

VÁCLAV HOŘEJŠÍ

Imunoterapie nádorových onemocnění se stává realitou!

Imunoterapie nádorových onemocnění byla po několik desítek let velkým a kontroverzním tématem, které střídavě vyvolávalo vlny optimismu a pesimismu. K jakému pokroku reálně došlo po důkladném poznání řady základních imunologických mechanismů?

V posledních nejméně dvaceti letech byly na mezinárodních imunologických kongresech sekcím věnovaným tomuto tématu pro mimořádný zájem vždy rezervovány ty největší přednáškové sály. Nicméně posluchači z nich opakovaně odcházeli se smíšenými pocity – přednášející prezentovali výborné hodnoty dosažené na myších modelech nebo mnohem skromnější výsledky klinické, pro něž bylo typické, že ty pozitivní se dostavily jen u několika málo procent pacientů, a to i tehdy, když obdobné preklinické výsledky na myších modelech byly až spektakulárně dobré. Nyní se ale zřejmě situace mění – zdá se, že po důkladném poznání řady základních imunitních mechanismů a jejich regulace mohou některé nové imunoterapeutické postupy již velmi brzy přinést alespoň u některých onkologických onemocnění skutečný průlom a přinejmenším účinně doplnit, ne-li částečně nahradit standardní metody, jako je chemoterapie a radioterapie.

Dá se říci, že jako více či méně perspektivní se dnes jeví využití několika známých zbraní imunitního systému, a to jak jednotlivě, tak v kombinaci s konvenčnějšími postupy.

Chemoterapie jako pomocník imunitního systému?

Všeobecně se soudí, že chemoterapie poškozuje imunitní systém pacienta a může mít negativní důsledky pro sice slabé, ale přece jen existující přirozené protinádorové obranné mechanismy. Překvapivým objevem několika posledních let je, že některá chemoterapeutika (např. imatinib mesylát, cyklofosamid, anthracykliny, 5-fluorouracil) i určité režimy ozařování mají imunostimulační účinky – nádorové buňky totiž jejich působením „imunogenním způsobem“ hynou. Ten je charakterizován hlavně stresovou reakcí endoplazmatického retikula a prezentací intracelulárních molekul „signálů nebezpečí“.¹

Monoklonální protilátky proti některým nádorovým antigenům

Základním předpokladem protinádorového působení imunitního systému je, aby na povrchu nádorových buněk rozeznal „nádorové antigeny“ – tedy molekuly pro tyto malig-

ní buňky více či méně charakteristické. Jak je známo ze základních učebnic, existují dva typy nádorových antigenů: antigeny specifické pro nádory (tumor-specific antigens; TSA) a antigeny asociované s nádory (tumor-associated antigens; TAA).

Mezi antigeny pro nádory specifické patří molekuly, které se na normálních buňkách vůbec nevyskytují, jako např. komplexy MHC molekul s abnormálními fragmenty buněčných proteinů (produkty mutovaných genů, resp. produkty abnormálního štěpení normálních proteinů v nádorové buňce, fragmenty proteinů onkogenních virů). Antigeny asociované s nádory se nacházejí i na některých normálních buňkách. Patří mezi ně např. tzv. onkofetální antigeny produkované normálně embryonálními buňkami, které v postnatálním období mizí a poté se objevují pouze na některých nádorových buňkách; patří sem karcinoembryonální antigen (CEA) produkovaný buňkami karcinomu tlustého střeva nebo α -fetoprotein (AFP) sekretovaný hepatomy. Dalším typem antigenů asociovaných s nádory jsou některé melanomové antigeny (MAGE-1, Melan-A), které jsou silně exprimovány na melanomových buňkách, v menším množství ale také na normálních melanocytech a na buňkách testikulárních tkání. Patří k nim také některé povrchové antigeny leukemických buněk, které jsou přítomny i na některých typech zdravých bílých krvinek; nejznámějším příkladem je povrchový antigen akutních lymfoblastických leukemií CALLA (common acute lymphoblastoid leukaemia antigen; CD10), který se nachází též na pre-B buňkách a neutrofilních granulocytech, nebo povrchové proteiny normálních i maligních B-lymfocytů CD19 a CD20.

Přirozené protilátkové odpovědi se v obraně proti nádorovým onemocněním uplatňují zřejmě jen velmi nedostatečně. V posledním desetiletí ale došlo k výraznému pokroku v terapeutickém využití uměle připravených monoklonálních protilátek. Poměrně rutině se dnes začíná používat řada protinádorových monoklonálních protilátek a ve fázi preklinického výzkumu nebo klinických studií je mnoho dalších. Mechanismy jejich působení zahrnují většinu dobře známých fyziologických funkcí protilátek, jako je blokování receptorů růstových faktorů nádorových buněk, opsonizace („zchutnění“ pro fagocyty), aktivace NK-buněk prostřednictvím jejich Fc-receptorů (mechanismus zvaný

Prof. RNDr. Václav Hořejší,
CSc., viz Vesmír 94, 93,
2015/2.



ADCC, tedy „antibody-dependent cellular cytotoxicity“), aktivace komplementu či indukce apoptózy.

V prvních klinických testech terapeutických monoklonálních protilátek myšního původu bylo velkým problémem to, že imunitní systém pacienta začal vytvářet protilátky proti oněm cizorodým (myším) proteinovým molekulám a tím je brzy inaktivoval. Řešením byla „humanizace“ myších monoklonálních protilátek – molekulárně genetickými manipulacemi byly pozmeněny tak, aby byly strukturně co nejpodobnější protilátkám lidským. Komplikací samozřejmě zůstává možnost poškození normálních tkání, které nesou onen nádorový antigen (třídy asociovaných s nádory), proti němuž je monoklonální protilátka zaměřena, a imunoselektce variant nádorových buněk, které ztratily expresi příslušné cílové struktury. Dalším problémem je vysoká cena tohoto druhu léčiv – výrobní náklady jsou objektivně mnohem vyšší než u většiny daleko jednodušších nízkomolekulárních chemoterapeutik.

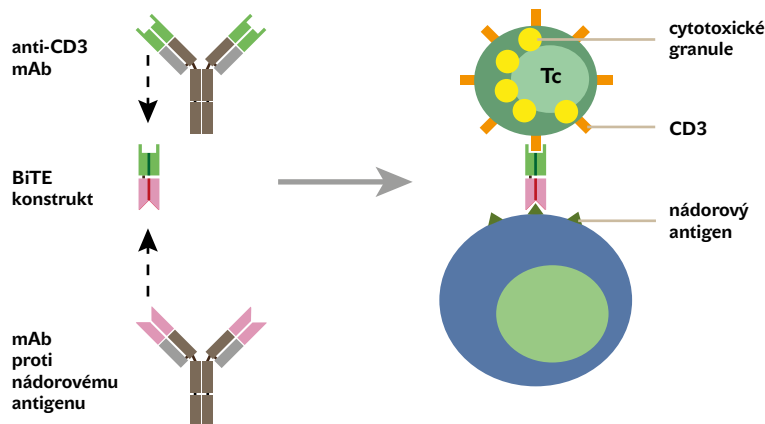
Klinicky se začínají používat (většinou v kombinaci s jinými terapeutickými prostředky) např. následující monoklonální protilátky (v závorce příslušný antigen a onemocnění):^{2,3}

- trastuzumab, pertuzumab (ERBB2; karcinom prsu, ovaria, prostaty a tlustého střeva)
- rituximab, tositumomab (CD20; lymfomy),
- alemtuzumab (CD52; chronická lymfocytická leukemie),
- bevacizumab (VEGF – růstový faktor endoteliálních buněk VEGF; metastatický karcinom tlustého střeva, v kombinaci s jinými léčivými i některé jiné druhy nádorů).

Kromě samotných monoklonálních protilátek je možno použít i jejich konjugátů s účinnými toxiny, resp. cytostatiky (konjugáty se nazývají imunotoxiny), nebo vhodnými radioizotopy s krátkým poločasem rozpadu (radioimunotoxiny). U těchto preparátů protilátka zaneše 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 lymfocytů T, především CTLA-4 a PD-1. Tyto receptory fyziologicky slouží k tomu, aby brzdily přílišnou imunitní odpověď proti patogenům, které by jinak mohly způsobovat nežádoucí imunopatologické reakce. Použití monoklonálních protilátek vážících se na tyto tlumivé receptory vede k „odblokování“ nádorově specifických T-lymfocytů a výraznému zvýšení jejich protinádorové aktivity. Nejvýznamnější preparáty této třídy schválené již k použití jsou ipilimumab (blokuje receptor CTLA-4 a vykazuje dobré výsledky u pacientů trpících karcinomy, melanomy a lymfomy) a pembrolizumab a nivolumab (oba blokují receptor PD-1 a uplatňují se v terapii karcinomů, melanomů, lymfomů a glioblastomů).⁴



V různých stádiích je také řada klinických testů ověřujících potenciál monoklonálních protilátek proti PDL1 (ligand receptoru PD-1 exprimovaný na nádorových buňkách) nebo proti dalšímu inhibičnímu receptoru LAG3. Probíhá rovněž mnoho klinických studií ověřujících potenciál různých kombinací protinádorových monoklonálních protilátek a spousta preklinických studií zaměřených na řadu dalších potenciálně nadějných povrchových receptorů lymfocytů T (TIM3/CD366, CD200, TIGIT, BTLA/CD272, B7-H3/CD272, B7-H5/VISTA).

Po nedávném kongresu americké onkologické společnosti se pod dojmem některých téměř spektakulárních výsledků klinických studií, založených zvláště na monoklonálních protilátkách proti tlumivému receptoru PD-1, objevily (asi trochu přehnané) komentáře ohlašující konec éry chemoterapie a nástup imunoterapie jako hlavní terapeutické metody u některých onkologických onemocnění.

Bispecifické protilátkové konstrukty a chimérické antigenní receptory

Imunitní systém obsahuje sice obrovské množství klonů lymfocytů T i B, ale jen nepatrný zlomek z nich nese receptory vážící nádorové antigeny. To spolu s malou imunogeností nádorů způsobuje nedostatečnou přirozenou protinádorovou účinnost imunitního systému. Pomocí moderních molekulárně biologických metod lze ovšem uměle vybavit velký počet pacientových T-lymfocytů tzv. chimérickými antigenními receptory (CAR) žádoucí specificity a s potřebnými aktivačními vlastnostmi. Takovéto geneticky modifikované T-lymfocyty pak mohou účinně likvidovat příslušné maligní buňky (viz Vesmír 92, 498, 2013/9).

Na velmi podobném principu je založena i jiná nadějná metoda využívající uměle konstruované tzv. bispecifické monoklonální protilátky, jejichž jedno vazebné místo rozpoznává nádorový antigen a druhé se váže na některou molekulu na povrchu T- či NK-buněk (CD3, CD2, CD16). Takovéto konstrukty (nazývané často BiTEs – Bispecific T-cell Engagers) jsou schopny přivést do těsného kontaktu nádorové buňky s velkým počtem T-lymfocytů nebo NK-buněk. Podstatné je, že tyto efektorové buňky nemusí být vybaveny receptory specificky rozpoznáva-

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 aktivovat cytotoxické mechanismy.

1) Adkins I. et al.: Oncoimmunology 3(12), e968434, 2015.

2) Weiner L. M. et al.: Nat. Rev. Immunol. 10(5), 317, 2010.

3) Weiner G. J.: Nat. Rev. Cancer 15(6), 361, 2015.

4) Turnis M. E. et al.: Eur. J. Immunol. 45(7), 1892, 2015.

jícími cokoli na povrchu nádorové buňky – toto rozpoznání je zajištěno prostřednictvím jedné poloviny onoho protilátkového konstruktů BiTE (obr. 1). Je překvapivé, že takovýto uměle navozený kontakt mezi nádorovou buňkou a „nespecifickým“ lymfocitem úplně postačuje k aktivaci jeho cytotoxických mechanismů a k likvidaci napadené nádorové buňky. Doposud byly optimální výsledky dosaženy s konstrukty složenými z minimálních Fv-fragmentů příslušných monoklonálních protilátek spojených flexibilním linkerem optimální délky. Prvním preparátem tohoto typu schváleným americkým regulačním úřadem FDA je blinatumo-

mab – 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.⁵ Výhodou konstruktů BiTE oproti metodě založené na chimérických antigenních receptorech je to, že není potřeba provádět pracné a drahé genetické modifikace T-lymfocytů individuálních pacientů, neboť léčivo je jednoduše pacientům injikováno do krve. Nevýhodou je prozatím nepříliš dobrá stabilita těchto preparátů a nutnost jejich opakovaného podávání. ☺



Genetický kód

ANTON
MARKOŠ

Pod kůží zažrané „pravdy“ bezmyšlenkovitě tradované po celá desetiletí nám brání vidět pestrý svět okolo. Uvítám od čtenářů poukazy na další podobné obraty.

Kyslík s vodíkem reagují za určitých podmínek na vodu, za jiných na peroxid a ještě za jiných vzniká radikál HO[•]. Nikoho nenapadne tvrdit, že obě látky reagují podle jakéhosi kódu a reakce jsou výsledkem vzájemných afinit molekul (za daných podmínek).

Podobně je to při replikaci nukleových kyselin: vzájemné afinity A:T, A:U či G:C jsou dány chemickým složením příslušných molekul (za daných podmínek – například se tam nesmí vyskytovat jiné báze než tyto). Přesto se často setkáváme s názorem, že jde o kódové přiřazení. Nejde!

O kódu lze mluvit v případech, kdy jsou objekty dvou různých množin k sobě přiřazeny nikoli podle „přirozenosti“ (například vzájemné afinity), ale podle klíče či pravidla, které z přirozenosti nijak nevyplývá, je ustaveno historicky, konvencí, kterou nutno dodržovat. Zdůrazňuji: konvence sama kódem není, nutno ji znát nezávisle na něm.

Předvedme si to na kódu pravopisném: jméno vyslovované jako [šmíd] lze zapsat jako „Šmíd“, „Schmidt“, „Schmied“ a možná i jinak – nic z toho není vynuceno existencí kovářů, jen a jen historickou konvencí. Podobně [dělalí] se dá zapsat jako „dělalí“ i „dělaly“ – dle pravidel (kódu) české gramatiky, která je nutno znát. Stejně je to s kódem výslovnosti zapsaného – třeba „mýdlo“, „Karlstein“, nebo „yacht“. Slovo zapsané jako „stát“ může kódovat jak zemi, tak děj, dle kontextu. (Není to vždy jednoznačné. Zápis téhož různými fonty, morseovkou nebo „tajnými“ značkami dětí za kód považovat asi nebudeme, avšak zápis pořadí bází formou ...ACG TTC... je vlastně

překódování čehosi do jiného média. Adenosin není v žádném případě písmenem „A“ ani jakousi stopou na paměťové kartě.)

Genetický kód – ona tabulka 64 tripletů a jim příslušejících aminokyselin – je takovou konvencí, ustavenou v evoluci a dodržovanou víceméně všemi obyvateli biosféry. Jeho rozpoznání je funkcí (a) ribozomu, který určí čtecí rámec na mRNA, a (b) baterie enzymů aminoacyl-tRNAsyntetáz, které sváží tRNA nesoucí jistý antikodon s příslušnou aminokyselinou. Pak už je to opět věci afinity aminoacyl-tRNA k tripletu na mRNA (a pochoptelně věci rafinovaných struktur a činností). Docházíme k překvapujícímu zjištění, že kód není zapsán v mRNA, a už vůbec ne v DNA (v genu). Tam je uložena informace v podobě pořadí bází, která je v procesu translace rozpoznána jakožto návod k proteosyntéze. Kód vystává až na úrovni translace, což se ví už dávno z pokusů s nepatřičnými kombinacemi tRNA a aminokyseliny (tím dojde k mutacím v proteinu, i když informace v mRNA se nezměnila); nedávno dokonce i kombinace mi zcela umělými (něco jmko kdybych místo písmenm „a“ začal psát třeba „ш“ – zkuste to přečíst!). Kódující sekvence v genech rozpoznáváme až my – ex post –, když už víme, jak funguje translace, a známe příslušné proteiny. Neznáme-li je, může být rozpoznání kódujících sekvencí na úrovni genu často i chybné.

Existuje kód na úrovni DNA? Samozřejmě, ale musí být rozpoznán. Transkripční aparát například rozpozná začátek genu; regulační proteiny rozpoznávají specifické sekvence, na které se vážou; metylace DNA určují vyšší formy regulace genové exprese. Genom je tedy spíše úložištěm, ve kterém systémy schopné jeho „čtení“ (tj. buněčný „wetware“) podle jistého kódu nacházejí příslušné významy. ☺