

# 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 – druh bílých krvinek zajišťujících imunitu upravených 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 poměrně krátce, přesto si však již vydobily významné postavení a jejich význam neustále roste. I když jejich vývoj a výroba nejsou předmětem běžné chemie léčiv, je účelné se s nimi alespoň stručně seznámit.

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 *theparmaletters* bylo již povoleno terapeutické použití přes 200 „biologických léčiv“ a ve vývoji jich má být na 1.500, z toho více než třetina 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 více, 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 směrnících proto nepoužívají termín biogenerika, ale spíše „bionapodobeniny“ (biosimilars) nebo dokonce „biovytvořeniny“ (biobetters). Jejich makromolekuly se sice poněkud liší od původních přípravků, zasahují však stejné cílové struktury.

## 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 určité kmeny kvasinek). 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 zabijáče“), 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 polyethylenglykolem, má podobné indikace jako interferon  $\alpha$ , hlavně se ale používá k léčbě roztroušené sklerózy. **Interferon  $\gamma$**  vzniká v lymfocytech, může sloužit při léčbě chronické lymfocytární leukémie, Hodgkinovy nemoci a s většími či menšími úspěchy byl zkoušen při léčbě různých solidních nádorů. Terapeutické využití interferonu  $\gamma$  v onkologii je však stejně jako v případě interferonu  $\beta$  jen okrajové.

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

Interleukinů je řada, některé z nich jsou protinádorově účinné. Uplatnění jako léčivo našel zejména rekombinantní **interleukin 2**, rIL-2, aldesleukin (Proleukin, Novartis) 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. Problémem jsou vedlejší účinky, zejména zvýšený únik plasmy z krevních kapilár. Ten roste při zvyšování dávek, k němuž svádí rychlé odbourání IL-2 v krvi. K léčbě relapsů akutní myeloidní leukemie byla povolena zajímavá kombinace histamin dihydrochloridu s interleukinem 2 (histamin je mediátorem alergických reakcí, v kombinaci posiluje působení IL-2 na buňky imunitního systému). Vyvinut byl modifikovaný IL-2, který má nižší vedlejší účinky. Aktivátorem imunitního systému má být interleukinový „koktejl“ obsahující IL-12, -15 a -18. Při léčbě nádorů melanomu, pankreatu, ledvin a plic byl nebo je zkoušený **pegilodekakin**, pegylovaný protizánětlivý IL-10, pacientům s nádory pankreatu však neprodlužoval dobu života. Vyvíjen je IL-15 s napojeným vazebným místem jeho receptoru IL-15R $\alpha$ , který má být jako účinnější a lépe tolerovaný než přirozené IL-2 a IL-15. Jako zajímavost lze uvést, že v r. 2018 byl povolen přípravek **tagraxofusp** (Elzonris, Stemline Therapeutics) – IL-3 s připojeným záškrťovým toxinem. Tagraxofusp se váže na buňky s receptorem pro IL-3. Je určen pro terapii velmi agresivního typu maligního hematologického onemocnění BPDCN - nádoru z blastických plasmocytoidních dendritických buněk se špatnou prognózou, pro nějž předtím neexistovala vhodná terapie

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 $\alpha$  studovány řadu let, jeho využití v onkologii nepřekročilo experimentální rámeček. Někdy byly sice dosaženy příznivé výsledky, ukázalo se však, že terapie TNF $\alpha$  je značně riziková. TNF $\alpha$  je odpovědný za kachexii (ochablost organismu) u pacientů s rakovinou, je mediátorem septického šoku, revmatické horečky, Crohnovy choroby a dalších autoimunitních a zánětlivých onemocnění. Při jejich léčbě jsou dokonce používány protilátky, které TNF nebo jeho receptory blokují. Jejich použití je přitom kontroverzní, protože u pacientů může narůstat výskyt nádorových onemocnění. Podobný účinek jako TNF má **TRAIL** (TNF-related apoptosis inducing ligand), který může vyvolávat buněčnou smrt. Podle předběžných výsledků mohou bílé krvinky s připojeným TRAIL zabraňovat metastázování a pro likvidaci nádorových buněk neodstraněných při chirurgickém zásahu byly vyvinuty lipidické nanočástice s připojeným TRAIL a adhezním receptorem E-selektinem.

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

Indukují jejich diferenciaci, ovlivňují diferencované buňky v různých stádiích dozrávání i některé regulační procesy organismu. Název dostaly, protože v tkáňových kulturách vyvolávají růst kolonií krevních buněk. Nemají cytostatický účinek, v onkologii se používají jako doplňkový lék k potlačení neutropenie, nedostatku neutrofilů (nejčastěji zastoupeného typu bílých krvinek), který bývá nežádoucím účinkem chemoterapie a způsobuje zvýšenou náchylnost k infekcím. Používán je **filgrastim** a jeho derivát stabilizovaný navázáním polyethylenglykolu **pegfilgrastim** (Neupogen a Neulasta, Amgen), rekombinantní faktor stimulující kolonie granulocytů G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), dále i jeho analog s navázaným methioninem **tbo-filgrastim** (Granix, Teva), glykosylovaný G-CSF, **lenograstim** (Granocyte, Chugai Pharma) a glykosylovaný G-CSF s navázaným polyethylenglykolem **lipegfilgrastim** (Lonquex, Teva). Generický filgrastim (Zarxio, Sandoz) byl první „bionapodobeninou“ povolenou v USA, jeho schválení ale provázely soudní patentové spory. Z dalších růstových faktorů byl zkoušen faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů, GM-CSF – **molgramostim**, ten ale byl schválen jen pro neonkologickou indikaci – léčbu syndromu akutní dechové tísně. Glykosylovaný GM-CSF **sargramostim** (Leukine, Sanofi) produkovaný geneticky upravenými kvasinkami byl schválen pro doplňkovou léčbu některých hematologických malignit po transplantaci kostní dřeně. U pacientů léčených růstovými faktory se však poněkud zvyšuje riziko, že naopak budou působit i jako růstové faktory nádorových buněk, zejména pacientů s myelomy. Zjistí-li se po jejich aplikaci, že progresse onemocnění pokračuje, musí být okamžitě vysazeny.

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 obnově 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 jejich používání epoetinů v onkologii. V terapii se používá **epoetin  $\alpha$** , popř. stabilnější **darbepoetin  $\alpha$**  a **epoetin  $\beta$**  navázaný na  $\omega$ -methoxypolyethylenglykol. Podobně jako u jiných růstových faktorů je jejich použití kontroverzní.

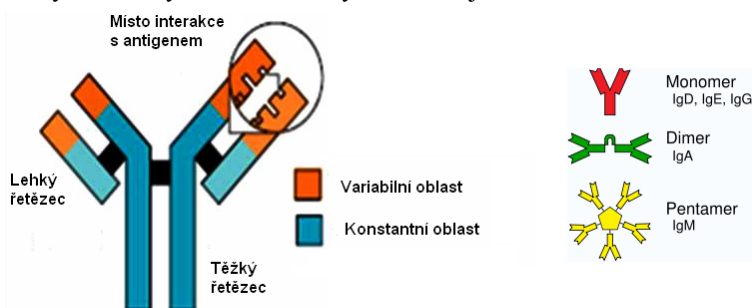
Kromě jednotlivých cytokinů se v terapii nádorů hlavy a krku byla zkoušena (fáze III) i jejich směs **Multikine** (Cell Sci) obsahující IL-1, IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  a GM-CSF v definovaném složení a vzájemných poměrech. Směs má indukovat imunitní odezvu na nádorové bujení tím, že mění typ imunitních buněk infiltrujících nádor z „CD-8“ na „CD-4“, proti kterým nemají nádorové buňky vyvinutou toleranci.

## 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 vyskytující se na povrchu infikovaných nebo nádorových, někdy ale i buněk normálních tkání), vázat se na ně a likvidovat různými mechanismy ty buňky, které příslušné antigeny mají na svém povrchu. V protinádorové terapii mohou být protilátky využity různým způsobem. Mohou „**neutralizovat**“ **růstové faktory a další látky signalizující buňce, že se má dělit**, a to buď navázáním na samotný faktor nebo signalizační molekulu, nebo na jejich receptory, 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“, spojených 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 nesmrtelnými nádorově přeměněnými bílými krvinkami (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 slezinové buňky a hybridomy. Počet dělení normálních slezinových buněk je však limitovaný, takže po určité době odumrou a v buněčné kultuře zůstanou jen hybridomy. Kultura se pak dále se množí v jamkách mikrotitračních destiček. Předtím se nařadí tak, aby do každé jamky přišla 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 nejúčinnější protilátky. Kultivace se provádí v tkáňových kulturách, může se ale provádět i *in vivo*. Přitom se hybridomové buňky obvykle 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 následovnicí 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 odmítnutí transplantovaných orgánů organismem. Zkoušen byl i v protinádorové terapii, při léčbě akutní lymfocytické leukemie vycházející z T-buněk. V této indikaci nebyl však úspěšný. Účinný byl hlavně při prvním podání, při opakovaném podání docházelo ke snížení účinnosti a dokonce i k anafylaktickému šoku. Myší monoklonální protilátky byly později povoleny jen pro radioterapii, kdy protilátka slouží k nasměrování navázaných radioizotopů k nádoru a to, že může vyvolat imunitní reakci organismu na cizorodou bílkovinu, tolik nevadí.

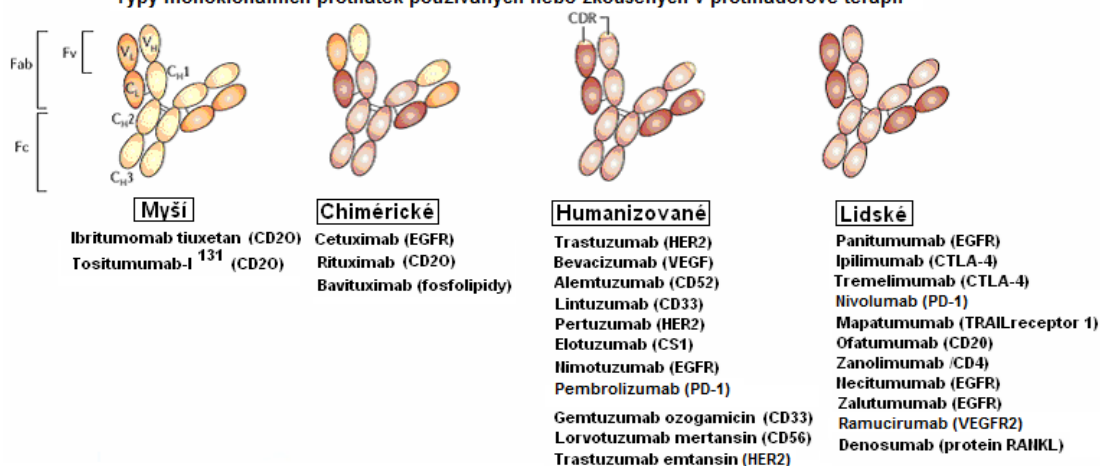
Řešení problémů s nežádoucími imunitními reakcemi přineslo použití **rekombinantních monoklonálních protilátek**. Ty se získávají tak, že se připraví segmenty DNA kódující určité části protilátek. Řetězec DNA kódující variabilní část myší protilátky, která rozeznává antigen, se pak spojí s lidskou DNA 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. Protinádorové protilátky mohou mít před těmito koncovkami ještě slabiku –**tu–** (od tumor)

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

Rekombinantní DNA se vpravují pomocí vhodného vektoru do produkčních buněk, v nichž je vnesená kódující DNA přepisována na protilátku. Jsou to obvykle buňky vaječníků čínskému křečka (CHO) nebo myší myelomové buňky (NSO). K produkci protilátek mohou být použity i kvasinky *Pichia pastoris*, ne však bakterie, jako např. *E. coli*, které neumí bílkoviny glykosylovat).

Produkční buňky 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 z buněk producenta a další látky obsažené v médiu protečou. Po eluci se získá protilátka až v 80% čistotě. Následuje snížení pH k inaktivaci virů, přičemž se oddělí virové částice, další 1-2 chromatografické čistící stupně a nakonec mikrofiltrační krok k finální eliminaci virů, které mohly kontaminovat produkční živočišné buňky.

Typy monoklonálních protilátek používaných nebo zkoušených v protinádorové terapii



Humanizované protilátky mohou obsahovat až 95% lidské bílkoviny. Pro humánní terapii jsou ovšem nejvhodnější „**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 myší s lidskými geny**. K výběru vhodných lidských protilátek slouží „**fágová prezentace**“ (phage display) a podobné techniky využívající interakci protilátek vystavených na povrchu bakteriálních, kvasinkových nebo i savčích buněk s modifikovaným genomem s antigeny, popř. techniky c-DNA, ribosomální nebo m-RNA prezentace.

K fágové prezentaci, jejíž původce George Smith z Univerzity v Missouri se podílel na Nobelově ceně za chemii 2018, se využívá infekce bakteriálních buněk, obvykle *Escherichia coli*, modifikovanými bakteriofágy, jejichž DNA kódující obalový protein se spojí s genem kódujícím lidské imunoglobuliny. Fág se v bakteriích pomnoží. Přitom vzniknou fágy s modifikovanou obalovou bílkovinou, které se pak z bakteriálních buněk uvolní vlastní lytickou aktivitou 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 jejichž obalové bílkovině jsou zabudovány lidské protilátky s nejvyšší aktivitou k antigenu. Nakonec se procesem nazvaným transdukce přeneše DNA kódující účinnou lidskou protilátku z fága do vhodných produkčních buněk.

Alternativou fágové prezentace by mohly být techniky, při nichž jsou různé bílkoviny prezentovány na povrchu bakteriálních nebo kvasinkových buněk s upraveným genomem. Při použití modelového antigenu však byly výsledky selekce vhodné protilátky při bakteriální prezentaci horší než při fágové prezentaci. Techniky cDNA a mRNA prezentace využívají napojení oligonukleotidového řetězce pomocí puromycinu jako linkeru na genem kódovanou bílkovinu. Při ribosomální prezentaci se využívá napojení mRNA na ribosom pomocí spojky neobsahující stop kodon. Vznikající komplex tvořený m-RNA, ribosomem a kódovanou protilátkou se tak nerozloží, takže může dojít k výběru protilátek na základě interakce s vázaným ligandem.

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. Vývoj terapeutických monoklonálních protilátek i jejich výroba jsou velmi náročné, což se odráží v jejich vysokých cenách – za jejich závažný vedlejší účinek je proto někdy považována „finanční toxicita“.

**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. Z nich již byly v r. 2017 povoleny Truxima (Celltrion) a Rixathon (Novartis). Firma Roche hodlá čelit konkurenci podkožní injekcí rituximabu nahrazující 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, proexpiroval v r. 2014. Z jeho napodobenin byly povoleny Ogivri (Mylan) a Ontruzant (Samsung Bioepis, Merck), Herzuma (Celltrion a Teva) a Kanjinti (Amgen). 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. Dokončováno je zkoušení **margatuximabu**, rovněž protilátky proti HER2.

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. U pacientů se ale rychle vyvíjí rezistence. 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, při léčbě melanomů nebyly úspěšné. 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. Výsledkem je zablokování přenosu signálů pro růst cévek zásobujících nádor. 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. Jeho napodobeninou je Zirabev (Pfizer) Protilátkou proti receptoru pro VEGF je **ramucirumab** (Cyramza, Eli Lilly) povolený v letech 2014-5 pro terapii nádorů plic, žaludku, střev a konečníku, později i proti nádorům močového měchýře a jater, 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 úspěšné zkoušky ale byly léčby lymfomů, zdá se ale, že by se mohl uplatnit i mimo onkologii, při léčbě roztroušené sklerózy. **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. Další zaregistrovanou protilátkou je **mogamulizumab** (Poteligeo, Kyowa), povolený pro léčbu jednoho typu lymfomu a jeho 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 tkáň. **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. Pro léčbu metastazujícího kožního skvamózního karcinomu je určen **cemiplimab** (Libtayo, Regeneron). Do pokročilých stadií klinických zkoušek dospěl **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** (Rencarex, Wilex), protilátka proti antigenu CA IX, byl zkoušen při adjuvantní léčbě nádorů ledvin. Úspěšné výsledky při léčbě metastazujících nádorů močového měchýře přinesly zkoušky **enfortumabu**, protilátky proti nektinu-4, který se vyskytuje v 97% nádorů močového měchýře.

Rada 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**, **okaratumumab**, **ublituximab**, **veltuzumab** a **obinutuzumab** (Gazyvaro, povolen na konci r. 2013 pro léčbu chronické lymfocytické leukemie, v r. 2016 pro léčení folikulární leukemie a v r. 2017 folikulárních lymfomů), další protilátka proti CD20 **okrelizumab** je povolena pro léčbu 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 klofarabinem a cytarabinem při léčbě akutní lymfocytické leukemie. Na konci roku 2015 byly pro kombinovanou léčbu mnohočetného myelomu povoleny **daratumumab** (Darzalex, Johnson & Johnson), nově aplikovatelný nejen v infuzi, ale i jako podkožní injekce a **elotuzumab** (Empliciti, BMS), protilátky proti povrchovým antigenům myelomových buněk CD38 resp. glykoproteinu CS1. Úspěšné zkoušky **isatuximabu**, další protilátky proti CD38, by měly vyústit v jeho povolení v první polovině roku 2020. Na povrchu kmenových myelomových buněk je antigen CD19, s nímž interagují protilátky **tafasitamab** (MorphoSys) a **MEDI-551** (MedImmune). Tyto protilátky snižují počet kmenových nádorových buněk, jejichž počet po předchozí léčbě někdy narůstá, což může být příčinou návratu onemocnění.

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 kinasá 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 **cirmtuzumab**. **Siltuximab** je protilátka proti interleukinu 6, mediátoru zánětu a horečky. Zkoušen je při léčbě mnohočetného myelomu a lymfomů. Jinou protilátkou proti IL6 je **tocilizumab**, který je primárně určen k léčbě reumatoidní artritidy, u dlaždicového karcinomu hlavy a krku pomáhá překonat radiorezistenci. **Olaratumumab** (Lartruvo, Eli Lilly), protilátka proti destičkovému růstovému faktoru, prodlužoval v kombinaci s doxorubicinem dobu přežití pacientů se sarkomy měkkých tkání. V r. 2016 byl pro tuto indikaci podmíněně povolen EMA (podmíněně povolení je udělováno v případech, kdy je třeba doplnit data, ale dosud zjištěné přínosy výrazně převyšují riziko), zkoušky fáze III ale nebyly příliš úspěšné. **Klaudiximab** (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.

### Některé protilátky 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 brání proti autoimunitním onemocněním, při nichž imunitní systém napadá vlastní zdravé buňky. Přitom ale může selhávat likvidace nádorových nebo virem napadených buněk. Selektivní tlak má za následek zvyšování množství těchto receptorů, což brání imunitní obraně organismu. 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). Za objevy těchto receptorů a možností jejich blokování obdrželi James P. Allison a Tasuko Hondžó (Honjo) v r. 2018 Nobelovu cenu. 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. Dalšími tlumivými receptory jsou TIM-3, LAG3 a VISTA a podobnou roli při tlumení imunitní odezvy má snad i adenosinový receptor A2AR. Antagonisté A2AR jsou ale zatím klinicky zkoušené jen při léčbě Parkinsonovy choroby.



Kromě zmíněných receptorů a jejich ligandů mohou imunitní reakce organismu potlačovat i některé enzymy. IDO1, indolamin-2,3-dioxygenasa katalyzuje první krok přeměny tryptofanu na kynurenin. Kynurenin negativně ovlivňuje růst a životnost T-lymfocytů. Aktivita IDO1 při nádorové transformaci roste, takže se enzym podílí na vzniku imunitní tolerance nádorů.

Tlumení imunitní odezvy organismu zajišťují i regulační T-lymfocyty,  $T_{reg}$ . Bez nich by imunitní systém napadal vlastní tkáň,  $T_{reg}$  se ale také podílí na blokování imunitní obrany organismu před nádorovým bujením. Na povrchu  $T_{reg}$  buněk se vyskytuje receptor GARP. Po jeho aktivaci transformačním růstovým faktorem TGF vzrůstá imunitní tolerance nádorových buněk. Blokáda GARP by proto mohla přispět potlačení nádorového bujení.

Léčba protilátkami proti PD-1, CTLA-4 nebo jejich ligandům je považována za průlom v boji s rakovinou. Podle některých prognóz by v příštích 10 letech měla být klíčovou komponentou až 60% režimů protinádorové terapie. I když je někdy mimořádně úspěšná, lze jí zatím vyléčit jen 20-40% pacientů, jejichž nádor je infiltrován dostatečným množstvím T-lymfocytů. Důležitou roli bude proto mít diagnostika, která může zjistit, kterému pacientovi drahá imunoterapie pomůže a pro kterého nebude účinná.

Problémem je i častý vznik rezistence a recidiv onemocnění zapříčiněný mutacemi genů pro receptory tlumící imunitní systém a „vyčerpáním“ T-lymfocytů, na němž se podílí kromě nárůstu počtu tlumících receptorů a jejich ligandů snad i změna jejich epigenetického profilu. Rezistenci je třeba překonávat nasazením jiné protilátky, „vyčerpání“ imunitních buněk lze do jisté míry předcházet kombinací protilátek blokujících „kontrolní místa“ s léčivými potlačujícími epigenetické změny, jako jsou např. nukleosidy 5-azacytosinu nebo inhibitory histondeacetylasy. To ale dále zvyšuje značnou nákladovost.

Dalším problémem je možný výskyt vedlejších účinků vyvolaných masivní produkcí řady cytokinů („cytokinovou bouří“), které pak aktivují imunitní systém i pro boj proti vlastním zdravým buňkám. Lze je potlačovat kortikoidy, někdy je ale nutný i drastičtější zásah. Při léčbě melanomu lze omezovat vedlejší účinky aplikací protilátek aktivujících imunitní systém přímo do nádoru pomocí náplastí s mikrožehlemi.

**Nivolumab** (Opdivo, Bristol-Myers-Squibb), blokující PD-1 a 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. V řadě indikací byl nebo je sám nebo v kombinacích zkoušen. Podávání nivolumabu snižovalo velikost nádorů plic před operacemi i počet relapsů. Jinou protilátkou proti PD-1 je **pembrolizumab** (Keytruda, Merck) povolený rovněž k léčbě melanomu, nádorů plic, nově i nádorů močového měchýře. Pembrolizumab byl nebo je úspěšně, ale někdy i neúspěšně zkoušen samotný nebo v kombinacích s dalšími léčivy, popř. i radioterapií v celkem 268 studiích. Po úmrtí 2 pacientů s mnohočetným myelomem byly 2 zkoušky v r. 2017 pozastaveny FDA a podobně byly pozastaveny i zkoušky dalších imuno-onkologických protilátek v této indikaci, pak ale byly obnoveny. Dalšími protilátkami proti receptoru PD-1 jsou **lambrolizumab** zkoušený při léčbě melanomu a dalších 5 nádorových indikacích, **cemiplimab** (Libtayo, Regeneron a Sanofi) označený za průlomovou terapii při léčbě kožního dlaždicového karcinomu (po melanomu druhého nejzhoubnějšího kožního nádoru), **tislelizumab** (BeiGene) zkoušený u nádorů plic, močového měchýře, jater, jícnu a lymfomů a v r. 2019 povolený v Číně, **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 kombinaci s paklitaxelem byl březnu 2019 povolen k léčbě metastázujících nádorů prsu a nedlouho poté v kombinaci s chemoterapeutiky pro léčbu malobuněčných a v prosinci i nemalobuněčných nádorů plic. V kombinaci bevacizumabem byl úspěšně zkoušen i u nádorů jater. V r. 2016 byl podmíněčně povolen pro léčbu nádorů močového měchýře, některé výsledky ale byly problematické. Jinými protilátkami blokujícími PD-L1 je **durvalumab** (Imfinzi, AstraZeneca) povolený pro léčbu nádorů močového měchýře a nádorů plic a **avelumab** (Bavencio, Pfizer a Merck KGaA) povolený pro léčbu kožních nádorů vycházejících z Merkelových buněk a nádorů ledvin, úspěšně testovaný při léčbě vaječnicků, močového měchýře a mesotheliomu. Obě protilátky obdržely u FDA statut „průlomové terapie“.

V březnu 2011 byl pro léčbu pokročilých stadií metastázujícího melanomu dospělých a v r. 2017 pro léčbu melanomů u dětí schválen **ipilimumab** (Yervoy, Bristol-Myers Squibb), protilátka proti CTLA-4. Blokáda CTLA-4 aktivuje především T lymfocyty s diferenční skupinou bílkovin CD8 na povrchu, které patří mezi nejmocnější zbraně imunitního systému. U šestiny až čtvrtiny pacientů s melanomem prodloužil ipilimumab významně dobu jejich života, ale nivolumab poskytoval lepší výsledky. Nejlépe se ale osvědčila kombinace ipilimumabu s nivolumabem, a to jak při léčbě melanomu, tak i nádorů ledvin (kombinace byla pro tuto indikaci v dubnu 2018 schválena FDA jako terapie první volby), plic, jater, střev a konečníku a některých dalších. Studium této kombinace, která byla v případě některých nádorů charakterizována jako „měnící léčebnou praxi“ mělo ukázat, že ipilimumab „instruuje“ T-lymfocyty, že mají reagovat na protilátky proti PD-1. U pacientů s nádory hlavy a krku významně zlepšuje ipilimumab kvalitu života, u 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. Zkoušen byl i u nemalobuněčných nádorů plic v kombinaci s durvalumabem. Výsledky ale nebyly uspokojivé a dokonce vyvolaly pochybnosti o účelnosti kombinace protilátek blokujících PD-1 nebo PD-L1 s protilátkami proti CTLA-1.

Protilátkou proti dalšímu receptoru tlumícímu imunitní reakce LAG3 je **relatlimab** (Bristol-Myers Squibb), který má rovněž blokovat růst nádorů tam, kde došlo ke vzniku rezistence na nivolumab. Zatím je jen ve stadiu zkoušení stejně jako vyvíjené protilátky proti receptorům TIM-3 (TSR-022, MBG453, LY3321367) a VISTA (JNJ-61610588). Zajímavá je i bispecifická protilátka **FS118** (Merck KGaA), která má blokovat jak PD-1 tak i LAG3.

Některé další protilátky aktivují imunitní systém jinými mechanismy než bloádou receptorů tlumících imunitní systém nebo jejich ligandů. V kombinaci s interleukinem 2 byl zkoušen **WX-G250** (Rencarex, Wilex AG), monoklonální chimická 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 Wilex, 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 jiné klinické zkoušky.

Vedle běžných monoklonálních protilátek rozpoznávajících jediný antigen mohou být bioinženýrskými metodami připravovány a terapeuticky využívány **bispecifické protilátky (BiTE)**, které interagují s antigeny na cytotoxických T-lymfocytech i s antigeny na nádorových buňkách. Těmito interakcemi propojí nádorové buňky s buňkami imunitního systému. T-lymfocyty pak začnou likvidovat i takové nádorové buňky, které jinak imunitní obraně organismu unikají.

Bispecifické protilátky se získávají enzymatickým odštěpením antigen rozpoznávajících fragmentů dvou protilátek a jejich fúzí s těžkým řetězcem. **Blinatumomab** (Blinicyto, Amgen) je konjugát fragmentů 2 myších protilátek. Jedním jeho cílovým antigenem je CD3, který se vyskytuje na povrchu T lymfocytů, buněk imunitního systému. Druhým je antigen CD19 na povrchu B-lymfocytů. Blinatumomab byl v r. 2014 podmíněně a v r. 2017 definitivně povolen pro léčbu akutní lymfoblastické leukemie, zkoušen je u nehodgkinských lymfomů, nově i u nádorů plic a trávicího traktu. Je však kritizován pro příliš vysokou cenu, která brání širšímu využití – náklady na roční terapii blinatomomabem činí 178 tis. \$.

Vyvíjena je řada dalších bispecifických protilátek. **Solitomab** je rekombinantní bispecifická protilátka proti CD3 a molekule odpovědné za adhezi buněk epitelu, která se vyskytuje na povrchu řady nádorových buněk, zejména nádorů hlavy a krku. **TNB-383B** a **AMG 420** jsou vyvíjené bispecifické protilátky proti CD3 a antigenu dozrávajících B-buněk (BCMA - B-Cell Maturation Antigen), transmembránovému glykoproteinu, který se sice vyskytuje i na normálních B-lymfocytech, ale ve zvýšené míře je exprimován na buňkách mnohočetného myelomu. **REGN1979** je bispecifická protilátka proti CD3 a nádorovému antigenu buněk nehodgkinských lymfomů CD20 (cílový antigen rituximabu). Při jeho prvních klinických zkouškách u 10 pacientů s folikulárním lymfomem, který nereagoval na předchozí léčbu nebo se opakoval, byla u 8 pacientů zaznamenána úplná terapeutická odezva.

**ABP-100** je bispecifická protilátka proti CD3 a HER2 vyvíjená Abpro Pharmaceuticals. Na rozdíl od jiných bispecifických protilátek, které obsahují po jedné rozpoznávající oblasti pro každý antigen, molekula ABP-100 obsahuje po dvou těchto oblastech, je tedy „tetravalentní“, čímž by měl být zvýšen její terapeutický účinek.

**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 některých jiných orgánů hromadí tekutina. Léčba spočívá v odsátí ascitické tekutiny následované infuzí katumaximabu do břišní dutiny.

**Ziv-aflibercept** (Zaltrap, VEGF Trap, Regeneron/Sanofi) není protilátkou, ale „imunoadhesivem“, 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, ale také zvyšuje permeabilitu dosavadních cév. Vedlejším účinkem je proto zvýšená krvácivost. Některé jeho klinické zkoušky nebyly úspěšné, v jiných případech ale bylo dosaženo prodloužení života pacientů. V kombinaci s irinotekanem, 5-fluoruracilem a leukovorinem povolily FDA v polovině a EMA na konci roku 2012 jeho použití při léčbě kolorektálního karcinomu. 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**. Specificita protilátek přitom zajišťuje, že zdravé tkáně nejsou účinnou složkou přípravku výrazněji poškozeny.

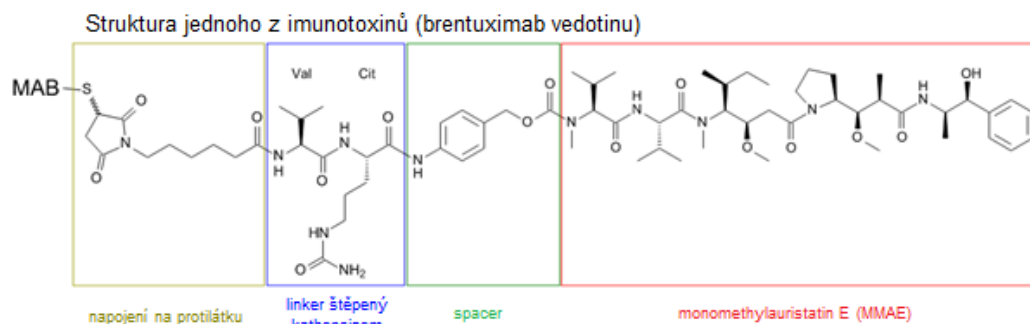


Při nádorově specifické radioterapii se používají myší protilátky proti nádorovému antigenu CD-20 s navázanými radioizotopy emitujícími intenzivní záření krátkého dosahu. Jsou to **tositumomab** (Bexxar, GSK), protilátka s navázaným  $^{131}\text{I}$ , který se rozpadá za vzniku  $\beta$ -záření, které proniká do hloubky 2,4 mm, takže nepůsobí na vzdálenější zdravé tkáně a **ibritumomab tiuxetan** (Zevalin, Biogen), protilátka s kovalentně navázaným chelátotvorným seskupením (diethylenetriaminpentaoctovou 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. Slibné výsledky poskytly zkoušky **burtomabu**, myší protilátky s navázaným  $^{131}\text{I}$  proti imunomodulačnímu povrchovému antigenu B7-H3. Burtomab, který významně zvyšoval dobu přežití dětí s neuroblastomem s mozkovými metastázemi obdržel v r. 2017 statut průlomové terapie. **Apamistanab** protilátka proti CD-45 s  $^{131}\text{I}$  (Iomab-B) je určen k léčbě starších pacientů s opakující se nebo rezistentní akutní myeloidní leukemií. Použití myších protilátek pro směrování izotopů nebo toxinů nevede, 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 prorůstat 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 tetraazacyklodekantetraacetamid.

Vývoj konjugátů protilátek s navázanými vysoce účinnými cytostatiky je náročný. Protilátka musí být zaměřena antigeny specificky se vyskytující na nádorových buňkách. Vazba léčiva musí odolávat působení hydrolytických enzymů v krevním oběhu, ale poté, co se konjugát dostane do buňky procesem endocytózy (vchlípením části membrány s navázaným konjugátem), má být léčivo uvolněno. K propojení léčiva s protilátkou se využívá vznik disulfidů, hydrazonů nebo i peptidů, popř. thioetherů. V posledním případě zbývá po rozložení protilátky v buňce léčivo spojené s aminokyselinou (cysteinem), které musí vyvolat cytotoxický účinek. Nasměrování na nádorové buňky umožňuje terapeuticky využít i látky, které by jinak nebyly použitelné pro vysokou systémovou toxicitu.

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** (Mylotarg, Pfizer) 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. Po nových klinických zkouškách se ukázalo, že přes určité riziko spojené s používáním bylo jeho stažení předčasné. Ve druhé polovině roku 2017 byl proto po sedmileté pauze znovu povolen. Osvědčil se také při léčbě hodgkinských lymfomů Příbuzný konjugát **inotuzumab ozogamicin** (Besponsa, Pfizer) byl v r. 2017 povolen pro léčbu akutní lymfoblastické leukemie.

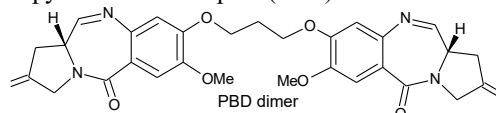
Konjugáty protilátek s cytotoxickými deriváty makrolidu maytansinu obsaženého v rostlinách *Maytenus* a interagujícího s mikrotubuly jsou **lorvotuzumab mertansin** zkoušený při léčbě mnohočetného myelomu a malobuněčných nádorů plic a v únoru 2013 povolený **trastuzumab emtansin** (T-DM1, Kadcyła, Genentech) určený k léčbě metastázujících nádorů prsu podobně jako samotný trastuzumab, konjugát je však účinnější. Totéž platí i pro v r. 2019 povolený **trastuzumab vedotin** (Enhertu, AstraZeneca a Daiichi) se silně cytotoxickým monomethylauristatinem E (MMAE), který blokuje polymeraci tubulinu. MMAE obsahuje i **brentuximab vedotin** (Adcetris, Seattle Genetics) je konjugát protilátky proti antigenu CD-30 Povoleno byl v r. 2011 v USA a v r. 2012 v EU pro léčbu hodgkinských a anaplastických lymfomů. MMAE je častou složkou různých konjugátů protilátek. Bývá (stejně jako jiné toxické složky konjugátů) navázan na protilátku pomocí linkeru – spojovacího řetězce, který je v cílových buňkách rozštěpen a spaceru – spojky mezi protilátkou s linkerem a MMAE. V r. 2019 byl ještě povolen další konjugát s touto látkou, **polatuzumab vedotin** (Polivy, Roche) určený k léčbě jednoho typu lymfomu



Vyvíjeno má být asi 200 dalších konjugátů, z toho je cca 60% v laboratorním a preklinickém vývoji a cca 20 přípravků v pokročilých fázích klinických zkoušek. Řada z nich obsahuje MMAE v množství 3–4 molekul na protilátku. Jsou to **enfortumab vedotin** s protilátkou proti nektinu 4, který se vyskytuje v krvi pacientů s nádory plic, **telisotuzumab vedotin** s protilátkou proti tyrosinové proteinkinase c-Met, zkušební rovněž při léčbě nádorů plic, **sofituzumab vedotin** (DMUC5754A) s protilátkou proti antigenu MUC16 (známějšímu jako C125) zkušební při léčbě nádorů vaječníků, **pinatuzumab vedotin** s protilátkou proti transmembránovému glykoproteinu CD22 specifickému pro B-lymfocyty určený pro léčbu folikulárních lymfomů a chronické lymfocytické leukemie, **indusatumab vedotin** s protilátkou proti guanylát cyklase 2c zkušební u nádorů pankreatu, **lifastuzumab vedotin** s protilátkou proti kotransportéru sodíku a fosfátu, který je zkušební u nádorů vaječníků, plic a některých dalších nádorů. Konjugát **PSMA-ADC** s lidskou protilátkou proti PSA, prostatickému specifickému membránovému antigenu, obsahující přes thiolovou spojku navázaný vcMMAE (vc označuje, že jako linker slouží dipeptid tvořený valinem a citrulinem), je zkušební u nádorů prostaty. **Tisotumab vedotin** s protilátkou proti tkáňovému faktoru, který ovlivňuje signalizaci v nádorových buňkách a angiogenesi je zkušební u nádorů děložního čípku i některých dalších nádorů. **Enapotumab vedotin** s protilátkou proti AxlR (od Anexeletu – nekontrolovaný růst), tyrosinkinaseovému receptoru, který bývá nadměrně exprimován na buňkách řady rezistentních nádorů, je zkušební v různých onkologických indikacích. Další konjugát MMAE **glembatumab vedotin** s protilátkou proti transmembránovému glykoproteinu NMB při klinických zkouškách zklamal. S MMAE příbuzný monomethylauristatin F obsahuje konjugát protilátky proti BCMA **belatamab mafodotin** zkušební u mnohočetného myelomu. **Depatuzumab mafodotin** s protilátkou proti EGFR je zkušební u nádorů plic a mozku.

**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**. Zkušební 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 malobuněčných nádorů plic a „dimeru“ derivátu pyrrolbenzodiazepinu (PBD).



Pyrrolbenzodiazepiny jsou produkovány aktinomycetami. PBD se váže do malého žlábků 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. Klinické zkoušky Rova T přinesly zklamání a v r. 2019 byly ukončeny. U jednoho typu lymfomů je ale úspěšně zkušební **lonkastuximab tesirin** s protilátkou proti receptoru CD19. Podobnou komponentu obsahuje **vadastuximab talirin**, konjugát pyrrolbenzodiazepinu SGD-1882 s protilátkou proti CD33, který se vyskytuje je myeloidních buňkách. Je povolen jako „lék sirotek“ (orphan drug, lék proti vzácným onemocněním) pro léčbu jednoho typu myeloidní leukemie. Stejnou nízkomolekulární složku mají i konjugáty **ADCT-301** a **ADCT-402** zkušební při hematologických malignitách.

**Sacitumumab govitekan** je konjugátem tekannového 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 orgánů, zatímco na normálních buňkách je jeho výskyt omezený. Zkušební je u „trojnásobně negativních“ nádorů prsu, nádorů pankreatu a některých dalších tumorů. Stejnou cytostatickou složku má **labetuzumab govitekan** s protilátkou proti karcinoembryonálnímu antigenu CEA (stanovení CEA se využívá v diagnostice nádorových onemocnění). Zkušební je u pacientů s metastázujícím nádorem střev, kteří i po léčbě irinotekanem mají v krvi zvýšenou hladinu CEA. Konjugáty s nespecifikovanou nízkomolekulární složkou vyvíjí i organizace patřící do rodiny české firmy Sotio.

Pod souhrnný pojem **imunotoxiny** jsou vedle konjugátů protilátek s cytostatiky řazeny i podobné konjugáty obsahující bakteriální toxiny, popř. místo protilátek jiné bílkoviny směřované na nádorové buňky.

**Proxinium** (Viventia Biotech) a **Vicinium** (Sesen Bio) jsou konjugáty exotoxinu A bakterií *Pseudomonas* s fragmenty monoklonální protilátky proti antigenu epitelových buněk EpCAM, který se vyskytuje se zejména na povrchu buněk nádorů hlavy a krku. Přípravek Proxinium byl v této indikaci povolen jako lék „sirotek“, přípravek Vicinium je zatím zkušební. Pseudomonádový exotoxin A obsahuje i konjugát fragmentu variabilní části těžkého řetězce myší protilátky proti lidskému nádorovému antigenu CD22 **moxetumomab pasudotox** (Lumoxiti, AstraZeneca) povolený v r. 2018 pro léčbu vlasatobuněčné leukemie.

**Cintredekin besudotox** je konjugát interleukinu 13 (IL-13) s pseudomonádovým exotoxinem A. **TransMID 107** je konjugát transferrinu se záškrťovým toxinem. Je zkušební 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**“, která byla vyvíjena na Ústavu makromolekulární chemie ve spolupráci s Mikrobiologickým ústavem AV ČR.

Protilátky proti nádorovým antigenům jsou v nich navázané na rozpustný kopolymer N-hydroxypropylmethakrylamidu, na nějž je přes peptidickou spojku připojeno cytostatické antibiotikum 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 zkratkou **ADEPT** (Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy).

Protilátka se váže na nádorové buňky. Konjugovaný enzym pak v okolí nádorové buňky odštěpí fosfátovou skupinu z podaného fosforylovaného profarmaka, např. fludarabin fosfátu. Vznikne produkt, který na rozdíl od silně polárního profarmaka může pronikat přes buněčnou membránu do nádorových buněk, ale normální buňky nezasáhne.

Podobně jako u jiných cílených léčiv má protinádorová terapie využívající protilátky méně vedlejších účinků než standardní chemoterapie, bez rizik však není ani ona. Závažným problémem je již zmíněná **imunogenita některých terapeutických protilátek**, kdy podaný přípravek může být imunitním systémem člověka 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 nebezpečné 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 kardiovaskulární 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 aj.

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, přípravu, čištění i kontroly jakosti a bezpečnosti.

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 trastuzumabem s 82.340 Lbšt při přežití ohodnoceném na 10,7 QALY, bez trastuzumabu 77.786 Lbšt při 8,78 QALY. Náklady na 1 QALY navíc tak činí 2.396 Lbšt, 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 enormně zvyšuje. Zdravotní pojišťovny řady zemí proto často 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 jen prodlužovala o několik měsíců. Roční náklady na „biologickou léčbu“ pacienta u nás v r. 2010 činily 2,2 mld. Kč. Pokud by ale byli v tom roce 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. Přitom se v následujících letech sortiment povolených drahých terapeutických protilátek podstatně zvýšil. Onkologové se proto oprávněně obávají hrozící podléčenosti pacientů.

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 patientek by však byla jen neúčelným vyhadzováním 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, nevádí 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, navíc ji zkomplikovala také možnost přenosu některých virů jako je MERS-CoV, koronavirus způsobující „blízkovýchodní respirační syndrom“, který byl objeven i v krvi velbloudů. Přesto by však jejich cena mohla být nižší než u běžných terapeutických monoklonálních protilátek. Léčebné využití „nanoprotilátek“ v brzké době ale nelze očekávat. 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. První 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 tzv. **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“ přežívaly 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 (viz níže) vyselektované tak, aby se vázaly na zvolené antigeny. 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.

Kromě 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 plenkách. Zkoušen byl např. aptamer neutralizující protein E7 produkovaný papilomavirem HPV16, který umožňuje infikovaným buňkám obejít přirozenou obranu organismu a nekontrolovaně se dělit. Za peptidické aptamery, které mohou při přípravě imunotoxinů výhodně nahrazovat protilátky s příliš velkými molekulami, lze považovat **DARPin** (DARP = Designed Ankyrin Repeat Proteins). DARPiny, 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. DARPinem s potenciálním terapeutickým využitím v onkologii je **MP0250**, bispecifický blokátor VEGFR a růstového faktoru hepacytů HGF, který byl zkoušen ve fázi 2 při léčbě mnohočetného myelomu. 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

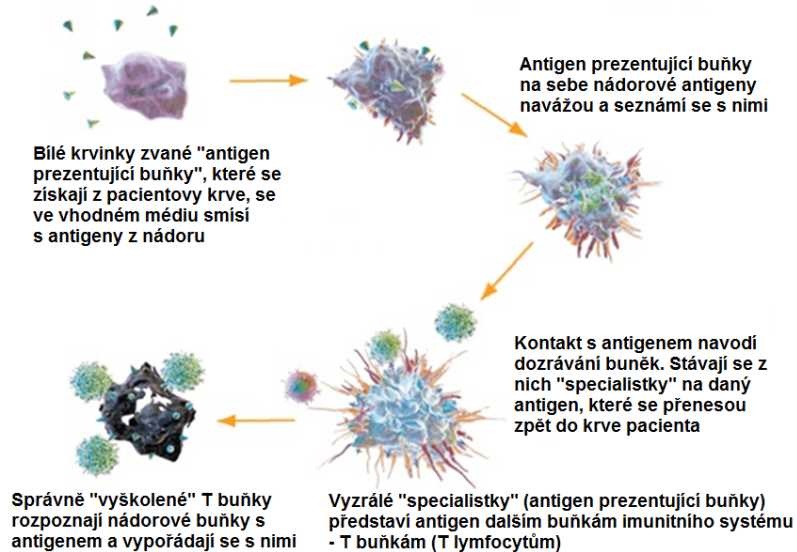
V protinádorové prevenci se uplatnily jen vakcíny, jejichž cílovými strukturami sice nejsou nádorové buňky, které však chrání organismus proti infekcím předcházejícím vzniku nádorového onemocnění.

Infekce pohlavních orgánů lidskými papilloma viry (HPV) typu 16 a 18 má v asi 70% případů za následek vznik gynekologických i některých dalších nádorů. 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 HPV vhodné k léčbě prekanceróz nebo již vzniklých nádorů a také vakcíny proti Epstein-Barrově viru, který rovněž může vyvolat vznik nádorů. Zatím není k dispozici vakcína proti žlutence typu C, která může vyústit v nádorové onemocnění jater nebo proti bakterii *Helicobacter pylori*, která může vyvolávat vznik nádorů žaludku.

Na rozdíl od vakcín pro prevenci slouží jiné vakcíny k **imunoterapii již vzniklých nádorů**. Většinou jsou tyto vakcíny **autologní**, 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“.

Tyto 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 zabíječe (natural killer cell) nebo jiné buňky 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.



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

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

Při přípravě protinádorových vakcín se proto často izolují z krve prekurzory dendritických buněk, ty se nechají dozrát a pak inkubují s izolovanými 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 gp1000 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 vývoje protinádorových vakcín je, že povrchové antigeny nádorových buněk se od antigenů na povrchu normálních tkáňových buněk liší často 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 mohou ale naopak být příčinou nedostatečné imunitní odezvy, kdy organismus nedokáže nádorové buňky zlikvidovat. Paradoxně může přitom vakcína vyvolat imunitní toleranci proti nádorovým buňkám a dokonce průběh nádorového onemocnění urychlit.

Lepší perspektivu proto mají vakcíny proti buňkám s **neoantigeny**, tj. peptidy specifické pro nádory, které vznikají v důsledku mutací spojených s nádorovým bujením. Na povrchu nádorových buněk jsou prezentovány pomocí hlavních histokompatibilních komplexů MHC I nebo II a vyvolávají tak odezvu imunitního systému. Každý nádor ale může vytvářet specifické neoantigeny, takže protinádorová vakcína pak nefunguje u všech pacientů.

Nádorová transformace je postupným procesem. Imunitní systém organismu přitom vykonává určitý selekční tlak, takže se po čase množí jen nejodolnější nádorové buňky, s nimiž se imunitní systém už nedokáže vypořádat. Organismus si tak může na nádorové buňky „zvyknout“. Nádorové buňky si přitom mohou osvojit schopnost určitých regulačních buněk bránit tomu, aby imunitní systém napadal vlastní tkáň. Jeden enzym označovaný jako A20 tlumí v dendritických buňkách 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.

Výzkum protinádorových vakcín je značně rozvinutý, ale ve farmaceuticky zaměřené literatuře není dostatečně prezentovaný. 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 proto byly spíše rozporné.



Při zkouškách vakcíny **Oncophage** (Antigenics Inc.) proti melanomu a nádorům ledvin u několika pacientů nádor vymizel, u jiných došlo k prodloužení doby bez známek onemocnění o 3-4 měsíce, celková průměrná doba přežití pacientů se však nezvyšovala. Vakcína **Canvaxin** (CancerVax) s polyklonálními protilátkami proti 30 antigenům tří linií buněk melanomu i dalších nádorů neprodloužovala dobu přežití pacientů. Zlepšení léčby melanomu nepřinesly ani zkoušky vakcíny **GM2/KLH-QS-21**. V kombinaci s ipilimumabem byla úspěšně zkoušena vakcína **TriMixDC-MEL** využívající dendritické buňky vzniklé z pacientových monocytů (druh bílých krvinek), do nichž byla elektroporací (otevřením pórů elektrickým impulzem) vnesena mRNA. Zajímavý přístup představuje v Izraeli vyvíjená „nanovakcína“ tvořená nanočásticemi biodegradabilního polymeru, které obsahují dva peptidy typické pro buňky melanomu, které pak slouží jako jakési neoantigeny vyvolávající imunitní odezvu.

Několik vakcín bylo 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 stimulujícího kolonie granulocytů a makrofágů GM-CSF. Antigenem je prostatická kyselá fosfatasa, která se vyskytuje v 95% buněk nádorů prostaty, Vakcína Provenge prodloužila dobu přežívání pacientů o 4,1 měsíce. Vzhledem k vysoké ceně (za jednu dávku podávanou v infuzi 31 tis USD, léčba zahrnuje 3 dávky) 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 drůbežích 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, 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 prodloužuje dobu přežití pacientů. V tuzemském, ale i zahraničním tisku měla vakcína až přehnaně pozitivní odezvu, vyvolala však také odpor našich antivakcionistů z jakéhosi „Hnutí za osvobození vědomí“. Jeho členové upozorňují že „miliardář 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 prodloužovala ve srovnání se standardní léčbou dobu do progresu onemocnění o 146% a dobu přežití pacientů o 60%. Statut léčiva „sírotka“ získala vakcína **BiovaxID** proti nehodgkinským lymfomům, která se připravuje procesem „záchranné fúzní hybridizace“. Přitom jsou pacientovy nádorové buňky hybridizovány s buňkami produkujícími protilátku za vzniku heterohybridomů, které pak produkují imunoglobuliny charakteristické pro antigeny pacientova nádoru. Ty se izolují a použijí jako vakcína, která dále obsahuje faktor stimulující 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 stimulující 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 měla účinkovat i 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 **HSPCC-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 známek 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 agresivnímu nádoru mozku, glioblastomu je **DCVax-L** (Northwest Biotherapeutics).

Další vakcína proti 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.

Vakcína proti nádorům u dětí je vyvíjen i v Brně klinikou dětské onkologie ve spolupráci s lékařskou fakultou MU.

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. Vakcíny, jejichž cílovým antigenem HER2, by mohly být účinné i proti nádorům střev, vaječníků, žaludku a dokonce i proti nádorům prostaty.

Zatímco vakcíny Gardasil a Cervarix mají preventivně chránit proti infekci onkogenními viry HPV, peptidická vakcína **TriVax HPV** je vyvíjena k léčbě nádorového onemocnění viry již vyvolaného. Vakcína vyvolává trvalou odezvu imunitního systému na nádory exprimující peptid E7 viru 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.

Neoantigenová vakcína **ADX-NEO** je vyvíjena tak, že několik nádorových neoantigenů je pomocí vhodného bakteriálního nosiče prezentováno imunitnímu systému, což vyvolává jak buněčnou, tak i protilátkovou protinádorovou imunitu. Vývoj je však zatím na samém počátku. Kombinací vakcíny „molekulárně informované nádorovými antigeny“ a buněk imunitního systému označovaných jako „přirození zabijáci“ (natural killers) je přípravek **NANT Cancer Vaccine**.

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. Na podobném přístupu jsou založeny i **mRNA vakcíny**.

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 a vakcína s modifikovanou sekvencí nukleotidů, která má označit nádorový antigen WT1 pro T-buňky imunitního systému za cizorodý a tím vyvolat likvidaci buněk s WT1 a DNA vakcína proti nádorům hlavy a krku způsobených infekcí virem HPV.

Léčbě vakcínami připravovanými z krve a/nebo nádorů pacientů se podobá **buněčná imunoterapie**.

Jeden směr buněčné imunoterapie představuje kultivace pacientových vlastních imunitních buněk – lymfocytů, které infiltrují 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) schopné lyzovat pacientovy nádorové buňky. Jejich účinnost může být při kultivaci zvýšena přidávkou TNF $\alpha$  a INF $\gamma$ , popř. 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 nádorových buněk, např. s antigenem 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 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. Byl 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, došlo 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 CAR-T povolen pro léčbu difuzního velkobuněčného lymfomu a v srpnu 2017 byl z krve pacienta připravovaný přípravek **tisagenlecleucel** (Kymriah, Novartis) povolen FDA pro léčbu akutní lymfoblastické leukemie vycházející z B-lymfocytů. Tisagenlecleucel tvoří namnožené T-buňky izolované z krve pacienta, do nichž byl genovými manipulacemi vnesen gen kódující receptor pro protein CD19, který se vyskytuje na povrchu B-lymfocytů. Postup realizovaný na zakázku během 22 dnů po odběru krve pacienta v americkém závodě švýcarské firmy Novartis je ale mimořádně nákladný, cena jedné terapeutické kúry 475 tis. \$ má ale být nižší než cena transplantace kostní dřevě. Novartis přitom slíbil, že nebude cenu účtovat pacientům, kterým léčba nepomůže. V říjnu 2017 byl povolen podobný přípravek **abcicabtagen ciloleucel** (Yescarta, Kite Pharma, nyní Gilead) rovněž s genem pro receptor pro CD19.

Jiný přístup k buněčné terapii označovaný zkratkou **TCR**, využívá receptor na povrchu T-lymfocytů, který rozeznává antigeny vázané na hlavní histokompatibilní komplex (MHC).

Při interakci TCR s uskupením antigen-MHC jsou T-buňky aktivovány a začnou se množit. Při screeningu lidských T-lymfocytů se získají T-buňky, které silně interagují s určitým antigenem na povrchu nádorových buněk pacienta. Pak se identifikuje gen kódující příslušný TCR. Ten se pak pomocí retrovirového vektoru vnese do pacientových T-lymfocytů. Upravené lymfocyty se pak po namnožení vrátí pacientovi, aby likvidovaly buňky jeho nádoru s příslušným antigenem.

**Viroterapie** je léčba onkolyticky působícími viry nebo viry genově upravenými tak, aby aktivovaly imunitní systém pro likvidaci nádorových buněk.

V klinickém zkoušení jsou přípravky obsahující původní, „divoké“, nebo i genově modifikované viry z více než 10 čeledí virů. Nejčastěji to jsou adenoviry, onkolyticky ale působí i echoviry, polioviry, pikornaviry, herpetické viry, paramyxoviry, parvoviry, reoviry, poxviry, retroviry a rhabdoviry. Onkolytický echovirus **Rigvir** byl vyvinut v Lotyšsku, kde byl povolený pro protinádorovou terapii již v r. 2004. **ONYX-015** je onkolyticky působícím modifikovaným adenovirem. 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*. Modifikovaný adenovirus **Oncorine** (H101, Sunway Biotech) má genom upravený tak, aby byla zneškodněna antivirová obrana organismu. Přednostně infikuje nádorové buňky, i když napadá i normální buňky. Jeho přídavek k chemoterapii ale prodlužuje dobu přežití pacientů na dvojnásobek. Povolen byl v Číně v r. 2005 pro léčbu nádorů hlavy a krku.

**Adenovirus Delta-24-RGD** je genově modifikovaný tak, aby atakoval buňky nádoru mozku, glioblastomu, klinicky je zkoušen od r. 2009. 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.IL-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. Přípravek **VB-111** (VBL Therapeutic, Izrael) tvořený nereplikujícím se serotypem 5 adenoviru s genem kódujícím protein FasC a promotorem regulujícím expresi prekursoru 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. **CG0070** je onkolytický adenovirus, který způsobuje selektivní expresi faktoru stimulujícího kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF) v buňkách s defektním tumorsupresorovým genem *RBI*. !

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. Genom herpetického viru **HSV1716** (přípravek **Seprevir**) je upraven delecí jednoho genu tak, aby se virus mohl množit rovněž jen 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 noradrenalinu, který může do nádorových buněk specificky vnášet některé sloučeniny s navázaným radioaktivním jodem. Jeho záření 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.

Pro léčbu zhoubných nádorů mozku, glioblastomů, je zkoušen modifikovaný virus dětské obrny **PVSRIP0**, podle preklinických zkoušek by mohl léčit i nádory prsu. Pro léčbu nádorů mozku byl na základě preklinických testů navržen i virus Zika. Podle zkoušek na myším modelu by vakcína obsahující oslabený živý virus **ZIKV-LAV** modifikovaný delecí virového genomu tak, aby se nemohl v mozkové tkáni množit, mohla být úspěšně používána k onkologické léčbě. Proti nádorům mozku bylo zkoušeno i použití **viru dětské obrny**. V protinádorové terapii mohou být využity i **viry spalniček** a **planých neštovic**, jde ale o viry geneticky modifikované, aby přednostně napadaly nádorové buňky. **Pexastimogen devacirepvec** (**Pexa-Vec**, **JX-594**, Jennerex Biotherapeutics), modifikovaný virus planých neštovic, má odstraněný virový gen pro thymidinkinásu a vložené lidské geny pro  $\beta$ -galaktosidasu a faktor podporující růst kolonií granulocytů a makrofágů (GM-CSF), který stimuluje imunitní systém. Představuje tak přípravek kombinující genovou terapii s viroterapií. Může se replikovat pouze v buňkách s vysokou hladinou thymidinkinasy, 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.

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.

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 zabíjet nádorové buňky, a to i kmenové. Napadají především nádorové buňky s onkogenem *ras*. Klinicky zkoušený u nádorů hlavy a krku, plic, pankreatu, střev a vaječnicků je **pelareorep** (Reolysin, Oncolytics Biotech), kanadský přípravek obsahující serotyp 3 reoviru. 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. Onkolytické vlastnosti některých virů mohou být zlepšeny také vnesením genu kódujícího bakteriální chondroitinazu, enzym odbourávající proteoglykany vyplňující prostor mezi buňkami některých nádorů.

Výše zmíněné modifikované viry jsou lidské, což znamená určité omezení pro jejich použití. Italští virologové proto vytvořili 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 nepoškozovat normální 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. V r. 2006 byl v Izraeli izolován typ viru newcastleské nemoci napadající drůbež, který působil onkolyticky na nádory mozku. **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. **Parvovirus H-1** 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.

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

Takovým sebevražedným genem je gen z viru Herpes simplex, který kóduje thymidinkinazu. 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 thymidinkinazu. Podobnými přípravky jsou **GliAtak, ProstAtak a PancAtak** (Advantagene) určené pro léčbu nádorů mozku, prostaty a pankreatu, při jejichž aplikaci se využívá valacyklovir místo gancykloviru. 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 cytosindeaminazu. 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.

Terapie onkolytickými viry zatím přinášela jen střídavé úspěchy, takže se zatím nepropracovala do běžné protinádorové terapie. Hledány proto jsou možnosti jak její účinnost zvýšit.

Jednu z nich představuje kombinace viroterapie s podáváním dalších léčiv – a nemusí to být léky protinádorové. Zajímavou možností zvýšení účinnosti představuje kombinace podávání onkolytických virů s dimethylfumarátem, který se používá při léčbě roztroušené sklerózy (přípravek Tecdifera). Při zkouškách s tkáňovou kulturou buněk nádorů ledvin dimethylfumarát podaný před aplikací různých onkolytických virů (viry puchýřkového zánětu ústní dutiny, herpetické viry, adenoviry, virus Sindbis) až stonásobně zvyšoval produkci virových částic v nádorových buňkách

**Genová terapie** je založena na vnášení celých funkčních genů tvořených rozsáhlou dvořetězcovou DNA. Teoreticky může být do buněk dopraven „nahý“ 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 jejich patogenita. Zkoušena je ale „doprava“ genů do buněk pomocí plasmidů i dalších nevirálních vektorů.

Genová terapie byla poprvé využita při léčbě kombinované imunodeficiency (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 tak snadno podléhají i lehkým nákazám. Musí proto žít v aseptickém prostředí. To jim zajišťují plastové vaky, „bubliny“, naplněné filtrovaným vzduchem (nemoc je 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 spočívající 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. 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. Později byly zkoušky obnoveny, avšak v r. 2005 další z dříve léčených pacientů onemocněl opět leukemií. Zkoušky byly znovu zastaveny. Byly hledány možnosti selektivního vnesení genů na taková místa genomu, kde by nežádoucí aktivace sousedních genů nehrozila. To umožnila až technika označovaná zkratkou CRISPR-Cas9, kterou v r. 2012 vyvinula Jennifer Doudna z university v Berkeley. Tato technika využívá specifický oligoribonukleotid se shluknutými pravidelně položenými 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 tím 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 znásobení počtu genů zodpovědných za produkci cytokinů regulujících imunitní odezvu organismu.

Prvním přípravkem povoleným pro genovou protinádorovou terapii již v r. 2004 je **gencidin** (SiBiono), rekombinantní adenovirus modifikovaný tak, aby exprimoval aktivní gen *p53*. Gencidin byl povolen pro léčbu nádorů hlavy v Číně, kde podmínky schvalování nových přípravků patrně nejsou tak přísné jako v jiných zemích. 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. Několik přípravků obsahuje geny kódující cytokiny regulující imunitní systém. **TNF erade** 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**, 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** tvořený adenovirem se zabudovaným genem pro interferon  $\alpha_{2B}$ . Při léčbě melanomu nebo v kombinaci s radioterapií je zkoušen přípravek je **INGN-241** 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**, 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. **Talimogen laherparepvek** (Imlygic, Amgen) je virus Herpes simplex (původce oparů) modifikovaný vložím genů kódujícího GM-CSF. Po injekci do nádoru dochází k nekróze buněk, do nichž virus proniknul. Současně je přitom aktivována imunitní obrana organismu proti buňkám s nádorovými antigeny na povrchu. Výsledky zkoušek při léčbě neoperabilního melanomu byly příznivé a v závěru roku 2016 byl T-VEC pro tuto indikaci 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. 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** je 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 peptidů z nádorové buňky. Jejich rozpoznání pak dává 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 polyetyleniminu a plasmidu s vloženým genem kódujícím 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 v nádorových buňkách, které zabíjí. Aplikuje se přímo do nádoru. Zkouší se při léčbě nádorů močového měchýře, úspěšné byly preklinické zkoušky jeho inhalačního podání u nádorů plic.

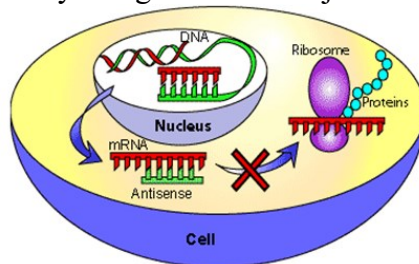
Kromě virů se v protinádorové terapii mohou uplatnit i některé **bakterie**.

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 myším modelu metastazujících nádorů pankreatu se podařilo eliminovat až 90% metastáz. V přípravku **axalimogene filolisbac** jde o stejné bakterie s genomem upraveným vnesením plasmidu kódujícího 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“

Zajímavou možností představuje využití oslabených bakterií kmene *Salmonella* k „propašování“ nanočástic tvořených kopolymerem polyesteru kyseliny mléčné a glykolové s navázaným léčivem do nádorových buněk v systému NanoBEADS (Bacteria Enabled Autonomous Drug delivery System). Jak ukázaly preklinické zkoušky s myším modelem, bakterie, které pronikají do tkání, jednak aktivují imunitní systém, jednak dopraví do nádorových buněk nanočástice s léčivem.

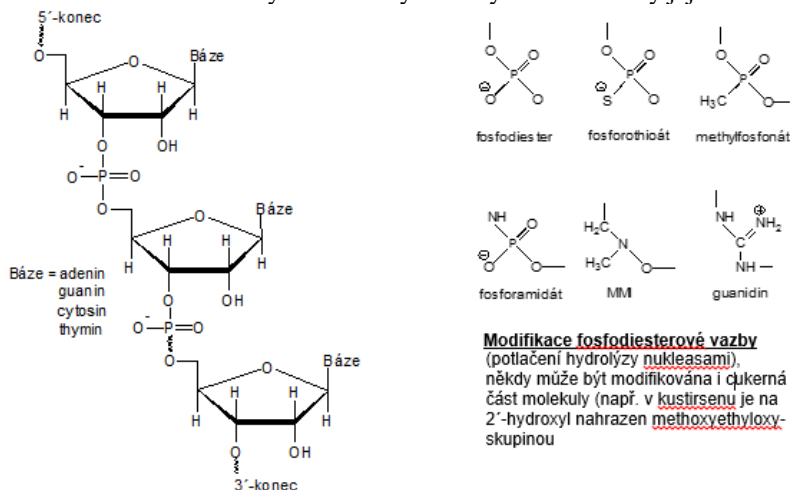
### Oligonukleotidy blokující přenos genetické informace

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 ribozymů (viz dále) bude zřejmě bránit i jejich omezená stabilita, problémy s průnikem do buněk i cena. Pro zvýšení stability musí být modifikovány jejich fosfátové skupiny.



Prvním povoleným komplementárním oligonukleotidem je **formivirsen** (Vitravene, Isis), který však není určen pro protinádorovou terapii, ale pro léčbu cytomegalovirových infekcí v očním lékařství. Protinádorově účinný je **oblimersen** (Genasense, 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. Zkoušení **trabedersenu**, který blokuje tvorbu transformujícího růstového faktoru TGF $\beta$ 2 dospělo do fáze III při léčbě nádorů mozku je. Statut urychleného posouzení obdržel **kustirsen** (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). Ten se v nadměrném množství vyskytuje v buňkách nádorů prostaty, kde brání apoptóze. Podání kustirsenu potlačuje rezistenci a zvyšuje účinnost používaných chemoterapeutik, používá se v kombinaci s docetaxelem a prednisonem. Kromě léčby rezistentních nádorů prostaty je kustirsen 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 leukémie v kombinaci s idarubicinem a cytarabinem. **Archexin** (Rexahn) je 20-mer komplementární k mRNA kódující serin-threoninovou proteinkinasu Akt1, která se podílí na potlačování apoptózy 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-EIF4E<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 účinný v řadě nádorových buněk, kde brzdí apoptózu 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 leukémie, účinný by měl být i u metastázujících nádorů prsu, nádorů střev a ledvin a nemalobuněčných nádorů plic. **SD-101** je deoxyoligonukleotid s thiofosfátovými vazbami, který je agonistou receptoru TLR9, který se vyskytuje u jednoho druhu specializovaných dendritických i u B-buněk. Aktivace receptoru vyvolává imunologickou odezvu vůči nádorovým buňkám. SD-101 injekčně aplikovaný do nádoru je zkoušen v kombinaci s pembrolizumabem při léčbě metastázujících melanomů a nádorů hlavy a krku vycházejících zdlazdicových buněk. 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 9).

Komplementárním oligonukleotidům se podobají tzv. **morfolina** (Morpholinos), které mají cukernou složku nahrazenou zbytkem morfolinu. Mívají kolem 25 bází a v důsledku své nepřírovnalé 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 specifitu. 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.

Průlom v oblasti terapeutických (ale zejména diagnostických) oligonukleotidů přinesly již zmíněné nukleotidické **aptamery** – ribo- nebo deoxyribooligonukleotidy s vysokou afinitou k vybraným biomolekulám.

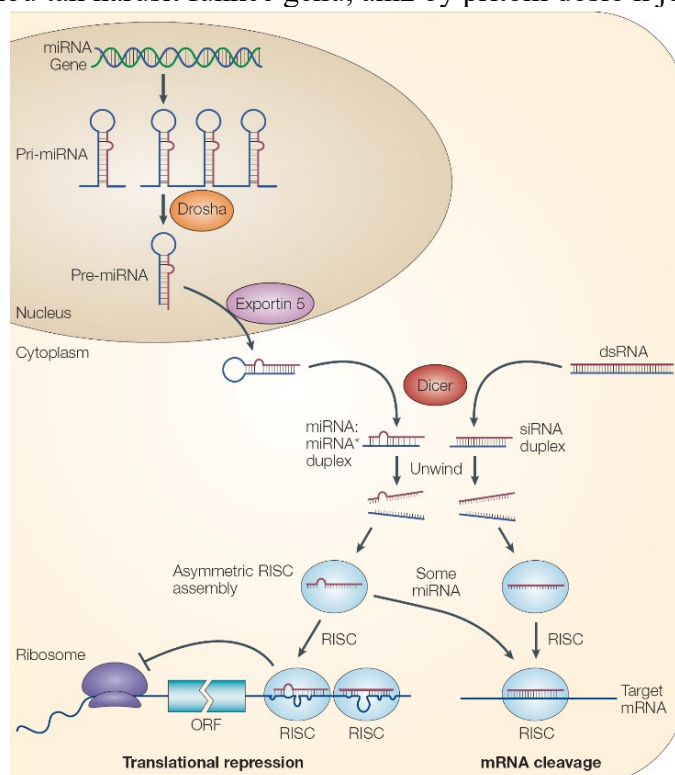
Aptamery jsou vybírány z knihoven syntetizovaných oligonukleotidů metodou označovanou jako **SELEX** (Systematic Evaluation of Ligands by **EX**ponential Enrichment). Přitom se na 3' a 5' konce zvoleného malého oligonukleotidu sloužícího jako primer napojují další nukleotidy. Vznikne knihovna jednořetězcových oligonukleotidů, která se podrobí vazebné interakci s cílovou strukturou zakotvenou na vhodném nosiči. Cílovou strukturou přitom může být některý enzym, receptor, oligo- nebo polynukleotid, ale i malé molekuly a ionty. Zachycené oligonukleotidy se pak eluují a polymerázovou řetězovou reakcí (Polymerase Chain Reaction, PCR) se namnoží. PCR spočívá v namnožení oligonukleotidů podle předloženého vzoru – templátu – tvořeného dvoušroubovicí DNA. Ta se krátkým zahřátím na teploty kolem 95°C rozdělí na jednořetězcové úseky, na jejichž konce po ochlazení na 50-65°C nasednou primery – vhodně zvolené oligonukleotidy. Na krátké komplementární úseky vniklé po nesednutí primerů se naváže termostabilní polymeráza izolovaná z termofilních bakterií (většinou *Thermus aquaticus* objevených v okolí mořských vývěrů horkých pramenů). Po ohřátí směsi v pufrovaném roztoku obsahujícím směs deoxynukleosid trifosfátů (dATP, dCTP, dGTP a TTP) a hořčnatých iontů na 75-85°C dojde k vytvoření komplementárních řetězců k původnímu templátu. Postup se pak opakuje. Reakce jsou rychlé a v automatickém termocyklu se velmi rychle dosáhne exponenciálního namnožení původně vloženého templátu.

Produkty PCR se znovu nechají interagovat s cílovou strukturou imobilizovanou na nosiči, upraví se ale podmínky eluce tak, aby byly vymyty aptamery s vyšší afinitou k příslušné struktuře. To se může ještě několikrát opakovat. Jak již bylo zmíněno, oligonukleotidové aptamery představují alternativu k protilátkám (viz výše) i komplementárním oligonukleotidům. Jejich předností je vysoká selektivita vůči cílové struktuře, nízká imunogenita a snazší příprava než je získávání lidských nebo humanizovaných protilátek a dobrá termická stabilita, nevýhodou rychlé hydrolytické štěpení fosfátových vazeb katalyzované nukleázami obsaženými v krvi. Určitými následnými modifikacemi lze však hydrolytickou stabilitu oligonukleotidických aptamerů zvýšit. Oligonukleotidickým terapeutickým aptamerem je **IMO-2125**, který je podobně komplementární oligonukleotid SD-101 (viz výše) agonistou receptoru TLR9. Zajímavou léčivou látkou může být **chimérický aptamer**, interagující hned se 3 receptory: EGFR, HER2 a HER3, který konstruován napojením HER3 aptameru (79 bází) přes 2 adenylátové spojky na 3'-konec jednoho řetězce a HER2 aptameru (34 bází) na 3'-konec druhého řetězce EGFR-siRNA přes 4-adenylátové spojky zajišťující konformační flexibilitu produktu. Při preklinických zkouškách vyvolával tento aptamer v tkáňové kultuře zastavení růstu a apoptózu nádorových buněk s receptory HER2 a HER3 a při zkouškách u myši s transplantovaným nádorem vykazoval vysokou afinitu k buňkám s těmito receptory také *in vivo*.

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

Připraveny byly ribozymy štěpící mRNA odvozenou od onkogenů *ras* nebo *fos*, resp. genu *mdr* podílejícího se na rezistenci nádorových buněk vůči cytostatikům, do protinádorové terapie ale ribozymy nepronikly. V letech 2001-3 byl klinicky zkoušen ve fázi I ribozym **Herzyme** (Ribozyme Pharmaceuticals), který štěpí mRNA kódující receptor typu 2 pro lidský epidermální růstový faktor HER2 vyskytující se v nadměrném množství na povrchu buněk nádorů prsu. Zkoušky měly sice být úspěšné, ale další zkoušení již nepokračovalo. Vzniku nových cév měl bránit **Angiozym**, ribozym specificky štěpící mRNA, která kóduje VEGFR1, jeden z receptorů pro vaskulární endoteliální růstový faktor, fáze II jeho klinického zkoušení při léčbě metastázujících nádorů prsu ale také 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 malých RNA mohou způsobit postranlační umlčení genů (gene silencing), tj. zablokovat přepis mRNA na odpovídající bílkovinný produkt. Mohou tak narušit funkce genů, aniž by přitom došlo k jejich poškození\*).



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

\*) Článek o těchto i dalších malých nekódujících DNA – viz K. Spurná, J. Viktorová, T. Ruml, Přehled malých nekódujících RNA, *Chemické listy* 112, 811-818, (2018)

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 „umlcování“ 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.

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 metastázujičích 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. Zvýšená hladina miR25 a miR93 umožňuje nádorovým buňkám vyhnout se útoku imunitního systému. miR150 se vyskytuje ve zvýšené míře v buňkách folikulárního lymfomu a ve spolupráci MU a CEITEC bylo navrženo její využití v diagnostice jako biomarkeru. 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 ubikvitinaci a následnou degradaci v proteasomech. Obnovení funkce p53 zajišťuje i miR34a, která při zkouškách po vnesení pomocí nanočástic do buněk nádorů žaludku s deficitem p53 inhibovala růst nádorových buněk a indukovala jejich apoptózu. Jiným příkladem protinádorově účinné miRNA může být miR145/147 inaktivující onkogen *KRAS*. Ve srovnání s normálními buňkami je v buňkách nádorů pankreatu koncentrace miR145/147 podstatně nižší. Zvýšení její hladiny by proto mělo růst nádorů potlačovat. Snížená hladina miR-429 v buňkách metastázujičích nádorů vaječnicků 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. Podobně zřejmě působí miR506, jejíž hladina je snížena v nádorech vaječnicků a pankreatu. Zvýšením hladiny miR506 byl potlačen růst nádorových buněk a metastázování, zvýšena byla účinnost chemoterapie. Pomocí nanočástic je možné vnášet miR506 přímo do pankreatu, což představuje zajímavou možnost léčení jednoho z nejnebezpečnějších nádorových onemocnění. Metastázování brání i nově objevená miR1199-5p. Tvorbu cyklinu A2, bílkoviny, která ovlivňuje průběh buněčného dělení a chrání buňky jater a střev před nadměrnou proliferací, potlačuje miR-22. Expresi téměř 4.800 lidských genů může ovlivňovat miR122. Snížení její hladiny nebo vymizení v buňkách nádorů jater má za následek nárůst množství několika onkogenů v jaterních buňkách a zhoršení prognózy léčby pro pacienty.

V kmenových nádorových buňkách je koncentrace jedné miRNA označované jako let-7 nebo Lethal-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. Novým poznatkem je, že snížení hladiny let-7 nebo nepřítomnost v T-lymfocytech mění tyto buňky v „superzabijáky“ a tím podstatně zvyšuje imunitní odpověď organismu.

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 dodání proto potlačovalo růst takových nádorových buněk.

Po úspěšných preklinických zkouškách měly být zahájeny klinické zkoušky prvního léčiva pro protinádorovou terapii s funkcí mikroRNA, **přípravku MRX34**, což je v liposomech enkapsulovaná dvouřetězová RNA, která působí podobně jako miR-34a. V novější literatuře jsou ale jen údaje o klinických zkouškách miravirsenu, což je anti-miR122 proti hepatitidě C.

Problémem, který brání využití léčby oligonukleotidy, je jejich rychlá degradace v krevním oběhu. Enkapsulace v liposomech nebo nanočásticích nebo modifikace jejich stavebních kamenů – nukleotidů – proto představuje proto možnost, jak jejich potenciál využít. Zahájeny byly např. preklinické zkoušky přípravku tvořeného sférickými nanočásticemi na myším modelu s nemalobuněčnými nádory plic, který obsahuje kromě miR-29-b lidský imunoglobulin IgG skrývající nanočástici před imunitním systémem, antigen MUC1 jako složku směřující nanočástici na nádory plic a poloxamer 188 (kopolymer tvořený bloky polypropylenoxidu a polyethylenoxidu), jímž jsou složky do nanočástice „slepeny“.

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

Blokováním určitých miRNA mohou zabránit nežádoucímu umlčování genů antagomiry vyvíjené pro léčbu nádorových, ale i virových a kardiovaskulárních onemocnění. Tvorbu miRNA má blokovat na guanin bohatý aptamer **AS1411** inhibující 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 vyvolává rezistenci nádorových buněk vůči cytostatikům a zvyšuje agresivitu nádorů.

První terapeutické siRNA patisiran, fitusiran, givosiran nebo inklisiran, postoupily do závěrečných fází klinických zkoušek, je to ale při léčbě dědičných genetických poruch, jako je amyloidóza, hemofilie, porfyrie, apod. Přípravky pro protinádorovou terapii zatím pokročily nanejvýš do stadia pokusů na zvířatech nebo do fáze 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 přitom 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) se v buňkách vyskytují i další druhy nekódujících oligoribonukleotidů. Jejich role a význam sice zatím nejsou dostatečně známy, zdá se však, že mohou hrát určitou roli i při nádorových onemocněních.

V poslední době z nich vzbudily zájem i některé lncRNA, „**dlouhé nekódující RNA**“ tvořené více než 200 páry bází. Jedna z nich označovaná zkratkou MALAT 1 (= **Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1**) reguluje expresi genů ve vztahem k metastázování a má zřejmě určitou roli i v řízení řady dalších buněčných procesů. Připraven byl komplementární oligonukleotid, který MALAT 1 blokuje. Jeho preklinické zkoušky u pokusných myší s transplantovanými nádory prsu byly velmi úspěšné.

V budoucnosti se mohou regulační RNA v terapii nádorových onemocnění zajímavě uplatnit. Studium jejich využití k umlčování genů, jejichž mutace nebo nadměrná exprese souvisí s nádorovým onemocněním, je však zatím na samotném počátku. Výhodou je, že regulační RNA jsou přirozenými látkami, které lze v zásadě připravovat biotechnologickými postupy místo pracné mnohastupňové syntézy. Komplikací ale je, že přirozené oligoribonukleotidy s nemodifikovanými fosfodiesterovými vazbami mohou být snadno štěpeny ribonukleasami a fosfodiesterasami, a to již v krevním oběhu, ještě předtím, než se dostanou k cílovým nádorovým buňkám. I když syntetické oligonukleotidy s modifikovanými fosfátovými vazbami nukleasami štěpeny nejsou, v důsledku značné polaritativy svých molekul pronikají jen nesnadno do nádorových buněk. Hlavním předpokladem terapeutického využití oligonukleotidů je kromě zábrany hydrolytického štěpení i nalezení vhodného způsobu jejich vpravování do buněk.



Pro možné terapeutické aplikace oligonukleotidů je proto vyvíjena a zkoušena celá řada potenciálně vhodných technik a lékových forem. Kromě již zmíněné enkapsulace do liposomů a nanočástic to je také navázání na polylysinové, chitosanové nebo jiné polymerní nanočástice, využití dendrimerů a dalších systémů, navázání na nanočástice zlata apod.. Nanočástice, které do buněk pronikají endocytózou, přitom mohou být „nasměrovány“ do nádorové tkáně protilátkami, které interagují s antigeny na povrchu nádorových buněk.

Jednu z intenzivně studovaných možností terapeutického využití oligonukleotidů představuje systém jejich stabilizace a vnášení do buněk 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 cyklohexinu 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 cyklohexinu, zatímco hydrofilní řetězce PEG směřující od jádra do vodného prostředí nanočástici stabilizují. Poslední komponentou je bílkovina směřující k nádorovým buňkám, na níž je přes polyethylenglykolovou spojku opět navázaný adamantan, který směřující molekulu ukotvuje 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 zkoušeny 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, aby se siRNA vyhnula degradaci působením fosfatů.

Jinou navrženou a zkoušenou možností je příprava dlouhého řetězce RNA s krátkou spojkou mezi opakujícími segmenty siRNA 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 nahromaděné v nádorové tkáni proniknou do buněk a v nich pak Dicer rozseká dlouhý řetězec na jednotlivé siRNA.

Problém umlčení nežádoucích miRNA by mohly řešit i genové manipulace vnášející do buněk polynukleotid, 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.

Jedním z předpokladů úspěšného terapeutického využití oligonukleotidů je i spolehlivé stanovení hladiny určitých interferujících RNA v buňkách. Soupravy pro stanovení různých miRNA vyvíjí a dodává mimo jiné i brněnská firma BioVendor.

## 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 zajímavý výzkum zabývající se hledáním nových účinných léčiv. Nové přípravky pomáhají snižovat mortalitu na nádorová onemocnění, jejichž výskyt roste, hlavně v důsledku stárnutí populace. Působí mnohem selektivněji, než starší klasická cytostatika, ale stále ještě nejsou prostě některých nežádoucích vedlejších účinků. Jsou také mnohem dražší. Přes obrovské úsilí věnované výzkumu a vývoji nových protinádorových léčiv a úspěchy nových přípravků v terapii nelze předpokládat, že bude možné všechna onemocnění shrnovaná pod pojmem rakovina vyléčit. Lze však očekávat, že další vývoj přinese onkologickým pacientům podstatné prodloužení doby života a zvýšení jeho kvality. Rakovina pro ně přestane být smrtelným onemocněním a změní se na onemocnění chronické.

## 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. Jakým způsobem lze aktivovat imunitní systém organismu k zásahu proti nádorovým buňkám.
6. Jaké jsou možnosti využití protinádorových vakcín?
7. Jak a čím lze blokovat replikaci, transkripci a translaci genů stimulujících růst a množení buněk?
8. Jaké problémy je třeba překonávat při využití různých oligonukleotidů v terapii?
9. Co to jsou malé interferující RNA a k čemu mohou být v terapii využity?
10. Co jsou mikro RNA a jak působí?