

# Protinádorová léčiva IV

## „Biologická léčba“

Významnou skupinu cílených léčiv s vysoce specifickým účinkem tvoří tzv. biologická léčiva. Do této skupiny patří různé bílkoviny a oligopeptidy, především cytokiny, terapeutické protilátky včetně protilátek stimulujících imunitní systém, dále jsou sem řazeny vakcíny, T-lymfocyty upravené tak, aby na svém povrchu měly receptory rozeznávající antigeny nádorových buněk, přirozené i syntetické oligo- a polynukleotidy, nativní („divoké“) geny zkoušené jako náhrada mutacemi poškozených tumorsupresorových genů, genová terapie využívající geny zabudované do virů, plasmidů a jiných vektorů, buněčná terapie a využití onkolytických virů a bakterií. Léčiva s biopolymerním charakterem se v terapii (nejen protinádorové) uplatňují sice jen krátce, přesto si však již vydobily významné postavení a jejich význam neustále roste.

ATC klasifikace si s nimi zatím spíše neví rady. Starší biopolymerní léčiva řadí do skupiny L03 Imunomodulační látky, podskupiny A Imunostimulanty, která se dále člení na L03AA, Faktory stimulující kolonie (jde o růstové faktory, které stimulují růst kmenových buněk kostní dřeně a jejich diferenciaci na krvinky nebo jiné krevní buňky), L03AB Interferony, L03AC, Interleukiny a L03AX, Jiné imunomodulační látky. Novější biopolymerní léčiva pak jsou zařazena do ATC skupin L01XC Monoklonální protilátky a L01XX Jiná antineoplastika. Podle údajů Americké asociace farmaceutického výzkumu a výrobců PhMRA (<http://www.slideshare.net/PhRMA/biologics-2013>) bylo počátkem r. 2013 jen v USA (novější nebo celosvětová data nebyla zatím zveřejněna) ve vývoji 907 různých „biologických“ léčiv, z toho 328 protinádorových. Až 75% protinádorových léčiv ve fázi II a III klinického zkoušení a v registračním řízení má patřit mezi biologická léčiva a mezi nově povolovanými i již zavedenými přípravky představují „biologika“ významnou skupinu.

Rozvoj trhu biologických léčiv má před sebou určité překážky: patentovou ochranu dosavadních přípravků a zatím ne zcela vyjasněnou a nejednotnou problematiku povolování jejich napodobenin.

První generické napodobeniny biofarmak se objevily až v posledních letech. V Evropě jich bylo zatím povoleno 13, šlo však převážně o polypeptidická léčiva, která mají ve srovnání s terapeutickými protilátkami jednoduchou strukturu. V USA bylo první bioenerikum – bioekvivalentní filgrastim – povoleno až v březnu 2015 a jeho povolení vyvolalo hned soudní spor. Lékové agentury sice vydaly směrnice pro povolování biogenerik (EMA v polovině r. 2011, FDA v únoru 2012), ty však zatím nejsou sjednocené. Zatímco připravit přesné ekvivalenty nízkomolekulárních léčiv je relativně snadné, u biopolymerních látek s komplikovanou stavbou molekul to může být zcela nemožné. Světové lékové agentury proto ve svých směrnicích proto nepoužívají termín biogenerika, ale spíše „bionapodobeniny“ (biosimilars).

## Imunomodulační látky – cytokiny

**Cytokiny** (nazývané někdy lymfokiny) jsou malé regulační bílkoviny resp. glykoproteiny imunitního systému, jejichž funkce a interakce mají významnou roli při zánětlivých reakcích, astmatu, virových infekcích a také nádorových onemocněních. V současné době je známo na 200 cytokinů. Dělí se na **interleukiny**, **interferony**, **růstové faktory** a další typy cytokinů.

Zprvu byly tyto látky připravovány izolací (např. interferon  $\alpha$  z leukocytů aktivovaných virem Sendai), dnes jsou vyráběny převážně biotechnologicky pomocí bakterií nebo kvasinek s upraveným genomem. Rekombinantní cytokiny získávané pomocí bakterií nejsou glykosylované, k přípravě cytokinů obsahujících cukernou složku je třeba použít buňky vyšších organismů (nejdříve to byly leukocyty, nyní se většinou používají kvasinky). Některé cytokiny mohou mít několik podtypů, které se poněkud odlišují svojí strukturou, mají však stejné biologické účinky.

**Interferony** byly charakterizovány jako mediátory odezvy odpovědi organismu na infekci virem.

Mají řadu podtypů, které se liší zastoupením aminokyselin v polypeptidickém řetězci. Objeveny byly v supernatantu tkáňové kultury buněk inkubovaných s tepelně inaktivovaným chřipkovým virem. Degradují virovou RNA a inhibují syntézu bílkovin potřebných k množení viru. Kromě toho aktivují i některé buňky imunitního systému (makrofágy a tzv. „přirozené zabíječe“), podílejí se na regulaci růstu a diferenciaci buněk a mají cytotoxický účinek na některé nádorové buňky. Izolovány byly 3 hlavní typy interferonů (někdy jsou rozeznávány 4 typy), které mají řadu podtypů. **Interferon  $\alpha$**  (IFN $\alpha$ ) je v organismu produkován leukocyty, používá se zejména při léčbě maligního melanomu, nádorů ledvin a některých typů leukemií a lymfomů, mimo oblast onkologie k léčbě žloutenky typu C. Pacientům s melanomem se aplikuje jako podkožní injekce nejprve 5 x a pak 3 x týdně. Výhodnější je „pegylovaný“ interferon  $\alpha$  (s navázaným polyethylenglykolem), který má prodloužený biologický poločas a může se proto aplikovat jen 1 x za týden. **Interferon  $\beta$**  je produkován fibroblasty a buňkami epitelu, má podobné indikace jako interferon  $\alpha$ , vedle toho se začal používat k léčbě roztroušené sklerózy. **Interferon  $\gamma$**  vzniká v lymfocytech, využívá se při léčbě chronické lymfocytární leukémie, Hodgkinovy nemoci s většími či menšími úspěchy byl zkoušen při léčbě různých solidních nádorů. Použití interferonů  $\beta$  a  $\gamma$  v onkologii je však jen okrajové.

**Interleukiny** jsou glykoproteiny produkované bílými krvinkami, jejichž úlohou je zajištění komunikace mezi leukocyty.

Interleukinů je řada, některé z nich jsou protinádorově účinné a jsou proto předmětem a klinického zkoušení. Praktické uplatnění jako léčivo zatím nalezl zejména rekombinantní **interleukin 2**, rIL-2, aldesleukin (celmoleukin) tvořený 133 aminokyselinami. Mezi jeho účinky patří zvyšování účinnosti protilátek nebo aktivace buněk imunitního systému, jako jsou „přirozené zabíječské buňky“ (natural killer cells, NKC), které se tím stávají cytotoxické a mohou likvidovat nádorové buňky. Používá se k léčbě maligního melanomu a nádorů ledvin. K léčbě relapsů akutní myeloidní leukemie byla povolena zajímavá kombinace histamin dihydrochloridu s interleukinem 2 (histamin je mediátorem alergických reakcí, v kombinaci posiluje působení interleukinu na buňky imunitního systému). Účinným aktivátorem imunitního systému má být také interleukinový „koktejl“ obsahující IL-12, -15 a -18.

Z ostatních cytokinů stojí za zmínku především **tumory nekrotizující faktor**, TNF.

TNF má významné funkce v regulaci obranných mechanismů organismu. Zprostředkuje zánětlivé reakce a zvyšuje tělesnou teplotu. Jedna z jeho forem, TNF $\alpha$ , kachektin, může vyvolávat apoptózu nádorových buněk. Účinkem TNF $\alpha$  bývá někdy vysvětlována spontánní regrese, samovolné vymizení nádoru. I když byly protinádorové účinky TNF $\alpha$  po řadu let intenzivně studovány, jeho využití v protinádorové terapii nepřekročilo experimentální rámec. V některých případech sice bylo dosaženo pozoruhodných výsledků, na druhé straně se však ukázalo, že terapie je riziková. TNF $\alpha$  je odpovědný za kachexii (ochablost organismu) spojenou s nádorovým onemocněním, je také mediátorem septického šoku, revmatické horečky a autoimunitních a zánětlivých onemocnění. Pro jejich léčbu jsou dokonce připravovány látky, které TNF nebo jeho receptory blokují. Jejich použití je však kontroverzní, protože u léčených pacientů může narůstat výskyt nádorových onemocnění. Podobný účinek jako TNF má **TRAIL** (TNF-related apoptosis-inducing ligand), protein, který působí jako ligand vyvolávající buněčnou smrt.

**Kolonie stimulující faktory** (colony stimulating factors) jsou růstovými faktory kmenových buněk kostní dřeně.

Indukují jejich diferenciaci, ovlivňují diferencované buňky v různých stádiích dozrávání, ale také některé regulační procesy organismu. Název dostaly, protože v tkáňových kulturách vyvolávají růst kolonií hematopoietických buněk. Nemají cytotatický účinek, v protinádorové terapii se používají jako doplňkový lék k potlačení neutropenie, nedostatku neutrofilů (nejčastěji zastoupeného typu bílých krvinek), který bývá nežádoucím účinkem chemoterapie. Pacienti s nedostatkem neutrofilů trpí zvýšenou náchylností k infekcím. Používán je **filgrastim** (Neulasta, Amgen), rekombinantní faktor stimulující kolonie granulocytů G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), jeho analog s navázaným methioninem **tbo-filgrastim**, glykosylovaný G-CSF, **lenograstim**, zkoušen je glykosylovaný G-CSF s navázaným polyethylenglykolem **lipegfilgrastim**. Dále se používá také faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů, GM-CSF – **molgramostim** nebo glykosylovaný GM-CSF **sargramostim** produkovaný geneticky upravenými kvasinkami. U pacientů léčených těmito růstovými faktory se však poněkud zvyšuje riziko onemocnění akutní myeloidní leukemií (AML) a myelodysplastickým syndromem. Generický filgrastim (Zarxio, Sandoz) byl první „bionapodobeninou“ povolenou v USA, jeho schválení provázely soudní patentové spory.

Mezi růstové faktory patří i **epoetiny**, glykoproteiny produkované v ledvinách, které řídí tvorbu červených krvinek.

**Epoetiny** jsou zařazeny do ATC skupiny B03 Antianemika, používají se ale i v onkologii jako podpůrný prostředek k obnovení růstu červených krvinek. To je sice přínosem, protože se však množí údaje o zrychlení růstu nádorů a o zvýšeném počtu úmrtí pacientů s nádory prsu a děložního čípku po podání epoetinů bylo v r. 2008 doporučeno, aby bylo omezeno používání epoetinů v onkologii. V terapii se používá **epoetin  $\alpha$** , popř. stabilnější **darbepoetin  $\alpha$**  a **epoetin  $\beta$**  navázaný na  $\omega$ -methoxy-polyethylenglykol. Podobně jako u jiných růstových faktorů je jejich použití kontroverzní.

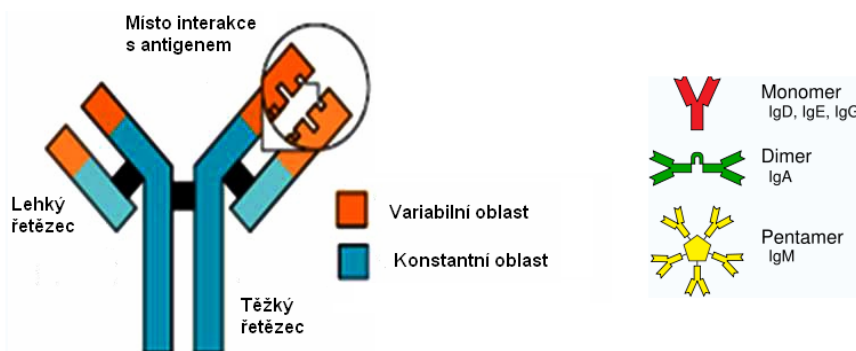
Kromě jednotlivých cytokinů se v terapii nádorů hlavy a krku zkouší (fáze III) i jejich směs **Multikine** obsahující IL-1, IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  a GM-CSF v definovaném složení a vzájemných poměrech.

## Monoklonální protilátky

Jeden z nejvýznamnějších přínosů pro protinádorovou terapii i diagnostiku představují **protilátky**. Jsou to bílkoviny, většinou glykosylované, které dovedou rozpoznávat **antigeny** (bakterie a viry cizorodé bílkoviny, ale i specifické bílkoviny, glykoproteiny nebo i polysacharidy na povrchu infikovaných nebo nádorových, ale někdy i normálních buněk), vázat se na ně a různými mechanismy nositele antigenů likvidovat. V protinádorové terapii mohou být protilátky využity různým způsobem. Mohou „neutralizovat“ **růstové faktory**, navázáním na samotný faktor nebo na jeho receptor, čímž zabrání předání signálu buňce, aby rostla a dělila se. Jiné protilátky mohou **aktivovat imunitní systém k zásahu proti nádorovým buňkám** nebo mohou posloužit **k nasměrování léčivých přípravků k nádorové tkáni**.

Základní jednotkou protilátek jsou **imunoglobuliny G (IgG)**, glykosylované plasmatické bílkoviny o molekulové hmotnosti asi 150 kDa, které mohou vytvářet dimery (IgA) nebo i pentamery (IgM).

IgG mají tvar písmene Y a jsou tvořeny dvojicemi stejných polypeptidických řetězců – „lehkých“ a „těžkých“, propojených disulfidickými můstky. Na konci lehkých řetězců jsou variabilní části, které rozpoznávají antigen.



Protilátky se tvoří po imunizaci zvířat nebo člověka antigeny. Vznikají v lymfocytech (bílých krvinkách) typu B. Ty jsou tvořeny různými populacemi (klony) buněk, takže vytvářené protilátky jsou **polyklonální**, tj. jsou směsí příbuzných bílkovin s různou afinitou k antigenu. Polyklonální protilátky bývají součástí vakcín. Když se po imunizaci pokusného zvířete (myš) získají ze sleziny lymfocyty B a působením polyethylenglykolu se spojí s nesmrtnými nádorovými (myelomovými) buňkami, které samy protilátky vytvářet nemohou, vzniknou fúzané buňky zvané **hybridomy**. Ty si zachovávají vlastnosti původních buněk – schopnost lymfocytů B vytvářet protilátky i schopnost nádorových buněk neomezeně se množit. Hybridomy se oddělí od nefúzaných myelomových buněk kultivací ve speciálním médiu, kde mohou růst jen slezinné buňky a hybridomy. Počet dělení slezinných buněk je však limitovaný, takže po určité době odumřou a v buněčné kultuře zůstanou jen hybridomy. Kultura se pak dále se množí v jamkách mikrotitračních destiček. Předtím se nařadí tak, aby se do každé jamky dostala jen jediná hybridomová buňka. Po namnožení se získají různé klony buněk. Klony v každé jamce jsou tvořeny stejnými buňkami, takže i protilátky jimi produkovány jsou identické, „**monoklonální**“. Protilátky produkovány každým klonem se otestují na schopnost interagovat s určitým antigenem. Po otestování se k další kultivaci vyberou hybridomy, které stabilně vytvářejí neúčinnější protilátky. Kultivace se provádí v tkáňových kulturách, může se ale provádět i *in vivo*. Přitom se hybridomové buňky injikují do břišní dutiny myši, kde pak dochází ke vzniku nádoru, který vylučuje protilátky do tzv. ascitické tekutiny. Z té se pak monoklonální protilátka izoluje. Za vývoj hybridomové techniky přípravy monoklonálních protilátek byli v r. 1984 César Milstein a Georges Köhler oceněni Nobelovou cenou.

**Monoklonální protilátky** jsou plasmatické glykoproteiny s jednotnou strukturou a stejným vysoce specifickým a selektivním účinkem. Lze je tedy považovat za chemická individua.

Názvy monoklonálních protilátek mají koncovku **-mab** (od **monoclonal antibody**, *antibody* je anglicky protilátka). Koncovce **-mab** předchází jedna nebo dvě hlásky, jimiž jsou protilátky blíže charakterizovány. Myší protilátky (koncovka **-omab**) se používají hlavně v diagnostice. Pro terapii nejsou vhodné, protože pro lidský organismus jsou cizorodými bílkovinami, které vyvolávají tvorbu jiných protilátek a následně nežádoucí imunitní reakce. Používají se proto jen výjimečně. Myší monoklonální protilátka byla sice povolena pro použití v humánní terapii již v r. 1986, ale následovníky v podstatě neměla. Byl to muromomab-CD3, protilátka proti receptoru CD3 na povrchu T-lymfocytů, buněk imunitního systému. Muromomab-CD3 byl používán jako imunosupresant k potlačení akutního odmítání transplantovaných orgánů organismem. Zkoušen byl i v protinádorové terapii, při léčbě akutní lymfocytické leukemie vycházející z T-buněk, v této indikaci však nebyl úspěšný. Účinný byl hlavně při prvním podání, při opakovaném podání docházelo ke snížení účinnosti a anafylaktickému šoku. Poměrně levné myší monoklonální protilátky byly později povoleny jen pro protinádorovou radioterapii, kdy protilátka slouží k nasměrování navázaných radioizotopů k nádoru a její imunogenita tolik nevádí.

Řešení problémů s nežádoucími imunitními reakcemi přineslo použití **rekombinantních monoklonálních protilátek**. Ty se získávají tak, že se připraví segmenty DNA kódující určité části protilátek. Řetězec DNA kódující variabilní část myší protilátky, která rozeznává antigen, se pak spojí s lidskou DNA kódující konstantní část protilátky. Pak se ještě může provést řízená mutagenese některých nukleotidů, která zajistí další „humanizaci“ rekombinantní protilátky. Produktem jsou buď „**chimérické protilátky (-ximab)** s lidskými těžkými řetězci a myšími lehkými řetězci nebo „**humanizované protilátky (-zumab)**, u nichž zůstává myší jen variabilní fragment lehkého řetězce protilátky.

V protinádorové terapii byly zkoušeny i chimérické protilátky se sníženou imunogenitou, které sestávají z variabilní oblasti protilátek primátů – opic makaků a konstantní části lidských protilátek.

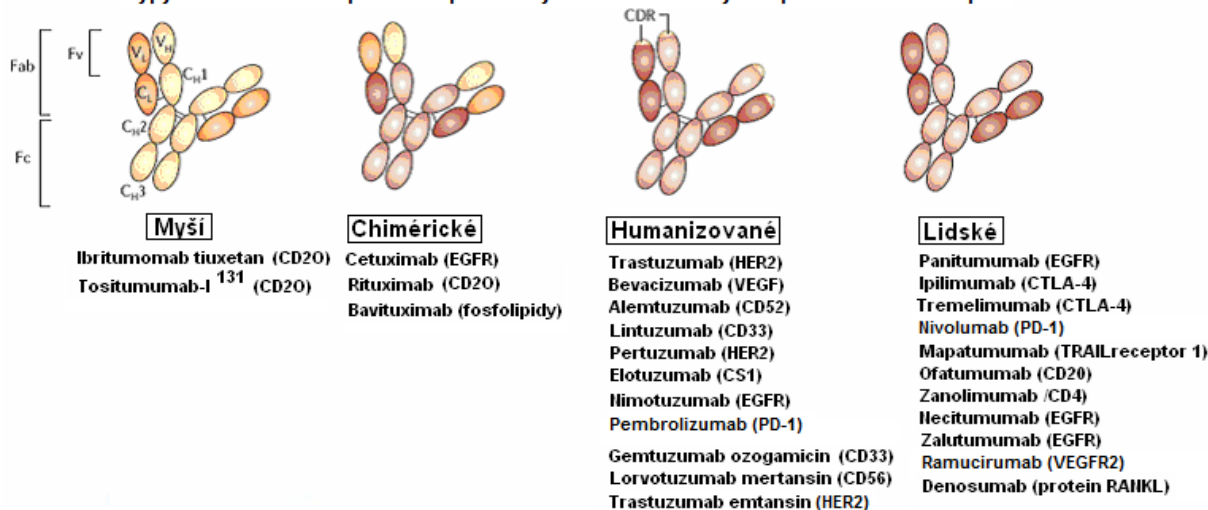
Rekombinantní DNA se vpravují pomocí vhodného vektoru do produkčních buněk, v nichž je gen kódující protilátku exprimován. Jsou to obvykle buňky vaječnicků čínského křečka (CHO) nebo myši myelomové buňky (NSO), někdy mohou být použity k produkci protilátek i kvasinky *Pichia pastoris* (bakterie, jako např. *E. coli*, neumí bílkoviny glykosylovat).

Produkční buňky pak při kultivaci v tkáňových kulturách (nebo dnes často i v jednorázových bioreaktorech) sekretují protilátky. Po vytvoření dostatečného množství protilátky se buňky odstředí, supernatant podrobí mikrofiltraci a protilátka se izoluje. Přitom se využívají různé chromatografické techniky, nejprve zpravidla afinitní chromatografie na imobilizovaném proteinu A (bílkovina izolovaná z kultur buněk zlatého stafylokoka) nebo proteinu G (rekombinantní streptokoková bílkovina), které se vyznačují vysokou afinitou k imunoglobulinům. Přitom se na sorbentu zachytí protilátky, zatímco jiné bílkoviny a další látky obsažené v médiu afinitním sorbentem protečou. Po eluci se získá protilátka až v 80% čistotě. Následuje snížení pH k inaktivaci retrovirů, přičemž se oddělí virové částice, další 1-2 chromatografické čistící stupně a nakonec mikrofiltrační krok k finální eliminaci virů.

Humanizované protilátky mohou obsahovat až 95% lidské bílkoviny. Pro humánní terapii jsou ovšem nevhodnější „zcela lidské“ protilátky (-umab). Ty by mohly teoreticky být získávány z hybridomů připravených fúzí lidských lymfocytů B a nádorových buněk. To ale není bez problémů, takže při jejich produkci dostalo přednost využití transgenních myši s lidskými geny nebo technika „fágové prezentace“ (phage display).

Ta využívá infekci bakteriálních buněk, obvykle *Escherichia coli*, modifikovanými bakteriofágy, jejichž DNA kódující obalový protein se spojí s genem kódujícím lidské imunoglobuliny. Fág se v bakteriální buňce pomnoží. Přitom vzniknou fágy s modifikovanou obalovou bílkovinou, které se pak z bakteriálních buněk uvolní buď v důsledku vlastní lytické aktivity nebo za účasti pomocného fága. Uvolněné fágové částice se pak nechají interagovat s antigenem imobilizovaným v jamkách mikrotitračních destiček. Po promytí zůstanou zachycené fágy, jejichž obalový protein obsahuje protilátku, zatímco fágy se zabudovanými neúčinnými bílkovinnými fragmenty se vymyjí. Pak se zachycené fágy uvolní a znovu pomnoží v bakteriích. Výběr se pak opakuje, až se nakonec tímto procesem **molekulárního klonování** nazvaným příznačně „rýžování“ získají fágy, v jejich obalové bílkovině jsou zabudovány lidské protilátky kódované rekombinantní DNA s nejvyšší aktivitou k antigenu. Nakonec se procesem nazvaným transdukce vnese DNA kódující účinnou lidskou protilátku do vhodných produkčních buněk.

#### Typy monoklonálních protilátek používaných nebo zkoušených v protinádorové terapii



Problémy s použitím myších protilátek znamenaly, že až 8 let po muromomabu-CD3 byla pro terapii povolena další protilátka. Byl to abciximab, chimérická protilátka určená k rozpouštění krevních sraženin.

V protinádorové terapii se protilátky začaly používat v r. 1997, kdy byl povolen rituximab. Výroba terapeutických monoklonálních protilátek je náročná, což se odráží v jejich vysokých cenách.

**Rituximab** (Rituxan, MabThera; Roche) je chimérická protilátka, která se váže na antigen CD-20 vyskytující se na povrchu nezralých B-lymfocytů, ne však diferencovaných krevních buněk. Osvědčil se při terapii tzv. ne Hodgkinsonských lymfomů, nádorů lymfatických žláz vycházejících z B-lymfocytů, nově je indikován i při revmatoidní artritidě. Přesný mechanismus účinku není znám, zřejmě se při něm kombinuje několik efektů vedoucích k eliminaci buněk, které na povrchu mají antigen CD20. To umožňuje, aby se z kmenových buněk vyvinuly nové zdravé B-buňky. V poslední době bylo připraveno několik „bionapodobenin“ Rituxanu, které čekají na povolení k prodeji. Firma Roche hodlá čelit konkurenci tím, že vyvinula podkožní injekci rituximabu, která by měla nahradit dosavadní infuzi do žíly

Druhou monoklonální protilátkou zavedenou do protinádorové terapie byl **trastuzumab** (Herceptin, Roche), který byl povolen v r. 1998. Je to humanizovaná monoklonální protilátka proti receptoru HER2 (Her2/neu resp. erbB-2), který patří do rodiny receptorů pro lidský epidermální růstový faktor EGF. Zvýšené množství receptoru HER2 se vyskytuje v buňkách některých nádorů prsu i některých jiných nádorů. Trastuzumab se váže na receptor, zablokuje jej a tím brání přenosu signálu k buněčnému dělení. Kromě toho potlačuje angiogenesi a může svojí vazbou na receptor nasměrovat imunitní systém k likvidaci buněk s navázanou protilátkou. Používá se k léčbě pokročilých metastázujících nádorů prsu u pacientek s pozitivním nálezem receptoru HER2, které nereagovaly na dva předchozí režimy chemoterapie. Je aplikován intravenózně, nyní je zkoušeno subkutánní podání. Trastuzumab je jednou z nejpoužívanějších terapeutických protilátek, základní patent, který jej chrání, proexspiroval v r. 2014 a několik firem připravuje jeho generické napodobeniny. V r. 2012 v USA a v r. 2013 v EU povolený **pertuzumab** (Perjeta, Roche) je další protilátkou proti HER2 receptoru. S receptorem interaguje na jiném místě než trastuzumab, při současném podání působí obě protilátky synergicky. Receptory pro EGF blokuje také chimérická monoklonální protilátka **cetuximab** (Erbix, BMS, ImClone), s níž byl spojen skandál na trhu akcií. Manažéři firmy ImClone se na sklonku roku 2002 dozvěděli, že FDA bude žádat doplnění výsledků klinických zkoušek cetuximabu. Tuto informaci ale pozdrželi a rychle prodali akcie firmy. Po zveřejnění oznámení FDA cena akcií ImClone klesla z 20 \$ na 6 \$, čímž byli ostatní akcionáři poškozeni. Manažéři firmy pak byli odsouzeni k odnětí svobody za zneužití informací v obchodním styku (insider trading). Přes finanční potíže se ale nakonec firmě ImClone podařilo klinické zkoušky dokončit. V červenci 2004 byl cetuximab schválen FDA pro léčbu nádorů konečníku a střev a v březnu 2006 pro léčení nádorů hlavy a krku. Jinou monoklonální protilátkou proti receptoru EGF je **nimotuzumab** (Theraloc, Theracim, YM Biosciences), určený rovněž pro léčbu nádorů hlavy a krku a kromě toho i nádorů mozku (žádost o povolení u EMA ale byla stažena) a pankreatu. Zkoušky **necitumumabu** (Portrazza, Eli Lilly), další protilátky proti EGFR, nebyly úspěšné v případě melanomu. Lepší výsledky přineslo jeho zkoušení u pokročilých stadií jednoho typu nádoru plic. Přestože nákladná terapie prodlužovala život pacientů jen o týdny, byl v listopadu 2015 necitumumab pro tuto indikaci povolen FDA. Problematické jsou i jeho vedlejší účinky – tvorba krevních sraženin. U nádorů hlavy a krku je zkoušen i **zalutumumab** (HuMax-EGFr, Genmab). Nejnověji povolenou terapeutickou protilátkou proti receptoru pro EGF je **panitumumab** (Vectibix, Amgen), zcela lidská protilátka pro terapii pacientů s jinak neléčitelnými nádory střev a konečníku. Protilátkou proti vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru VEGF je **bevacizumab** (Avastin, Roche). Ten se váže na růstový faktor, který pak nemůže interagovat se svým receptorem VEGFR. Výsledkem je zablokování přenosu signálů pro růst cév v nádoru. Bevacizumab byl schválen v r. 2004 jako lék proti metastázujícímu kolorektálnímu karcinomu, používá se v kombinaci s 5-fluoruracilem. Později byl povolen k léčbě nádorů plic, ledvin, prsu a mozku. Prodlužuje život pacientů s mesotheliomem a, používá se i v očním lékařství. Protilátkou proti VEGFR je **ramucirumab** (Cyramza, Eli Lilly) povolený v letech 2014-5 samostatně nebo v kombinaci k léčbě nádorů plic, žaludku, střev a konečníku a zkoušený u dalších nádorů. V r. 2009 byl pro léčbu chronické myeloidní leukemie povolen **ofatumumab** (Arzerra, Genmab), čistě humánní protilátka proti CD20, antigenu, který je cílovou strukturou i pro rituximab a v lednu 2016 se povolená indikace rozšířila i na chronickou lymfoidní leukemii. Málo úspěšně zkoušky ale byly léčby lymfomů. **Alemtuzumab** (Campath, Genzyme) je protilátkou proti antigenu CD52, který se vyskytuje na povrchu zralých lymfocytů, ale ne na povrchu kmenových buněk, z nichž lymfocyty vznikají. Používá se k léčbě chronické lymfocytické leukemie a lymfomů. V Japonsku zaregistrovanou protilátkou je **mogamulizumab** (Poteligeo, Kyowa), povolený pro léčbu jednoho typu lymfomu, jehož výrobce žádá o povolení pro další lymfomové indikace. V r. 2010 byl nejprve pro léčbu osteoporózy a pak i pro prevenci zlomenin u pacientů s kostními metastázami povolen **denosumab** (Xgeva, Amgen), lidská protilátka proti ligandu aktivujícímu receptor RANK, který se podílí na regulaci odbourávání kostní tkáně. **Dinutuximab** (Unituxin, AbbVie) povolený FDA v březnu 2015 se váže na povrch buněk neuroblastomu, vzácného typu nádoru, který se vytváří na nezralých nervových buňkách dětí. Protinádorovou monoklonální protilátkou, která dospěla do pokročilých stadií klinických zkoušek, je **bavituximab** (Peregrine), protilátka proti fosfolipidu, který se má vyskytovat pouze na povrchu cév v nádorech. Má nasměrovat imunitní systém organismu na likvidaci buněk cévního systému v nádoru a pak i buněk nádoru samotného. K zásahu proti buňkám cév v nádoru byla vyvinuta humanizovaná protilátka proti endosialinu (tumorovému endoteliálnímu markeru 1, TEM-1) s kódovým označením **MORAb-004** (Morphotec), která je zkoušena při léčbě nádorů střev a konečníku. Ve fázi III je u nádorů vaječníků zkoušen **farletuzumab**, protilátka proti folátovému receptoru  $\alpha$ , který se vyskytuje na povrchu buněk nádorů prsu, vaječníků, plic, ledvin, střev a konečníku a nádorů mozku. **Girentuximab** (Rencorex, Willex), protilátka proti antigenu CA IX, je zkoušen ve fázi III při adjuvantní léčbě nádorů ledvin. Řada dalších protilátek pro onkologické aplikace je v časných fázích vývoje. Úspěch rituximabu a ofatumumabu vyvolal zájem o přípravu a zkoušky terapeutického použití dalších monoklonálních látek proti povrchovému antigenu CD20 bílých krvinek typu B, přestože se výskyt tohoto antigenu neomezuje jen na maligní B-lymfocyty. Protilátky proti CD20 zkoušené při léčbě některých hematologických malignit jsou **atumumab**, **okaratuzumab**, **ublituximab**, **veltuzumab** a **obinutuzumab** (Gazyvaro, povolen na konci r. 2013 pro léčbu chronické lymfocytické leukemie a v r. 2016 pro léčení folikulární leukemie), další protilátka proti CD20 **okrelizumab** je zkoušena i při léčbě roztroušené sklerózy. Protilátkou proti jinému antigenu CD22 na povrchu maligních, ale i zdravých B-lymfocytů je **epratuzumab**, který je úspěšně zkoušen v kombinaci s chemoterapeutiky klofobarabinem a cytarabinem při léčbě akutní lymfocytické leukemie. Na konci roku 2015 byly pro léčbu mnohočetného myelomu povoleny **daratumumab** (Darzalex, Johnson&Johnson) a **elotuzumab** (Empliciti, BMS), protilátky proti povrchovým antigenům myelomových buněk CD38 resp. glykoproteinu CS1, pokračují zkoušky **isatuximabu**, další protilátky proti CD38.

Na povrchu kmenových myelomových buněk je antigen CD19, s nímž interaguje protilátka **MEDI-551** (MedImmune). Po léčbě lenalidomidem a dexamethazonem počet kmenových nádorových buněk narůstá, což může být příčinou návratu onemocnění, protilátka jejich počet snižuje. Protilátkou proti receptoru pro insulinu se podobající růstový faktor 1 (IGF-1R) je **cixutumumab**. IGF-1R, který je nadměrně exprimován v řadě nádorových buněk, předává buňkám signály k nádorové přeměně, proliferaci a metastázování. **Onartuzumab** blokuje receptor pro hepatocytární růstový faktor HGF, se kterým je spřažena kinasa MET. Její abnormální aktivace vede k invazivnímu růstu různých nádorů. Protilátkou proti receptoru ROR1, který se vyskytuje na povrchu téměř všech buněk určitého typu lymfomů a chronické lymfatické leukemie je **cirtuzumab**.

**Siltuximab** je protilátka proti interleukinu 6, který je mediátorem zánětů a horečky, zkoušen je při léčbě mnohočetného myelomu, lymfomů aj. Jinou protilátkou proti IL6 je **tocilizumab**, který je primárně určen k léčbě reumatoidní artritidy. Jeho další zkoušky ukázaly, že u dlaždicového karcinomu hlavy a krku pomáhá překonat radiorezistenci. **Olaratumumab** (Lartruvo, Eli Lilly), protilátka proti destičkovému růstovému faktoru, při zkouškách kombinace s doxorubicinem významně prodloužoval dobu přežití pacientů se sarkomy měkkých tkání, v r. 2016 byl „podmíněně“ povolen EMA (podmíněně povolení je udělováno v případech, kdy je třeba doplnit data, ale dosud zjištěné přínosy výrazně převyšují riziko). **Claudiximab** (IMAB362) je protilátka proti bílkovině klaudinu 18.2 podílející se na tvorbě neproniknutelného spojení buněk, zkoušen je při léčbě nádorů žaludku.

Několik protilátek bylo vyvinuto proti receptorům na povrchu kmenových nádorových buněk nebo jejich ligandům. Jejich použití v protinádorové terapii by mělo zabránit recidivám onemocnění. **Demcizumab** blokuje ligand DLL4, který aktivuje signalizační dráhu Notch důležitou pro nádorové kmenové buňky. Vazbou na receptory Notch 2 a 3 blokuje tuto signalizační dráhu **tarextumab**. Podobně působí **bronktituzumab**, který se váže na receptor Notch 1, **Vantiktumab** blokuje receptor Frizzled (=nakadeřený) na povrchu buněk „trojnásobně negativních nádorů“ prsu (bez nálezu receptorů pro estrogen, progesteron a HER) a tím brání přenosu signálů k růstu a přežívání kmenových buněk.

### V poslední době vzbudily značnou pozornost **protilátky, které mohou aktivovat imunitní systém k zásahu proti nádorovým buňkám.**

Důležité buňky imunitního systému, T-lymfocyty, mají na svém povrchu jakási kontrolní místa (checkpoints) imunitní odezvy, což jsou receptory, které mohou při interakci s určitými ligandy nebo antigeny tlumit imunitní odezvu organismu. Tím se organismus sice brání proti autoimunitním onemocněním, při nichž imunitní systém napadá vlastní zdravé buňky, ale na druhé straně přitom selhává likvidace nádorových nebo virem napadených buněk. Blokáda těchto receptorů, popř. jejich ligandů, může imunitní obranu reaktivovat. Nejdůležitější receptory tlumící T-lymfocyty jsou označovány symboly PD-1 (Programmed cell Death protein 1) a CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4). Receptor PD-1 podporuje apoptózu antigen-specifických T-lymfocytů v lymfatických uzlinách a současně potlačuje apoptózu regulačních (supresorových) T-lymfocytů. Má dva bílkovinné ligandy PD-L1 a PD-L2, které jsou produkovány řadou nádorových buněk. Receptor CTLA-4 vypíná imunitní odezvu při interakcích s proteiny CD80 a CD86 vyskytující se na povrchu antigen prezentujících buněk.

Léčba protilátkami proti PD-1, CTLA-4 nebo jejich ligandům představuje jeden z důležitých směrů protinádorové imunoterapie a je považována za průlom v boji s rakovinou. Podle některých prognóz by se během příštích 10 let měla stát klíčovou komponentou až 60% režimů protinádorové terapie.

**Nivolumab** (Opdivo, Bristol-Myers-Squibb), blokující PD-1 i jeho ligand PD-L1 byl povolen v r. 2014 k léčbě metastázujících melanomů a v r. 2015 pro léčbu nemalobuněčných nádorů plic, nyní je povolen v celkem 8 nádorových indikacích. Jinou protilátkou proti PD-1 je **pembrolizumab** (Keytruda, Merck) povolený rovněž k léčbě melanomu i nádorů plic a zkoušený v dalších indikacích. Dalšími protilátkami proti receptoru PD-1 jsou **lambrolizumab** zkoušený při léčbě melanomu a dalších 5 nádorových indikacích, **BMS 936559** (Bristol Myers Squibb), kde již bylo klinické zkoušení u melanomu a nádorů plic dokončeno a **STI-A1110** (Servier), zatím v preklinickém vývoji. V případě **pidilizumabu** (CT-011, Cure Tech), zkoušeného při léčbě některých lymfomů byla interakce s PD-1 zpochybněna, klinické zkoušky byly pozastaveny, ale pak bylo povoleno jejich obnovení. **Atezolizumab** (Tecentriq, Roche) blokuje ligand PD-L1. V květnu 2016 byl povolen pro léčbu nádorů močového měchýře, úspěšně je zkoušen při léčbě melanomu a nádorů plic u bývalých kuřáků. Jinými protilátkami blokujícími PD-L1 je **durvalumab** (MEDI4736) zkoušený při léčbě nádorů plic a **avelumab** (Pfizer, Merck) testovaný při léčbě nádorů ledvin, vaječníků, kožních nádorů vycházejících z Merkelových buněk a mesotheliomu. Obě protilátky obdržely u FDA statut „průlomové terapie“, což zaručuje urychlené projednání budoucí žádosti o povolení. V březnu 2011 byl pro léčbu pokročilých stadií metastázujícího melanomu schválen **ipilimumab** (Yervoy, Bristol-Myers Squibb), protilátka proti CTLA-4. U šestiny až čtvrtiny pacientů s melanomem prodloužil ipilimumab významně dobu jejich života, ještě lepší výsledky přinesla jeho kombinace s nivolumabem. U pokročilých nádorů prostaty ale úspěšný nebyl. **Tremelimumab**, jiná protilátka proti CTLA-4 je účinný při léčbě nádorů jater, uplatnit by se mohl i při léčbě žloutenky typu C.

Problémem léčby protilátkami aktivujícími imunitní systém je jednak to, že lze vyléčit jen asi 20% pacientů, jejichž nádor je infiltrován dostatečným množstvím T-lymfocytů. Problémem je i výskyt vedlejších účinků vyvolaných masivní produkcí řady interleukinů („cytokinovou bouří“), které pak aktivují imunitní systém proti vlastním zdravým buňkám. Vedlejší účinky autoimunitního charakteru lze potlačovat podáváním kortikoidů, někdy ale je nutný drastičtější zásah (zejména při léčbě ipilimumabem). V případě melanomu by pro omezení vedlejších účinků měla být účelná také aplikace protilátek aktivujících imunitní systém přímo do primárního nádoru náplastmi s mikrožehlemi.

Dalšími problémy je vznik rezistence zapříčiněný mutacemi genů pro receptory a „vyčerpání“ T-lymfocytů, jehož příčinou je změna jejich epigenetického profilu. Rezistenci je třeba překonávat nasazením jiné protilátky, „vyčerpání“ lze předcházet kombinací protilátek blokujících „kontrolní místa“ s léčivy potlačujícími epigenetické změny.

Některé další protilátky aktivují imunitní systém jinými mechanismy než blokadou receptorů PD-1 a CTLA-4 nebo jejich ligandů. V kombinaci s interleukinem 2 byl zkoušen **WX-G250** (Rencarex, Willex AG), monoklonální chimérická protilátka proti anhydrase kyseliny uhličitě IX, která se vyskytuje na 95% buňkách nádorů ledvin, ne však na buňkách zdravých ledvin. WX-G250 se váže variabilní částí na antigen, zatímco jeho konstantní část interaguje s receptorem na povrchu buněk imunitního systému nazývaných přirození zabíječi (Natural Killer – NK cells). Tím se nastartuje mechanismus imunitní obrany závislý na protilátce (ADCC – antibody dependent cellular cytotoxicity). Podobným mechanismem by měl účinkovat **OvaRex**, jiná protilátka fy Willex, tentokrát proti antigenu C-125, který se vyskytuje na povrchu buněk nádorů vaječníků. Způsobem podobajícím se účinku protinádorových vakcín aktivuje imunitní systém **oregovomab**, protilátka proti nádorovému antigenu C-125, který může být vázaný na buňkách nebo i cirkulovat v krevním oběhu. Komplex antigen-protilátka je přijat dendritickými buňkami, které po zpracování prezentují fragmenty antigenu T-buňkám imunitního systému. Výsledkem je imunitní odezva vedoucí ke zvýšení doby přežití pacientek s pokročilými stadii nádorů vaječníků. **IMP321**, rozpustný rekombinantní fúzní protein imunoglobulinu a extracelulární části aktivátoru dendritických buněk LAG-3, stimuluje prezentaci nádorových antigenů cytotoxickým T-lymfocytům. Zkoušen je u metastázujících nádorů prsu. **Lirilumab** a **1-7F9** jsou monoklonální protilátky blokující receptory KIR (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor), které tlumí nebo naopak aktivují cytotoxicitu buněk imunitního systému nazývaných přirození zabíječi (natural killers, NK), jež umí rozpoznávat viry napadené nebo nádorově transformované buňky. Zkoušky lirilumabu při léčbě akutní myeloidní leukemie byly zastaveny jako neúspěšné, pokračují však další klinické zkoušky

Vedle běžných monoklonálních protilátek rozpoznávajících jediný antigen mohou být bioinženýrskými metodami připravovány a terapeuticky využívány **protilátky bispecifické (BiTE)**, které rozpoznávají dva různé antigeny, jeden na T-lymfocytech a druhý na nádorových buňkách.

Patří mezi ně **blinatumomab** (Blincyto, Amgen), konjugát fragmentů 2 myších protilátek. Jedním z jejich cílových antigenů je CD3, který se vyskytuje na povrchu T lymfocytů, buněk, které jsou důležitou součástí imunitní obrany organismu proti nádorovým buňkám. Druhým je antigen CD19 na povrchu B-lymfocytů. Bispecifická protilátka svými interakcemi nádorovou buňku i cytotoxickou T-buňku propojí. Tím se podstatně zvýší cytotoxický účinek a T-lymfocyty začnou likvidovat i takové nádorové buňky, které jinak imunitní obraně organismu unikají. Blinatumomab byl v r. 2014 povolen jako lék druhé volby pro léčbu akutní lymfoblastické leukemie, zkoušen je u ne Hodgkinsonských lymfomů, nově i u nádorů plic a trávicího traktu, je ale kritizován pro příliš vysokou cenu – náklady na roční terapii činí 178 tis. \$.

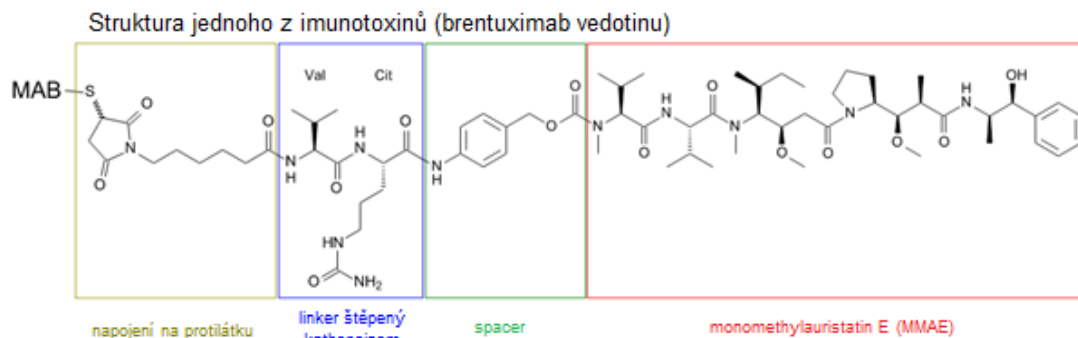
**Katumaximab** (Removab, Fresenius Biotech), hybridní myši-potkaní monoklonální protilátka dokonce interaguje s povrchovými antigeny tří typů buněk. Kromě antigenu CD3 to je adhesivní molekula epiteliálních buněk EpCAM vyskytující se na nádorových buňkách a Fc receptor, který se vyskytuje na povrchu dalších buněk imunitního systému: makrofágů, NK buněk (NK cells – natural killer cells, buňky „přirozených zabíječů“) a dendritických buněk. Katumaximab byl v Evropě povolen již v r. 2009 pro léčbu maligních ascitů, kdy se v břišní dutině pacientů s metastázujícími nádory vaječníků nebo jiných orgánů z břišní dutiny hromadí tekutina. Léčba spočívá v odsátí ascitické tekutiny a aplikace katumaximabu infuzí do břišní dutiny.

Podobný účinek jako bevacizumab má **ziv-aflibercept** (Zaltrap, VEGF Trap, Regeneron/Sanofi), který však není protilátkou, ale „imunoadhesinem“, fúzním proteinem vzniklým spojením extracelulárních fragmentů receptorů pro vaskulární endoteliální růstový faktor VEGFR1 a VEGFR2 s konstantní částí lidského imunoglobulinu IgG1. Brzdí vznik cév v nádoru, u dříve vytvořených cév zvyšuje permeabilitu, krvácení je proto jeho závažným vedlejším účinkem. Některé klinické zkoušky afliberceptu nebyly příliš úspěšné, v jiných případech však bylo dosaženo zřetelné zvýšení doby přežití pacientů. Jeho použití při léčbě kolorektálního karcinomu v kombinaci s irinotekanem, 5-fluoruracilem a leukovorinem povolily FDA v polovině a EMA na konci roku 2012. Kritizována je jeho cena (měsíční terapie, tj. dvě infuze dávky 4 mg/kg podávané v intervalu dvou týdnů stojí 11 tis. \$), která zřejmě bude bránit širšímu využití. Antiangiogenní účinek má také **dalantercept**, který je zkoušen ve fázi 2. Je to fúzní protein, který obsahuje konstantní část lidského IgG1 s bílkovinným fragmentem, který se váže na transformující růstové faktory a tím blokuje buněčnou signalizaci prostřednictvím kinasu ALK1.

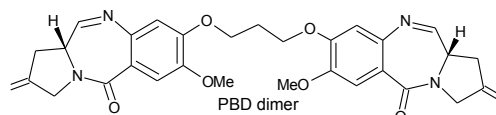
Některé protilátky proti antigenům vyskytujícím se na povrchu nádorových buněk se využívají **k nasměrování různých toxinů, cytostatik, enzymů nebo radioizotopů na nádorové buňky**. Specifita protilátek přitom zajišťuje, že zdravé tkáně nejsou účinnou složkou přípravku výrazněji poškozeny. Poté, co protilátka nalezne nádorovou buňku, je na ni navázaná látka enzymaticky odštěpena, aby pak mohla buňku zabít. V důsledku nasměrování konjugátu na nádorové buňky lze přitom terapeuticky využít i takové látky, které by jinak nebyly použitelné pro vysokou systémovou toxicitu.

Při nádorově specifické radioterapii se používají myší protilátky proti nádorovému antigenu CD-20 s navázanými radioizotopy emitujícími intenzivní záření krátkého dosahu. Jsou to **tositumomab** (Bexxar), protilátka s navázaným  $^{131}\text{I}$ , který se rozpadá za vzniku  $\beta$ -záření, které proniká do hloubky 2,4 mm, takže nepůsobí na vzdálenější zdravé tkáně a **ibratumomab tiuxetan** (Zevalin), protilátka s kovalentně navázaným chelátotvorným seskupením (diethylentriaminpentaoctovou kyselinou) s izotopem yttria  $^{90}\text{Y}$  (Y90-Zevalin) emitujícím  $\beta$ -záření, nebo india  $^{111}\text{In}$  (In111-Zevalin) vydávajícím  $\gamma$ -záření s krátkým dosahem.

Použití myších protilátek v těchto případech nevadí, protože jde o jednorázové zničení cílových nádorových buněk, zkoušeny však jsou i chimérické nebo humanizované protilátky proti nádorovým antigenům: při léčbě gliomů chimérická protilátka s navázaným  $^{131}\text{I}$ , **Cotara** (Techniclone/Peregrine), při selektivní léčbě nádorů prsu výše zmíněný **nimotuzumab** s navázaným radioaktivním izotopem india  $^{111}\text{In}$  a při léčbě nádorů pankreatu **klivatuzumab tetraxetan** s  $^{90}\text{Y}$ . Klinicky zkoušený při léčbě akutní myeloidní leukemie je Actimab tvořený **lintuzumabem**, s navázaným izotopem aktinia  $^{225}\text{Ac}$ . Lintuzumab je protilátkou proti antigenu CD33, který se při akutní myeloidní leukemii a podobných hematologických malignitách vyskytuje ve zvýšeném počtu na povrchu bílých krvinek.  $^{177}\text{Lu}$ -**DOTA-rituximab** obsahuje radioisotop lutecia emitující nízkoenergetické  $\beta$ -záření s krátkým dosahem (max. 1,6 mm) navázaný na konjugát rituximabu s chelátující 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctovou kyselinou. Je určen pro chemoradioterapii lymfomů, které mohou prorůst do normálních tkání, takže krátký dosah záření je žádoucí. Silně cytotoxické je  $\alpha$ -záření emitované při rozpadu izotopu olova 212 vázaného v  $^{212}\text{Pb}$ -**TCMC-trastuzumabu**, jehož chelátotvorným seskupením je tetraazacyklodekantetraacetamidem. Z **imunotoxinů**, toxických látek navázaných na protilátku, byl zkoušen konjugát prudce jedovatého ricinu, do terapeutické praxe se však nedostal. Lék s generickým názvem **gemtuzumab ozogamicin** (Myotarg, Wyeth) obsahuje humanizovanou monoklonální protilátku proti nádorovému antigenu CD33 s navázaným protinádorovým antibiotikem kalicheamycinem. Používal se k léčbě akutní myeloblastické leukemie. Povoleno byl v r. 2001, v r. 2010 ale byl na doporučení FDA výrobcem stažen, nyní se po nových klinických zkouškách uvažuje o jeho znovuzavedení. Příbuzný konjugát **inotuzumab ozogamicin** je úspěšně zkoušený při akutní lymfoblastické leukemii. Konjugáty protilátek s cytotoxickými deriváty makrolidu maytansinu obsaženého v rostlinách *Maytenus* a interagujícího s mikrotubuly jsou **lorvotuzumab mertansin** zkoušený při léčbě mnohočetného myelomu a malobuněčných nádorů plic a v únoru 2013 povolený **trastuzumab emtansin** (T-DM1, Kadcyla, Genentech) určený k léčbě metastázujících nádorů prsu podobně jako samotný trastuzumab, konjugát je však účinnější. **Brentuximab vedotin** (Adcetris, Seattle Genetics) je konjugát protilátky proti antigenu CD-30 se silně cytotoxickým monomethylauristatinem E (MMAE), povolen byl v r. 2011 v USA a v r. 2012 v EU pro léčbu Hodgkinských a anaplastických lymfomů.



MMAE blokující polymeraci tubulinu obsahuje i **glembatumumab vedotin** s protilátkou proti transmembránovému glykoproteinu NMB zkoušený při léčbě melanomu a metastázujících nádorů prsu, **DMUC5754A** s protilátkou proti antigenu MUC16 (známějšímu jako C125) určený pro léčbu nádorů vaječníků, **enfortumab vedotin** s protilátkou proti nektinu 4, jehož výskyt byl prokázán v krvi pacientů s nádory plic a **lifastuzumab vedotin** zkoušený u nádorů plic a vaječníků. Podobný konjugát **PSMA-ADC** s lidskou protilátkou proti PSA, prostatickému specifickému membránovému antigenu, je zkoušen při terapii nádorů prostaty. **Anetumab ravtansin** obsahuje jako cytotoxickou složku další derivát maytansinu, který je navázan na protilátku proti mesothelinu, který je nadměrně exprimován na buňkách mesotheliomu, některých nádorů pankreatu a vaječníků, zatímco na normálních buňkách se vyskytuje jen v omezené míře. Další derivát maytansinu obsahuje konjugát protilátky proti folátovému receptoru, který se sice vyskytuje i na buňkách některých normálních tkání, ale zejména na buňkách některých nádorů, **mirvetuximab soravtansin**. Zkoušen je u nádorů vaječníků a děložní sliznice rezistentních na platinová cytostatika. **Rovalpituzumab tesirin** (Rova T) je konjugátem protilátky proti antigenu DLL-3, který se vyskytuje na 80% buněk nemalobuněčných nádorů plic a „dimeru“ pyrrolobenzodiazepinu (PBD). Pyrrolobenzodiazepiny jsou přirozené látky produkované aktinomycetami. PBD se váže do malého žábku DNA, přičemž dochází k propojení aminodusíku guaninu s C11 molekuly PBD. Tím je blokována replikace DNA, dělení buňky se zastaví ve fázi G2 a dojde k apoptóze. Dvojitá spirála DNA přitom není deformována, což znamená, že po vazbě PBD prakticky nedochází k opravě DNA reparačními mechanismy.



**Sacitumumab govitekan** je konjugátem tekanového cytostatika SN-38, jehož rozpustným profarmakem je irinotekan (viz Farm10) a protilátky proti proteinu Trop, který se vyskytuje ve značném množství na buňkách nádorů prsu, střev, plic a dalších, zatímco na normálních buňkách je jeho výskyt omezený. Zkoušen je u nádorů pankreatu a některých dalších nádorů. Stejnou cytostatickou složku má **labetuzuab govitekan** s protilátkou proti karcinoembryonálnímu antigenu CEA (ten se využívá hlavně v diagnostice). Zkoušen je u pacientů s metastázujícím nádorem střev, kteří i po léčbě irinotekanem mají v krvi zvýšenou hladinu.



**Proxinium** (Viventia Biotech) je konjugát exotoxinu A, který produkují bakterie *Pseudomonas*, s fragmentem monoklonální protilátky proti antigenu epitelových buněk EpCAM, který se vyskytuje zejména na povrchu buněk nádorů hlavy a krku. Povoleno bylo jeho použití jako léku „sirotka“ (orphan drug, léku proti vzácným onemocněním). Pseudomonádový exotoxin A obsahuje i konjugát fragmentu variabilní části těžkého řetězce myši protilátky proti lidskému nádorovému antigenu CD22 **moxetomomab pasudotox** zkoušený u vlasatobuněčné leukemie.

Pod souhrnný pojem **imunotoxiny** jsou vedle konjugátů protilátek s toxiny řazeny i podobné konjugáty jiných bílkovin se zvýšenou afinitou vůči nádorovým buňkám.

**Cintredekin besudotox** je konjugát interleukinu 13 (IL-13) s pseudomonádovým exotoxinem A. **TransMID 107** je konjugát transferrinu se záškrťovým toxinem. Je zkoušen při léčbě gliomů, agresivních nádorů mozku. Přitom se využívá toho, že nádorové buňky mají na svém povrchu zvýšené množství receptorů pro transferrin.

Zajímavým typem konjugátů jsou „**cíleně směřovaná polymerní léčiva**“ vyvíjená na Ústavu makromolekulární chemie ve spolupráci s Mikrobiologickým ústavem AV ČR.

Protilátky proti nádorovým antigenům jsou v nich konjugovány s kopolymerem N-hydroxypropylmethakrylamidu, na který je přes peptidickou spojku navázáno cytostatikum doxorubicin. Zkoušení se ujala česká firma Zentiva, ale poté, co ji koupil koncern Sanofi, byly klinické zkoušky zastaveny.

Konjugáty enzymu fosfatasy a protilátek proti nádorovým antigenům se zkoušejí při způsobu léčby nesoucím zkratku **ADEPT** (Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy).

Protilátka se váže na nádorové buňky. Navázaný enzym pak v okolí nádorové buňky štěpí netoxické fosforylované profarmakum, např. fludarabin fosfát, na protinádorově účinný lék, který (na rozdíl od silně polárního fosforylovaného derivátu) může pronikat přes buněčnou membránu do nádorových buněk.

Podobně jako u jiných cílených léčiv je protinádorová terapie využívající protilátky méně riziková z hlediska vedlejších účinků, bez rizik však není ani ona. Závažným problémem je již zmíněná **imunogenita terapeutických protilátek**, kdy podaný přípravek může být imunitním systémem vnímán jako cizorodá bílkovina. To pak vyvolá v organismu vznik jiných protilátek, což pak vede v lepším případě ke snížení účinnosti původní protilátky, v horším k imunitní reakci – anafylaktickému šoku. Jak již bylo rovněž zmíněno, u protilátek aktivujících imunitní systém může při jejich podání docházet k **autoimunitním reakcím**, napadání vlastních zdravých buněk. Dalším problémem může být orgánová toxicita některých protilátek, zejména kardiotoxicita

Např. trastuzumab způsobuje u 2-7% léčených patientek kardiologické problémy. Činnost srdce u patientek léčených trastuzumabem proto musí být pravidelně kontrolována, pro léčbu žen, které měly problémy s funkcí srdce je trastuzumab nevhodný a rizikový. Kardiotoxicitu vykazují i jiné protilátky. Problémem může být i **syndrom lýzy nádorů** – poškození ledvin, srdce a některé další komplikace způsobené rozpadem nádorových buněk, při němž se do krevního oběhu uvolňují nadměrná množství draselných, vápenatých, fosforečnanových iontů, kyseliny močové, mléčné apod.

Monoklonálních protilátek určených pro terapii rychle přibývá. Přes poměrně krátkou dobu, po níž se používají, přináší prodeje protinádorových terapeutických protilátek miliardové částky. Vysoká čísla ale neodráží počet prodaných dávek, ale spíše velmi vysoké ceny protilátek, do nichž se promítá i velká náročnost vývoje, přípravy, čištění i kontroly jakosti a bezpečnosti. Vysoké ceny terapeutických protilátek vedou k tomu, že za jejich nejzávažnější vedlejší účinek je považována jejich „**finanční toxicita**“

Maximální úhrada za 150 mg balení trastuzumabu (Herceptin) pro léčbu pokročilých stadií nádorů prsu je 14.936 Kč. Doporučenou počáteční dávkou jsou 4 mg na 1 kg tělesné hmotnosti, udržovací dávka podávaná každé 1-3 týdny je 2 mg/kg. Úhrada 6 léčebných cyklů u průměrné pacientky tak činí cca 100 tis. Kč. Podle farmakoekonomické studie provedené britským NICE činí náklady pro celoživotní léčbu patientek s pokročilými stadii nádorů prsu s trastuzumabem s 82.340 Lbst při přežití ohodnoceném na 10,7 QALY, bez trastuzumabu 77.786 Lbst při 8,78 QALY. Náklady na 1 QALY navíc tak činí 2396 Lbst, což je ještě považováno za únosnou částku. Jiné terapeuticky používané protilátky jsou ale dražší. Náklady na léčbu pak mohou dosahovat i částek přesahujících 2 mil. Kč za rok. V některých případech je dosahováno lepších výsledků při použití kombinace dvou protilátek, což náklady dále zvyšuje. Zdravotní pojišťovny řady zemí proto odmítají nákladnou léčbu některými protilátkami hradit. Moderní léčiva tak nedostávají všichni pacienti, kterým by prospěla. V ČR se podle vyjádření předsedy České onkologické společnosti peníze zatím vždy našly v případech, kdy nákladná léčba zachraňovala pacientovi život, ne však v případě, kdy mu život prodlužovala jen o několik měsíců. Roční náklady na „biologickou léčbu“ pacienta u nás v r. 2010 činily 2,2 mld. Kč. Pokud by ale byli léčeni všichni potřební pacienti, dosáhly by tyto náklady téměř 6 miliard korun. To dokazuje, že biologická léčba je indikována přísně výběrově. Vzhledem k úsporám nákladů na zdravotnictví se ale situace zhoršuje. Do konce roku 2010 hradily pojišťovny léčbu konkrétním pacientům, od r. 2011 dostávají onkologická centra paušální částku bez ohledu na počet a potřeby pacientů. Onkologové se proto oprávněně obávají zvýšení podléčenosti.

Nákladovost léčby protilátkami mohou snížit diagnostické testy, jimiž se zjišťuje, zda v nádoru dochází k nadměrné expresi genu kódujícího cílovou strukturu protilátky. Podle výsledků se pak drahá léčba nasadí jen tam, kde je šance, že protilátka pomůže.

Jako první byly zavedeny testy pro prognózu terapie trastuzumabem. Gen kódující receptor HER2, proti němuž je protilátka zacílena, je nadměrně exprimován v buňkách 20-25% nádorů prsu. U nemocných žen s pozitivním nálezem receptoru představuje léčba trastuzumabem výrazný terapeutický přínos, u 75-80% jiných pacientek by však byla jen neúčelným vyhazováním peněz. Přínosnost zjišťování hladiny HER2 zatím ale snižuje vysoká cena genetického testu.

Perspektivně by mohly zlevnění léčby přinést „**bionapodobeniny**“ (biosimilars) **protilátek**. O problémech povolování takových „bionapodobenin“ se ale stále široce diskutuje, protože dosáhnout úplné strukturální ekvivalence protilátek, které jsou složitými glykoproteiny, je málo pravděpodobné.

Lze to např. ilustrovat tím, že již zmíněný trastuzumab má sumární vzorec  $C_{6470}H_{10012}N_{1726}O_{2013}S_{42}$  a molekulovou hmotnost 145531,5 g/mol. Terapeutické monoklonální protilátky jsou při kultivaci genově upravených tkáňových buněk produkovány do média, z něhož se izolují a čistí. Výroba je nákladná, ale nákladná bude i výroba bionapodobenin. Zkoušeny jsou možnosti zlevnění produkce monoklonálních protilátek pomocí transgeních zvířat i rostlin. Ani to však nezajistí podstatné snížení nákladů na výzkum, vývoj a výrobu.

Šance na zlevnění terapie protilátkami byla spatřována v „**nanoprotilátkách**“ (nanobodies). Nanoprotilátky byly objeveny v krvi velbloudů, mají je ale i také lamy a chrupavkovité ryby, jako jsou žraloci. Mají asi 10 x menší molekulu než lidské protilátky. Mají jednoduchou strukturu tvořenou malými „těžkými“ řetězci. „Lehké“ řetězce jim chybí, přesto jsou však plně funkční a jejich afinita k antigenům se neliší od běžných protilátek. Navíc jsou stálejší, nevadí jim tolik teplo ani nízké hodnoty pH. Pokusy se zvířaty naznačují, že při jejich aplikaci nedochází k tvorbě „protilátek proti nanoprotilátkám“. Jejich příprava sice také není zcela jednoduchá, zkomplikovala ji možnost přenosu některých virů jako je MERS-CoV, koronavirus způsobující „blízkovýchodní respirační syndrom“. Přesto by však jejich cena mohla být nižší než u běžných terapeutických monoklonálních protilátek. Léčebné využití „nanoprotilátek“ je ale zřejmě dosti vzdálené. Výzkum v této oblasti není nijak zvlášť intenzivní a teprve v r. 2007 bylo zahájeno klinické zkoušení první nanoprotilátky, bylo to ale mimo oblast onkologie. Nanoprotilátky proti receptoru HER2 použitelné v protinádorové terapii byly připraveny až v r. 2011.

S cílem zjednodušit a zlevnit přípravu „biologických“ léčiv je připravována a zkoušena řada **protilátkových mimetik**. Jednu možnost představují „**plastické protilátky**“ – čistě syntetické polymerní nanočástice s terciární strukturou získanou „molekulárním otiskem“ antigenu po jeho přidání do polymerační směsi. I když jde o postup známý již z 80. let minulého století, kdy představoval jednu z variant přípravy sorbentů pro afinitní chromatografii, příprava a použití polymerních nanočástic s výraznou afinitou k určitému antigenu byla opublikována až v r. 2010. Šlo o částice s afinitou vůči hlavní složce včelího jedu. Myši, kterým byla bezprostředně po injekci letální dávky jedu podána suspenze „plastické protilátky“ přežily výrazně déle než myši, které dostaly pouze jed. Případné terapeutické využití je však značně vzdálené.

Místo protilátek lze k zacílení na nádorové antigeny využít i **aptamery**, malé oligoribo- nebo -deoxyribonukleotidy vyselektované tak, aby se vážaly na zvolené antigeny. Vedle těchto oligonukleotidových aptamerů byly připraveny i peptidické aptamery, oligopeptidy rozeznávající určitou látku. Aptamery sice mohou být připravovány snáze než monoklonální protilátky, ale i v jejich případě je vývoj a praktické využití v terapii zatím jen v plénkách. Zkoušen je RNA aptamer neutralizující protein E7 produkovaný papilomavirem HPV16, který umožňuje infikovaným buňkám obejít přirozenou obranu organismu a nekontrolovaně se dělit. Velkým problémem je malá biologická stabilita nukleotidických aptamerů. Podstatně lepší perspektivu má tak spíše uplatnění různě značených oligonukleotidických aptamerů při diagnostických zobrazovacích technikách, kde rychlé biologické odbourání může naopak být výhodné.

Za peptidické aptamery, které mohou při přípravě imunotoxinů výhodně nahrazovat protilátky s příliš velkými molekulami lze považovat **DARPin** (DARP = Designed Ankyrin Repeat Proteins). DARP, které mají být ideálními směřujícími molekulami, jsou syntetické oligopeptidy se strukturou odvozenou od opakujících se sekvencí 33 aminokyselin molekuly bílkoviny ankyrinu vyskytující se na vnitřní straně membrány červených krvinek. Oligopeptidem, který je antagonistou receptoru CXCR4, je **BL-8040**, jehož klinické zkoušky při léčbě akutní myeloidní leukemie byly nedávno zahájeny. Receptor CXCR4 se vyskytuje v nadměrném množství v buňkách 70% nádorů. Podílí se na retenci nádorových buněk v kostní dřeni, růstu a přežívání nádorových buněk, angiogenezi a metastázování.

**Monolátky** (monobodies) jsou další alternativou k protilátkám. Jsou to malé vazebné oligopeptidy připravované technikami genového inženýrství, které jsou vytvářeny s využitím domény fibronektinu III jako molekulového „lešení“, jehož části jsou modifikovány. Monolátka **NS1** se váže na bílkovinné produkty onkogenů *H-RAS* a *K-RAS* a tím blokuje jejich onkogenní aktivitu.

## Protinádorové vakcíny

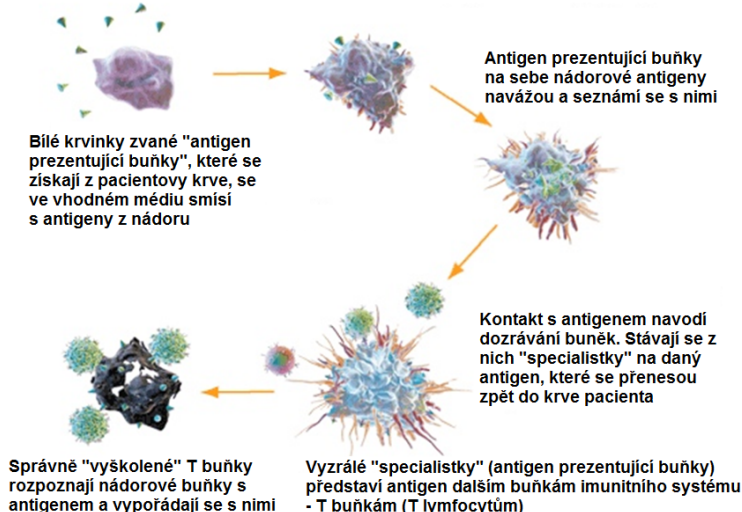
V protinádorové prevenci se uplatnily jen vakcíny, jejichž cílovými strukturami sice nejsou nádorové buňky, které však chrání organismus proti infekcím předcházejícím vzniku nádorového onemocnění.

Infekce pohlavních orgánů lidskými papilloma virem (HPV) typu 16 a 18 má v asi 70% případů za následek vznik nádorů děložního čípku. K ochraně před infekcí byly vyvinuty bivalentní vakcína **Cervarix** (GlaxoSmithKline) proti HPV 16 a 18 a kvadrivalentní vakcína **Gardasil** (Merck), která chrání i proti HPV 6 a 11, které vyvolávají vznik bradavičnatých výrůstků na genitáliích a nejnověji nonavalentní vakcína Gardasil 9, která chrání proti HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, a 58. Různé aspekty použití těchto vakcín v prevenci gynekologických nádorů a nádorů konečníku a jícnu byly v poslední době široce diskutovány. Vyvíjeny jsou vakcíny proti HPV16, vhodné i terapeuticky k léčbě prekanceróz a již vzniklých nádorů.

Protinádorové vakcíny slouží k **imunoterapii již vzniklých nádorů** a ne k prevenci (na rozdíl od vakcín proti onkogenním virům). Většinou jsou **autologní**, tj. vakcíny, kdy k vyvolání imunitní odezvy jsou využívány vlastní nádorové buňky pacienta nebo biomakromolekuly z pacientova nádoru, případně vakcína obsahuje vlastní buňky imunitního systému pacienta, které jsou vhodným způsobem „trénované“.

Protinádorové vakcíny jsou tvořené polyklonálními protilátkami, tj. směsí protilátek s různou afinitou vůči antigenům na povrchu nádorových buněk. Jejich interakce s nádorovými antigeny upozorní imunitní systém organismu na přítomnost nežádoucích buněk, aktivuje cytotoxicky působící T-lymfocyty, makrofágy, tzv. přirozené zabijáče (natural killer cell) nebo jiné specializovaným buňkám imunitního systému a dá jim signál k tomu, aby nádorovou buňku zlikvidovaly. Po aktivaci buněk imunitního systému dojde ke specifické diferenciaci a klonálnímu pomnožení cytotoxických lymfocytů. Ty pak likvidují rozpoznané nemocné buňky. Ke zlepšení imunitní odezvy jsou zkoušeny různé možnosti zvýšit cytotoxickou účinnost T lymfocytů různými genetickými manipulacemi.

Signál k aktivaci poskytne souhra interakcí „naivního“ nediferencovaného lymfocytu, při níž klíčovou roli hrají buňky prezentující antigen. Nejúčinnějšími aktivátory přitom jsou tzv. dendritické buňky, které antigen pohltní, zpracují a pak se v lymfatických uzlinách přemění na buňky prezentující antigen, které pak nasměrují cytotoxické T-lymfocyty k likvidaci nádorových buněk s prezentovaným antigenem. Využity mohou být i dendritické buňky s mRNA pro antigen.



Schematické znázornění přípravy protinádorové vakcíny (zdroj: <http://www.osel.cz/index.php?clanek=4382>)

Při přípravě protinádorových vakcín se proto často izolují z krve prekursor dendritických buněk, ty se nechají dozrát a pak inkubují s nádorovými antigeny, lyzáty nádorových buněk, usmrcenými nebo i živými nádorovými buňkami. Dále se připravují i tzv. DNA vakcíny, kde se místo antigenů používá DNA kódující nádorový antigen. Použity mohou být i geneticky modifikované viry s vneseným genem kódujícím antigenní proteiny nádorových buněk (např. proteiny gp100 a MART1 z melanomových buněk). Antigeny jsou glykoproteiny a pro organické chemiky může být zajímavá informace, že se pro úspěšný „trénink“ imunitního systému podařilo oligosacharidy některých nádorových antigenů syntetizovat.

Vážným problémem výzkumu a vývoje protinádorových vakcín je, že povrchové antigeny nádorových buněk se od antigenů na povrchu normálních tkáňových buněk liší jen nepatrně.

Vedlejším účinkem protinádorových vakcín proto mohou být nežádoucí autoimunitní reakce, kdy imunitní systém začne likvidovat i normální buňky se stejnými antigeny, jaké mají buňky nádorové. Např. po podání vakcíny proti melanomu může imunitní systém organismu pacienta někdy napadat i normální melanocyty, kožní buňky produkující hnědé kožní barvivo melanin. To pak má za následek, že se na kůži léčeného pacienta začnou objevovat světlé skvrny (vitiligo). Závažnější autoimunitní projevy se však zatím při klinických zkouškách protinádorových vakcín nevyskytly.

Malé rozdíly mezi antigeny normálních a nádorových buněk jsou někdy příčinou nedostatečné imunitní odezvy, takže organismus nedokáže nádorové buňky zlikvidovat. Paradoxně může přitom vakcína dokonce vyvolat imunitní toleranci proti nádorovým antigenům. Vakcinace pak může průběh nádorového onemocnění dokonce urychlit.

Imunitní tolerance vůči nádorovým buňkám může být způsobena tím, že nádorová transformace je postupným procesem, takže si organismus může na nádorové buňky zvyknout. Imunitní systém organismu vykonává určitý selekční tlak, takže se množí jen nejodolnější buňky, s nimiž se imunitní systém už nedokáže vypořádat. Příčinou může být i to, že si nádorové buňky osvojí schopnost určitých regulačních buněk bránit tomu, aby imunitní systém napadal vlastní tkáň. Nedávno byl identifikován enzym označovaný jako A20, který v dendritických buňkách tlumí přenos signálu o zánětlivých procesech a tím ovlivňuje prezentaci antigenů. Při jeho nedostatku nebo po jeho inhibici produkují dendritické buňky nadměrná množství cytokinů a dalších stimulačních molekul. Důsledkem je silná imunitní odezva, kterou regulační buňky neumí potlačit. Při pokusech na myších se ukázalo, že imunitní systém, jehož hyperaktivita byla vyvolána dendritickými buňkami s deficitem A20, dokáže likvidovat nádorové buňky i tam, kde současné vakcíny byly neúčinné nebo jen málo účinné. Selektivní inhibice A20 by proto mohla účinnost protinádorové vakcinace zvýšit.

Při vývoji různých protinádorových vakcín byla pozornost věnována zejména vakcínám proti melanomu, kožnímu nádoru, jehož výskyt se zvyšuje v souvislosti se snižováním tloušťky ozónové vrstvy.

Melanom byl považován za imunogenní, ukázalo se však, že specifické antigeny buněk melanomu vyvolávají jen slabou imunitní odezvu. Výsledky zkoušek jsou proto spíše rozporné. Vakcína **Oncophage** (Antigenics Inc.) proti melanomu a nádorům ledvin je založena na vyvolání tvorby protilátek proti antigenům nádorových buněk pacienta. Při klinických zkouškách vakcíny u několika pacientů nádor vymizel, u jiných došlo k prodloužení doby bez známek onemocnění o 3-4 měsíce, celková průměrná doba přežití se však nezvýšila. Jiný typ vakcíny, **Canvaxin** (CancerVax), je založen na polyklonálních protilátkách proti 30 antigenům tří buněčných linií nádorových buněk melanomu i jiných nádorů. Zkoušky vakcíny ale neprokázaly, že by prodlužovala dobu přežití pacientů. Zlepšení výsledků léčby melanomu nepřinesly ani zkoušky vakcíny **GM2/KLH-QS-21**. Nově je v kombinaci s ipilimumabem úspěšně zkoušena vakcína **TriMixDC-MEL**, využívající dendritické buňky vzniklé z pacientových monocytů (druh bílých krvinek) do nichž byly elektrickým impulzem otevřeny póry umožňující vstup mRNA.

Několik vakcín je vyvíjeno proti pokročilým stadiím nádorům prostaty nereagujících na jinou léčbu.

Vakcína **Provenge** (sipuleucel T) povolená v dubnu 2010 FDA je připravována kultivací vlastních imunitních buněk pacienta s rekombinantním antigenem za přítomnosti faktoru stimulačního kolonie granulocytů a makrofágů GM-CSF. Antigenem je prostatická kyselá fosfatasa, která se vyskytuje v 95% buněk nádorů prostaty. Při klinických zkouškách Provenge prodloužila dobu přežívání pacientů o 4,1 měsíce. Vzhledem k vysoké ceně vakcíny (za jednu infuzi 31 tis USD, léčba zahrnuje 3 dávky za 93 tis. USD) je ale Provenge považována za kontroverzní. Jinými vakcínami určenými pro léčbu metastázujících nádorů prostaty nereagujících na hormonální léčbu jsou **PROSTVAC-V/TRICOM** a **PROSTVAC-F/TRICOM** (Bavarian Nordic), které jsou tvořeny oslabenými viry planých neštovic nebo drubežích neštovic geneticky upravenými tak, aby produkovaly prostatický specifický antigen PSA a současně i tři další proteiny (TRICOM), které pomáhají zvýšit schopnost imunitního systému likvidovat nádorové buňky. Při klinických zkouškách zvyšoval PROSTVAC dobu přežití pacientů o 8,5 měsíců. Vakcínu **DCVAC/PCA** proti nádorům prostaty založenou na prezentaci nádorových antigenů dendritickými buňkami izolovanými z krve pacienta vyvíjí i česká firma Sotio ze skupiny PPF miliardáře Kellnera, která přitom převzala výsledky Imunologického ústavu 2. LF UK. Vakcína postoupila již do fáze III klinických zkoušek nazvané VIABLE, jichž se má účastnit 1170 pacientů z ČR i řady dalších zemí včetně USA. Z předchozích výsledků vyplývá, že vakcína má dobrý bezpečnostní profil, že po subkutánním podání dendritické buňky migrují do lymfatických uzlin a aktivují imunitní mechanismy a že v kombinaci s chemoterapií prodlužuje dobu přežití pacientů. V tuzemském i zahraničním tisku měla vakcína až přehnaně pozitivní odezvu, vyvolala však odpor antivakcionistů z jakéhosi „Hnutí za osvobození vědomí“. Jeho členové upozorňují že „Kellner vytváří nebezpečnou vakcínu proti rakovině“ protože „kdo sleduje hollywoodské filmy (!) nebo historii 20. století tak ví, že tyto vakcíny mají většinou zcela opačné účinky, jež se zjistí a projeví až po několika letech či generacích....“). Podle zatím kusých zpráv má Sotio vyvíjet i vakcínu proti nádorům plic.

Vakcínou získávanou pomocí dendritických buněk z tkáně gliomů, nádoru mozku pacienta a peptidového komplexu proteinu tepelného šoku HSPPC96 jako antigenu je **Prophage G-100** (Agenus). Vakcína při klinických zkouškách prodlužovala ve srovnání se standardní léčbou dobu do progresu onemocnění o 146% a dobu přežití pacientů o 60%. Statut léčiva „sirotka“ získala vakcína **BiovaxID** proti ne Hodgkinsonským lymfómům, která se připravuje procesem „záchranné fúzní hybridizace“. Přitom jsou pacientovy nádorové buňky hybridizovány s buňkami produkujícími protilátky za vzniku heterohybridomů, které pak produkují imunoglobuliny charakteristické pro antigeny pacientova nádoru. Ty se izolují a použijí jako vakcína, která dále obsahuje faktor stimulační kolonie granulocytů a makrofágů a jako nosnou bílkovinu a adjuvans KLH, hemocyanin mořského plže přílipky. Při zkouškách prodloužila vakcína u pacientů střední dobu bez známek onemocnění z 30,6 na 44,2 měsíců.

Vakcína **belagenpumatucel-L** (Lucanix) při zkouškách fáze III významně zvyšovala dobu přežití pacientů s nemalobuněčnými nádory plic předléčených radioterapií (40,1 měs. po podání vakcíny proti 10,3 měsíců s placebem). Vakcína potlačuje tvorbu transformujícího růstového faktoru TGF- $\beta$ 2 nádorovými buňkami a stimuluje imunitní odezvu organismu.

Vakcína **GVAX Pancreas** obsahuje buňky nádoru pankreatu upravené tak, aby produkovaly faktor stimulační kolonie granulocytů a makrofágů GM-CSF, který podporuje imunitní odezvu organismu. V kombinaci s ipilimumabem zvýšila dobu přežití pacientů s pokročilým stadiem nádoru pankreatu na 5,5 měsíců ze 3,3 měsíců u pacientů léčených jen ipilimumabem. Ještě lepší výsledky byly dosaženy v kombinaci s vakcínou **CRS-207** s živými oslabenými buňkami *Listeria monocytogenes*, které exprimují mesothelin, bílkovinu obsaženou ve značných koncentracích v buňkách nádorů pankreatu. Vakcína CRS-207 stimuluje imunitní systém pacienta k likvidaci buněk obsahujících mesothelin.

Proti více typům nádorů, na jejichž buňkách se vyskytuje nádorový antigen MUC-1 má působit vakcína **ONT-10**. Tato experimentální vakcína proti nádorům mozku u dětí využívá k vyvolání imunitní odezvy peptidy z epitopu (oblasti, na níž se váží protilátky) antigenů vyskytujících se v glioblastomech, nádorech mozku. Podobně má účinkovat liposomální vakcína **tecemotid** (dříve Stimuvax, Merck KGaA) stimulující T-lymfocyty vyhledávající buňky s antigenem MUC1. Vakcína v kombinaci s cisplatinou byla ale neúspěšně zkoušena u nádorů plic a další vývoj byl zastaven. Při rozsáhlých (přes 200 pacientů) zkouškách fáze III selhala také vakcína **MAGE-A3** (GlaxoSmithKline) proti nádorům plic s nadměrně exprimovaným genem *MAGE-A3*. Nyní se zjišťuje, jestli by byla vhodná alespoň pro určité skupiny pacientů. Vakcína **HSPPC-96** (Vitespen) proti nádorům mozku dospělých využívá k navození imunitní odezvy proteiny tepelného šoku HSP-96 izolované z pacientových nádorových buněk. Při zkouškách fáze 2 prodloužila vakcína dobu přežití pacientů z 32 na 47 týdnů. Další vakcína proti nádorům mozku **ICT-107** (ImmunoCellular Therapeutics) je tvořena dendritickými buňkami získanými z krve pacienta, které jsou kultivovány v přítomnosti syntetických peptidů se sekvencemi, které se vyskytují v epitopech 6 nádorových antigenů z buněk glioblastomu. Tři z těchto antigenů se vyskytují i na kmenových nádorových buňkách, takže vakcína může atakovat i přežívající buňky zodpovědné za recidivu nádorového bujení. Vakcína byla zkoušena jako doplněk chemo- a radioterapie, po její aplikaci se střední doba bez známké vracejícího se onemocnění prodloužila na 16,9 měsíců z 6,9 měsíců při standardní terapii. Byl jí udělen statut léku pro vzácná onemocnění. Podobným typem vakcíny, rovněž proti nádoru mozku, glioblastomu je **DCVax-L** (Northwest Biotherapeutics). Další vakcína proti agresivnímu nádoru mozku, glioblastomu, **rindopepimut** (Rintega, Celldex Therapeutics), působí na buňky s mutací genu *EGFRvIII*. Po Provenge měla být druhou povolenou protinádorovou vakcínou. Po jejím podání spolu s bevacizumabem mělo přežít 5 let od diagnózy 11% pacientů, z nevakcinovaných žádný. Nejnovější klinické výsledky ale její úspěšnost nepotvrdily.

Peptidická vakcína **NeuVax**, kde imunitní odezvu mají vyvolávat peptidický fragment E75 receptoru HER2 spolu s GM-CSF, má být u recidivujících nádorů prsu účinnější než trastuzumab. Vakcína stimuluje cytotoxické T buňky k zásahu proti buňkám, v nichž je exprimován receptor HER2.

Zatímco vakcíny Gardasil a Cervarix mají preventivně chránit proti infekci onkogenními viry HPV, peptidická vakcína **TriVax HPV** je vyvíjena k léčbě nádorového onemocnění viry vyvolaného. Vakcína vyvolává trvalou odezvu imunitního systému na nádory exprimující peptid E7viru HPV. Protože tento peptid je organismu cizí, nedochází přitom k vedlejším účinkům autoimunitního charakteru. Jinou vakcínou proti nádorovému onemocnění vyvolanému HPV je **TG4001** (Merck), která je úspěšně zkoušena v kombinaci s avelumabem.

Vedle vakcín proti nádorovým nebo virovým antigenům je ve vývoji i **vakcína proti telomerase**.

Za vakcíny nové generace jsou považovány **DNA vakcíny**. Místo imunogenních proteinů a peptidů se u nich využívá k vyvolání imunitní odezvy DNA, která vhodné antigeny kóduje. DNA se přitom do buněk vnáší podobně jako při genové terapii. Nevýhodou DNA vakcín je slabší imunitní odezva.

Větší zkušenosti s protinádorovými DNA vakcínami zatím chybí. Přípravovány jsou zkoušky dvou DNA vakcín pro léčbu akutní i chronické myeloidní leukemie. Ve vývoji je také DNA vakcína **SynCon** zacílená na dva antigeny nádorů prostaty.

Léčbě vakcínami připravovanými z krve pacientů se podobá **buněčná imunoterapie**.

Jeden směr buněčné imunoterapie představuje kultivace pacientových vlastních imunitních buněk – lymfocytů, které mohou infiltrovat nádor (TILs– Tumor Infiltrating Lymphocytes). Ty se oddělí z periferní krve ze vzorků pacientova nádoru a namnoží kultivací v pacientově séru v přítomnosti interleukinu 2. Přitom se získají tzv. LAK buňky (LAK = Lymphokine-Activated Killer cells, lymfokiny aktivované zabíječské buňky), které schopné lyzovat pacientovy nádorové buňky. Jejich účinnost může být při kultivaci zvýšena přidávkou TNF $\alpha$  a INF $\gamma$ , popř. i dalších cytokinů. Po namnožení se pak asi  $10^{10}$  LAK buněk podá v infuzi zpět pacientovi

V r. 2013 byl za průlom protinádorové terapie označen postup **adoptivní imunoterapie T- buňkami**. Jde o účinnou obdobu léčby vakcínami z krve pacientů. Využívají se přitom T-lymfocyty pacienta, které byly aktivovány interleukinem 2 a staly se tak cytotoxické. Varianty postupu jsou označovány zkratkami **CAR-T** (Chimeric Antigen Receptor T-cell approach) nebo **TCR** (T-Cell Receptors).

Prvním krokem postupu CAR-T je izolace T-lymfocytů z pacientovy krve. Následuje jejich úprava metodami genového inženýrství tak, aby se na jejich povrchu vyskytoval chimérický receptor, umožňující lepší a specifitější rozpoznávání určitého nádorového antigen, např. antigenu CD19, který se vyskytuje na většině leukemických buněk a buněk lymfomů. T-buňky jsou ještě dále modifikovány, aby se po přichycení na buňky s antigenem CD19 pomnožily, vyhledaly další nádorové buňky a zlikvidovaly je. Po úpravě se T-lymfocyty s chimérickým antigenním receptorem pro nádorový antigen v tkáňové kultuře namnoží a pak vrátí do pacientova krevního oběhu. Přístup CAR-T je zkoušen pro léčbu různých typů leukemie, lymfomů, mnohočetného myelomu, melanomu, nádorů vaječníků a pankreatu. Je velmi úspěšný, zatím byl ale odzkoušen jen na malém počtu pacientů. Ve skupince pacientů s pokročilým stadiem akutní lymfoblastické leukemie, kterým byl prognózován již jen měsíc života, vymizelo po „živé terapii“ CAR-T v 94% případů k vymizení symptomů onemocnění. U různých typů hematologických malignit došlo k příznivé terapeutické odezvě u 80% pacientů. V březnu 2014 byl postup povolen pro léčbu difuzního velkobuněčného lymfomu.

TCR, receptor na povrchu T-lymfocytů rozeznává antigeny vázané na hlavní histokompatibilní komplex (MHC). Při interakci TCR s uskupením antigen-MHC jsou T-buňky aktivovány vstupují do buněčného cyklu a množí se. Při screeningu lidských T-lymfocytů se získají T-buňky, které silně interagují s určitým nádorovým antigenem. Pak se identifikuje gen kódující příslušný TCR. Ten se pak pomocí retrovirového vektoru vnese do pacientových T-lymfocytů. Upravené lymfocyty se pak vrátí pacientovi, aby likvidovaly buňky jeho nádoru s příslušným antigenem.

Od DNA vakcín je jen malý krok k **viroterapii**, léčbě onkolyticky působícími viry nebo viry genově upravenými tak, aby aktivovaly imunitní systém pro likvidaci nádorových buněk.

Onkolytický virus **Rigvir** byl vyvinut v Litvě, kde byl povolený pro protinádorovou terapii již v r. 2004. Genově modifikovaný adenovirus **Oncorine** (H101, Sunway Biotech), jehož genom je upravený tak, aby byla zneškodněna antivirová obrana organismu, byl povolen v Číně v r. 2005 pro léčbu nádorů hlavy a krku. Oncorine přednostně infikuje nádorové buňky. Napadá sice i normální buňky, jeho přídavek k chemoterapii ale prodlužuje dobu přežití pacientů na dvojnásobek. V r. 2006 byl v Izraeli izolován typ viru Newcastlelské nemoci napadající drůbež, který působil onkolyticky na nádory mozku. Lidské **reoviry** infikují dýchací a trávicí systém, infekce se obvykle projevuje jen jako mírná chřipka. Pro normální tkáňové buňky nejsou příliš nebezpečné, mohou ale selektivně zabít nádorové buňky, a to i kmenové. Napadají především nádorové buňky s onkogenem *ras*. Klinicky zkoušený u nádorů hlavy a krku, plic, pankreatu, střev a vaječníků je **pelareorep** (Reolysin, Oncolytics Biotech), kádnáský přípravek obsahující serotyp 3 reoviru. Reoviry V r. 2015 byl pelareorep povolen jako lék pro vzácná onemocnění pro léčbu nádorů vaječníků. **NTX-010** (Neotropix) je pikornavirus nazývaný virus údolí Seneca. Je zkoušen u nádorů plic a některých dětských nádorů. Respirační syncytiální virus (RSV), který je původcem těžkých respiračních onemocnění u malých dětí, může u dospělých napadat a likvidovat nádorové buňky, a to i u imunokompetentních jedinců. Jeho injekce do nádorové tkáně, např. nádorů prostaty, by u pacientů s nenarušenou imunitou měly být bezpečné, protože virus jinak napadá jen plicní tkáň, a to hlavně u dětí. **Virus myxomatózy**, králičí nemoci, který není pro člověka infekční, může při podání spolu s imunosupresivně působícím léčivem rapamycinem, napadat a usmrcovat buňky glioblastomu, zhoubného nádoru mozku. Podobně tomu je v případě **parvoviru H-1**, který je infekční pro hlodavce, pro člověka je však neškodný. Pokusy na zvířatech s transplantovanými lidskými nádory ukázaly, že parvovirus napadá buňky nádorů mozku, ale okolní zdravou nervovou tkáň nepoškozuje. V protinádorové terapii mohou být využity i viry spalniček a planých neštovic, jde ale o viry geneticky modifikované, aby přednostně napadaly nádorové buňky. Pro terapii nádorů prostaty nereagujících na antiandrogeny byl upraven pro lidi neškodný ptačí virus způsobující newcastleskou nemoc drůbeže, tak aby se množil pouze v buňkách s aktivním prostatickým specifickým antigenem, PSA. Onkolytické vlastnosti některých virů mohou být zlepšeny také vnesením genu kódujícího bakteriální chondroitinázu, enzym odbourávající proteoglykany vyplňující prostor mezi buňkami některých nádorů. V klinickém zkoušení jsou přípravky obsahující původní, „divoké“, nebo i genově modifikované viry z nejméně 9 čeledí virů (adenoviry, pikornaviry, herpetické viry, paramyxoviry, parvoviry, reoviry, poxviry, retroviry a rhabdoviry). Onkolyticky působícím virem je modifikovaný adenovirus **ONYX-015**. Ten selektivně zabíjí jen buňky obsahující mutovaný tumorsupresorový gen *p53*, zatímco na buňky s funkčním genem *p53* nepůsobí. Podobně působí jiný modifikovaný adenovirus **enadenotucirev** (PsiOxus) zkoušený u nádorů vaječníků rezistentních k platinovým cytostatikům, Destrukci nádorových buněk a aktivaci imunitního systému organismu vyvolává další modifikovaný adenovirus **CG0070**. Jiný virus upravený metodami genového inženýrství může usmrcovat buňky s mutovaným genem *Rb*. Herpetický virus **HSV1716** byl metodami genového inženýrství upraven tak, aby se mohl množit pouze v dělicích se buňkách. Po injekci do nádorové tkáně zabíjel a lyzoval nádorové buňky, zatímco normální diferencované tkáňové buňky nepoškozoval. Jeho použití bylo úspěšně vyzkoušeno na nádorech mozku, zahájeny byly zkoušky u některých sarkomů postihujících dětské pacienty. **Adenovirus Delta-24-RGD** je genově modifikovaný tak, aby atakoval buňky nádoru mozku, glioblastomu, klinicky je zkoušen od r. 2009. Úspěšně zkoušeným protinádorovým virem je **peaxstimgen devacirepvec (Pexa-Vec, JX-594, Jennerex Biotherapeutics)**, modifikovaný virus planých neštovic. Má odstraněný virový gen pro thymidinkinázu a vložené lidské geny pro  $\beta$ -galaktosidázu a faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů, který stimuluje imunitní systém. Představuje tak přípravek kombinující genovou terapii s viroterapií. Může se replikovat pouze v buňkách s vysokou hladinou thymidinkinázy, což jsou nádorové buňky s mutovanými geny *RAS* nebo *p53*. Takové buňky pak virus lyzuje. Byl zkoušen u nádorů jater, kde ale nebylo dosaženo předpokládaného zlepšení, zkouší se ale dále u nádorů vaječníků, ledvin, střev a konečníku. **Talimogen laherparepvec** (Imlygic, Amgen) je virus Herpes simplex (původce oparů) modifikovaný vložením genu kódujícího faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF). Po injekci do nádoru dochází k nekróze buněk, do nichž virus proniknul. Současně je přítom aktivována imunitní obrana organismu proti buňkám s nádorovými antigeny na povrchu. Výsledky zkoušek u při léčbě neoperabilního melanomu byly příznivé a v závěru roku byl T-VEC pro tuto indikaci v USA i EU povolen, pokračují zkoušky u nádorů hlavy a krku, prsu, pankreatu, střev a konečníku. Podobným modifikovaným virem je japonský **telomelysin** (Oncolys BioPharma). Vložený gen pro GM-CSF obsahuje také adenovirus **CG0070** (Cold Genesis) zkoušený u nádorů močového měchýře. **TNF erade** (Biologic) obsahuje gen pro TNF zabudovaný do upraveného adenoviru. Je zkoušen při léčbě nádorů pankreatu, hlavy a krku, kolorektálního karcinomu a melanomu v kombinaci s chemoterapií a/nebo radioterapií. Zahájeny byly klinické zkoušky fáze I **Ad5-TRAIL** (University of Iowa), adenovirového vektoru s lidským genem kódujícím induktor apoptózy TRAIL (TRAIL je zkratka pro **TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand**). Několik přípravků obsahuje geny kódující cytokiny regulující imunitní systém. Při léčbě nádorů močového měchýře je zkoušen **SCH 721015** (FKD Therapy, Finsko) tvořený adenovirem se zabudovaným genem pro interferon  $\alpha_{2B}$ . Při léčbě melanomu nebo v kombinaci s radioterapií je zkoušen přípravek je **INGN-241** (Introgen Therapeutics) s DNA kódující IL-24 (interleukin 24), který působí jako tumorsupresor, ale ovlivňuje i imunitní systém jako cytokin.

Podobnou funkci má přípravek **Ad.II-12** (ZIOPHARM Oncology), který obsahuje adenovirový vektor s genem pro interleukin 12. Přípravek stimuluje imunitní systém organismu k likvidaci nádorových buněk T-lymfocyty a buňkami nazývanými přirození zabíječi (NK buňky, natural killer cells) a také má brzdit angiogenesi, zkoušen je u metastázuji- cích melanomů, účinný by měl být i u nádorů jater a střev. Přípravek **VB-111** (VBL Therapeutic, Izrael) tvořený nereplikujícím se serotypem 5 adenoviru s genem kódujícím protein FasC a promotorem regulujícím expresi prekur- zoru PPE1 (preproendothelin-1), z něhož v organismu vzniká endothelin 1. Přípravek brzdí vznik nových cév v nádoru. Zkoušen je ve fázi II u nádorů štítné žlázy a glioblastomu.

Virus coxsackie, který je příčinou nachlazení a různých dětských infekcí, byl v Australii modifikován na onkolytický virus **Cavatak** (Viralytic), který byl kombinací s pembrolizumabem úspěšný při prvních zkouškách léčby melanomu. Genom herpetického viru **HSV1716** (přípravek **Seprevir**) je upraven delecí jednoho genu tak, aby se virus mohl mno- žit pouze v dělicích se buňkách. Po injekci do nádorové tkáně virus zabíjí a lyzuje nádorové buňky, zatímco normální diferencované tkáňové buňky nepoškozuje. Jeho použití bylo úspěšně vyzkoušeno na nádorech mozku, zahájeny byly zkoušky u některých sarkomů postihujících dětské pacienty. Připraveny byly i některé další varianty tohoto viru, např. varianta nesoucí gen pro transportér noradreanilu, který může do nádorových buněk specificky vnášet některé slouče- niny s navázaným radioaktivním jodem. Jeho zařazení pak jsou vystaveny jen nádorové buňky. Podobně jako Seprevir působí proti nádorům mozku a také nádorům vaječníků genově upravený onkolytický virus Herpes simplex **34.5ENVE** který má i antiangiogenní účinnost. Zkoušen je jednak samotný, jednak v kombinaci s doxorubicinem.

Zmíněné modifikované viry jsou lidské, což znamená určité omezení pro jejich použití. Italští virologové proto vytvo- řili onkolytický virus **BoHV-4** modifikací herpetického viru, který způsobuje průjmy hovězího dobytka. Ještě dále přitom šli pracovníci několika amerických biotechnologických pracovišť, kteří v listopadu 2016 ohlásili, že vytvořili syntetický virus **sCAV2** s dosud největším umělým genomem (34 tis. párů bází), který má selektivně ničit nádorové buňky rakoviny kostí osteosarkomu a přitom nepoškozo- vat normální buňky.

Jinou možnost viroterapie představuje vpravení „sebevražedných“ genů do nádorových buněk.

Takovým sebevražedným genem je gen z viru Herpes simplex, který kóduje thymidinkinasu. Gen je v přípravku **siti- magen ceradenovec** (Cerepro, Ark Therapeutics) vložen do adenovirového vektoru (ad-HSV-tk). Zkoušen je při léčbě mozkových nádorů, gliomů. Virová kinasa aktivuje antivirotikum gancyklovir, který je účinný jen po převedení na fosfát. V normálních buňkách se kinasa schopná fosforylovat gancyklovir nevyskytuje, takže antivirotikum zabíjí jen buňky napadené virem kódujícím thymidinkinasu. Podobnými přípravky jsou **GliAtak, ProstAtak a PancAtak** (Advantagene) určené pro léčbu nádorů mozku, prostaty a pankreatu, při jejichž aplikaci se využívá místo gan- cykloviru valacyklovir. Jiné sebevražedné geny kódují enzymy štěpící neškodná profarmaka na cytotoxické produkty. Selektivně, jen na nádorové buňky, má působit přípravek **vocimagen amiretorepvec** (Toca 511, Tocagen) s retrovirovým replikujícím se vektorem, jímž se vnáší do nádorových buněk gen kódující cytosindeaminasu. Zkoušen je u nádorů mozku, aplikuje se přímo do nádoru. Po podání 5-fluorcytosinu dochází v nádorových buňkách k jeho enzymatické deaminaci na protinádorově účinný 5-fluoruracil.

**Genová terapie** je založena na vnášení celých funkčních genů do organismu. Nejde tedy o relativně malé oligonukleotidy, ale rozsáhlé dvouřetězcové DNA. Teoreticky může být do buněk dopraven „na- hý“ gen, samotná kódující DNA. Prakticky se ale využívá vnesení genu do buněk pomocí vhodného „vektoru“. Zatím se geny nejčastěji vkládají do virů, které bývají upravené tak, že je eliminována je- jich patogenita. Zkoušena je „doprava“ genů do buněk pomocí plasmidů i dalších nevirálních vektorů.

Genová terapie byla poprvé využita při léčbě kombinované imunodeficiencie (SCID, severe combined immunodeficiency) způsobené mutací genu, který zajišťuje růst a zrání buněk imunitního systému. Nemoc je naštěstí velmi vzácná. Gen se vyskytuje na nepárovém chromosomu, takže SCID onemocní jen chlapci. Postižení nemají funkční imunitní systém a mo- hou proto snadno podlehnout i lehkým nálezům. Aby se vyhnuli infekcím, musí žít v aseptickém prostředí. To jim zajišťují plastové vaky, „bubliny“, naplněné filtrovaným vzduchem (nemoc je proto anglicky nazývána nemoc bublinových chlapců, „bubble boy disease“). Přes veškerou péči se postižení dožívají v průměru jen 12 let. Léčba byla možná jen transplantací kostní dřeně. Ta však nemusí být vždy úspěšná a kromě toho je problémem nalezení vhodného dárce. Genová terapie spočí- vající ve vnesení funkčního genu do organismu postižených pomocí virového vektoru byla považována za velký přínos, protože se jí podařilo úspěšně vyléčit 15 chlapců z 18. Pak se však vyskytly komplikace, když jeden z léčených chlapců onemocněl leukemií. Ukázalo se, že vnesený gen se dostal do blízkosti genu, který se podílí na regulaci buněčného dělení. Ten přitom byl aktivován a spustil procesy vedoucí ke vzniku nádorového onemocnění. Další zkoušky genové terapie proto byly v říjnu 2002 pozdrženy do doby, kdy budou získány lepší předpoklady, že pacienti se uzdraví a neonemocní jinak. Později byly zkoušky obnoveny, avšak v r. 2005 další z dříve léčených pacientů onemocněl opět leukemií. Zkoušky byly znovu pozastaveny a hledány byly možnosti selektivního vnesení genů na taková místa genomu, kde by nežádoucí aktivace sousedních genů nehrozila. Tuto možnost přinesla technika označovaná zkratkou CRISPR-Cas9, kterou v r. 2012 vyvinula Jennifer Doudna z university v Berkeley. Tato technika využívá specifický oligoribonukleotid se shluknutými pravidelně proloženými palindromickými repeticemi (CRISPR = Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats) s asociovanou nukleasou Cas9 (CRISPR associated protein 9), který umí vyhledat určitou specifickou sekvenci DNA. Enzym Cas9 tam pak DNA rozstříhne a připraví tak místo pro přesné vložení nového genu.

Nádorové onemocnění je vyvoláno poruchami genů, genová terapie je tedy jednou z nabízejících se perspektivních možností léčby rakoviny. Přípravky pro genovou terapii jsou zkoušeny u pokročilých stadií nádorů, možnost připojení funkčních genů na nevhodné místo proto není tak riziková, jako je tomu při genové terapii jiných chorob. Bude však třeba ještě mnoho úsilí, než ji bude možné rutinně využívat. Mohla by se uplatnit i při posílení odolnosti normálních buněk vůči cytostatikům a genetické imunomodulaci, ke zvýšení antigenního charakteru povrchu nádorových buněk pomocí DNA vakcín nebo ke znásovení počtu genů zodpovědných za produkci cytokinů regulujících imunitní odezvu organismu.

Prvním přípravkem povoleným pro genovou protinádorovou terapii již v r. 2004 je **gencicin** (SiBiono), rekombinantní adenovirus modifikovaný tak, aby exprimoval aktivní gen *p53*. Gencicin byl povolen pro léčbu nádorů hlavy v Číně, kde podmínky schvalování nových přípravků patrně nejsou příliš přísné. Informací o účinnosti a dalších vlastnostech přípravku je k dispozici jen málo. Podobným přípravkem je **kontusgen ladenovek** (contusgene ladenovec, Advexin, Introgen Therapeutics), který obsahuje lidský tumorsupresorový gen *p53* a promotor cytomegaloviru zabudované do adenoviru 5 tak, aby nahradily virové geny *E1A* a *E1B*. Při klinických zkouškách byl virový vektor s funkčním genem *p53* vstříknut pacientům přímo do nádoru. U 29% pacientů došlo ke zmenšení nádoru a interval do progresu nádoru činil více než 12 měsíců, u 48% pacientů došlo k nejméně tříměsíční stabilizaci onemocnění. Dlouhodobé toxické účinky nebyly zjištěny ani za 46,5 měsíců. Jiný adenovirový přípravek kódující tumorsupresorový gen *REIC/Dkk3* vyvíjený japonskou firmou Momotaro Gene se zkouší při léčbě nádorů prostaty. **TNF erade** (Biologic) je přípravek obsahující gen pro faktor nekrózy nádorů zabudovaný do upraveného adenoviru. Je zkoušen při léčbě nádorů pankreatu, hlavy a krku, kolorektálního karcinomu a melanomu v kombinaci s chemoterapií a/nebo radioterapií. Podobným přípravkem pro genovou terapii, který rovněž postoupil do fáze I klinických zkoušek je **Ad5-TRAIL** (University of Iowa), adenovirový vektor s lidským genem kódujícím induktor apoptózy TRAIL (TRAIL je zkratka pro **TNF-related apoptosis inducing ligand**). Několik přípravků obsahuje geny kódující cytokiny regulující imunitní systém. Při léčbě nádorů močového měchýře je zkoušen **SCH 721015** (FKD Therapy, Finsko) tvořený adenovirem se zabudovaným genem pro interferon  $\alpha_{2B}$ . Při léčbě melanomu nebo v kombinaci s radioterapií je zkoušen přípravek je **INGN-241** (Introgen Therapeutics) s DNA kódující IL-24 (interleukin 24), který působí jako tumorsupresor, ale ovlivňuje i jako cytokin imunitní systém. Podobnou funkci má přípravek **Ad-RTS-hIL-12** (ZIOPHARM Oncology), který obsahuje adenovirový vektor s genem pro interleukin 12. Přípravek stimuluje imunitní systém organismu k likvidaci nádorových buněk T-lymfocyty a buňkami nazývanými přirození zabíječi (NK buňky, natural killer cells) a také má brzdit angiogenesi, zkoušen je u metastázujících melanomů, účinný by měl být i u nádorů jater a střev. Jeho zkoušení při léčbě nádorů mozku ale zkomplikovalo úmrtí pacienta na nitrolebeční krvácení. Přípravek **VB-111** (VBL Therapeutic, Izrael) tvořený nereplikujícím se adenovirem s genem kódujícím protein FasC a promotorem regulujícím expresi prekurzoru PPE1 (preproendothelin-1), z něhož v organismu vzniká endothelin 1. Přípravek brzdí vznik nových cév v nádoru. Zkoušen je ve fázi II u nádorů štítné žlázy a glioblastomu.

Několik přípravků pro genovou terapii využívá k vnesení genů do buněk místo virů plasmidy.

Plasmidy jsou kruhové útvary tvořené dvouřetězcovou DNA, které se mohou přirozeně vyskytovat v bakteriích i v některých eukaryotických buňkách. Ve vhodných hostitelských buňkách se mohou nezávisle replikovat, mohou se ale také integrovat do chromosomů a pak replikovat jako jejich součást. **EGEN-001** (Egen) je jiným přípravkem s DNA kódující interleukin 12. Plasmidová DNA je „holá“ a tedy silně polární, plasmidy používané v genové terapii jsou proto aplikovány v lipidických částicích nesoucimi kladné náboje. V přípravku EGEN-001 to je lipopolyamin, kopolymer ethylenglykolu a ethylendiaminu, s navázaným cholesterolem. Zkoušen je při léčbě nádorů vaječníků a kolorektálního karcinomu. **Velimogen aliplasmid** (AlloVectin-7, Vical) je lipidický komplex s plasmidem obsahujícím sekvence DNA kódujícími lidský leukocytární antigen HLA-B7 a  $\beta_2$ -mikroglobulin. Kódované proteiny společně vytvářejí hlavní histokompatibilní komplex I (MHC-I), který lze považovat za jakýsi podstavec pro prezentaci různých peptidů z nádorové buňky. Ty pak dávají signál T-lymfocytům, aby buňku likvidovaly. Klinické zkoušky u metastázujících melanomů ale přinesly zklamání, výsledky nebyly lepší než při běžné léčbě. Selektivně působící jen na nádorové buňky má být přípravek **BC-819**, což je komplex polyethyleniminu a plasmidu obsahujícího gen kódující podjednotku A toxinu bakterií záškrtu. Tvorba toxinu vyžaduje součinnost s promotorem H19. Ten není aktivní v normálních buňkách, je ale reaktivován v nádorových buňkách. Toxin tak není produkován v normálních buňkách, ale nádorové buňky zabíjí. BC-819 se aplikuje do nádoru. Zkouší se při léčbě nádorů močového měchýře, úspěšné byly preklinické zkoušky inhalačního podání přípravku u nádorů plic.

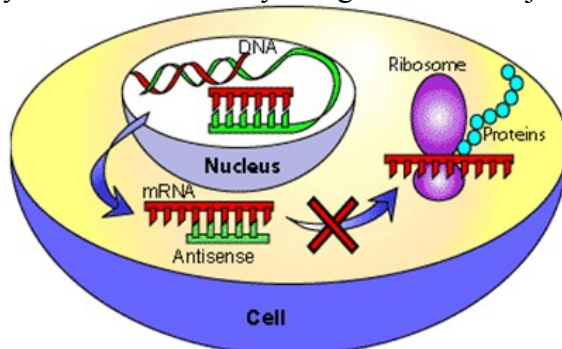
Kromě virů se v protinádorové terapii mohou uplatnit i **bakterie**.

Zkoušeno je využití mutant bakterií *Salmonella typhimurium* vybraných tak, aby se přednostně množily v nádorových tkáních s deficitem genu *p53*. Zajímavý postup kombinující bakterioterapii s radioterapií představuje využití infekce oslabenými bakteriemi *Listeria monocytogenes*, které se mohou množit pouze v nádorových buňkách. Na buňky je navázán izotop rhenia  $^{188}\text{Re}$ , jehož  $\beta$ -záření pak likviduje infikované buňky a jejich blízké okolí. Vzhledem ke krátkému poločasu je poškození zdravých buněk minimální. Při zkouškách na vyšším modelu metastázujících nádorů pankreatu se podařilo eliminovat až 90% metastáz. V přípravku **Axalimogene filolisbac** jde o stejné bakterie s genomem upraveným transféci plasmidem kódujícím protein peptid E7 viru HPV16, které selektivně hubí buňky nádorů vyvolaných infekcí papilomavirem – nádorů děložního čípku, hlavy a krku a konečníku, kde se virus vyskytuje. Pro tyto indikace byl přípravek povolen jako lék „sirotek“



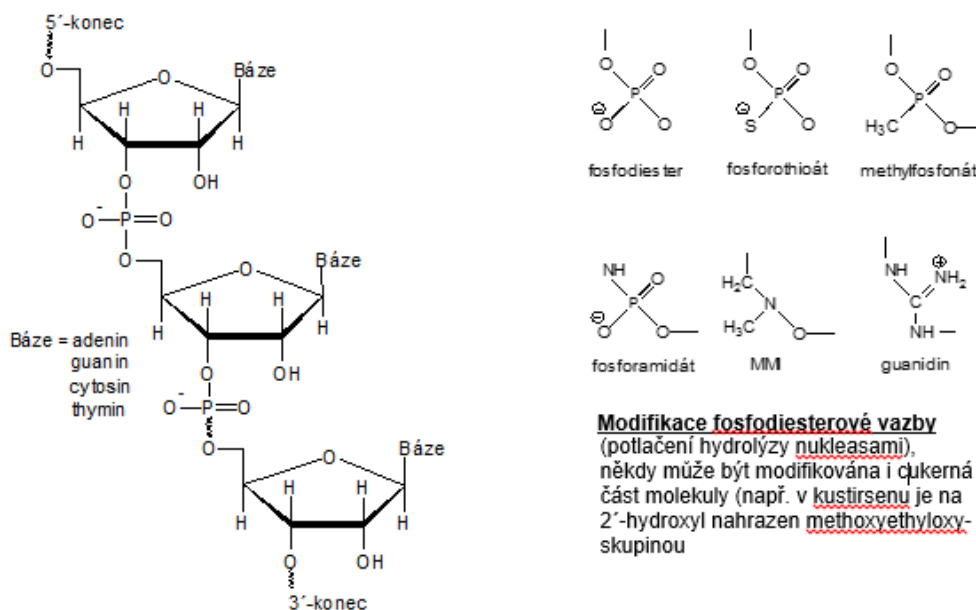
## Oligonukleotidy blokující přenos genetické informace

Další možnost „biologické“ protinádorové terapie představují zásahy do přenosu genetické informace. Přepis onkogenů lze blokovat pomocí **komplementárních** (protisměrných, antisense) **oligonukleotidů**. Jde o krátké jednořetězcové sekvence ribo- nebo deoxyribooligonukleotidů nebo jejich analog („peptidových NA“) s 15-30 bázemi, které jsou obvykle spojeny modifikovanými fosfátovými vazbami nebo jsou pegylovány, popř. mají v poloze 2 cukerné části místo vodíku methoxylovou skupinu. Takové modifikace zvyšují stabilitu molekul oligonukleotidů, které pak lépe odolávají hydrolyze katalyzované nukleasami. Když se komplementární oligonukleotid naváže na určitý úsek mRNA, je zablokována tvorba příslušné bílkoviny a mRNA s navázaným oligonukleotidem je rozštěpena ribonukleasou H.



Blokování translace komplementárními (antisense) oligonukleotidy

Komplementární oligonukleotidy jsou studovány již od 70. let. Jejich klinické zkoušení ale zatím nepřineslo žádný výrazný úspěch a tak se (na rozdíl od monoklonálních protilátek) v protinádorové terapii neprosadily. Širšímu terapeutickému využití komplementárních oligonukleotidů nebo i ribozymů (viz dále) bude zřejmě bránit i jejich omezená stabilita, problémy s průnikem do buněk i vysoká cena. Pro zvýšení stability musí být modifikovány jejich fosfátové skupiny:



Prvním povoleným komplementárním oligonukleotidem je **formivirsén** (Vitravene, Isis), který však není určen pro protinádorovou terapii, ale pro léčbu cytomegalovirových infekcí v očním lékařství. Protinádorově účinný je **oblimersén** (Gena-sense, Genta), který je komplementární k prvním 6 trinukleotidovým sekvencím genu kódujícího inhibitor apoptózy, protein Bcl-2. Zkoušen byl pro léčbu chronické myeloidní leukémie a pokročilých stadií melanomu, povolen ale nebyl. Komplementárním nukleotidem ve fázi III klinických zkoušek při léčbě nádorů mozku je **trabedersén**, který blokuje tvorbu transformujícího růstového faktoru TGFβ2. Statut urychleného posouzení obdržel **kustirsén** (OGX-011/TV1011, OncoGenex Pharmaceuticals), komplementární oligonukleotid druhé generace blokující tvorbu klusterinu, kyselého glykoproteinu (označovaného také TRPM-2, což je zkratka pro Testosterone-Repressed Prostatic Message), který je nadměrně exprimován v buňkách nádorů prostaty a blokuje jejich apoptosu. Podání kustirsenu potlačuje rezistenci nádorových buněk a zvyšuje účinnost používaných chemoterapeutik, používá se proto v kombinaci s docetaxelem a prednisonem. Kromě léčby rezistentních nádorů prostaty je kustirsén zkoušen i při léčbě nádorů plic.

Podobným komplementárním oligonukleotidem je **apatorsen** (OGX-427), tvořený 20 nukleotidy (20-mer, od meros = řecky část) guaninu, 5-methylcytosinu a thyminu, z toho 16 deoxyribonukleotidy a 4 nukleotidy 2'-O-methoxyethylribosy spojenými fosforothioátovými vazbami. Apatorsen blokuje tvorbu proteinu tepelného šoku Hsp27, který je produkován buňkami nádorů prostaty, močového měchýře a některých dalších nádorů jako odezva na stres způsobený chemoterapií a radioterapií. HSP27 podporuje buněčné dělení a růst a brání apoptóze, jeho tvorba souvisí i s rezistencí nádorových buněk na antiandrogeny a další léčiva. Apatorsen byl zkoušen v kombinaci s abirateronem u nádorů prostaty, s jinými léčivy při léčbě nádorů plic a močového měchýře, neúspěch přinesly zkoušky v kombinaci s abraxanem (paklitaxel vázaný na albumin) při léčbě nádorů pankreatu. **Cenersen** (Aezea, Eleos), je rovněž 20-mer s fosforothioátovými vazbami. Je komplementární k mutované formě genu *p53* a má potlačovat tvorbu neúčinné varianty proteinu p53. Zkoušen byl při léčbě akutní myeloidní leukemie v kombinaci s idarubicinem a cytarabinem. **Archexin** (Rexahn) je 20-mer komplementární k mRNA kódující serin-threoninovou proteinkinazu Akt1, která se podílí na potlačování apoptosy a je ve zvýšené míře exprimována v řadě nádorů. Má statut zrychleného posuzování léků sirotků pro 5 nádorových indikací, v kombinaci s gemcitabinem je zkoušen při léčbě nádorů pankreatu. Ve fázi II klinického zkoušení jsou ještě komplementární oligonukleotidy **ISIS-EIF4<sub>Rx</sub>** blokující gen pro eukaryotický iniciační faktor 4e, zkoušen je u nádorů plic a pankreatu; **ISIS-STAT3<sub>Rx</sub>**, který blokuje gen pro „převodník signálu a aktivátor transkripce 3“, protein STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3), jenž je nadměrně účinný v řadě nádorových buněk, kde brzdí apoptosu a podporuje růst, zkoušen je u solidních nádorů a lymfomů. **LOR-2040** je komplementární oligonukleotid blokující tvorbu podjednotky M2 ribonukleotidifosfátoreduktasy, enzymu, který se podílí na syntéze DNA a tím ovlivňuje buněčné dělení. Jeho nadměrná exprese stimuluje růst nádorů. Zkoušen je při léčbě akutní myeloidní leukemie, účinný by měl být i u metastázujících nádorů prsu, nádorů střev a ledvin a nemalobuněčných nádorů plic. U tří jiných komplementárních oligonukleotidů (**BP-100-1.01**, **EZN-2968 A EZN-4176**) byla zahájena fáze I klinického zkoušení, několik dalších je v preklinickém vývoji. Mezi komplementární oligonukleotidy lze zařadit i některá již zmíněná potenciální léčiva zkoušená jako inhibitory telomerasy (viz Farm 11).

Od komplementárních oligonukleotidů jsou odvozena tzv. **morfolina** (Morpholinos), které mají cukernou složku nahrazenou zbytkem morfolinu. Mívají kolem 25 bází a v důsledku své nepřírozené struktury nejsou degradovány nukleasami. Morfolina účinně blokují translaci mRNA, ukázalo se však, že mohou negativně ovlivňovat sestřih pre-mRNA, takže se do řetězce mRNA dostávají místo exonů některé introny. Jejich vnašení do buněk je komplikované a mají malou specificitu. Jejich chybné párování pak může být příčinou buněčné smrti, která byla pozorována u nervových i jiných buněk. Morfolino, které blokuje protein GRP78 vyskytující se ve zvýšeném množství v buňkách nádorů prsu, napomáhá zvyšovat účinnost antiestrogenů, jako je tamoxifen.

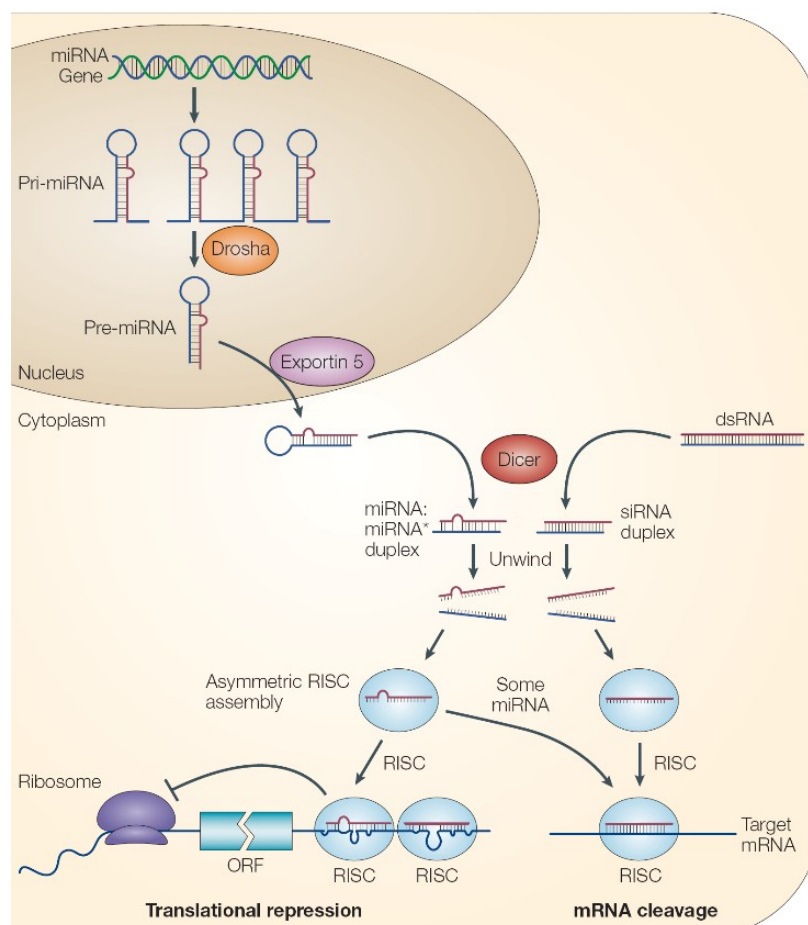
Zatímco komplementární oligonukleotidy blokují přepis genetické informace z DNA na mRNA, **ribozomy**, ribonukleové kyseliny s katalytickou aktivitou, mohou štěpit již vytvořenou mRNA.

Zkonstruovány byly ribozomy štěpící mRNA odvozenou od onkogenů *ras* nebo *fos*, resp. genu *mdr* podílejícího se na rezistenci nádorových buněk vůči cytostatikům. Klinicky je zkoušen ribozym **Herzyme** (Ribozyme Pharmaceuticals), který štěpí mRNA kódující receptor typu 2 pro lidský epidermální růstový faktor HER2, který se v nadměrném množství vyskytuje na povrchu buněk některých nádorů prsu. Vzniku nových cév má bránit „**angiozym**“, ribozym specificky štěpící mRNA, která kóduje VEGFR1, jeden z receptorů pro vaskulární endotelální růstový faktor, fáze II jeho klinického zkoušení při léčbě metastázujících nádorů prsu ale skončila neúspěchem.

V poslední době je věnována velká pozornost tzv. **malým interferujícím RNA** (siRNA, small interfering RNA) nebo **mikroRNA** (miRNA, microRNA). Jsou to malé oligoribonukleotidy se 17-25 bázemi, které jsou přirozenými regulátory exprese genů. Oba typy oligoribonukleotidů mohou způsobit postranlační umlčení genů (gene silencing), tj. zablokovat přepis mRNA na odpovídající bílkovinný produkt. Mohou tak narušit funkci genu, aniž by přitom došlo k jeho poškození.

Malé regulační RNA byly objeveny v r. 1993 u červíka *Caenorhabditis elegans*, předtím byly považovány pouze za fragmenty RNA. Ukázalo se, že mají významnou úlohu při „umlčování“ genů (regulují přepis až 30% genů) a to vyvolalo obrovský zájem o jejich studium. Dnes je známo na 600 lidských siRNA a miRNA. Jsou komplementární k určitým částem mRNA, vzniklý komplex s mRNA pak není schopen translace. siRNA jsou tvořeny krátkými zdvojenými řetězci RNA, miRNA jsou jednořetězcové. Meziprodukty tvorby siRNA jsou krátké (malé) vlásečkové shRNA (short/small hairpin RNA) se dvěma komplementárními řetězci, které jsou na jednom konci propojeny ostrým záhybem. Připomínají tak vlásečku.

V organismu vznikají siRNA z dvouřetězcové RNA nebo shRNA působením endoribonukleasy Dicer, miRNA vzniká z pri- a pre-mikroRNA. Cílovým místem siRNA jsou zejména oblasti bohaté na tzv. AU-elementy, které často obsahuje mRNA odvozená od onkogenů. Při interakci nasměrují siRNA s komplementární sekvencí k m-RNA komplex RISC (RNA-induced silencing complex), který část m-RNA rozštěpí. Zbytek molekuly se pak stane značně náchylný k další degradaci. Translaci blokují i miRNA, nemusí však vyvolávat štěpení mRNA.



He, L. and Hannon, G.J.. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* 5(7):522-31, (2004), převzato z M. Mráz, BIOLOGICAL ROLE OF microRNAs IN ANIMAL CELLS, DEVELOPMENT AND CANCER, Web Book, 2010

Zatímco komplementarita siRNA je značná, k dostatečně silné interakci miRNA s mRNA má stačit, aby komplementární byla sekvence pouhých 2-8 nukleotidů na 5'-konci. Jedna miRNA tak může interagovat s celou řadou různých mRNA. To znamená, že blokáda funkce určité miRNA může ovlivňovat expresi různých genů v různých tkáních. V některých nádorech byl zjištěn zvýšený výskyt určitých typů miRNA, které inaktivují geny tlumící růst a dělení buněk. Pro jejich význam pro vznik nádorů byly nazvány **onkomiry**. Např. v metastázujících melanomech bylo zjištěno zvýšené množství mikroRNA-182 (miR-182) potlačující expresi dvou tumorsupresorových genů a tím snižující koncentraci tumorsupresorů v melanomových buňkách. Aktivaci imunitního systému potlačuje miR-183. Jiná miRNA, miR-155, inhibuje geny kódující enzymy opravující špatné párování bází v DNA. Zvýšená exprese miR-155 pak má za následek genetickou nestabilitu buněk a tedy zvýšené riziko jejich nádorové transformace. Dalšími identifikovanými onkomiry jsou např. miR-15, 16, 17, 19a, 19b, 20, 21, 92, 125b nebo 569.

Některé miRNA mohou naopak mít protinádorové účinky, např. tím, že blokují expresi onkogenů.

Příkladem takových miRNA nazývaných také **antionkomiry** mohou být miR-192, miR-194 a miR-215, které potlačují expresi genu kódujícího protein MDM2. Protein MDM2 inaktivuje tumorsupresor p53 tím, že katalyzuje jeho ubiquitinaci a následnou degradaci v proteasomech. Obnovení funkce p53 zajišťuje i miR-34a, která při zkouškách dopravení miRNA pomocí nanočástic do buněk nádorů žaludku s deficitem p53 inhibovala růst buněk a indukovala apoptózu. Jiným příkladem protinádorové účinné miRNA může být miR145/147 inaktivující onkogen *KRAS*. Ve srovnání s normálními buňkami je v buňkách nádorů pankreatu koncentrace miR145/147 podstatně snížena. Zvýšení její hladiny by proto mělo růst nádorů potlačovat. Snížená hladina miR-429 v buňkách metastázujících nádorů vaječníků souvisí s jejich invazivností, návrat na původní úroveň může proto potlačit metastázování. Tumorsupresorovou funkci má miR-486: v buňkách nádorů plic blokuje tvorbu růstového faktoru IGF, který dává signály k buněčnému dělení. Zvýšená doba přežití pacientů s některými nádory souvisí s vyšší hladinou miR-200 v jejich nádorových buňkách. Je to vysvětlováno tím, že mi-R200 blokuje vznik nových cév v nádoru. Podání miR-200 pokusným zvířatům snižovalo hladinu cytokinů IL8 a CXCL1, čímž potlačovalo růst nádorů a bránilo metastázování. Tvorbu cyklinu A2, bílkoviny, která ovlivňuje průběh buněčného dělení a chrání buňky jater a střev před nadměrnou proliferací, potlačuje miR-22. Nedávno bylo prokázáno, že tumorsupresor p53 může brzdit tvorbu PD-L1 a tím i únik nádorových buněk před imunitní kontrolou ovlivňováním tvorby miR-34a. V některých nádorových buňkách je hladina miR-34a snížena a její zvýšení proto jejich růst potlačovalo. Po úspěšných preklinických zkouškách měla být v r. 2015 ukončena fáze I klinických zkoušek prvního léčiva s funkcí mikroRNA, **přípravku MRX34**, což je v liposomech enkapsulovaná dvouřetězová RNA, která napodobuje mi-34a.

V kmenových nádorových buňkách je koncentrace jedné miRNA označované jako let-7 podstatně nižší nejen ve srovnání s diferencovanými normálními tkáňovými buňkami, ale i běžnými zralými nádorovými buňkami. Ukázalo se, že let-7 umlčuje onkogen *ras* a že tedy působí jako tumorsupresor, může ale ovlivňovat i expresi dalších genů, které se podílejí na buněčné proliferaci. Nízký obsah let-7 v kmenových nádorových buňkách naznačuje, že dodání této miRNA by mohlo tyto buňky aktivovat, aby se začaly dělit a mohly pak být lépe zasáhnuty protinádorovými léčivy.

Jestliže některé miRNA mohou potlačovat růst nádoru, v jiných případech může být naopak třeba tvorbu a účinky miRNA blokovat. Ve vývoji je proto i několik „anti-miRNA“, tzv. **antagomirů**, oligonukleotidů s vysokou komplementaritou k cílové miRNA.

Antagomiry přitom mají blokováním příslušné miRNA zabránit nežádoucímu umlčování genů. Jsou vyvíjeny pro léčbu nádorových, ale i virových a kardiovaskulárních onemocnění. Tvorbu miRNA by měl blokovat na guanin bohatý aptamer **AS1411**. Ten inhibuje nukleolin, bílkovinu potřebnou pro „zrání“ miRNA. Vysoká hladina nukleolinu v nádorech prsu je spojena nadměrnou produkcí miR-21, miR-103, miR-221 a miR-222, což má za následek rezistenci nádorových buněk vůči cytostatikům a agresivitu nádorů.

Využití RNA interference k umlčování genů, jejichž mutace nebo nadměrná exprese souvisí s nádorovým onemocněním, ale naráží na řadu problémů. Přirozené oligoribonukleotidy s nemodifikovaným fosfodiesterovými vazbami mohou být snadno štěpeny ribonukleasami a fosfodiesterasami, a to již v krevním oběhu. I když nejsou štěpeny, pak v důsledku značného počtu vysoce polárních ionizovaných fosfátových skupin pronikají siRNA nebo miRNA jen nesnadno do buněk. V budoucnosti bude zřejmě možné využít malé regulační RNA v terapii nádorových onemocnění. Studium takových možností je však zatím na samotném počátku. Jejich výhodou je, že jsou přirozenými látkami, které lze v zásadě připravovat biotechnologickými postupy místo pracné syntézy. Využití RNA interference k umlčování genů, jejichž mutace nebo nadměrná exprese souvisí s nádorovým onemocněním, ale naráží na řadu problémů. Jedním je vysoká polarita záporně nabitých molekul siRNA nebo miRNA komplikující jejich průnik do buněk. Dalším je možnost inaktivace enzymatickým štěpením jejich fosfodiesterových skupin, a to již v krevním oběhu.

Předpokladem jejich terapeutického využití je jednak stanovení hladiny určitých miRNA v buňkách a jednak nalezení vhodného způsobu vnášení do buněk. Pro stanovení miRNA vyvíjí a nabízí mimo jiné i brněnská firma BioVendor. Pro podání malých terapeutických oligoribonukleotidů do buněk je vyvíjena a zkoušena celá řada technik a lékových forem vhodných pro podání, např. enkapsulace do liposomů, navázání na polylysinové, chitosanové nebo jiné polymerní nanočástice, které se do buněk dostávají endocytosou. Nanočástice přitom mohou být „označeny“ bílkoviny, které interagují s nádorovými antigeny nebo jinými biopolymery na povrchu nádorových buněk. Jednou z možností je systém stabilizace oligoribonukleotidů v lipidických částicích SNALP (Stable Nucleic Acid Lipid Particles) o průměru cca 120 nm. V částicích s povrchem s navázaným polyethylenglykolem je siRNA obklopena lipidickou dvojvrstvou tvořenou směsí kationoidních lipidů a lipidů schopných fúzovat s buněčnou membránou. O něco komplikovanější je patentovaný systém RONDEL (RNA/Oligonucleotide Nanoparticle Delivery), který je tvořen 4 komponentami. Základem jsou nanočástice tvořené kopolymerem, v němž se střídají zbytky cyklodextrinu s lineárními řetězci nesoucími kladné náboje, s nimiž pak asociují terapeutické oligoribonukleotidy. Dalšími komponentami systému je polyethylenglykol s navázaným adamantanem. Vysoce hydrofobní adamantan asociuje s hydrofobními centry cyklodextrinu, zatímco hydrofilní řetězce PEG směřující od jádra do vodního prostředí nanočástici stabilizují. Poslední komponentou je bílkovina směřující nanočástici k nádorovým buňkám, na níž je přes polyethylenglykolovou spojku opět navázaný adamantan, který směřující molekulu ukotví v nanočástici. Lipidické nanočástice obsahující protinádorové léčivo s kladně nabitými skupinami na povrchu, na něž je iontovou vazbou vázána siRNA potlačující rezistenci nádorových buněk byly využity při inhalačním podání. Tímto způsobem bylo k nádorům plic dopraveno léčivo v téměř 3 x větším množství než při jiných způsobech podání; inhalační způsob přitom umožnil siRNA, aby se vyhnula degradaci působením fosfátas. Další zkoušenou možností je příprava dlouhého řetězce RNA s opakujícími krátkou spojkou mezi segmenty se sekvencí 21 nebo podobného počtu nukleotidů metodou „transkripce v otáčejícím se kruhu“ (rolling circle transcription). Řetězec se „sbalí“ do kompaktní kulovité nanočástice, která se pak obalí polymerem s kladnými náboji. Tím je usnadněn průnik do buňky endocytózou. Nanočástice se hromadí v nádorové tkáni, proniknou do buněk a tam Dicer rozseká dlouhý řetězec na jednotlivé siRNA.

Problém umlčení nežádoucích miRNA by mohly řešit genové manipulace vnázející do buněk gen, který kóduje RNA působící jako „miRNA houba“. Každý RNA transkript, který vzniká v buňkách s vneseným genem, má několik sekvencí komplementárních k určité miRNA, jejíž molekuly pak může na sebe „nasát“. Tím je zabráněno, aby příslušná miRNA nadále umlčovala tumorsupresorové nebo jiné důležité geny. Jedna „miRNA houba“ přitom může blokovat celou rodinu příbuzných miRNA. Pracovníci lékařské fakulty MU a fakultní nemocnice U sv. Anny navrhli software miRNAsong (microRNA sponge generator and tester) pro jejich počítačové generování a testování.

První terapeutická siRNA již postoupila do fáze III klinických zkoušek, bylo to ale v očním lékařství. Přípravky pro protinádorovou terapii jsou zatím ve stadiu pokusů na zvířatech nebo ve fázi I klinického zkoušení.

Nejvíce pokročily zkoušky **TKM-PLK1** (Tekmira), siRNA umlčující PLK1 (Polo-Like Kinase 1), jednu z kinas buněčného cyklu. Přípravek **ALN-VSP02** vyvíjený firmou Alnylan pro léčbu nádorů jater obsahuje dvě siRNA blokující tvorbu VEGF a kinesinu, bílkovinného motoru zajišťujícího pohyb po mikrotubulech. Má tlumit růst krevních kapilár v nádoru.

Zahájeny by měly být klinické zkoušky přípravku **Atu027** (Silence Therapeutics) obsahujícího stabilizovanou siRNA blokující expresi genu kódujícího proteinkinasu N3 exprimovanou v buňkách cévní výstelky, která se podílí na řízení morfologie a pohybu endoteliálních a nádorových buněk. Komplexní systém RONDEL využívá k zásahu proti nádorovým buňkám přípravek **CALAA-01** obsahující siRNA blokující tvorbu podjednotky M2 ribonukleotidreduktasy, která participuje na vzniku deoxyribonukleotidů. Na povrchu částic s touto siRNA je přítom navázána bílkovina transferrin, která částice směřuje k nádorovým buňkám, na jejichž povrchu je v nadměrné míře exprimován transferrinový receptor.

Vedle siRNA je v přípravcích **pbi-shRNA™ STMN1 LP** a **pbi-shRNA™** (Gradalis) zkoušena i možnost použití prekurzoru – shRNA, která je pro usnadnění vnášení do buněk uzavřena v kationoidních lipidických částicích obsahujících cholesterol, které mohou fúzovat s buněčnou membránou. V prvním přípravku, který je zkoušen ve fázi I, je cílem gen *Stathmin 1* (*STMN1*) regulující buněčný cyklus destabilizací mikrotubulů. *Stathmin 1* je nadměrně exprimován v řadě nádorových buněk, siRNA vznikající v buňkách ze shRNA gen umlčuje. Druhý přípravek zatím zkoušený preklinicky má umlčovat gen kódující pankreatický a duodenální homeoboxový faktor 1, jaderný protein regulující transkripci.

Kromě miRNA a siRNA (a samozřejmě i ribosomální a transferové RNA) je v buňkách vyskytují i další druhy nekódujících oligoribonukleotidů, jejichž role a význam nejsou ještě dostatečně známy a které mohou mít určitý význam pro nádorové bujení.

V poslední době z nich vzbudily zájem některé lncRNA, „**dlouhé nekódující RNA**“. Jedna z nich označovaná zkratkou MALAT 1 (= **M**etastasis **A**sociated **L**ung **A**dencarcinoma **T**ranscript **1**) reguluje expresi genů se vztahem k metastázování a má zřejmě určitou roli i v řadě dalších buněčných procesů. Připraven byl komplementární oligonukleotid, který MALAT 1 blokuje. Jeho preklinické zkoušky u pokusných myší s transplantovanými nádory prsu byly velmi úspěšné.

## Závěr

Protinádorová léčiva, která byla v minulosti dosti opomíjená, představují dnes nejrychleji se rozvíjející skupinu léčiv. Přibývají nová protinádorová léčiva, další jsou ve výzkumu a vývoji. Mapování nádorového genomu přináší nové poznatky o příčinách nádorové transformace buňky a současně nabízí i nové možnosti pro hledání nových účinných léčiv. Nové přípravky pomáhají snižovat mortalitu na nádorová onemocnění, jejichž výskyt roste, hlavně v důsledku stárnutí populace. Tyto přípravky působí mnohem selektivněji, než starší klasická cytostatika, jsou však také mnohem dražší. Přes obrovské úsilí věnované výzkumu a vývoji nových protinádorových léčiv a úspěchy nových přípravků v terapii nelze však předpokládat, že podaří všechna onemocnění shrnovaná pod pojmem rakovina v dohledné době zcela vyléčit. Lze však očekávat, že příští léta přinesou onkologickým pacientům prodloužení doby života a zejména podstatné zvýšení jeho kvality.

## Kontrolní otázky pro zopakování

1. Co jsou monoklonální protilátky a jak se získávají?
2. Jaké monoklonální protilátky mohou být používány k léčbě pacientů?
3. K čemu se monoklonální protilátky používají v terapii nádorových onemocnění?
4. Co to jsou imunotoxiny?
5. Jaké jsou možnosti využití protinádorových vakcín?
6. Jak a čím lze blokovat replikaci, transkripci a translaci genů stimulujících růst a množení buněk?
7. Jaké problémy je třeba překonávat při využití různých oligonukleotidů v terapii?
8. Co to jsou malé interferující RNA a k čemu mohou být v terapii využity?
9. Co jsou mikro RNA a jak působí?
10. Jaké jsou možnosti genové terapie nádorových onemocnění?
11. Jaké jsou principy viroterapie a bakteriotherapie nádorových onemocnění?