

Tab. 2 Nejdůležitější zástupci mikroflóry žijící na kůži zdravého člověka

<p><i>Acinetobacter</i>, <i>Aerococcus</i> bacily, klostridie, korynebakterie <i>Micrococcus</i>, <i>Peptostreptococcus</i> <i>Propionibacterium</i> stafylokoky, streptokoky houby: <i>Candida</i>, <i>Malassezia</i></p>
--

buněčnou stěnu navíc krytou další nepropustnou vnější membránou?

Ve skutečnosti volná DNA přichází otevřenými dveřmi. Na povrchu bakterií byly objeveny desítky receptorů, které mimo buněčnou DNA zachycují a vážou. Bakteriální obaly jsou navíc opatřeny zvláštními póry, kterými DNA aktivně přechází na vnitřní membránu, kde už je soustředěna speciální mašinerie zajišťující přenos genetické informace, která dá pokyn k rozvinutí dvoustranně pronikající DNA. Jedno vlákno DNA je bezprostředně zničeno enzymem nukleázou, druhé přechází do cytoplazmy a hned se začleňuje do chromozomu. Některé druhy bakterií jsou schopny integrovat řádově jenom tisícinu transportované DNA, jiné až desítky procent. Snadněji se rekombinují geny podobné s geny příjemce. Integrují se však i geny ze zcela nepřibuzných genomů. Některé bakterie (např. původce kapavky) mohou přijímat cizí DNA trvale, jiné to dovedou jen v určitém období svého života.

#### Jak bakterie získávají rezistenci k antibiotikům

Gramnegativní bakterie se brání vstupu antibiotik do buňky do velké míry svou přirozenou výbavou, nepropustnou vnější membránou. Jiné získají odolnost genetikou cestou — buď mutacemi, nebo horizontálním přenosem genů rezistence od bakterií, které už odolnost k antibiotikům získaly. Při reakci bakterií na setkání s antibiotikem se také zvyšuje frekvence mutací nebo se počnou uvolňovat plazmidy nesoucí geny pro rezistenci k antibiotikům, případně další mobilní genetické elementy jako jsou integrony.

## Protinádorové vakcíny II. Terapeutické vakcíny

### Vladimír Vonka

V předchozí části přehledu o protinádorových vakcínách jsme se věnovali vakcínám profylaktickým. Ukázali jsme, že takové preparáty jsou zaměřeny aspoň prozatím výhradně proti nádorům vyvolaným viry. Podobají se klasickým očkovacím látkám. Jejich cílem je zabránit infekci, která by mohla vyvolat zhoubné bujení. Přes 80 % nádorů je však nevírového původu a při jejich případné imunoterapii se musíme spolehnout na vakcíny terapeutické.

Jak bylo řečeno v první části (Živa 2006, 2: 53–54), většina nádorů — a možná, že všechny — obsahuje antigeny, které je odlišují od normálních tkání. Mnoho stoupenců má hypotézu, že nádory za přirozených podmínek vznikají proto, že organismus není s to imunologicky rozpoznat nové antigeny nádorové buňky. I když tomu tak někdy

Tab. 3 Příklady horizontálního přenosu kompletních chromozomálních genových sekvencí kódujících metabolické aktivity u eukaryot

Geny pro	Vektory	Původ
glukozofosfátovou izomerázu	<i>Escherichia coli</i>	dvouděložné rostliny lokanka lepá ( <i>Clarkia unguiculata</i> )
Fe superoxidovou dismutázu	<i>Entamoeba histolytica</i>	prokaryota
aldolázu	kvasinky	<i>Escherichia coli</i>
cytochrom c	huseniček Thalův ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	houby
xylanázu	<i>Rumomococcus</i>	houby
thioredoxin	rostliny	prokaryota
glyceraldehydovou dehydrogenázu	<i>Escherichia coli</i> sinice ( <i>Anabaena</i> )	eukaryota

Bakterie využívají různé mechanismy rezistence. Např. dokážou zamezit navázání antibiotik na bakteriální buňku (tak se dnes brání až 60 % zlatých stafylokoků antibiotiku methicilinu), nebo je enzymaticky rozloží (tak vyřazují ze hry peniciliny bakteriální β-laktamázy), anebo mohou zpátky vyčerpávat antibiotika, která už do buněk pronikla (to dělají rezistentní pseudomonády).

#### Sít informace

Geny pro množení, prepis a překlad genetické informace se ve srovnání s geny rezistence šíří horizontálním přenosem daleko pomaleji. V přírodě dochází k přenosu genů také mezi taxonomicky velmi vzdálenými druhy. Vytvářejí se velmi komplikované funkční sítě, po nichž probíhá mnohásměrný tok genetické informace. Příklady přenosů celých chromozomálních sekvencí pro geny regulující některé metabolické reakce jsou uvedeny v tab. 3.

Mnoho takových výměn se odehrává přímo pod našima nohama, v půdě. Půda není jen neživá hmota, je to složitý superorganismus, komplexní biocenóza, v níž se převtělují mrtvá těla rostlin a živočichů do jiných živých forem. Plocha pastviny, která užívá jednoho koně, skrývá v podzemí tolik živých organismů, že by vyvážili 8 koní. Polovinu z tohoto množství tvoří mikroorganismy, zejména bakterie. Jediný gram půdy

jich obsahuje na 10<sup>9</sup>. Je překvapující, jak jsou druhově pestré. Britští molekulární genetici T. P. Curtis a W. T. Sloan z univerzity v Newcastlu odvodili z databází bakteriální RNA, že v jediném gramu půdy žije na 7 000 druhů bakterií, zatímco ve stejném množství mořské vody jen 160.

Jedny z nejvýznamnějších půdních mikroorganismů jsou bakterie rodu *Rhizobium* (Živa 2006, 1: 9–12), které žijí v těsné symbióze s rostlinami. Jejich obří plazmidy nesou kompletní genetickou informaci, která rhizobiím nejen umožní invazi do kořenových buněk, ale obsahuje také pokyny pro přeměnu těchto buněk na výrobní haly, v nichž pak tyto bakteriální symbionti vyrábějí ze vzdušného dusíku amonné ionty.

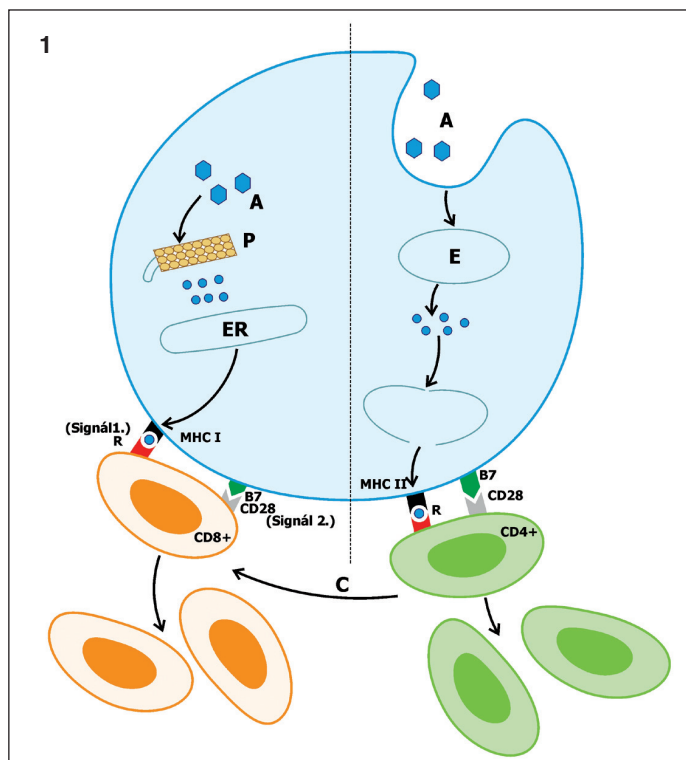
Množství vektorů genetické informace v přírodě je neuvěřitelné. V jediné kapce vody existují miliony nosičů genů. Např. geny pro fotosyntézu mořských bakterií jsou vneseny řávy. Řávy jsou na naší Zemi nejpočetnější. Odhaduje se, že existuje 10<sup>30</sup> řávných partikul, které každou vteřinu infikují 10<sup>25</sup> bakteriálních buněk. DNA je v biosféře všudypřítomná, ať už volná nebo jako součást živých organismů, a vytváří obří web — světovou pavučinu, po níž se přenáší genetická informace.

Věnováno našemu učiteli Prof. Ctiradu Jobnovi.

vakcín byly již testovány ve stovkách klinických studií. Navzdory skvělým úspěchům s experimentálními vakcínami v dobře definovaných zvířecích modelech a přes povzbudivé výsledky řady klinických studií se v humánní medicíně dosud nenaplnila očekávání spojená s terapeutickými protinádorovými vakcínami. Problémy, s nimiž se imunoterapie lidských nádorů potýká, vyplývají do značné míry z biologie nádorové buňky a z vlastností buněčných populací, kterými je nádor tvořen. Na rozdíl od mnoha experimentálních zvířecích nádorů, jejichž buněčné populace jsou víceméně homogenní, je složení přirozených nádorů silně heterogenní. Navíc se buněčná skladba nádoru mění s jeho růstem a rovněž v důsledku terapeutických zásahů. Nehomogenost se týká i přítomnosti nádorových antigenů a jejich množství. Aby mohl i méně zasvěcený čtenář pochopit současně těžkosti týkající se terapeutických protinádorových vakcín a orientovat se ve strategiích používaných k jejich konstrukci, musíme se zmínit o některých poznatcích novodobé nádorové imunologie, které mají bezprostřední vztah k diskutované problematice.

určitě bývá, tuto koncepci je obtížné zevšeobecnit. Protinádorové terapeutické vakcíny mají za cíl aktivovat imunitní systém nemocného tak, aby nádorové antigeny rozpoznal, buňky, které je nesou, rozrušil a dlouhodobě udržel obranyschopnost organismu.

V posledních letech tyto snahy nabývaly na intenzitě a různé typy protinádorových



Obr. 1 Zpracování antigenů endogenního a exogenního původu v buňce. A — antigen, P — proteazom, ER — endoplazmatické retikulum, R — receptor, E — endozom, C — uvolněné cytokiny, které stimulují cytotoxické lymfocyty T CD8+, CD4+ — pomocné lymfocyty T, B7 — kostimulační molekula, CD 28 — povrchová molekula lymfocytů T, která zprostředkovává vazbu s molekulami rodiny B7 (zjednodušeno, blíže v textu)

### Problémy s vyvoláním protinádorové imunity

Při vzniku specifické imunitní reaktivity, včetně té zaměřené proti nádorům, hrají klíčovou roli lymfocyty T. Dělíme je do dvou hlavních tříd, které spojuje přítomnost povrchového antigenu CD3. Buňky T první třídy fungují jako pomocné (helper, proto Th), vzhledem k přítomnosti povrchového antigenu CD4 se též označují jako CD4+. Do značné míry podmiňují výkonnost jiných složek imunitního systému. Druhé třídy lymfocytů T patří úloha destruktivní. Na buňky infikované virem nebo jinak antigenně pozměněné (např. přítomnosti nádorového antigenu) působí toxicky (cytotoxicity, Tc). Vzhledem k přítomnosti povrchového antigenu CD8 se označují také jako CD8+.

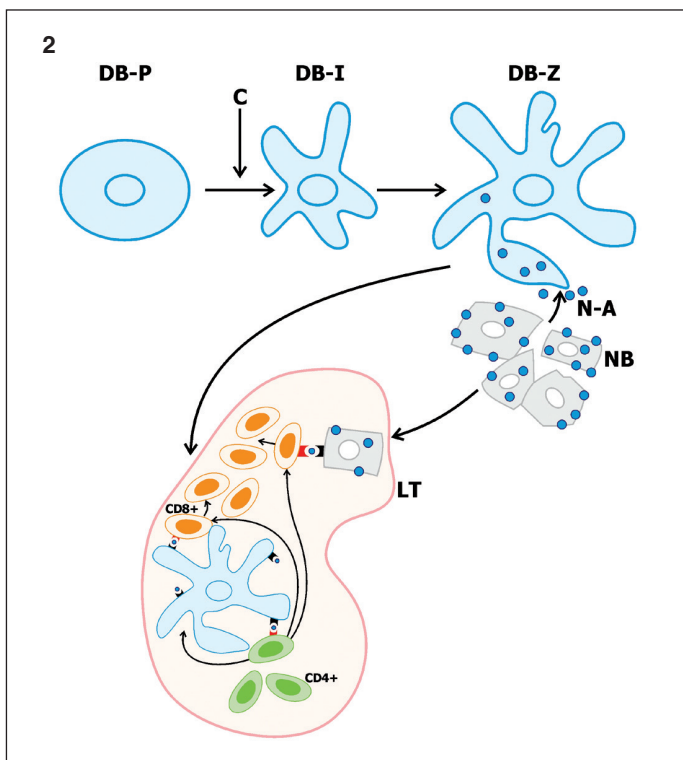
Aby byly buňky T aktivovány, musí jim být nabídnut antigen ve formě krátkých peptidů ve spojení se specializovanými molekulami nazývanými hlavní histokompatibilní komplex (Major Histocompatibility Complex, MHC). Jsou vysoce různorodé (polymorfni), což se projevuje tím, že molekuly MHC rozdílných jedinců vážou různé peptidy z degradovaných antigenů (viz dále). Rozeznáváme MHC I. a II. třídy, které se liší jak svým uspořádáním, tak svou funkcí. MHC I. třídy prezentují antigeny endogenního původu (např. virové či nádorové) ve formě peptidů o délce 8–10 aminokyselin. Ty reagují s lymfocyty T CD8+, které nesou receptor komplementární k prezentovanému antigenu. Molekuly MHC II. třídy nabízejí imunitnímu systému antigeny jako peptidy o něco delší, tvoří je 11–15 amino-

kyselin. Reagují s odpovídajícími receptory lymfocytů T CD4+.

Popsané interakce samy o sobě k aktivaci lymfocytů T nestačí. K ní je zapotřebí účasti dalšího hráče, tzv. kostimulačních molekul, které skýtají potřebný druhý signál. Nejznámějšími z nich jsou molekuly B7.1 a B7.2. Spojují se s povrchovou molekulou lymfocytů T označenou jako CD28 (obr. 1). Rozhodující význam pro vznik imunitní odpovědi mají tzv. buňky prezentující antigen (Antigen Presenting Cells — APC). Nejdůležitější z nich jsou tzv. dendritické buňky, které se po kontaktu s antigenem a jeho zpracováním mění, dozrávají a vcestují do lymfatických uzlin (obr. 2). Tam pak dochází k aktivaci lymfocytů T a k jejich pomnožení. Aktivované lymfocyty posléze vycestují do krevního a lymfatického oběhu.

Buňky nádorů jsou špatnými APC. Jedním z důvodů, proč imunitní systém nerozpozná nádorové antigeny, je nepřítomnost kostimulačních molekul (až na výjimky). Další překážkou může být u některých nádorů produkce látek (např. mucinu), které brání kontaktu s lymfocyty T. Kromě toho mají nádorové buňky na svých površích snížené množství molekul MHC I. třídy. Důsledkem nedokonalých interakcí, hlavně však chybění druhého signálu, je stav funkčního selhání (anergie) lymfocytů T, které hrají rozhodující roli při ničení nádorových buněk (obr. 3). Schopnost organismu reagovat s nádorovými antigeny je tak snížena. V této souvislosti se hovoří o imunologické toleranci.

Obecně se přijímá, že pro vývoj protinádorové imunity nestačí tradiční výše popsaný dvousignálový model. Třetím signálem, o němž se předpokládá, že je nezbytný pro překonání imunologické tolerance, je „poplašný signál“, který přeměruje T buňky do místa, kde se množí nádorové buňky, a vyvolá zánět. Takové signály vysílá např. virová či parazitární infekce nebo různé komponenty bakterií, ale i dvousřoubovicová RNA či určité sekvence DNA, ať již bakteriálního původu nebo připravené synteticky. Následkem zánětu je rozrušení části nádorových buněk provázené uvolněním



Obr. 2 Pro protinádorovou imunitu jsou rozhodující lymfocyty T CD8+. Po kontaktu s antigenem se buňky prezentující antigen — APC (Antigen Presenting Cells) aktivují a vcestují do lymfatických uzlin. V nich dochází k aktivaci CD4+ i CD8+ buněk. Aktivované CD4+ buňky napomáhají dozrávání APC a expanzi buněk CD8+. DB-P — prekurzorová dendritická buňka (DB), DB-I — intermediální (přechodná) DB připravená k pohlcení a zpracování antigenu, DB-Z — zralá dendritická buňka, NA — nádorové antigeny, NB — nádorové buňky, NA — nádorový antigen, LT — lymfatická tkáň (pozn.: velikosti jednotlivých útvarů neodpovídají skutečným poměrům)

nádorových antigenů. Buněčné fragmenty jsou pak pohlceny APC. Rozvoj imunitního procesu napomáhají cytokiny (molekuly přenášející signály mezi buňkami), které se při popsanych pochodech uvolní.

I když se však imunita proti nádorovým antigenům vytvoří, nemusí se uplatnit. Již zmíněná nízká koncentrace molekul MHC I na povrchu nádorových buněk je činí málo viditelnými pro výkonné složky imunitního systému, jimiž jsou hlavně cytotoxické lymfocyty T CD8+. Úniku imunitního systému dále napomáhá skutečnost, že se v nádorech tvoří látky, které brání zrání APC a potlačují specificky aktivované lymfocyty T. Do jisté míry je tak neodpovídavost (= nepřítomnost imunitní odpovědi) na nádorové antigeny výsledkem aktivních procesů probíhajících v prostředí nádoru. Imunitu potlačující (imunosupresivní) faktory jsou produkovány nejen vlastními nádorovými buňkami, ale i buňkami pojivové tkáně a makrofágy, které do nádoru pronikají, a jejich tvorba může být podnícena i v samotných dendritických buňkách. Takové molekuly se někdy označují jako koinhibiční (opak molekul kostimulačních). Množství imunosupresivních faktorů je přímo úměrné velikosti nádorů. Ale to ještě není vše. V průběhu růstu nádorů se mohou objevit mutantní buňky, které ztratily nádorový antigen, takže je specifické imunitní reakce nemožnou postihnout. Takové buňky mají v částečně imunním prostředí selekční výhodu a brzy se stávají v populaci

nádorových buněk dominantními. Pokud někomu připomíná taková situace vznik bakteriálního mutantu rezistentního k použitému antibiotiku, není daleko od pravdy.

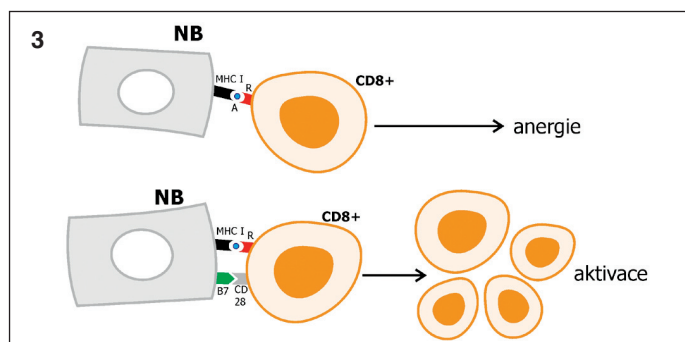
Nebezpečí vzniku imunorezistentních klonů je podstatně menší tam, kde je nádorový antigen součástí proteinu zodpovědného za udržení fenotypu nádorové buňky (tzv. onkoproteinu). Jak však ukazují některá, byť zatím vzácná pozorování, i v jejich případě se mohou objevit mutanty postrádající původní nádorový antigen. Nádorová buňka je totiž ze své podstaty geneticky nestabilní a může dojít k mutaci, která pozmění důležité antigenní determinanty onkoproteinu, aniž by narušila jeho funkčnost, anebo aktivuje odlišnou biochemickou dráhu, která udrží zhoubný potenciál buňky jinými prostředky. Jinými slovy, dojde k selekci buněčných klonů pozměněných tak, že se jejich onkogenní potenciál stane nezávislým na původním spouštěcím mechanismu.

S problémem antigenní variability nádorové buňky se lze do jisté míry vyrovnat tím, že vakcína obsahuje více než jeden nádorový antigen, pokud jsou ovšem takové antigeny známy. Příkladem mohou být zhoubné kožní nádory melanomy. Obsahují nejméně tři typy antigenů, jež mohou být terčími imunoterapeutických zásahů. Označují se jako antigeny diferenciací (charakteristické pro melanocyty, tj. buňky, ze kterých melanomy vycházejí), nádorové specifické (nacházejí se i v jiných nádorech, ale nikoli v normálních tkáních s výjimkou varlat) a jedinečné (vznikají mutacemi různých buněčných genů a liší se nádor od nádoru).

Je povzbudivé, že alespoň v některých situacích předchozí setkání organismu s antigeny nádorových buněk neznemožňuje imunizační účinek. Tolerance je zřejmě spíše kvantitativní než absolutní. Jsou známy situace, kdy v nádorových buňkách dojde k nadbytečné produkci některých buněčných proteinů. Z experimentálních prací, ale i z prvních klinických studií, se ví, že se takové buňky mohou stát terčem imunitních reakcí organismu. Daří se vyvolat je vhodnými vakcínami. Pro tento jev, v anglosaské literatuře popisovaný jako antigen overexpression, se snažíme zavést český termín „stav přetížení antigenem“. Nejspíš jakýkoli antigen, který v nadbytku vytvářejí nádorové buňky, může být rozpoznán imunitním systémem, je-li prezentován ve správném kontextu.

V posledních dvou desetiletích byl proveden velký počet klinických studií s protinádorovými terapeutickými vakcínami. Přinesly množství výsledků, od zcela nega-

*Obr. 3 Interakce mezi antigenem (A) nádorových buněk (NB) a buňkami T v nepřítomnosti kostimulačních molekul (B7) vede k nedostatečné obranné reakci organismu (anergii)*



tivních až po ty, které bychom mohli označit jako úspěšné. Nejvíce klinických zkušeností je s léčbou melanomů a nádorů ledvin, ale spektrum zhoubných nádorů, které jsou předmětem zájmu, se neustále rozšiřuje. V centru pozornosti je karcinom děložního čípku, ale i další nádory vyvolané viry. Ty většinou obsahují dobře charakterizované virové proteiny, které se nabízejí za cíl imunitnímu systému. Jak jsme si už pověděli v první části, u nádorů vyvolaných viry jsou nositeli nádorových antigenů virové onkoproteiny zodpovědné za vznik a udržení zhoubného charakteru nádorové buňky. Nebezpečí antigenních variací, které by nenarušily jejich funkci, je proto menší než u jiných nádorů.

Jiným zhoubným onemocněním vhodným pro imunoterapii je chronická myeloidní leukemie. Klíčovou roli v její patogenезi hraje translokace mezi chromozomy 9 a 22, jejímž důsledkem je vznik fúzního genu (označuje se *bcr-abl* — zkratky fúzujících genů). Produkt tohoto genu zajišťuje jak nádorovou přeměnu (transformaci) buňky, tak udržení stavu transformace. Vzniká nová aminokyselinová sekvence, která nemá obdobu u žádného z dosud známých proteinů. Lze si představit, že takové místo by mohlo být terčem imunitních reakcí organismu.

### Strategie vývoje protinádorových terapeutických vakcín

Podat úplný přehled dosavadních zkušeností s terapeutickými vakcínami by zabralo nesmírně mnoho místa. Navíc jde o velmi nesourodý soubor údajů. Vývoj a vlastnosti používaných vakcín se mění nejen nádor od nádoru, ale od studie k studii. Ty se dále liší složením pacientů, jejich klinickým stavem, počtem a velikostí podaných dávek, způsobem hodnocení atd. Provedené studie navíc vycházejí z různých teoretických koncepcí, které se nevyhnutelně promítají do klinických protokolů a kritérií úspěšnosti. Není proto překvapením, že možnosti vyvodit obecnější závěry z dosavadní výzkumné práce jsou notně omezené. Přesto se pokusíme několik takových závěrů formulovat:

- Nádory se liší svou vnímavostí k účinku terapeutických vakcín.
- Prozatímní úspěchy jejich užití nejsou nikterak dramatické, nicméně v mnoha studiích se podařilo dosáhnout pozitivního efektu u různě velké části pacientů.
- Podařilo se nalézt a uplatnit různé způsoby zvýšení účinku vakcín.
- Vývoj a hodnocení účinků vakcín je jednodušší, pokud známe nádorové antigeny; jsou však situace, kdy lze proti nádorům imunizovat, aniž bychom znali povahu nádorových antigenů.
- Indukce imunity proti nádorovým antigenům se dá velmi často prokázat testy *in*

*vitro*, klinická odezva se však projeví podstatně méně často; to naznačuje důležitost kvality protinádorové imunity.

- Nitrokožní podání protinádorových vakcín je účinnější než podání jinou cestou.
- Vzhledem k tomu, že únik nádoru imunitnímu systému je dán nejen nedostatečnou imunogeností nádorových antigenů, ale i imunosupresí v místě nádoru, měly by být snahy o protinádorovou aktivní imunizaci provázeny dalšími zásahy, které by zlepšily podmínky pro lokální uplatnění imunitních reakcí.

V následující části se pokusím popsat hlavní přístupy používané k vývoji terapeutických vakcín. Většinou vycházejí z metodologie genového inženýrství.

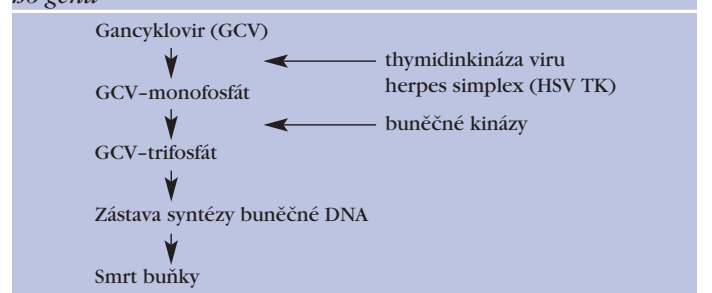
### Buněčné vakcíny

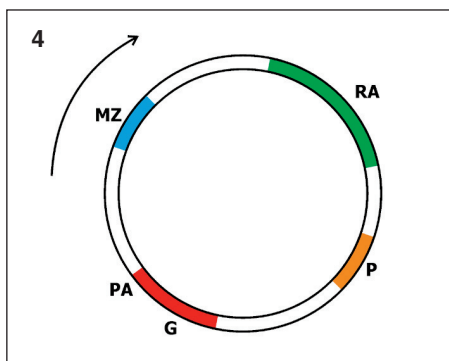
Jako buněčné vakcíny se dají použít suspenze usmrcených, nemodifikovaných nádorových buněk získaných buď přímo z nádorů, nebo kultivovaných *in vitro*. Jejich výhodou je, že není potřeba znát nádorový antigen a že se dá imunita navodit současně proti několika nádorovým antigenům. Tím se snižuje nebezpečí vzniku antigenních mutantů, které unikají reaktivitě imunizovaného organismu, což je problémem všech typů vakcín zaměřených proti jednomu nádorovému antigenu.

Daleko častěji než prosté nádorové buňky se nyní používají buňky upravené vnesením genů kódujících různé imunostimulační faktory. Jejich působením se zvyšuje lokální prezentace nádorových antigenů imunitnímu systému či se předávají stimulační signály buňkám důležitým pro imunitní odpověď. Protinádorový účinek různých cytokinů je znám již delší dobu, ale jejich toxicita brání systémovému podávání. Vpravením genů přímo do buněk nádoru se zajistí vysoká lokální koncentrace cytokinů, čímž se podstatně zvýší šance na specifickou aktivaci imunitního systému, aniž by se dostavily vedlejší účinky. Geny pro imunostimulační faktory lze vpravit přímo do nádoru *in situ*, ale nejčastěji se nádor vyjme, jeho rozvolněné buňky se ošetří *in vitro* a vpraví zpět do organismu. K dosažení účinku lze použít i allogenních buněčných linií, které sice ztrácejí oproti vakcínám připraveným z vlastních nádorových buněk pacienta (autologních buněk) některé zásadní přednosti, ale mají i určité výhody. Mezi ně patří standardní příprava, snadnější biologická kontrola a možnost kombinace různých linií, které obsahují různé antigeny stejného typu nádoru, případně tvoří i různé cytokiny. K vyvolání vysoké lokální koncentrace cytokinů se dají užít i geneticky modifikované cizorodé buňky, které se vpraví do místa nádoru.

Produkce cytokinů vede často ke ztrátě onkogenních vlastností buněk. Přestože u zví-

*Tab. 1 Mechanismus usmrcení buňky produktem sebevražedného genu*



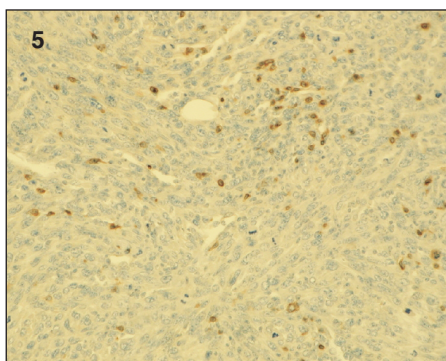


Obr. 4 Schéma plazmidu. Pro použití k vakcinaci musí být plazmid upraven tak, aby byla zaručena exprese zvoleného genu v savčích buňkách. MZ — místo začátku replikace plazmidu. RA — gen pro rezistenci na antibiotikum. Jeho produkt umožňuje selektivní pomnožení bakterií, které nesou upravený plazmid. P — promotor, který umožní účinný přepis genetické informace v savčích buňkách, G — gen pro antigen naší volby. PA — polyadenylační signál, který stabilizuje přepsanou genetickou informaci a zajišťuje její překlad v protein. Šipka ukazuje směr replikace. Všechny orig. G. Mísařové

řat se ukázaly být živé, geneticky modifikované nádorové buňky účinnější než buňky usmrcené ozářením nebo jejich lyzáty, z etických důvodů se prozatím v humánní medicíně s užitím živých nádorových buněk nepočítá. V některých případech se paradoxně ukázalo, že se v ozářených buňkách může produkovat imunostimulační faktor alespoň přechodně zvýšit.

Do upravovaných buněk lze vpravit i sebevražedné geny, tj. takové, jejichž produkty činí buňku vnímavou k toxickému účinku jinak neškodných substancí. Jejich prototypem je gen pro thymidin-kinázu viru herpes simplex (HSV TK). Jeho produkt fosforyluje některé deriváty nukleosidů jako jsou acyklovir a gancyklovir, běžně používané k léčbě nemocí vyvolaných herpetickými viry. Z vytvořených monofosfátů buněčné kinázy vyrobí vysoce cytotoxické trifosfáty. Nádorové buňky, do kterých byl zaveden gen pro HSV TK, jsou podáním uvedených antivirotik zničeny (tab. 1). Při hynutí buňek se navíc uvolňuje velké množství nádorových antigenů a některých cytokinů, v místě nádoru dojde k nekróze a zánětu, čímž se vytvářejí podmínky pro vznik protinádorové imunity. Čtenáře asi napadne, že by bylo vhodné zavést do buňky současně sebevražedné geny a geny pro imunostimulační faktory. Takové pokusy byly skutečně provedeny a v některých systémech se prokázal synergický efekt produktů těchto genů. Z důvodů, které dosud neznáme, se však u jiných experimentálních nádorů takový účinek neprojevil.

Zvláštním příkladem buněčných vakcín jsou vakcíny připravené pomocí tzv. onkolýtických virů. Označujeme tak viry, které se díky svým přirozeným vlastnostem, nebo v důsledku genových manipulací množí pouze nebo daleko lépe v nádorových buňkách. Podle pozorování z posledních let takto rozrušené nádory anebo lyzáty z nádorových buněk připravených *in vitro* vyvolávají silnou imunitní reakci — snad proto, že slabé nádorové antigeny jsou prezentovány imunitnímu systému současně se silně imunogenními virovými antigeny a že se rozvoji imunitní odpovědi dostává potřebného trétiho signálu (viz výše).



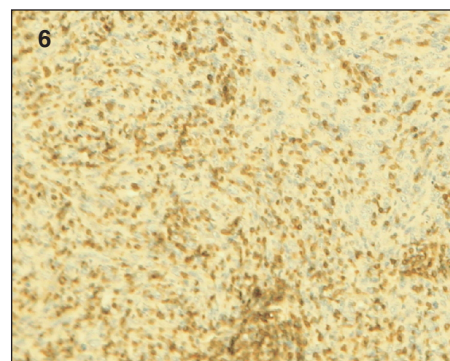
Obr. 5 Histologické vyšetření nádorů vyvolaných u myši buňkami transformovanými lidským papillomavirem. Řez nádorem neléčeného zvířete (velikost nádoru 7×6×2 mm) ♦ Obr. 6 Řez podstatně menším nádorem (3×2×2 mm) zvířete léčeného dvěma dávkami vakcíny s modifikovaným genem pro nádorový antigen E7. Oproti kontrole je patrná významně zvýšená přítomnost lymfocytů T. V obou případech byly nádory vyňaty 31. den po inokulaci buněk. (Ošetřeno krysí anti-CD3 protilátkou a sekundární protikrysí králičí protilátkou s navázaným biotinem. Dobarveno komplexem streptavidin-peroxidáza a DAB). Snímky Š. Němečkové a J. Jelínka

Jedny z nejvíce povzbudivých výsledků s buněčnými vakcínami poskytla nedávno dokončená studie v Německu. Buňky z chirurgicky odebraných nádorů ledvin byly *ex vivo* opracovány cytokinem, který se označuje jako interferon, čímž se podstatně zvýšila jejich imunogennost. Lyzáty těchto buněk pak byly opakovaně vpraveny pacientům, od nichž nádory pocházely. Pětileté sledování několika set imunizovaných a standardně léčených pacientů ukázalo, že vakcinace významně prodloužila dobu přežití.

Jiný typ protinádorových vakcín je založen na extraktech z nádorových buněk připravených tak, aby byly bohaté na tzv. protein tepelného šoku (HSP70), který má silný imunostimulační účinek. Kvůli své povaze a funkcím na sebe HSP70 váže buněčné proteiny, mezi nimi i ty, které nesou nádorově specifické antigeny. Výhodou takových vakcín je, že nevyžadují znalost nádorových antigenů.

#### Vakcíny z dendritických buněk

Jak už bylo uvedeno, dendritické buňky (DB) jsou nejdůležitějšími mezi buňkami prezentujícími antigen. Obsahují 50× více molekul MHC než makrofágy a na svém povrchu mají velké množství kostimulačních molekul. Jde o různorodou skupinu buněk, které se liší nejen svou anatomickou lokalizací, ale i svými povrchovými vlastnostmi a funkcí. Jsou rozptýlené ve většině tkání. Vedle DB, které stimulují imunitní odpověď, existují i takové, které ji potlačují. Tyto buňky hrají klíčovou roli při aktivaci T lym-



focytů (viz výše), dokáží překonat toleranci k vlastním antigenům. To se týká i některých antigenů, které jsou pro svou povahu málo imunogenní. Dendritické buňky proto zaslouženě zaujímají jedno z předních míst ve vývoji protinádorových vakcín. Nevýhodou vakcín na bázi DB je však složitost přípravy a z toho plynoucí vysoké náklady. Z 50 ml krve lze získat pouze asi 5×10<sup>6</sup> DB. V nedávné minulosti se podařilo vypracovat metody kultivace DB *in vitro*. To podstatně zlepšuje vyhlídky.

Dendritické buňky mohou pohlcovat i větší fragmenty buněk nesoucích nejrůznější proteiny, včetně těch, které nesou nádorově specifické antigeny a dokonce i celé mrtvé či hynoucí buňky. Geny pro nádorové antigeny se dají vnést do DB pomocí rekombinantních virů či plazmidů. Výhodami takto aktivovaných DB je vysoká koncentrace antigenu, jeho přirozená konformace a trvalá produkce až do zániku těchto buněk. Po úspěšných pokusech na zvířatech probíhají v současné době klinické studie s aktivovanými DB u pacientů s melanomem, karcinomem prostaty, karcinomem děložního čípku, krevními malignitami a dalšími nádory. Optimální strategie využití DB k léčbě nádorů se však stále hledá.

#### DNA vakcíny

Jako DNA vakcíny označujeme bakteriální plazmidy (malé kruhové genetické elementy bakteriálního původu), do nichž byl zabudován gen pro ochranný antigen (obr. 4). DNA vakcíny se zpočátku označovaly jako genetické vakcíny, ale později byly pod tento název zahrnuty všechny vakcíny připravené metodami genového inženýrství. V případě protinádorové DNA vakcíny musí plazmid obsahovat genetickou informaci pro specifický nádorový antigen. Aby bylo možné takovou vakcínu konstruovat, musí být k dispozici naklonovaný gen pro protein nebo jeho část nesoucí nádorový antigen. Protinádorovým DNA vakcínám se věnuje vzrůstající pozornost pro jejich obecné výhody (tab. 2).

DNA vakcíny se vpravují do organismu různými způsoby. Neúčinnější se zdá být očkování do kůže, což je dáno hustotou APC v tomto orgánu. Imunizační účinek DNA vakcín byl nade vše pochybnost prokázán v různých experimentálních systémech, přičemž se získalo velké množství poznatků o mechanismech, které se uplatňují při vyvolání imunitní odpovědi a o její povaze. Přesto zůstává otevřeno mnoho otázek spojených s podáním DNA vakcín. Např. se dosud nepodařilo objasnit, proč jsou daleko méně účinné u primátů než u hlodavců nebo skotu. V současné době probíhá řada klinických studií, v nichž jsou DNA vakcíny testovány proti různým nádorům jako jsou např. karcinom tlustého střeva, karcinom prostaty,

Tab. 2 Hlavní výhody DNA vakcín

1. Nízké náklady spojené s výrobou
2. Vysoký stupeň stability, k transportu a skladování není zapotřebí chladového řetězce
3. Přirozená konformace vytvořeného proteinu
4. Stimulace humorální i buněčné imunity
5. Možnost imunizace v přítomnosti protilátek
6. Možnost přípravy vakcín proti antigenům, v jejichž případě nelze připravit vakcíny klasickými postupy
7. Možnost přípravy vakcín imunizujících současně proti několika antigenům

nádory z lymfatické tkáně (lymfomy) a karcinom děložního čípku.

### Peptidové vakcíny

Peptidové (též syntetické) vakcíny jsou krátké aminokyselinové sekvence nesoucí důležité antigenní determinanty. Hlavní výhody těchto preparátů spočívají v tom, že jsou definované, stabilní a bezpečné. Nejdůležitějším předpokladem v jejich vývoji je poznání aminokyselinových sekvencí, které reprezentují antigeny, o něž nám jde. K tomu máme k dispozici řadu biochemických postupů a počítačové programy. Ačkoli se daří peptidovými vakcínami generovat vysoké počty buněk T specifických pro daný antigen (více než 5 %), klinická účinnost bývá nízká. Souvisí to s malou šíří imunitní odpovědi zaměřené pouze k jedné antigenní determinantě. Zvýšení imunogenity syntetických vakcín pomocí vazby na různé nosiče znamená ztrátu části výhod, jimiž se tento typ vakcín pyšní. Jejich humánní využití komplikuje už zmíněný polymorfismus molekul MHC, který rozhoduje, jaké sekvence aminokyselin jsou nabídnuty imunitnímu systému.

Co se týče protinádorových peptidových vakcín, je nutná znalost rozhodujících determinant nádorového antigenu. Ty se podařilo stanovit u virových onkoproteinů a též u produktů některých mutovaných onkogenů. Zkušenosti s takovými vakcínami u lidí jsou zatím omezené. Polymorfismus molekul MHC se podařilo obejít u pacientů s chronickou myeloidní leukémií použitím směsi různých peptidů, jež spojuje pouze to, že obsahují aminokyselinovou sekvenci fúzního místa produktu zmíněného hybridního genu *bcr-abl*.

### Vakcíny ze živých rekombinantních virů a bakterií

Principem rekombinantních vakcín je úspěšné vpravení genu pro nádorový antigen do genomu vysoce oslabeného viru či bakterie tak, aby se zachovala životnost příslušného infekčního agens a při jeho pomnožení došlo k expresi vneseného genu. Samozřejmým předpokladem je nepatogenost vektoru. Jeho příliš silné oslabení je bohužel často spojeno s nízkou schopností množit se v imunizovaném hostiteli. To snižuje imunogenost některých už připravených vakcín tohoto typu. Výhodou vakcín z živých infekčních činitelů je, že dodávají poplašný signál, čímž vytvářejí podmínky pro silnou imunitní odpověď.

Při přípravě rekombinantních vakcín se nejvíce používá viru vakcinie, který byl užíván k prevenci pravých neštovic. Především je velmi málo patogenní pro člověka a genové manipulace potřebné pro rekombinaci ho dále oslabují. Další velkou výhodou je, že virus má o hodně více genů, než kolik jich nezbytně potřebuje pro replikaci. Některé z nadbytečných genů mohou být nahrazeny geny pro nádorové antigeny a jiné geny pro imunostimulační faktory. Produkty některých postradatelných genů viru vakcinie zabraňují rozvoji imunitní odpovědi. Těchto genů se lze zbavit dalšími cílenými genetickými manipulacemi. Práce s virem je spojena s nízkými náklady a k dispozici jsou účinná média pro výběr vhodných rekombinantů. Navíc lidstvo má s virem vakcinie více než dvěstěleté zkušenosti, což má nemalý psychologický význam. Další rekombinantní vakcíny byly zkonstruovány z adenovirů a alfavirů (čel. *Togaviridae*).

Rekombinantní viry vakcinie a geneticky modifikované adenoviry byly použity k léčbě několika lidských nádorů (např. karcinomu děložního čípku či prostaty). Aplikací se podařilo vyvolat či zvýšit reaktivitu proti specifickým nádorovým antigenům, klinická účinnost však nebyla příliš výrazná.

Mezi bakteriemi, o kterých se nejvíce uvažuje v souvislosti s vývojem živých rekombinantních vakcín, jsou salmonely — *Listeria monocytogenes* a *Mycobacterium bovis*. Využití vakcín na jejich bázi k léčbě nádorů je v počátcích.

### Vakcíny připravené v rostlinách

Díky rozvoji rostlinných biotechnologií se daří v posledních letech navodit produkci různých virových, bakteriálních a živočišných proteinů u rostlin. Pro výrobu vakcín nabízejí rostliny lákavé výhody. Patří mezi ně nízké náklady (odhaduje se, že by byly 100–1 000× levnější než běžné vakcíny), možnost perorálního podání (odtud název jedlé vakcíny — více Živa 2003, 4: 150–152), jež by zaručilo vznik slizniční imunity, možnost současného vyvolání imunity proti několika chorobám, stabilita a bezpečnost.

Navzdory výzkumnému úsilí se prozatím nepodařilo vyřešit všechny problémy, které s přípravou rostlinných vakcín souvisejí. Hlavním nedostatkem je nízká tvorba cizích proteinů. Mnozí věří, že jej pomůže vyřešit využití fotosyntetických organel rostlin — chloroplastů (obsahují kruhovou DNA, množí se semiautonomně, rostlinná buňka obsahuje až 10 000 chloroplastů). Díky zmíněným vlastnostem by se právě tyto organely mohly stát vysoce účinnými producenty cizích proteinů.

Jako v případě jiných nových systémů pro přípravu vakcín, uvažuje se i o rostlinných protinádorových vakcínách. U několika různých druhů rostlin se již podařilo vyvolat tvorbu některých nádorových antigenů. Např. u tabáku a u brambor byly připraveny antigeny lidských papillomavirů a byla prokázána jejich imunogenost. Zatím však jde o počáteční studie. Na definitivní zhodnocení možnosti konstruovat protinádorové vakcíny na rostlinách si budeme muset ještě nějaký čas počkat.

### Jak dál

Přes vskutku obrovské úsilí, které se věnuje vývoji terapeutických protinádorových vakcín, nemůžeme jejich přípravu a využití ani zdaleka pokládat za vyřešené. Velkým nedostatkem dosavadních studií je jejich nestejnoročnost. Protokoly, podle kterých pracovaly různé výzkumné skupiny, se podstatně liší a někdy působí improvizovaným dojmem. Výsledky se proto velmi obtížně porovnávají. Významnou vadou většiny studií je, že nebyly provedeny přesně podle pravidel pro kontrolované klinické studie, což při malých souborech pacientů mohlo narušit spolehlivost hodnocení. Dosažené výsledky dále zkresluje skutečnost, že se vakcíny většinou podávají pacientům s velmi pokročilou chorobou, u kterých selhaly jiné způsoby terapie. Velmi pravděpodobně by imunoterapie byla účinnější v počátečním stadiu nemoci. Jak jsem uvedl výše, nádory působí imunosupresivně a tento jejich efekt je přímo úměrný rozsahu chorobného procesu. Protinádorová vakcinace bude mít tudíž největší naději na úspěch, bude-li správně načasována, tj. bude-li provedena u pacientů s malým počtem nádorových buněk. To podstatně zvýší poměr mezi specificky aktivovanými buňkami imunitního systému, produkce nádorových imunosupresivních faktorů bude minimalizována a sníží se pravděpodobnost vzniku antigenních mutantů. Taková situace, vhodná pro terapii, nastává ve dvou obdobích vývoje nádoru — poprvé v nejranějším období jeho růstu, podruhé po jeho redukci chirurgickým zákrokem, zářením či chemoterapií.

V prvním případě se nádor klinicky neprojevuje a úvahy o léčbě nejsou na místě. Dobou, která se jeví být pro imunoterapii optimální, je tedy stav po potlačení onemocnění. Nádorové vakcíny asi nikdy v budoucnosti nenahradí jiné způsoby léčby, ale mají velkou naději stát se jejich standardním doplňkem, přinejmenším u některých typech nádorů. Pravděpodobnost vyléčení se tím podstatně zvýší.

Co je třeba pro urychlení vývoje terapeutických protinádorových vakcín? Domnívám se, že především je to prohloubení znalostí o mechanismech protinádorové imunity a podmínkách pro jejich uplatnění. Přízně si, že jsme teprve na začátku cesty. Naše dosavadní poznatky jsou převážně kvalitativní. Bez hlubšího poznání kvantitativních aspektů molekulových a buněčných procesů spojených s nádorovými procesy a znalostí vzájemných interakcí těchto dějů v čase a prostoru nenastane zásadní zvrat ve vývoji a širším uplatnění protinádorových vakcín. Je zapotřebí nových modelů, které umožní poznat složitou situaci v prostředí nádoru, v němž vznikají podmínky pro lokální potlačení imunitní odpovědi. Zvláště důležité je objasnit mechanismy, které omezují aktivaci, rozšíření a výkonné funkce specificky aktivovaných lymfocytů T. Dalšími nezbytnými předpoklady je prohloubení vědomostí o biologii nádorů a stále tvůrčí uplatňování pokroků imunologie. Klinický výzkum protinádorových vakcín by měl pokračovat v neztenčeném (nebo raději větším) měřítku a měla by při něm být důsledně respektována pravidla pro kontrolované klinické studie nezaměřené pouze na pacienty v pokročilém stadiu choroby. Mezi výzkumnými skupinami by měly být dohodnuty jednotné protokoly pro vakcinaci, což by ovšem nemělo bránit paralelnímu zkoušení jiných vakcinačních schémat, a měla by se sjednotit kritéria úspěšnosti. Velkou pozornost je nutné věnovat korelacím mezi klinickým průběhem nemoci a imunitními reakcemi měřitelnými *in vitro*, přičemž analyzovaný materiál by neměl pocházet jen z krve, ale i z nádorové tkáně a lymfatických uzlin.

Mnozí soudí — a s nimi se shoduje autor tohoto článku — že na jednom z prvních míst dalšího vývoje by se měly ocitnout vakcíny z autologních, geneticky modifikovaných buněk, které zajistí vystavení imunizovaného pacienta celému spektru nádorových antigenů, a to za podmínek, které budou přát silně imunitní odpovědi. Příprava takových vakcín bude vyžadovat zvláštní pracovní režim, který není možný bez speciálně vybaveného pracoviště. V zahraničí už byly vypracovány návrhy, jak by takové pracoviště mělo vypadat. Jeho vybudování v areálu některé z našich velkých nemocnic s dobře fungujícím onkologickým oddělením je reálné a mělo by se přednostně uskutečnit.

Výzkumná práce autora je podporována grantem IGA MZ NR-9075-3 a Lígou proti rakovině.