

Buněčná imunoterapie nádorů pomocí geneticky modifikovaných zabijáků

PAVEL OTÁHAL
VÁCLAV HOŘEJŠÍ

Nádorová onemocnění jsou ve většině případů nevléčitelná a smrtelná. Jsou příčinou zhruba 25 % všech úmrtí v ČR. Bohužel občas doslova jako blesk z čistého nebe postihnou i mladé pacienty v produktivním věku. Většina pacientů si klade otázku, co udělali špatně, jestli měli přijít k lékaři dříve, jestli náhodou neopomněli varovné příznaky, které je trápily i několik měsíců před zjištěním diagnózy. Mnoho pacientů bohužel promešká vhodnou dobu, kdy je nádor ještě lokalizovaný a dobře léčitelný, a začíná se léčit teprve, když je onemocnění již rozsáhlé a téměř nevléčitelné. Základní léčebná strategie je mnoho let v principu stejná: chirurgické vyjmutí nádorů, zničení nádorové tkáně ionizujícím zářením a zabití nádorových buněk podáním látek toxických pro rychle se dělící buňky (chemoterapie). Tyto klasické postupy mohou vyléčit rakovinu většinou pouze v časných stadiích, později nikoliv. V posledních letech se šance na vyléčení či alespoň šance na podstatné prodloužení života nemocných výrazně zvyšuje. Zčásti je to díky zlepšení oněch klasických metod (např. nové operační postupy, které umožní provádět radikálnější výkony, účinnější a přesnější radioterapie, lepší podpurná léčba umožňující intenzivnější chemoterapii, kterou by dříve pacienti nepřežili). Stále ale roste význam principiálně nových, cílených léčiv. Ta například selektivně inhibují mutované enzymy kinázy, způsobující maligní transformaci, nebo blokují určité signální dráhy nezbytné pro přežívání maligních buněk. Limitujícím faktorem „klasických“ protinádorových léčiv je jejich toxicita, která se projevuje typicky útlumem krvetvorby, poškozením srdce, jater, ledvin a sliznic trávicího traktu. Ale i nová cílená léčiva mohou mít závažné nežádoucí účinky a jejich klinické užití je zatím v praxi často omezené pouze na klinické studie.

Jak zvýšit intenzitu léčby, aniž by současně rostla i toxicita?

Odpovědí na tuto otázku může být biologická léčba. Tak označujeme léčebné postupy, které částečně využívají k poměrně specifickému zabíjení nádorů pacientův vlastní imunitní systém.¹ Nejčastěji se přitom využívá uměle vyrobených monoklonálních protilátek² reagujících s antigeny na povrchu nádorových buněk. V podstatě to funguje úplně stejně, jako když imunitní systém

likviduje bakterie nebo buňky infikované virem. Molekuly podané „umělé“ protilátky se naváží na povrch nádorových buněk a následně aktivují efektorové mechanismy imunity založené na fagocytóze, soustavě obranných proteinů zvaných komplement, a na NK buňkách (Natural Killers, přirození zabijáci). Jedna z nejpoužívanějších a nejúčinnějších terapeutických monoklonálních protilátek je Rituximab rozpoznávající antigen zvaný CD20, což je molekula fyziologicky přítomná na povrchu zdravých B-lymfocytů, ale také na povrchu buněk některých typů leukemií a lymfomů. Podáním této protilátky *de facto* imunitní systém „podvedeme“ – donutíme ho, aby lymfomy považoval za cizí nebo infikované tkáně, které musí být z organismu odstraněny.

Protilátky jsou vskutku úžasné molekuly s obrovským potenciálem – nejenže nás přirozeně chrání před infekcemi, ale ve formě monoklonálních protilátek je možno je uměle připravit ve velkém množství a použít např. k léčbě onkologických a autoimunitních onemocnění. Na protilátky lze také chemicky navázat radioaktivní izotopy nebo různé toxiny a tyto (radio)imunotoxiny použít jako „řízené střely“ pro směřování přímo do nádorové tkáně. Léčba pomocí monoklonálních protilátek patří k nejrychlejší se rozvíjejícím oborům dnešní medicíny a představuje již dnes mnohamiliardový segment globalizovaného trhu farmak. Každým rokem se objevují nové a nové terapeutické monoklonální protilátky. S trochou nadsázky lze říci, že již neexistuje téměř žádný známý povrchový antigen, který by nebyl vyzkoušen jako jejich možný terapeutický cíl. Přes tyto slibné postupy ale bohužel pořád platí, že ani nejnovejší biologická léčiva nedokážou zcela vyléčit pokročilá nádorová onemocnění.

Jaké další nové léčebné metody přicházejí v úvahu?

Zdá se, že se nedávno podařilo učinit několik skutečně průlomových objevů. Již mnoho let se testují postupy založené na vyvolání

1) Pozn. red.: Pro snadnější orientaci v základních pojmech imunologie doporučujeme čtenáři článek V. Hořejšího „Jak funguje (a někdy nefunguje) imunitní systém“ ve Vesmíru 88, 116, 2009/2.

2) Přívlastek „monoklonální“ značí, že jsou to velmi homogenní produkty jediného klonu buněk (uměle imortalizovaných B-lymfocytů). Fyziologická protilátková odpověď je vysoce polyklonální (vznikající protilátky proti určitému antigenu jsou velmi heterogenní produkty tisíců klonů B-lymfocytů).

protinádorové imunitní reakce pomocí vakcinace. Je totiž známo, že imunitní systém je ve většině případů schopen rozpoznat, že nádorové buňky jsou abnormální, ale často není schopen je účinně likvidovat. Nádorové buňky se totiž umějí proti útokům imunitního systému mnoha způsoby bránit. Proto je potřeba uměle povzbudit imunitní systém, tak aby obranné mechanismy nádoru překonal. Dá se toho docílit třeba tím, že se do organismu vpravuje větší množství nádorových antigenů za přítomnosti adjuvantních (pomocných) látek, které výrazně zvyšují imunitní odpověď. Jde tedy o stejný princip jako u vakcinace proti infekčním mikroorganismům. Jinou možností zvýšit účinnost přirozené imunitní protinádorové reakce nebo účinnost protinádorové vakcinace je vyřadit některé obranné mechanismy nádorů – např. přechodně odstranit regulační T-lymfocyty, které nádorovou tkáň brání, protože je až příliš podobná tkáním normálním. Tyto přístupy ale zatím nebyly v klinických testech moc úspěšné.

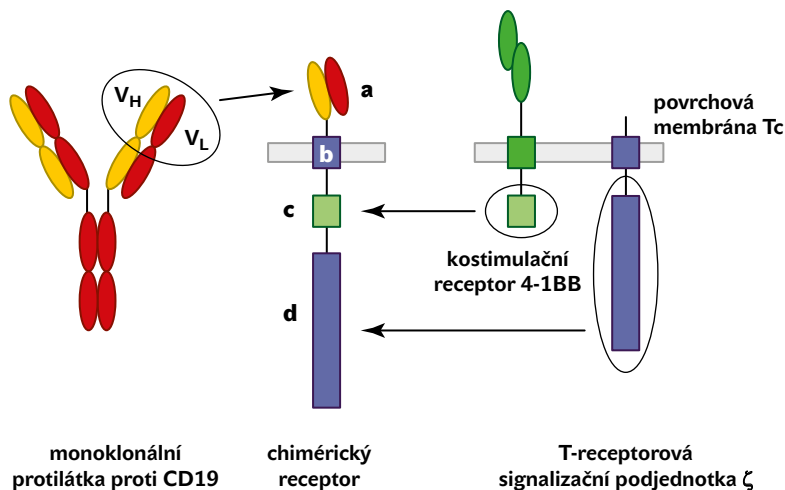
Další možnost, jak razantně zaútočit na nádor

Přirozené (a obvykle málo účinné) protinádorové mechanismy jsou většinou založené na cytotoxických T-lymfocytech (Tc). Tyto lymfocyty buňku bez milosti zabijí, pokud na jejím povrchu najdou něco „nepatřičného“ (např. fragment virového nebo nádorového antigenu).

Tc rozeznávají cílové struktury (antigeny) pomocí vysoce specifických T-receptorů (TCR). Každý z mnoha milionů klonů buněk Tc je vybaven poněkud odlišným TCR, který velmi specificky rozeznává nějaký možný antigen. Poznamenejme ještě, že tyto receptory rozeznávají nikoli cizorodé struktury jako takové, ale jejich krátké fragmenty (peptidy) navázané na molekulách hlavního histokompatibilního komplexu (MHC, u lidí zvaný též HLA), které slouží jako jejich nosiče na buněčném povrchu.

Pokud buňka Tc rozezná pomocí svých receptorů na buněčném povrchu „správný“ antigen, projeví se toto „zatahání“ za TCR spuštěním složité kaskády signálních dějů, které nakonec vedou k aktivaci několika mechanismů způsobujících zabití kontaktované buňky. K tomu, aby byl tento proces optimálně účinný, se ho musí zúčastnit ještě několik pomocných receptorů a adhezivních molekul.

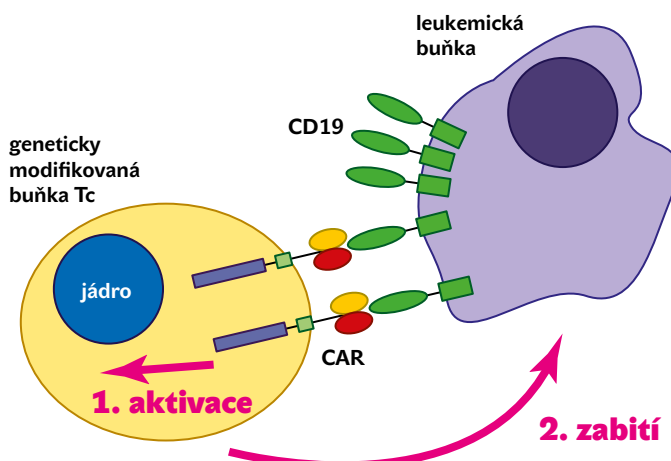
Potíž je ale v tom, že buněk Tc máme síce v těle mnoho miliard, ale jen velmi malá část z nich je připravena rozeznávat antige-



1. Schéma chimérického antigenního receptoru 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 zakotvený 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 ζ 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 konstruktů může být vcelku libovolně měněna použitím příslušných výchozích monoklonálních protilátek (resp. genů kódujících jejich polypeptidové řetězce).

ny určitého typu nádoru. To je také jednou z příčin nedostatečné imunity proti nádorům. Naprostá většina Tc je totiž připravena k rozeznání úplně jiných struktur – např. rozmanitých virových antigenů na povrchích infikovaných buněk, molekul na povrchu poškozených buněk nebo nějakých úplně jiných nádorových antigenů.

2. Likvidace leukemických buněk modifikovanými buňkami Tc nesoucími 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 signální děje, které vyústí v aktivaci cytotoxických mechanismů a zabití napadené leukemické buňky. Buňka Tc následně může kontaktovat a zabit další leukemické buňky („sériové zabíjení“). Na povrchu příslušných buněk jsou desítky až statisíce kopií molekul CD19, resp. CAR. Kromě toho jsou na jejich povrchích stovky jiných druhů povrchových proteinů (v tisících až milionech exemplářů).



MUDr. Pavel Otáhal, Ph.D., (*1976) vystudoval 2. lékařskou fakultu UK v Praze. Absolvoval postdoktorální pobyt na Pennsylvania State University College of Medicine. Na 1. lékařské fakultě UK a v Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v. v. i., se věnuje základnímu a aplikovanému výzkumu imunoterapeutických postupů.

Prof. RNDr. Václav Hořejší, CSc., (*1949) vystudoval Přírodovědeckou fakultu UK v Praze. V Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v. v. i., který od roku 2005 řídí a kde je vedoucím Oddělení molekulární imunologie, se zabývá povrchovými a signálními molekulami buněk imunitního systému. Přednáší imunologii na Přírodovědecké fakultě UK v Praze.

Bylo by proto ideální, kdybychom mohli nějakým způsobem mnohonásobně zvýšit počet Tc specifických pro ten konkrétní „správný“ nádorový antigen. Ukazuje se, že to s pomocí moderních molekulárněbiologických metod skutečně lze udělat. Základním principem je vybavit uměle velké množství Tc žádoucími T-receptory. To se dá v principu udělat tak, že zjednodušeně řečeno izolujeme klony Tc se správnou specifitou, vyklonujeme z nich geny kódující polypeptidové řetězce jejich TCR a pak je pomocí zavedených virových vektorů vpravíme do směsi Tc izolovaných z krve pacienta. Tyto Tc potom budou mít dva různé TCR – svůj původní a ten nově vpravený protinádorový. Před několika lety se tak skutečně začalo postupovat, ale ukázalo se, že tato cesta není správná, protože přináší příliš mnoho technických obtíží. TCR je totiž strukturně komplikovaný (skládá se ze dvou „rozeznávacích“ a čtyř signalizačních podjednotek), potřebuje spolupráci s několika dalšími receptory, a hlavně rozeznává složitý ligand – peptidový fragment nádorového antigenu s nosičovým proteinem MHC. Molekuly MHC jsou extrémně polymorfní (existují v populaci ve stovkách poněkud odlišných forem) a konkrétní TCR je schopen efektivně rozeznávat takovýto ligand jen u omezeného počtu jedinců.

Proto se začalo experimentovat s jednodušším umělým typem receptoru pro nádorové antigeny. Je sestaven z rozeznávací části odvozené z molekul protilátek (ty rozeznávají jednodušší ligandy nezávislé na proteinech MHC) a signalizační části pocházející z jedné z podjednotek TCR.

Lze totiž poměrně snadno spojit úseky genů kódujících část molekuly protilátky rozeznávající nějaký vhodný povrchový antigen s částí genu kódující vnitrobuněčnou (intracelulární) signalizační část TCR (nebo i nějakého jiného receptoru). Takovýto konstrukt bude pak kódovat umělý receptor (chimérický antigenní receptor, CAR), který bude fungovat v principu stejně jako normální TCR, avšak jeho specifita bude definovaná protilátkovou částí a nebude omezena variabilitou nosičových molekul MHC. Po vnesení tohoto umělého genu do T-lymfocytů pacienta a jejich namnožení *in vitro* získáme ohromný, libovolně velký počet cytotoxických lymfocytů rozpoznávajících zvolený povrchový antigen nádorových buněk. Vlastnosti takových chimérických antigenních receptorů lze ještě optimalizovat tím, že se do jejich vnitrobuněčných signalizačních částí přidají další úseky pocházející z molekul pomocných kostimulačních receptorů (zvaných CD28, 4-1BB, CD40). Vznikne tak jakýsi „superreceptor“, který propůjčuje geneticky manipulovaným cytotoxickým T-lymfocytům mnohem silnější zbraně než ty přirozené (obr. 1).

Tento postup byl v několika modifikacích použit v klinických studiích hlavně u pacientů s hematologickými malignitami (leukemie a lymfomy) odvozenými z B-lymfocytů. Byl připraven lentivirový vektor kódující

chimérický receptor specificky rozeznávající povrchový protein B-lymfocytů CD19. Tento funkčně důležitý protein je přítomen jak na normálních, tak maligně transformovaných B-lymfocytech.

Vlastní léčba pak probíhá v několika fázích: nejprve jsou pacientům odebrány z krve pomocí aferézy leukocyty (všechny bílé krvinky obsahující relativně malé množství T-lymfocytů). Ty jsou následně aktivovány *in vitro* pomocí protilátek stimulujících T-receptor a kostimulační receptor CD28 (molekuly přítomné pouze na T-lymfocytech). Takto připravené aktivované T-lymfocyty se v další fázi infikují příslušným lentivirovým vektorem a poté expandují v kultivačním médiu po dobu asi 14 dnů. Během této krátké doby exponenciálně rostou, takže nakonec lze získat až deset miliard buněk vybavených chimérickým „superreceptorem“. Ty se pak zamrazí a čekají na vhodnou dobu pro podání pacientovi, z jehož krve byly připraveny. Vzhledem k tomu, že se tyto buňky vpravují do krve pacientů, musí jejich příprava probíhat v superčistých prostorách, je velmi náročná na dodržení správných pracovních postupů a podléhá přísnému dohledu regulačních úřadů (v ČR to jsou Státní ústav pro kontrolu léčiv, Ministerstvo životního prostředí a etická komise příslušného zdravotnického zařízení).

V organismu si tyto uměle vyrobené buňky rychle najdou cestu k nádorovým, resp. leukemickým buňkám a začnou je likvidovat. Jakmile rozpoznají pomocí svého chimérického receptoru na jejich povrchu protein CD19, spustí se aktivační signály, buňky Tc se těsně přilepí na povrch nádorových buněk, uvolní své cytotoxické látky a zabijí je (obr. 2). Velmi důležité je, že aktivace přes chimérický antigenní receptor navodí také další množení T-lymfocytů, což dále posiluje útok na nádorové buňky. Léčba směřovaná na antigen CD19 má závažný, ale nikoliv zásadní nežádoucí účinek – dojde i k eliminaci všech zdravých B-lymfocytů. To sice vede postupně k protilátkovému deficitu, který však lze úspěšně řešit podáváním imunoglobulinů. Tento typ experimentální léčby se zatím ověřuje pouze na několika špičkových klinických pracovištích v USA, a to s velmi nadějnými výsledky.³ Počet takových klinických studií využívajících různé typy chimérických antigenních receptorů (nejen proti CD19) proto rychle roste (blíže viz www.clinicaltrials.gov) a je jisté, že v blízké budoucnosti lze skutečně očekávat rychlý rozvoj této metody.

V laboratořích Ústavu molekulární genetiky AV ČR a 1. lékařské fakulty UK vyvíjíme několik nových typů chimérických antigenních receptorů (CAR), které by bylo možno během několika let testovat v klinických studiích.

Abstract: Chimeric antigen receptors (CARs) are engineered receptors which after expression in cytotoxic T cells (Tc) may turn these cells into effective anti-tumour effectors with therapeutic potential. So far promising results were obtained in clinical studies mainly with leukemia patients. The authors' laboratories are currently working on novel CAR types.