

Dočkáme se protinádorových vakcín?

V. Vonka

Ústav hematologie a krevní transfuze Praha, ředitel prof. MUDr. Marek Trněný, CSc.

Souhrn: Souběžně s tím, jak přibývá poznatků o úloze imunitního systému v kontrole růstu nádorů, sílí snahy o vývoj protinádorových vakcín. V současné době se výrazně uplatňují profylaktické vakcíny proti nádorům virového původu, ale rychlý pokrok lze pozorovat i při vývoji terapeutických vakcín. Podmiňují jej jak rozšiřující se poznatky o biologii nádorové buňky, tak i rozvoj imunologie. Nicméně vývoj terapeutických vakcín je spojen s nemalými potížemi, které vyplývají jednak z omezených vědomostí o nádorových antigenech, jednak z aktivní role nádoru a jeho mikroprostředí při obraně proti specifickým protinádorovým imunitním reakcím. Nejedná se však o problémy neřešitelné. Na příkladu chronické myeloidní leukemie autor navrhuje strategii vývoje protinádorové terapeutické vakcíny.

Klíčová slova: vakcíny – nádory – chronická myeloidní leukemie

Will vaccines appear on the scene of oncology in the near future?

Summary: In parallel with the increasing knowledge of the role played by the immune system in the control of tumour growth, the efforts to develop anti-cancer vaccines intensify. In the present time two highly efficient prophylactic vaccines against the virus-induced cancers are in use, but a rapid progress in the development of anti-cancer therapeutic vaccines can also be seen. It is conditioned by an increasing understanding of the biology of the tumor cells and the rapid progress in the field of immunology. Nevertheless, these developments are associated with a number of difficulties, among which the immunosuppressive activities of the tumor cells and the tumor microenvironment are the most important. On the example of chronic myeloid leukemia the author proposes a strategy for the development of a therapeutic cancer vaccine.

Key words: vaccines – cancer – chronic myeloid leukemia

Úvod

Stejně jako jiné lékařské obory, tak i onkologie prodělává rychlé a zásadní změny. Pokračující pokroky v terapii výrazně prodlužují život pacientů a přibývá těch, u kterých se daří maligní chorobu vyléčit. Výsledky se liší mezi různými typy nádorů, které svou povahou rovněž předurčují použitelnost různých terapeutických modalit. Po desítky let se terapie nádorů opírá o klasickou triasu, kterou tvoří chirurgie, záření a chemoterapie, jejímž nejvýraznějším posledním výdobytkem jsou molekulově cílené léky („targeted drugs“). Jako příklad může sloužit imatinib-mesylát, který dramaticky zvýšil šance na dlouhodobé přežití u pacientů s chronickou myeloidní leukemií, ale i některými jinými zhoubnými nádory. K nim přistupují v poslední době tak zvané biologické terapie. Mezi nimi hrají prim monoklonální protilátky zaměřené proti určitým typům povrchových proteinů nádorových buněk.

Po více než 100 let se zkouší imunoterapie nádorů. Můžeme ji považo-

vat za zvláštní typ biologické terapie. Donedávna empirickým pozorováním o účinnosti těch či oněch imunoterapeutických zásahů se v poslední době postupně dostává racionálního vysvětlení. Tím se nejen výrazně rozhojňují poznatky o imunologii nádorů, ale používané postupy se postupně zdokonalují a inspirují vznik nových. Vycházejí do značné míry z postupujícího rozpoznávání molekulových mechanismů, jež podmiňují zvrát normální buňky v buňku s maligním potenciálem, a tím též významně přispívají k změně antigenní struktury buňky. Z rozšiřujících se poznatkové základny se odvíjejí nové koncepce vývoje protinádorových vakcín.

Vakcíny preventivní

Mluvíme-li o protinádorových vakcínách, pak musíme rozlišovat mezi vakcínami preventivními a terapeutickými. Preventivní vakcíny se v současné době uplatňují v boji proti maligním chorobám vyvolaným virem. Jde o vakcínu proti hepatitidě B [1], jejíž původce hraje klí-

čovou roli při vzniku velké části primárních hepatomů, a vakcínu proti lidským papillomavirům [2], které vyvolávají karcinom děložního čípku, část karcinomů hlavy a krku, některé nádory kůže a snad i některé další lidské nádory. Účinnost zmíněných vakcín v prevenci byla nade vše pochybnost prokázána. Jde o profylaktické vakcíny klasického typu. Jsou založené na antigenech virové kapsidy a jako takové vyvolávají tvorbu neutralizačních protilátek, které zabraňují virové infekci. Není však známo, že by tyto vakcíny ovlivnily růst již vytvořených nádorů. Zcela jiným typem preventivní vakcíny proti nádorům vyvolaným virem budou vakcíny namířené proti virovým nestrukturálním proteinům, které jsou součástí nádorové buňky, a odpovídají za její transformaci a udržení stavu transformace. Tyto virové proteiny se označují jako onkoproteiny. Inkubační doba mezi infekcí papillomaviry a klinickou manifestací nádorů trvá zpravidla několik desítek let. Je pravděpodobné, že vyvolání imunitních reakcí proti viro-

vým onkoproteinům u zatím zdravých žen, které byly infikovány vysoce rizikovými papillomaviry (tj. typy 16, 18, 31, 33 a několika dalšími), by podstatně snížilo nebezpečí, že se infekce projeví vznikem karcinomu. Takové vakcíny jsou ve vývoji, ale pokud je autorovi této statě známo, nebyly dosud použity v klinických testech. Snahy mimo jiné brzdí skutečnost, že prověrka jejich účinnosti si vyžádá desítky let.

Zdá se, že pro nejbližší dobu budou preventivní vakcíny omezeny na nádory infekčního původu, kterých je podle současného stavu poznání maximálně okolo 15% [3]. Nicméně lze spekulovat o tom, že by se mohly v budoucnosti, a to snad nepříliš vzdálené, objevit preventivní vakcíny proti nádorům s neinfekční etiologií. Mohly by se jimi stát preparáty založené na antigenech, které charakterizují některé nejčastěji aktivované (mutované) onkogeny. Zatím velmi omezené experimentální studie naznačují, že by podobné vakcíny mohly být funkční [4–6]. Dříve či později zcela určitě dojde k rozsáhlým a systematickým pokusům je prověřit. Také u nich si na prověrku jejich účinnosti budeme muset počkat 20, ale spíše více let.

Vakcíny terapeutické

Vakcíny, které by napomohly účinné léčbě již existujících nádorů, by znamenaly pro lidské společenství více než vakcíny schopné zabránit infekci onkogenními činiteli. Zcela určitě se však uplatní i u klinicky manifestních nádorů infekčního původu. Ostatně právě to je cílem mnoha výzkumných skupin, které se snaží využít skutečnosti, že virové onkoproteiny představují pro imunitní systém velké a dobře definované terče [7,8].

Vývoj terapeutických vakcín vychází z poznání, že pravděpodobně všechny nádory obsahují antigeny, které se v normálních buňkách nevyskytují. Označujeme je jako nádorové antigeny (tumour-associated antigens – TAA). Někteří diferencují mezi TAA a antigeny nádorové specifickými (TSA), které

jsou přítomné výhradně v buňkách daného typu nádoru. Jako příklad mohou sloužit nádory virového původu a chronická myeloidní leukemie. Cílem očkování je aktivovat imunitní systém nemocného tak, aby nádorové buňky rozpoznal a zničil a aby dlouhodobě udržel obranyschopnost organismu proti případným relapsům nemoci. Díky experimentálním studiím je proces aktivace imunitního systému probádán natolik, že vývoj terapeutických vakcín se má o co opřít. Je zřejmé, že k aktivaci protinádorové imunity nestačí tradiční dvousignálový systém, tj. jednak kontakt mezi peptidy prezentovanými v kontextu molekul MHC I. a II. třídy a příslušnými receptory na povrchu lymfocytů T a jednak interakce mezi lymfocyty T s tzv. kostimulačními molekulami nacházejícími se na povrchu buněk prezentujících antigen (APC) imunitnímu systému. Do hry musí vstoupit třetí signál, který se označuje jako poplašný. Pod jeho vlivem se aktivují APC. Makrofágy procházejí změnami rezultujícími v produkci cytokinů a chemokinů. Důsledkem je prozánětlivý efekt a přesměrování buněk T do místa, kde se množí nádorové buňky. Takové signály vysílá kupříkladu virová či parazitární infekce, různé komponenty bakterií nebo určité sekvence DNA, ale též nádorové buňky narušené chemoterapií [9]. Vyvolat účinnou imunitu proti maligním buňkám není snadné, a to hned z několika důvodů. Fenotyp nádorové buňky se zpravidla vyznačuje nízkou expresí kostimulačních molekul [10], jejichž interakce s buňkami T je předpokladem vzniku imunitní odpovědi, a velmi často snížením exprese molekul MHC I. třídy, které podmiňují, že specificky cytotoxické lymfocyty T „uvidí“ své cíle na povrchu nádorových buněk. Jiným problémem je exprese ko-inhibičních molekul, jako je např. Fas ligand, který zabíjí buňky T, které molekulu Fas na svém povrchu exprimují [11] nebo molekuly B7-H1 [12] či B7-H4 [13]. Navíc existuje možnost, že vlivem imunoselekčního prostředí vytvářeného imunitací se v populaci buněk nádoru stanou

dominantními ty, které v důsledku mutace ztratily nádorový antigen anebo jej vytvářejí ve snížené míře [14,15]. Takové nebezpečí hrozí zvláště u peptidových vakcín, často zaměřených jen proti jednomu epitopu. Vakcinace však musí vzít v úvahu i poznání, že nádor není v utkání s imunologickým systémem organismu pasivním hráčem, ale že se imunitním reakcím organismu brání produkcí faktorů a aktivací buněčných elementů, jež je potlačují [16–19]. Mezi ně patří indukce určitých buněk imunitního systému, jejichž přítomnost v mikroprostředí nádorů je krajně nežádoucí. Jde především o tzv. regulační buňky T (T reg), které potlačují výkonnost lymfocytů T, specificky aktivovaných proti nádorovým antigenům. Krom toho nádorové buňky prostřednictvím chemokinů přitahují nezralé myeloidní supresorové buňky (myeloid-derived suppressive cells – MDSC), jež jsou pravděpodobně mateřskými buňkami makrofágů 2. typu (M-2), producentů několika nežádoucích faktorů. Mezi substancemi, které mají imunosupresivní efekt, se nejvíce pozornosti soustřeďuje na interleukin 10 (IL10) [20] a TGFβ (transforming growth factor β) [21]. Krom toho nádorové buňky tvoří substance podporující neoangiogenezi, bez které není možný růst nádorů. Mezi nimi asi nedůležitější je VEGF (vascular endothelial growth factor) [22], který má současně i imunosupresivní účinek [23]. Podobný negativní vliv mohou mít a zřejmě mají i další buňky nádorového stromatu. Produkce těchto faktorů je tím vyšší, čím větší je nádor. Z toho plyne, že naděje na úspěch imunoterapie je tím větší, čím je nádor menší. Je nepochybné, že to je souhra všech vyjmenovaných činitelů, která se výrazně uplatnila při selhání mnoha protinádorových vakcín v minulosti, a to tím spíše, že vakcíny bývaly užívané převážně k léčbě nádorů, které byly rozsáhlé a nezládnutelné jinými typy léčby. Lze se nadít, že budoucí imunoterapie malignit vezme zmíněné skutečnosti v úvahu, a že bude doprovázena zásahy proti buňkám a sub-

stancím, které narušují protinádorové imunitní reakce organismu a podporují neoangiogenezi. Cílem imunizace je zasáhnout do mikroprostředí nádorů tak, aby se změnilo z **pronádorového** v **protinádorové**.

Rozhodující roli v protinádorové imunitě hrají specificky aktivované lymfocyty T CD8+, které jsou s to nádorové buňky zničit. K jejich aktivaci dochází hlavně prostřednictvím dendritických buněk (DB), které jsou nejdůležitějšími mezi APC. To je důvodem, proč v současné době probíhají rozsáhlé klinické studie s vakcínami založenými na autologních DB [24], které jsou in vitro exponovány k nádorovým antigenům (např. vystavením působení lyzátů nádorových buněk) či jsou transfekovány RNA extrahovanou z nádorových buněk, nebo jsou fúzovány s nádorovými buňkami. V případě některých hematologických malignit se odvozují od nádorových buněk. Vakcíny založené na DB nejsou ani zdaleka jedinými typy imunopreparátů vyvíjenými a zkouše-

nými jako protinádorové vakcíny. Mají řadu konkurentů. Přehled hlavních typů současných terapeutických vakcín je uveden v tab. 1. Patří mezi ně vakcíny založené na peptidech odvozených od TAA [25], rekombinantní virové a proteinové vakcíny [26], které exprimují, resp. obsahují TAA či jeho podstatnou část, plazmidové (DNA) vakcíny s genem kódujícím TAA [27], a konečně buněčné vakcíny, zpravidla geneticky modifikované tak, aby produkovaly některý významný imunostimulační faktor, který můžeme označit jako biologické adjuvans [28]. Každý z uvedených typů vakcín má své výhody a své nevýhody. Tradičním cílem protinádorových terapeutických vakcín byl melanom, ke kterému přibýly karcinomy ledvin a prostaty, glioblastomy a řada dalších. Úsilí o vývoj protinádorových terapeutických vakcín si budeme demonstrovat na příkladu chronické myeloidní leukemie (CML), která je autorovi této statě jako model nejbližší a která se v současné době z ně-

kolika důvodů (viz níže) těší velkému zájmu výzkumníků v oblasti nádorové imunologie. Je možné či dokonce pravděpodobné, že případný úspěch při léčbě této nemoci se stane modelem pro imunoterapii dalších nádorů člověka.

Chronická myeloidní leukemie (CML)

CML se octla v centru zájmu z několika důvodů [29]. Jako magnet zapůsobila skutečnost, že fúzní gen *bcr-abl*, který hraje klíčovou roli v patogenezi CML, kóduje protein BCR-ABL obsahující v místě fúze fragmentů obou proteinů unikátní aminokyselinovou sekvenci, jež se nevyskytuje v žádném jiném známém proteinu. Taková sekvence představuje ideální cíl pro imunitní reakce. Dalším příznivým faktorem je skutečnost, že se nemoc vyvíjí pomalu, což skýtá poměrně dlouhý čas pro imunoterapeutické zásahy. Výhodou je i to, že nádorové buňky cirkulují v krvi a v lymfě, což je činí dobře přístupnými buň-

Tab. 1. Vyvíjené terapeutické protinádorové vakcíny.

Označení	Výhody	Nevýhody
1. DNA vakcíny	snadná výroba nízké náklady výroby stabilita silná imunogennost	pomalý nástup imunitní odpovědi
2. peptidové vakcíny	snadnost výroby	nízká imunogennost HLA restrikce možnost navození tolerance
3. rekombinantní nebuněčné vakcíny (i) na bázi živých virů	nízké náklady výroby dobrá imunogennost	náročný vývoj biologická rizika silná imunogennost vektoru
(ii) proteinové (iii) hybridní VLP	vysoká imunogennost vysoká imunogennost	náročný vývoj náročný vývoj
4. buněčné vakcíny (i) na bázi DB (ii) na bázi inaktivovaných nádorových buněk či jejich lyzátů (iii) na bázi inaktivovaných, geneticky modifikovaných autologních či allogenních nádorových buněk	dobrá imunogennost snadná výroba snadná výroba	náročný vývoj možnost vzniku autoimunitních reakcí náročný vývoj možnost vzniku autoimunitních reakcí

VLP – virus-like particles, virové kapsidy připravené pomocí genového inženýrství, neobsahují virovou nukleovou kyselinu
DB – dendritické buňky, nejdůležitější antigen prezentující buňky (APC)

Tab. 2. Klinické studie s terapeutickými vakcínami proti CML.

Vakcína	Klinická odpověď	Imunologická odpověď	Citace
1. peptidy odvozené od BCR-ABL	ne	ano	30
2. peptidy odvozené od BCR-ABL	ano	ano	31
3. peptidy odvozené od BCR-ABL	ano	ano	32
4. peptidy odvozené od BCR-ABL	ano	ano	33
5. peptidy odvozené od BCR-ABL	ano	ano	34
6. peptidy odvozené od BCR-ABL	ano	ano	35
7. autologní DB	ne	ano	36
8. autologní DB	ano	ano	37
9. autologní DB	ano	ano	38
10. peptid odvozený od PR-3	ano	ano	39
11. peptidy odvozené od Pr-3 a WT-1	ano	ano	40
12. komplexy peptidů s HSP70	ano	ano	41
13. inaktivované geneticky modifikované leukemické buňky	ano	ano	42

kám imunitního systému. Konečně, za čtvrté, existuje velmi účinná terapie CML, reprezentovaná již zmíněným imatinib-mesylátem a dalšími inhibitory tyrosin-kináz. Ty sice nedokážou nemoc vyléčit, ale jsou s to drasticky zredukovat nádorovou masu, a tím snížit již zmíněné imunopresivní aktivity nádorových buněk. K uvedeným příznivým podmínkám pro imunoterapii přistupují důkazy, že imunologické reakce hrají v patogenezi CML a v jejím průběhu důležitou roli. Svědčí pro to řada pozorování. Mezi ně patří účinnost interferonu α v léčbě CML, která se přikládá hlavně jeho imunomodulační aktivitě, a terapeutická účinnost allogenních transplantací. Zásadní význam měl průkaz imunogenní aktivity peptidů odvozených z fúzní zóny proteinu BCR-ABL u pacientů s CML. Postupně však byly rozpoznány v leukemických buňkách další proteiny, které jsou s to vyvolat u velké části pacientů specifické imunitní reakce. První mezi nimi byly protein Wilmsova tumoru 1 (WT-1) a Proteinasa 3 (Pr-3, označovaná též jako myeloblastin).

Na základě uvedených poznatků přikročilo několik skupin k provedení klinických zkoušek s vakcínami u pacientů s CML. V uplynulém desetiletí jich bylo provedeno 13. Jejich přehled je v tab. 2. Je patrné, že nejvíce vak-

cín bylo založeno na peptidech odvozených z fúzní zóny proteinu BCR-ABL [30–35]. Další byly reprezentovány autologními dendritickými buňkami [36–38] nebo peptidy, které byly odvozeny od proteinů Pr-3 či WT-1 [39,40]. V jednom případě posloužil jako vakcína extrahovaný HSP70 (heat-shock protein 70) s navázanými leukocytárními peptidy [41] a v poslední dosud provedené klinické studii byla použita buněčná vakcína [42]. Tvořily ji ozářené buňky linie odvozené od pacienta v blastické fázi CML, které byly geneticky modifikovány tak, aby produkovaly imunostimulační cytokin GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor). Všechny vakcíny byly dobře tolerovány, všechny vyvolaly měřitelnou imunologickou odpověď a v 11 z provedených studií jejich podání následovalo zlepšení klinického stavu u části pacientů. Nicméně tyto výsledky je nutné hodnotit s velkou dávkou opatrnosti. Provedené studie zahrnovaly malé skupiny pacientů, žádná z nich nebyla dvojitě slepá a ve všech případech byly pacienti léčeni i jinými prostředky. Nelze proto bezpečně určit, které efekty byly dílem vakcinace a které obstaraly jiné terapeutické modalit. Nicméně se zdá být vysoce pravděpodobným, že příznivé účinky se dostavily alespoň u části pacientů, i když

je nelze označit za zvláště výrazné či dokonce převratné v léčbě CML.

Pokračující bádání v oblasti imunologie CML přineslo několik mimořádně zajímavých poznatků. Mezi nimi vyniklo pro mnohé překvapující zjištění, že tolik vyzdvihovalá unikátní aminokyselinová sekvence fúzní zóny proteinu BCR-ABL není imunodominantním antigenem leukemické buňky [43]. Fúzní protein však odpovídá za indukci řady dalších proteinů, které dotvářejí její antigenní strukturu [44]. Vesměs jde o proteiny, které nejsou přítomné v normálních buňkách (s výjimkou testes v případě tzv. „cancer/testis“ antigenů, viz přehled [45]), anebo se v nich tvoří jen v malém množství. Všechny, jejichž funkce se znají, zřejmě přispívají ku vzniku maligního fenotypu buňky. Takových proteinů, které je možné bez zábran považovat za TAA, bylo už rozpoznáno přes 20, a kdykoli se pátralo po jejich imunogenitě, byly u pacientů zjištěny specificky aktivované lymfocyty T. Pozoruhodné je, že žádný z nich nebyl nalezen v buňkách všech pacientů, z čehož plyne, že nádorové buňky různých pacientů nemají stejnou antigenní strukturu, a je velmi pravděpodobné, že mezi pacienty existují dobře definovatelné individuální rozdíly. Pro vývoj terapeutických vakcín proti CML lze z těchto pozorování vyvo-

dit následující závěry: vakcíny by měly obsahovat co největší množství antigenů zjišťovaných v leukemických buňkách a složení vakcín by mělo co nej přesněji odpovídat antigenní struktuře leukemických buněk daného pacienta.

Pozoruhodným nedávným příspěvkem imunologii CML je pozorování, že v průběhu léčby imatinib-mesylátem dochází u pacientů ke vzniku velmi silných imunitních reakcí proti autologním nádorovým buňkám, které však mají jen přechodnou povahu a mizí paralelně s vyvoláním remise [46]. Na základě těchto nálezů byl konstruován matematický model ukazující, že vakcína podaná v době přítomnosti optimálního množství nádorových buněk by měla vést k vyléčení nemoci [47].

Studie s buňkami transformovanými fúzním genem *bcr-abl* na myších

Mnozí, kteří se zabývají vývojem vakcín proti CML, se snaží získat základní vědomosti o imunologii buněk transformovaných fúzním genem *bcr-abl* na myším modelu. Práci na toto téma existuje velké množství. Mezi nejzajímavějšími výsledky je zjištění imunogennosti nonapeptidu odvozeného od fúzního proteinu BCR-ABL [48], buněčných extraktů bohatých na chaperony [49] a celobuněčných vakcín [50,51]. V naší laboratoři jsme provedli v uplynulých letech studie s buňkami transformovanými fúzním genem *bcr-abl* na myších Balb/c. Pokusy navodit imunitu proti čelení pomocí vakcín založených na fúzní zóně proteinu BCR-ABL o délce 25 aminokyselin selhaly, ať již se jednalo o DNA vakcíny různého uspořádání [52], rekombinantní virus vakcinie či rekombinantní protein odvozený od vysoce imunogenního detoxifikovaného toxinu proteinu *B. pertussis* (Němečková et al, rukopis v přípravě) či pomocí hybridních částic imitující virové partikule (virus-like particles – VLP) [53], jejichž vysoká imunogennost byla prokázána v jiných systémech [54]. Úspěšnější jsme byli s nádorovými buňkami, které jsme geneticky

modifikovali zavedením genů pro cytokiny interleukin 2 (IL-2), interleukin 12 (IL-12) a již zmíněný GM-CSF. Genovou modifikací ztratily buňky nádorový potenciál [55] a byly s to navodit imunitu proti homologním buňkám (Petráčková et al, rukopis v přípravě). Když jsme je použili v terapeutickém uspořádání proti vysoce agresivním syngením heterologním buňkám, dokázaly významně oddálit objevení se nádorů. Když pak byly podány v kombinaci s chemoterapií či interferonem α , které byly aplikovány v dávkách, které rozvoj nádorů významně neovlivnily, část zvířat nádory vůbec nevytvořila [56]. Nejúspěšnější byla vakcinace buňkami, které tvořily IL-2. Velmi závažným pak bylo zjištění, že pomocí RT-PCR nebyly nalezeny ve slezinách, játrech či kostní dřeni takto ošetřených myší transkripty genu *bcr-abl*. To lze považovat za důkaz, že myši byly prosté reziduální nemoci.

Je jistým, že účinnost buněčných vakcín v popsanych pokusech nebyla důsledkem vzniku imunity proti epitopu nacházejícímu se ve fúzní zóně proteinu BCR-ABL. Soudíme, že se při vzniku imunity uplatnily buněčné antigeny, snad podobné těm, které byly nalezeny v lidských leukemických buňkách.

Jak dále s vývojem vakcín proti CML

Přes limitace spojené s jakýmkoli experimentálním modelem a translací získávaných výsledků do humánní medicíny, lze vyslovit domněnku, že podobné efekty jako u myší bude možné dosáhnout pomocí buněčných vakcín u pacientů s CML. Buněčné vakcíny nesou soubor celých proteinů s mnohočetnými epitopy, které se vážou na rozličné molekuly HLA, takže skýtají naději, že vyvolají velmi širokou imunitní odpověď a zabrání tomu, aby nádorové buňky unikly imunitním reakcím organismu. Jako takové překonávají slabosti peptidových vakcín či vakcín z dendritických BCR-ABL-pozitivních buněk, které se ukázaly být málo účinnými v pokusech o léčbu CML. Buněčné vakcíny založené na buněčných

liniích odvozených od pacientů s CML by se mohly uplatnit v boji i proti jiným myeloidním malignitám, které netvoří protein BCR-ABL, ale s buňkami CML sdílejí jiné antigeny.

Na základě dosavadních pozorování v experimentálních modelech a dosavadních výsledků klinických studií lze navrhnout strategii vývoje terapeutické vakcíny proti CML. I když by vzhledem k antigenním rozdílům mezi jednotlivými pacienty byly ideální vakcíny založené na autologních buňkách, takový přístup není reálný. Pokud je nám známo, dosud se nepodařilo izolovat kontinuální buněčné linie od pacientů v chronické fázi nemoci, u kterých je naděje na úspěch imunizace nejvyšší. I kdyby však byl zdárně vyřešen problém jejich derivace pomocí nových metodických přístupů, vždy by šlo o práci časově náročnou, nákladnou a s nejistým výsledkem. Mnohem větší naději mají vakcíny allogenní, založené na již existujících buněčných liniích odvozených od pacientů v blastické fázi nemoci. Takových linií existuje několik desítek. Možnou slabinou je, že vakcína připravená z některé takové linie nebude obsahovat antigen, který má pro daného pacienta zásadní význam. Tento nedostatek se však dá obejít – přinejmenším u převážné většiny případů – použitím směsi allogenních vakcín. Výhody allogenních vakcín jsou nabíledni. Kontinuální buněčné linie představují v podstatě nevyčerpatelné zdroje imunizačních antigenů, produkce vakcín se dá snadno standardizovat, takže nedochází k změnám v kvalitě a složení, jejich příprava je poměrně levná a – a to hlavně – budou k dispozici, kdykoli jich bude třeba.

Podle našich představ bude vývoj vakcín proti CML sestávat ze 3 fází. V první části by měla být provedena analýza antigenní struktury leukemických buněk několika desítek pacientů. Jejím cílem by mělo být rozdělení pacientů do několika antigenních subtypů, jejichž existenci lze na základě současných znalostí předpokládat. Při tom by mělo být využito výsledků

analýz provedených nedávno pomocí cDNA mikroarrayů [57–59], doplněných podle potřeby dalšími vyšetřeními této kategorie. V druhé fázi by měla být provedena proteomová analýza několika (aspoň 5–6) kontinuálních buněčných linií; je velmi pravděpodobné, že se linie budou vzájemně výrazně lišit. Zdrojem informací budou výsledky již publikovaných analýz [60–62] doplněné o vyšetření dalších linií. Cílem bude definovat rozdíly v proteomech jednotlivých linií a posléze najít analogie mezi antigenními strukturami buněk pacientů a těmito liniemi. Vybrané linie by měly být geneticky upraveny vnesením genu pro IL-2 či pro jiné cytokiny, které se ukážou být nejvhodnějšími pro terapeutické účely. Třetí částí programu, která se bude rozvíjet paralelně s popsány etapami, bude podstatné rozšíření současných znalostí o imunologii CML. Jejich doplnění by mělo nejen umožnit monitorování vlivu vakcinace na imunitní reakce organismu proti leukemickým buňkám a nalézt nové markery změn klinického stavu pacienta v průběhu onemocnění, ale i odhalit a přesněji definovat imunosupresivní vlivy, které pomáhají rozvoji onemocnění a snižují účinnost vakcinace. Jejich likvidace anebo alespoň výrazné omezení by se měly stát cílem doplňující léčby. Lze si představit, že takové úsilí bude komplexní, že zahrne nejen chemoterapeutické zásahy a monoklonální protilátky, ale možná i imunizaci proti některým faktorům, které nežádoucím způsobem tlumí účinnost vakcinace, buď proto, že působí imunosupresivně, anebo proangiogeneticky.

Závěr

V dubnu tohoto roku došlo k události, kterou mnozí onkologové pokládají za historický přelom: FDA schválila k použití první terapeutickou protinádorovou vakcínu. Jde o očkovací látku, která statisticky významně prodlužuje život u pacientů s metastatickým karcinomem prostaty. Vzhledem k množství klinických studií s protinádorovými vak-

cínami, které ve světě probíhají (je potěšitelné, že několik se jich uskutečňuje v České republice), se lze nadít, že se na trhu brzy objeví další. Rychlý nárůst jejich počtu nepochybně usnadní přibývající vědomosti o mechanismech protinádorové imunity a rozpoznání dalších faktorů, které její uplatnění brzdí. Přes dílčí úspěchy je však na místě si přiznat, že jsme teprve na začátku dlouhé cesty. Naše poznatky jsou zatím hlavně kvalitativní. Pro to, aby nastal zásadní zvrat ve vývoji a aplikaci protinádorových vakcín, je třeba hlubšího poznání kvantitativních aspektů imunitních procesů spjatých se vznikem, progresí a případnou regresí zhoubných nádorů a jejich vzájemných interakcí v čase a prostoru. Mezi úkoly s nejvyšší prioritou patří rozšířit vědomosti o biologii buněk T, o jejich aviditě k TAA, proliferaci, délce přežívání, specifické výkonnosti a vzniku paměťových buněk. Zvláště je pak třeba objasnit mechanismy, které brání aktivaci, pomnožení a fungování lymfocytů T specificky zaměřených proti TAA. Mnozí soudí, že klíčový význam pro zvýšení účinnosti protinádorové imunizace by měla identifikace molekuly specifické pro T reg buňky, jež by umožnila jejich spolehlivé cílené vyřazení, např. imunizací. Vývoji budoucích vakcín by určitě prospěla intenzivnější spolupráce mezi výzkumnými skupinami, rychlá výměna zkušeností, standardizace imunizačních protokolů, která by však neměla bránit prověrce různých imunizačních schémat, a také dohoda na kritériích úspěšnosti.

Odpověď na otázku položenou v nadpisu je kladná. Imunoterapie nádorů vstoupí do onkologie a stane se její významnou součástí. Nikoli však, aby nahradila současné léčebné postupy, ale aby je doplnila.

Výzkumná práce autora je podporována grantem IGA Ministerstva zdravotnictví České republiky č. NS 10 634–3/2009.

Literatura

1. Blumberg BS. Primary and secondary presentation of liver cancer caused by HBV. *Front Biosci* 2010; 2: 756–763.

2. Vonka V, Hamšíková E. Vaccines against human papillomaviruses – a major breakthrough in cancer prevention. *Cent Eur J Public Health* 2007; 15: 131–139.

3. Martin D, Gutkind JS. Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer. *Oncogene* 2008; 27 (Suppl 2): S31–S42.

4. Šmahel M, Sobotková E, Vonka V et al. DNA vaccines against oncogenic hamster cells transformed by HPV16 E6/E7 oncogenes and the activated ras oncogene. *Oncol Rep* 1999; 6: 211–215.

5. Fattori E, Aurisicchio L, Zampaglione I et al. ErbB2 genetic cancer vaccine in non-human primates: relevance of single nucleotide polymorphisms. *Hum Gene Ther* 2009; 20: 253–265.

6. Wang H, Wei H, Zhang R et al. Genetically targeted T cells eradicate established breast cancer in syngeneic mice. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 943–950.

7. Su JH, Wu A, Scotney E et al. Immunotherapy for cervical cancer: Research status and clinical potential. *Bio Drugs* 2010; 24: 109–129.

8. Cid-Arregui A. Therapeutic vaccines against human papillomaviruses and cervical cancer. *Open Virol J* 2009; 3: 67–83.

9. Ullrich E, Bonmort M, Mignot G et al. Tumor stress, cell death and ensuing immune response. *Cell Death Differ* 2008; 15: 21–28.

10. Driessens G, Kline J, Gajewski TF. Costimulatory and coinhibitory molecules in antitumor immunity. *Immunol Rev* 2009; 229: 126–144.

11. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ et al. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 2000; 74: 181–273.

12. Dong H, Strome SE, Salomao DR et al. Tumor associated B7-H1 promotes T cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002; 8: 793–800.

13. Sica GL, Choi IH, Zhu G et al. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. *Immunity* 2003; 18: 849–861.

14. Jäger E, Ringhoffer M, Karbach J et al. Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8+ cytotoxic T-cell response: evidence for immunoselection of antigen-loss variants in vivo. *Int J Cancer* 1996; 66: 470–476.

15. Knutson KL, Lu H, Stone B et al. Immunoevasion of cancers may lead to epithelial to mesenchymal transition. *J Immunol* 2006; 177: 1526–1533.

16. Pittet MJ. Behavior of immune players in the tumor microenvironment. *Curr Opin Oncol* 2009; 21: 53–59.

17. Stewart TJ, Abrams SI. How tumors escape mass destruction. *Oncogene* 2008; 27: 5894–5903.
18. Bronte V, Mocellin S. Suppressive influences in the immune response to cancer. *J Immunother* 2009; 32: 1–11.
19. Petrausch U, Poehlein CH, Jensen SM et al. Cancer Immunotherapy: the role regulatory T cells play and what can be done to overcome their inhibitory effects. *Curr Mol Med* 2009; 9: 673–682.
20. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer cell immune escape and tumor progression by exploitation of anti-inflammatory and pro-inflammatory responses. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 924–933.
21. Wrzesinski SH, Wan YY, Flavell RA. Transforming growth factor β and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 5262–5270.
22. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nat Med* 1995; 1: 27–31.
23. Gabrilovich DL, Chen HL, Girgis KR et al. Production of vascular endothelial growth factor inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2: 1096–1103.
24. Melief CJ. Cancer immunotherapy by dendritic cells. *Immunity* 2008; 29: 372–383.
25. Mocellin S, Pilati P, Nitti D. Peptide-based anticancer vaccines. *Curr Med Chem* 2009; 16: 4779–4796.
26. Němečková Š, Šroller V, Heintz P et al. Experimental therapy of HPV16 induced-tumors with IL12 expressed by recombinant vaccinia virus in mice. *Int J Mol Med* 2003; 12: 789–796.
27. Liu MA. Gene-based vaccines: recent development. *Curr Opin Mol Ther* 2010; 12: 86–93.
28. De Gruijl TD, van den Eertwegh AJ, Pinedo HM et al. Whole-cell cancer vaccination: from autologous to allogeneic tumor and dendritic cell-based vaccines. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57: 1569–1577.
29. Vonka V. Immunotherapy of chronic myeloid leukemia: present state and future prospects. *Immunotherapy* 2010; 2: 227–241.
30. Pinilla-Ibarz J, Cathcart K, Korontsvit T et al. Vaccination of patients with chronic myeloid leukemia with bcr-abl oncogene breakpoint fusion peptides generates specific immune response. *Blood* 2000; 95: 1781–1787.
31. Cathart K., Pinilla-Ibarz J, Korontsvit et al. A multivalent bcr-abl fusion peptide vaccination trial in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 2004; 103: 1037–1042.
32. Bocchia M, Gentili S, Abruzzese E et al. Effects of a p210 multi-peptide vaccine associated with imatinib or interferon in patients with chronic myeloid leukemia and persistent residual disease: a multicentre observational trial. *Lancet* 2005; 365: 957–962.
33. Rojas JM, Knight K, Wang I et al. Clinical evaluation of BCR-ABL peptide in chronic myeloid leukemia: results of EPIC study. *Leukemia* 2007; 21: 2287–2295.
34. Jain N, Reuben JM, Kantarjian H et al. Synthetic tumor-specific breakpoint vaccine in patients with chronic myeloid leukemia and minimal residual disease: a phase 2 trial. *Cancer* 2009; 115: 3924–3934.
35. Maslak PG, Dao T, Gomez M et al. A pilot vaccination trial of synthetic analog peptides derived from the BCR-ABL breakpoints in CML patients with minimal disease. *Leukemia* 2008; 22: 1613–1616.
36. Takahashi T, Tanala Y, Nieda M et al. Dendritic cell vaccination for patients with chronic myelogenous leukemia. *Leuk Res* 2003; 27: 595–802.
17. Ossenkoppele CJ, Stam AG, Westers TM et al. Vaccination of chronic myeloid leukemia patients with autologous in vitro cultured leukemia dendritic cells. *Leukemia* 2003; 17: 1424–1426.
38. Westermann J, Kopp J, van Lessen A et al. Vaccination with autologous non-irradiated dendritic cells in patients with bcr/abl-chronic myeloid leukemia. *Br J Hematol* 2007; 137: 297–306.
39. Heslop HE, Stevenson FK, Molldrem JJ. Immunotherapy of hematological malignancy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003: 331–349.
40. Rezvani K, Yong AS, Mielke S et al. Leukemia-associated antigen-specific T-cell response following combined PR1 and WT1 peptide vaccination in patients with myeloid malignancies. *Blood* 2008; 111: 236–242.
41. Li Z, Qiao Y, Liu B et al. Combination of imatinib mesylate with autologous leukocyte derived heat shock protein and chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 4460–4468.
42. Smith BD, Kasamon YL, Kowalski J et al. K562/GM-CSF immunotherapy reduces tumor burden in chronic myeloid leukemia patients with residual disease on imatinib mesylate. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 338–347.
43. Grünebach F, Mirakaj V, Mirakaj V et al. BCR-ABL is not immunodominant in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res* 2006; 66: 5892–5900.
44. Brauer KM, Werth D, von Schwarzenberg K et al. BCR-ABL activity is critical for the immunogenicity of chronic myelogenous leukemia cells. *Cancer Res* 2007; 67: 5489–5497.
45. Caballero OL, Chen YT. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci* 2009; 100: 2014–2021.
46. Chen CI, Maecker HT, Lee PP. Development and dynamics of robust T cell response to CML under imatinib treatment. *Blood* 2008; 111: 5342–5349.
47. Kim PS, Lee PP, Levy D. Dynamics and potential impact of the immune response to chronic myelogenous leukemia. *PLoS Comput Biol* 2008; 4: e1000095.
48. He L, Feng H, Raymond A et al. Dendritic cell-peptide immunization provides immunoprotection against bcr-abl-positive leukemia in mice. *Cancer Immunol Immunother* 2001; 50: 31–40.
49. Kislin KL, Marron MT, Li G et al. Chaperone-rich cell lysate embedded with BCR-ABL peptide demonstrates enhanced anti-tumor activity against a murine BCR-ABL-positive leukemia. *FASEB J* 2007; 21: 2173–2184.
50. Ling X, Wang Y, Dietrich MF et al. Vaccination with leukemia cells expressing cell-surface-associated GM-CSF blocks leukemia induction in immunocompetent mice. *Oncogene* 2006; 25: 4483–4490.
51. Deeb D, Gao X, Jiang H et al. Vaccination with leukemia-loaded dendritic cells eradicates residual diseases and prevents relapse. *J Exp Ther Oncol* 2006; 5: 183–193.
52. Lučanský V, Sobotková E, Tachezy R et al. DNA vaccination against bcr-abl-positive cells in mice. *Int J Oncol* 2009; 35: 941–951.
53. Hrušková V, Morávková A, Babiarová K et al. Bcr-Abl fusion sequences do not induce immune response in mice when administered in mouse polyomavirus based virus-like particles. *Int J Oncol* 2009; 35: 1247–1256.
54. Ramquist T, Dalianis T. Immunotherapeutic polyoma and human papillomavirus-like particles. *Immunotherapy* 2009; 1: 303–312.
55. Petrůčková M, Sobotková E, Dušková M et al. Isolation and properties of gene-modified mouse bcr-abl-transformed cells expressing various immunostimulatory factors. *Neoplasma* 2009; 56: 194–201.
56. Sobotková E, Dušková M, Tachezy R et al. Combined chemo- and immunotherapy of tumors induced in mice by bcr-abl-transformed cells. *Oncol Rep* 2009; 21: 793–799.
57. Radich JP, Dai H, Mao M et al. Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid

leukemia. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103: 2794–2799.

58. Diaz-Bianco E, Bruns I, Neumann F et al. Molecular signature of CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cells of patients with CML in chronic phase. Leukemia 2007; 21: 494–504.

59. Song JH, Kim HJ, Lee CH et al. Identification of gene signatures for molecular classification in human leukemia cells. Int J Oncol 2008; 29: 57–94.

60. Zou L, Wu Y, Pei L et al. Identification of leukemia-associated antigens in chronic myeloid leukemia by proteomic analysis. Leuk Res 2005; 29: 1387–1391.

61. Fontana S, Alessandro R, Barranca M et al. Comparative proteome profiling and functional analysis of chronic myelogenous leukemia cell lines. J Proteome Res 2007; 6: 4330–4342.

62. Ferrari G, Pastorelli R, Buchi F et al. Comparative proteomic analysis of chronic

myelogenous leukemia cells: inside the mechanism of imatinib resistance. J Proteome Res 2007; 6: 367–375.

prof. MUDr. Vladimír Vonka, DrSc.

www.uhkt.cz

e-mail: vladimir.vonka@uhkt.cz

Doručeno do redakce: 24. 5. 2010

www.eOnkologie.cz