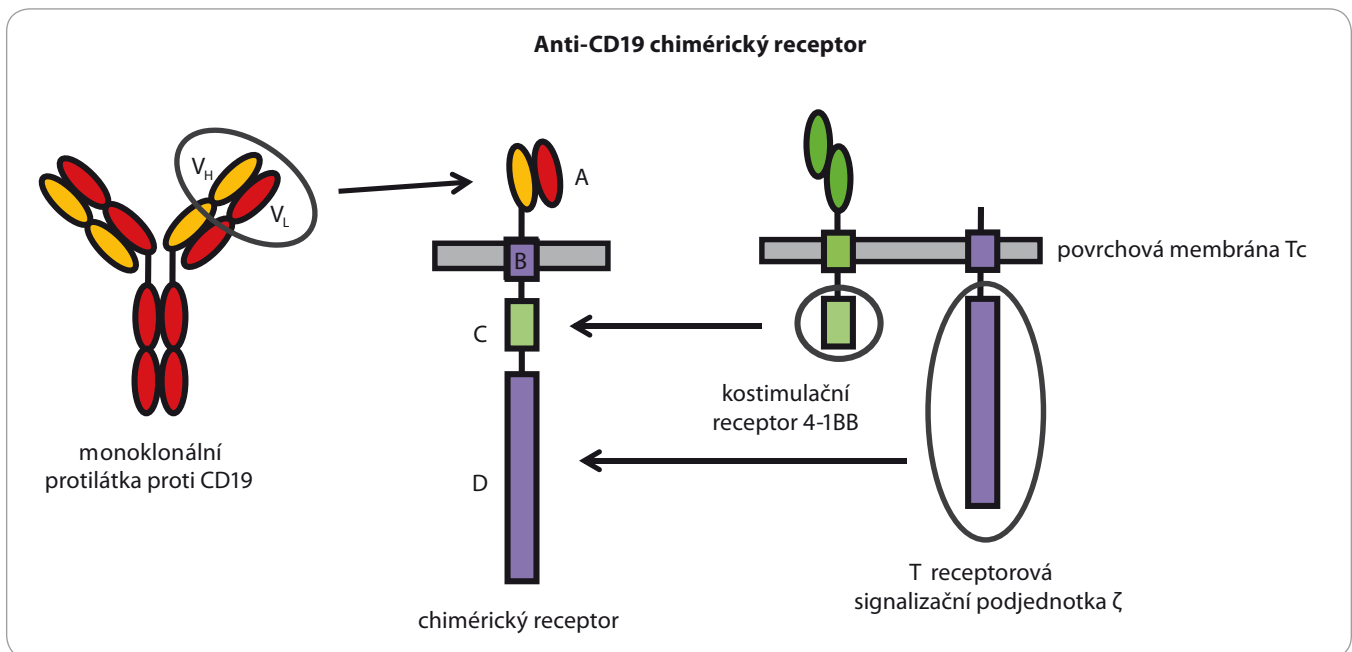
Tento přístup spočívá v namnožení a aktivaci pacientových T lymfocytů *ex vivo* a vrácení zpět nitrožilní infuzí [23]. Lymfocyty se získávají z krve nebo přímo z infiltrátu nádoru. V prvním případě jde o tzv. LAK buňky (lymphokine activated killers), v druhém o TIL (tumor infiltrating lymphocytes) buňky. 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 konstruktů, 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-

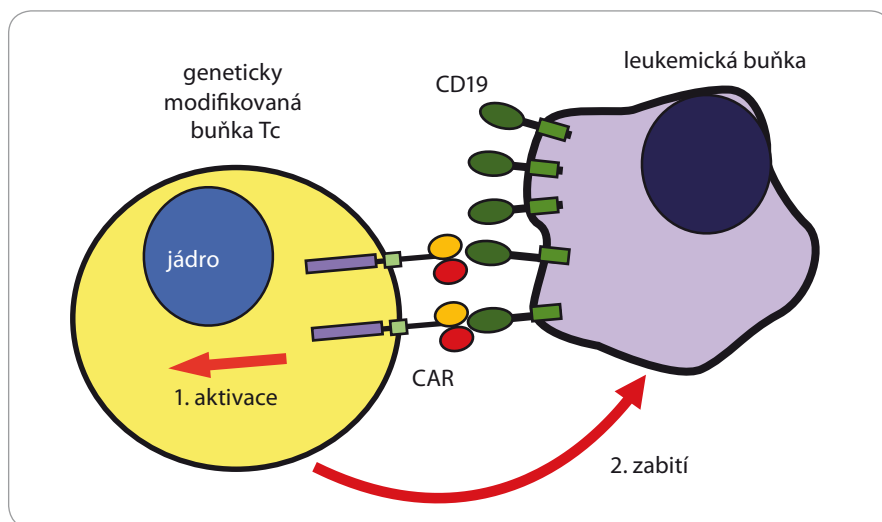
chový glykoprotein B lymfocytů a lymfomů CD19 byl v několika modifikacích použit s velmi nadějnými výsledky v klinických studiích u pacientů s hematologickými malignitami (leukemie a lymfomy) odvozených z B lymfocytů [24]. Při této terapii samozřejmě dochází také k likvidaci normálních B lymfocytů, a 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 (chimerický receptor).

Buňka Tc rozezná pomocí chimerického „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 zabítí 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 optimizmus s pesimismem. Nyní jsme ve fázi velkého optimizmu – 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. *Immunity* 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. Vínay 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 Deghathier 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/immr.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.