

# Zdravljenje raka z imunskimi celicami

## Cellular immunotherapies of cancer

Ana Herman, Matjaž Jeras

**Povzetek:** V zadnjem času smo priča velikemu porastu rakavih obolenj. Stopnja umrljivosti je žal še vedno visoka, zato so raziskave usmerjene v razvoj novih pristopov zdravljenja. Veliko obeta imunsko zdravljenje malignih bolezni, ki pa je še vedno v fazi kliničnih preizkušanj. Za zdravljenje raka z imunskimi celicami se uporablja različne vrste celic, vse od limfocitov T, naravnih celic ubijalk, dendritičnih celic, preko imunohibridomov do gensko manipuliranih imunskih celic. Zdravljenje z adoptivnim prenosom celic počasi pridobiva na pomenu, vendar pa bo do njegove vsakdanje uporabe preteklo še nekaj časa, saj bo prej potrebno optimizirati postopek priprave efektorskih celic, odpraviti ali vsaj omiliti neželene stranske učinke ter natančno določiti kriterije za izbiro darovalcev in prejemnikov.

**Ključne besede:** Rak, celično imunsko zdravljenje

**Abstract:** A vast increase in malignant diseases is lately being observed. Unfortunately, the death rate still remains on a very high level, resulting in many researches committed to finding new therapeutic approaches. This paper focuses on adoptive cell therapy, a part of immunotherapy cancer treatments that appears to be one of the novel promising strategies. Many different immune cells – lymphocytes T, NK cells, dendritic cells, immunohybridomas and genetically manipulated immune cells, have already been used for that purpose. Adoptive cell therapy is gaining on its importance, but as long as at least the manufacturing process of effector cells is not optimized, the adverse effects are not at least mitigated or even dismissed and the criteria for selection of donors and recipients is not precisely defined, the adoptive cell therapy will not become a common practice in cancer treatment.

**Keywords:** Cancer, cellular immunotherapy

## 1 Uvod

Rakave bolezni so eden izmed treh vodilnih vzrokov smrti v razvitem svetu. Onkološko zdravljenje danes temelji na lokoregionalnem zdravljenju, kamor sodita kirurgija in obsevanje, ter sistemskem zdravljenju, ki poleg različnih oblik kemoterapije vključuje tudi zdravljenje z biološkimi zdravili. Kljub nenehnemu razvoju in napredku vseh omenjenih načinov zdravljenja pa z njimi žal ne dosegajo zadovoljivega napredka v času preživetja in kvalitati življenja bolnikov, zato so prizadevanja številnih raziskovalcev že dolgo časa usmerjena v razvoj novih pristopov zdravljenja.

Največ novosti je prav gotovo na področju imunskega zdravljenja malignih bolezni in eden izmed trenutno najbolj aktualnih pristopov je zdravljenje z imunskimi celicami ali zdravljenje z adoptivnim prenosom celic (ACT – Adoptive Cell Therapy) (1). Med drugim bomo predstavili tudi izsledke nekaterih uspešnih kliničnih testiranj, ki dajejo upanje na vključitev zdravljenja z imunskimi celicami v standardno obliko zdravljenja bolnikov z rakom.

Temelj novih pristopov zdravljenja raka predstavlja paradigma ponovne vzpostavitve ravnovesja imunskega sistema, ki je v bolnikih porušeno. To se med drugim kaže v porastu števila regulatornih imunskih celic, kar omogoča razvoj in vzdrževanje neželene tolerance na tumorske antigene, zaradi česar bolnikov imunski sistem ne zmore obvladati

razrasta novotvorb. Izražena tumorskih antigenov na tumorskih celicah, dokazana imunska odzivnost na večino tumorjev ter različni mehanizmi, s katerimi se tumorske celice uspešno izogibajo nadzoru imunskega sistema, kažejo na to, da je prav normalno delovanje slednjega ključno za uspešno zdravljenje. Zato si številne raziskovalne skupine prizadevajo najti ustrezne načine za njegovo modulacijo v smislu ponovne vzpostavitve polne funkcionalnosti pri preprečevanju rasti oziroma popolni odstranitvi tumorja. Hiter tehnološki napredek danes omogoča osamitev posameznih limfocitnih subpopulacij, pripravo čistih tumorskih antigenov in njihovo natančno opredelitev, učinkovito gojenje izbranih, za točno določene antigene specifičnih klonov celic T ter krepitev imunskega odziva s provnetnimi citokini. S tem pa se krepi potencial in zanimanje za imunsko zdravljenje tumorjev (2).

Trenutne dosežke na področju imunskega zdravljenja človeških trdnih tumorjev razvrščamo v tri glavne kategorije:

- nespecifična imunomodulacija,
  - aktivna imunizacija s tumorskimi cepivi in
  - zdravljenje z adoptivnim prenosom celic (ACT),
- ki so podrobneje predstavljene v preglednici 1 (3).

V nadaljevanju se bomo posvetili predvsem imunskemu zdravljenju z adoptivnim prenosom celic in aktivni imunizaciji s cepivi, pripravljenimi na osnovi dendritičnih celic.

**Preglednica 1:** Pregled trenutnih imunskih pristopov za zdravljenje raka (3), (4), (5).

**Table 1:** A list of contemporary anti-cancer immunotherapeutic approaches (3), (4), (5).

PRISTOP	PRIMER UPORABE	STRANSKI UČINKI
<b>NESPECIFIČNA IMUNOMODULACIJA</b>		
Vzpodbujanje vnetja	Klasičen primer je aplikacija živih bakterij BCG (Bacillus Calmette-Guérin) neposredno v tumor. Uporaba: zdravljenje karcinoma mehurja; nadaljni razvoj v smeri genskega inženirstva.	Pneumonitis in/ali hepatitis; ledvična ali razsejana okužba z BCG.
Zdravljenje s citokini	Prva je bila sistemska aplikacija IL-2 z namenom razmnoževanja naravnih celic ubijalk (NK) in celic T <i>in vivo</i> . Zaradi hude toksičnosti so ta pristop opustili. Danes uporabljajo GM-CSF kot dodatek skupaj s tumorskimi cepivi.	Sistemska toksičnost, kot npr. sindrom kapilarnega puščanja pri zdravljenju z IL-2.
Zdravljenje z monoklonskimi protitelesi	Uporaba monoklonskih protiteles (MoAb), namnoženih <i>ex vivo</i> , kot npr.: proti-CD25 (daclizumab) za zdravljenje T-celičnih levkemij; proti-CD20 (rituximab) za zdravljenje B-celičnih limfomov; proti-HER2 (trastuzumab) za zdravljenje raka dojke ter proti-CTLA4 (implimumab) za zdravljenje melanoma in karcinoma ledvic.	Toksičnost za normalna tkiva, npr. kardiotoksičnost (trastuzumab) ali povzročitev nastanka hudih avtoimunskih reakcij (implimumab).
<b>AKTIVNA IMUNIZACIJA</b>		
Protitumorska cepiva	Protitumorska cepiva, ki izražajo/vsebujejo tumorske antigene. Uporabimo lahko celice, proteine, peptide in/ali širok spekter imunizacijskih vektorjev. Primer: virusni vektorji z genskim zapisom za tumorske antigene z ali brez vgrajenega adjuvansa, ki okrepi T-celične ali prirojene imunske odgovore; hibridne celice pripravljene s fuzijo dendritičnih in tumorskih celic; dendritične celice z dodanimi ali vgrajenimi tumorskimi antigeni, ki delujejo kot antigen predstavitvene celice (APC).	Relativno majhno število resnih komplikacij, potencialno lahko pride do pojava avtoimunosti.
<b>ACT – ZDRAVLJENJE Z ADOPTIVNIM PRENOSOM CELIC</b>		
Celično imunsko zdravljenje	Infuzije avtolognih ali alogenskih krvotvornih matičnih celic (KMC) za zdravljenje hematopoetskih malignih bolezni, po predhodni delni ali popolni odstranitvi bolnikovih imunskih celic. Infuzije tumorsko-specifičnih limfocitov za zdravljenje melanoma in drugih trdnih tumorjev po predhodni delni ali popolni odstranitvi bolnikovih imunskih celic. Tumorsko specifične limfocite pripravijo <i>ex vivo</i> iz imunskih celic, ki se nahajajo v tumorju.	Nastanek avtoimunosti zaradi delovanja na druga tkiva; GvHD - bolezen presadka proti gostitelju po presaditvi alogenskih KMC; uveitis in vitiligo pri zdravljenju melanoma.

## 2 Kratek zgodovinski pregled področja adoptivnega celičnega imunskega zdravljenja rakavih bolezni

Koncept adoptivnega prenosa imunskih celic ter prvi poskusi na živalih segajo v začetek dvajsetega stoletja. Leta 1988 pa je Rosenberg s sodelavci objavil izsledke prvega kliničnega preizkušanja na ljudeh (6). Kot prvi so pri bolnikih z napredovalim rakom ledvic ter melanomom izvedli adoptivni prenos avtolognih imunskih celic, sposobnih specifičnega prepoznavanja in uničevanja tumorskih celic (LAK cells – Lymphokine Activated Killer cells), sočasno z visokimi odmerki IL-2 (7). Le okoli 20 odstotkov bolnikov se je odzvalo na celične infuzije, ki so vsebovale pretežno celice NK, kasnejša preizkušanja pa so dokazala, da lahko podoben protitumorski učinek dosežejo že po sistemski aplikaciji samega IL-2. Ti prvi, sicer precej skromni uspehi, so spodbudili mnoge raziskovalne skupine k nadaljnjemu proučevanju uporabe adoptivnega T-celičnega imunskega zdravljenja. Slika 1 prikazuje časovni potek razvoja adoptivnega prenosa imunskih celic v preteklosti (6).

Trenutno širom sveta potekajo številna klinična preizkušanja s tega področja, s čimer eksponentno narašča tudi število bolnikov, ki so oziroma še bodo zdravljeni s tovrstnimi pripravki (8).

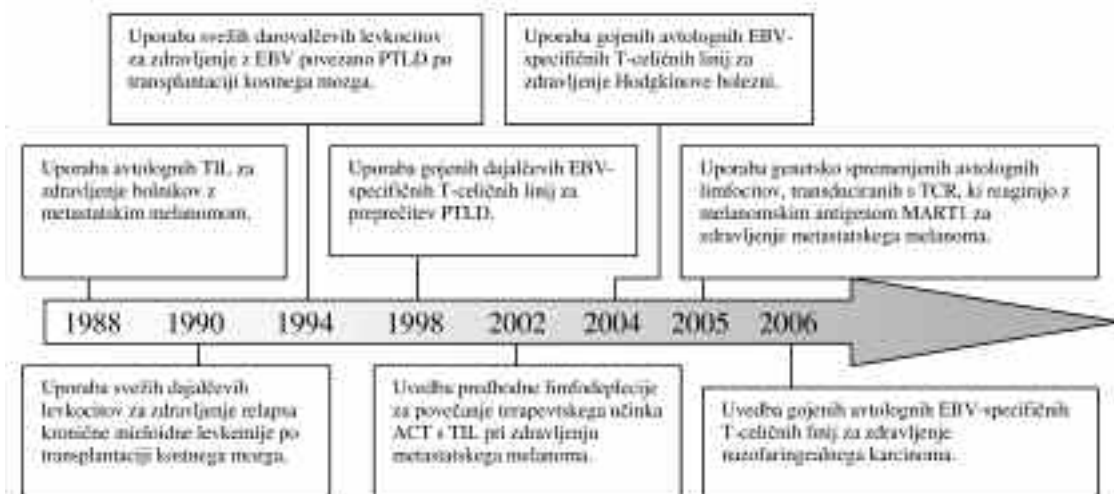
## 3 Uporaba različnih vrst imunskih celic in njihovih kombinacij za zdravljenje raka

Specifični celično posredovani imunski odziv na tumorske antigene izvaja več različnih vrst efektorskih celic. Mednje sodijo citokine izdelujoče celice T CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1 in T<sub>H</sub>2 ter citotoksični limfociti T CD8<sup>+</sup>. Poleg

teh svoj delež prispevajo tudi različne nespecifične celice, zlasti makrofagi, nevtrofilci, eozinofilci in seveda naravne celice ubijalke. Zelo pomembno vlogo igrajo tudi dendritične celice (DC), profesionalne antigen predstavitvene celice, ki so nujne za učinkovito sprožitev protitumorskega T-celičnega odziva (2). Delno uspešen in precej toksičen postopek ACT temelji na uporabi bolnikovih lastnih tumor infiltrirajočih limfocitov (TIL), ki jih lahko izoliramo, namnožimo in aktiviramo ex vivo, v prisotnosti velikih količin človeškega rekombinantnega IL-2. Celice nato vrnemo v bolnika, ki so mu bile predhodno specifično odstranjene imunske celice, hkrati pa mu apliciramo tudi rekombinantni IL-2, ki ob sistemski aplikaciji lahko povzroča neželene učinke. Najboljše rezultate so s tem postopkom dosegli pri zdravljenju melanoma, vendar je njegova uporaba omejena izključno na bolnike z resektabilnimi tumorji, v katerih se nahaja dovolj velika količina TIL (4), (9).

### 3.1 Limfociti T CD8<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup>

Celice T CD8<sup>+</sup> so se pri adoptivnem protitumorskem imunskem odzivu izkazale kot zelo učinkovite. Tarčni antigeni, ki jih s svojimi T-celičnimi receptorji (TCR) specifično prepoznavajo tumorsko reaktivne celice T CD8<sup>+</sup>, so največkrat nemutirani lastni antigeni, ki jih v organizmu poleg normalnih izražajo tudi tumorsko spremenjene celice ter tumor specifični antigeni (TA), ki jih na svoji površini, vezane na molekule MHC razreda I, izražajo rakave celice (10). Dokazali so tudi prisotnost tumorsko specifičnih celic T CD4<sup>+</sup>, vendar te lahko delujejo na več različnih načinov in so zato zmožne bodisi ojačati ali pa izrazito oslabiti protitumorske imunske odzive, kar je odvisno predvsem od mikrookolja v katerem se nahajajo. Adoptivni prenos protitumorskih limfocitov T v bolnike, ki so bili predhodno podvrženi limfodepleciji, predstavlja obetaven nov pristop k imunskemu zdravljenju malignih bolezni in med vsemi predstavljenimi možnostmi imunskega celičnega zdravljenja dosega najboljše rezultate (1), (9), (10).



**Slika 1:** Časovni prikaz razvoja in izvajanja različnih vrst ACT pri bolnikih z rakom (3).

Opomba: EBV-virus Epstein-Barr, PTLD – postransplantacijska limfoproliferativna bolezen, TCR-T-celični receptor, TIL-tumorje infiltrirajoči limfociti, ACT – zdravljenje z adoptivnim prenosom celic, GvHD – bolezen presadka proti gostitelju.

**Figure 1:** Time scaled evolution of different types of ACT approaches used in cancer patients (3).

Note: EBV- Epstein-Barr virus, PTLD – posttransplantation lymphoproliferative disease, TCR-T-cell receptor, TIL-tumor infiltrating lymphocytes, ACT – adoptive cell therapy, GvHD – graft versus host disease.

### 3.1.1 Predhodna odstranitev bolnikovih limfocitov

V preteklosti so bolniki pred adoptivnim prenosom protitumorskih limfocitov prejemali sistemsko imunosupresijo, ki jo je v novejšem času nadomestila specifična odstranitev imunskih celic (limfodeplecija) z uporabo različnih kemoterapevtikov ali obsevanja celotnega telesa. S takšno predpripravo vplivamo na številne mehanizme preko katerih lahko povečamo učinkovitost zdravljenja z ACT. Z limfodeplecijo dosežemo:

- odstranitev imunosupresivnih celic, kot so CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorni limfociti T (T<sub>reg</sub>), mieloidne supresorske celice (MSC) in celo celice NK,
- odstranitev endogenih imunskih celic, ki tekmujejo za aktivirajoče citokine IL-2, IL-7 in IL-15 (limfociti T in B, celice NK) ter
- izboljšanje funkcije ter razpoložljivosti antigen predstavitvenih celic (APC), in sicer kljub temu, da pride do zmanjšanja njihovega celotnega števila, saj se zaradi tega poveča možnost srečanja tumorsko reaktivnih klonov limfocitov T CD8<sup>+</sup> z antigeni, izraženimi v okviru molekul MHC na površini APC; sproščanje agonistov toll-like receptorjev (TLR), ki je posledica poškodb sluznice po uporabi kemoterapevtikov ali obsevanja, pospešuje dozorevanje DC in s tem izražanje kostimulatornih molekul na njihovih površinah ter izrazito povečanje njihove sposobnosti aktiviranja limfocitov (10).

## 3.2 Naravne celice ubijalke (celice NK)

Naravne celice ubijalke ali celice NK so pomembno orožje za boj proti raku. V pogojih *in vitro* povsem spontano, brez predhodne imunske senzibilizacije gostitelja, lizirajo določene tumorske celice. Predstavljajo edinstveno podvrsto limfocitov, ki jih razdelimo na dve populaciji. Celice NK CD56<sup>bright</sup> (močna izraženost) imajo imunoregulatorne lastnosti, ki so posledica obilne proizvodnje citokinov, medtem ko so celice CD56<sup>dim</sup> (šibka izraženost) izrazito citotoksične.

Celice NK imajo edinstven mehanizem prepoznavanja tumorjev, saj se njihovo citotoksično delovanje sproži ob stiku s tumorskimi celicami, ki ne izražajo posameznih ali celo vseh telesu lastnih molekul MHC razreda I, kar je pogost mehanizem, s katerim se izognejo specifičnemu imunskemu prepoznavanju. Celice NK izražajo receptorje KIR (inhibitory Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors) in receptorski kompleks CD94-NKG2A, s pomočjo katerih prepoznavajo različne skupine molekul HLA-A, HLA-B, HLA-C in HLA-E (molekule MHC razreda I). Posamezniki se med seboj razlikujemo glede na število in vrsto podedovanih genov KIR. Večina celic NK izraža najmanj en inhibitorni KIR, ki je specifičen za lastne antigene HLA razreda I. V primeru, da pride celica NK v stik s tarčno celico, ki na svoji površini nima tega antigena, jo lizira, saj ni ustrezno inhibirana (KIR-ligand neujemanje).

S številnimi preizkušnji na mišjih eksperimentalnih modelih so dokazali ključno vlogo celic NK pri uničevanju vsajenih tumorskih celičnih linij ter spontano nastalih tumorjev. Ugotovili so, da so celice NK najučinkovitejše pri uničevanju metastazirajočih celic in majhnih tumorskih mas, medtem ko večjih niso mogle izkoreniniti (6).

### 3.2.1 Različni pristopi pri zdravljenju raka s celicami NK

Povečanje odziva celic NK na tumor lahko dosežemo z določenimi citokini, ki jih neposredno ali posredno aktivirajo. Aktivnost naravnih celic ubijalk lahko izboljšajo tudi imunomodulatorni zdravili talidomid in lenalidomid, BCG ter imunostimulatorni kompleksi DNA.

Po alogenski presaditvi kostnega mozga pride pri bolnikih do izboljšanja tako zaradi same kemoterapije oziroma obsevanja celotnega telesa (kondicioniranje) pred transplantacijo krvotvornih matičnih celic (KMC) kot tudi zaradi vzpostavitve funkcionalnega darovalčevega imunskega sistema po njej, ki je sposoben sprožiti reakcijo presadka proti tumorju (GvT – Graft versus Tumor effect) in tako uničiti bolnikove zaostale tumorske celice. Pri tem igrajo pomembno vlogo tudi celice NK, saj v primeru, da prejemnik nima vsaj enega izmed ligandov HLA razreda I, ki bi ustrezal darovalčevim KIR, lahko po presaditvi KMC pride do aloreaktivnega NK-celičnega odziva (6).

Zanimiva so novejša klinična preizkušanja adoptivnega prenosa celične linije NK-92. Ta izraža različne vrste NK-celičnih aktivirajočih receptorjev, ne pa tudi inhibitornih KIR in je izrazito citotoksična za veliko število drugih celičnih linij. Obsevane celice NK-92 so infundirali več kot 20 bolnikom z napredovalim ledvičnim karcinomom in malignim melanomom. Izkazale so se kot varne, pri nekaterih bolnikih so opazili protitumorski učinek. Prednost uporabe celične linije je v tem, da lahko celice pripravljajo v standardiziranih in nadzorovanih pogojih dobre proizvodne prakse (GMP), poleg tega jih lahko tudi gensko spreminjajo, kar odpira številne zanimive možnosti za nadaljnja klinična preizkušanja (6).

## 3.3 Dendritične celice

Dendritične celice so diferencirane potomke krvotvornih matičnih celic, ki najučinkoviteje med vsemi antigen predstavitvenimi celicami imunskega sistema aktivirajo celice T pomagalke CD4<sup>+</sup> in citotoksične limfocite T CD8<sup>+</sup>. Poleg tega so sposobne aktivirati tudi celice NK in NKT ter limfocite B. Zaradi izjemne sposobnosti uravnavanja vseh elementov imunskega odziva so primerna tarča in orodje za cepljenje (11), (12).

Njihovo delovanje povezuje mehanizme tako naravne odpornosti kot tudi specializiranih procesov imunskega odziva. Dendritične celice izzovejo nastanek specifičnega imunskega odziva, določajo njegove lastnosti, trajanje in obseg ter sodelujejo pri vzpostavitvi tolerance na telesu lastne antigene. Zaradi vseh izjemnih lastnosti so jih kmalu začeli uporabljati v namen zdravljenja in danes predstavljajo pomemben del dopolnilnega zdravljenja raka. Kot celična cepiva posredno sodelujejo pri odstranjevanju neoplastičnih celic, ki na svojih površinah izražajo specifične tumorske antigene (TA). Dendritične celice privzamejo TA, jih predelajo v peptide, ki se vežejo na molekule HLA razredov I in II in jih tako, ob zagotavljanju močnih kostimulacijskih signalov, ponujajo v prepoznavo nezrelim/neaktiviranim limfocitom T. So daleč najučinkovitejše APC pri aktivaciji primarnega protitumorskega imunskega odziva. Raziskovalci zato verjamejo, da lahko DC, ki jih ustrezno pripravimo *in vitro*, prekinejo toleranco limfocitov T na tumorske celice *in vivo*. Večje količine DC lahko v definiranih pogojih *in vitro* pripravimo iz monocitov, osamljenih iz periferne krvi (5), (13), (14), (15).

Čeprav so DC, pripravljene *ex vivo* tako, da so izražale TA, doslej uporabili v številnih kliničnih preizkušanjih za zdravljenje rakavih obolenj, so bili rezultati slabši od pričakovanih. Vsekakor je dokazano, da cepiva z DC delujejo, vendar bo potrebno bolje definirati številne imunološke in klinične parametre, s katerimi bi lahko povečali učinkovitosti takšnega cepljenja. Zato so v zadnjem času številne raziskave ponovno usmerili v proučevanje delovanja DC *in vitro*, da bi določili najboljši način priprave imunostimulacijskih DC in uporabili najustreznejši vir tumorskih antigenov (11), (13).

Poleg uporabe DC obstajajo še drugi pristopi za cepljenje bolnikov z rakom. Mednje sodijo: uporaba avtolognih in alogenskih tumorskih celic, ki jih lahko gensko spremenijo tako, da proizvajajo različne proznetne citokine, tumorskih proteinov, peptidov in DNA cepiv. Večinoma lahko z njimi izzovejo tumorsko specifične imunske odzive in delno regresijo tumorjev. Vsi omenjeni pristopi temeljijo na naključnem srečanju vira TA, ki ga vnesemo v bolnika v obliki cepiv in gostiteljevih DC. Žal je verjetnost takšnega srečanja razmeroma majhna. Poleg tega obstaja tudi možnost, da cepljenje naleti na nezrele oziroma neaktivirane DC, kar lahko, zaradi odsotnosti kostimulacijskih signalov, vodi v dodatno zaviranje protitumorskega imunskega odziva. S tem lahko delno pojasnimo slabosti takšnih protitumorskih cepiv (11).

Kljub zgoraj naštetim pomanjkljivostim cepiv z dendritičnimi celicami nas opogumlja dejstvo, da je bilo pred kratkim v ZDA registrirano prvo avtologno celično zdravilo Provenge (sipuleucel-T), namenjeno zdravljenju raka prostate, narejeno prav na osnovi dendritičnih celic.

### 3.3.1 Klinična učinkovitost DC cepiv

Ključno vprašanje je, ali so cepiva, pripravljena z DC učinkovitejša od drugih. Odgovor nanj lahko iščemo v izsledkih številnih kliničnih preizkušanj faze I in II, v okviru katerih so proučevali delovanje različnih vrst cepiv: peptidov iz TA, samih tumorskih celic, TA izraženih s pomočjo virusnih vektorjev ter DC, ki so predstavljale TA, uporabljene na bolnikih z različnimi vrstami metastatskega raka. Pri tem lahko kaj hitro ugotovimo, da je zaradi zelo različne dovzetnosti posameznih vrst raka za imunsko zdravljenje smiselno primerjati izsledke le pri eni vrsti bolezni. V tem članku predstavljamo povzetek izidov kliničnih preizkušanj na bolnikih z metastatskim melanomom, ker ta bolezen predstavlja dober model za cepljenje, saj so mnogi melanomski antigeni dobro okarakterizirani. Cepljenje z DC z melanomskimi antigeni je v 9,5% pripeljalo do tumorske regresije (v šestih različnih preizkušanjih se je na to zdravljenje odzvalo 11 od 116 bolnikov), medtem ko najboljši rezultat z ostalimi vrstami cepljenj daje cepljenje s tumorskimi celicami, to je 4,6% (2 izmed 43 bolnikov). Temu sledijo še peptidna cepiva z 2,7% uspešnostjo (11 izmed 410 bolnikov), na zadnjem mestu pa so virusni vektorji z 1,9% uspešnostjo (3 izmed 160 bolnikov). Ti rezultati še vedno dajejo le približno oceno objektivne regresije tumorjev, vendar vseeno vzbujajo določeno upanje in opravičujejo nadaljnja preizkušanja s cepivi na osnovi DC (11), (16). Ker so rakava obolenja kronične bolezni, bi lahko že podaljšanje preživetja in izboljšanje kvalitete življenja lahko obravnavali kot merili za uspešnost zdravljenja, s čimer bi še bolj promovirali uporabo in razvoj novih pristopov zdravljenja (11). Prednost imunskega zdravljenja s cepivi, pripravljenimi na osnovi dendritičnih celic, ki jo je potrebno omeniti, je vsekakor varnost takšnega zdravljenja, saj gre za zdravljenje z bolniku lastnimi celicami.

### 3.3.2 Imunohibridomi

Imunohibridom je celica, ki jo dobimo po zlitju (fuziji) dendritične in tumorske celice. Gre za idealno kombinacijo celotnega nabora TA in lastnosti najučinkovitejših APC. Največja prednost uporabe imunohibridomov kot cepiv je dejstvo, da imunskim celicam bolnika predstavijo celoten nabor TA, torej tudi tistih, ki jih še ne poznamo, in jih učinkovito aktivirajo (17), (18), (19). Poleg tega lahko tovrstna cepiva pripravimo tudi tako, da v primeru pomanjkanja zadostnih količin avtolognih tumorskih celic za fuzijo uporabimo kar določene komercialno dostopne tumorske celične linije (18).

V eksperimentalnih živalskih modelih so dokazali, da cepljenje z imunohibridomi deluje zaščitno proti nastanku določenih vrst tumorjev, poleg tega pa tudi terapevtsko, saj so na ta način dosegli regresijo že prisotnih novotvorb. V kliničnih preizkušanjih na bolnikih z različnimi metastatskimi oblikami raka so ugotovili, da bolniki tako zdravljenje dobro prenašajo. Dokazali so tudi, da cepljenje z imunohibridomi omogoča ne le zaščito pred razrastom tumorskih celic, temveč tudi zmanjšuje obstoječe tumorje. V nekaterih kliničnih preizkušanjih so po aplikaciji cepiva pri večini bolnikov potrdili tumorsko specifične imunske odzive, a žal le pri manjšem številu tudi objektivno tumorsko regresijo (17), (18). Kljub temu mnogi avtorji s svojimi raziskavami in vitro prikazujejo bistveno močnejšo aktivacijo limfocitov T s strani *hibridomov* kot s strani različnih kombinacij dendritičnih in tumorskih celic oziroma tumorskih antigenov, zaradi česar je prihodnost zdravljenja s hibridomi verjetno še obetavnejša od zdravljenja s cepivi, pripravljenimi na osnovi dendritičnih celic (20), (21).

## 3.4 Možne izboljšave že uveljavljenih postopkov ACT in aktivne imunizacije s tumorskimi cepivi

V predkliničnih in kliničnih preizkušanjih so po aplikaciji ACT uspeli razjasniti številne kompleksne mehanizme, ki so ključni za uspešnost zdravljenja z adoptivnim prenosom imunskih celic in ki predstavljajo osnovo za razvoj novih, izboljšanih kliničnih protokolov za zdravljenje rakavih bolnikov.

Eden od pristopov za izboljšanje učinkovitosti ACT je uporaba selektivnejših načinov limfodeplecije, ki so bistveno manj toksični za bolnika kot nespecifična kemoterapija in obsevanje. Celice  $T_{REG}$  in ostale imunosupresivne celice, ki aktivno ščitijo tumorsko tkivo pred delovanjem imunskega sistema bolnika, bi bilo mogoče selektivno odstraniti s pomočjo usmerjenih imunotoksinov ali pa njihovo delovanje preprečiti z uporabo določenih citokinov, na primer tumorje nekrotizirajočega dejavnika (TNF). Pomanjkanje določenih topnih dejavnikov, do katerega pride zaradi prisotnosti drugih celic, ki jih porabljajo, bi lahko rešili z dodajanjem aktivirajočih (proznetnih) rekombinantnih citokinov.

Zgodnejše diferencijske stopnje celic T so primernejše za uporabo v ACT. Zato bodo v prihodnosti za doseganje optimalnih kliničnih rezultatov najverjetneje morali natančno definirati kriterije za izbiro efektorskih celic. Mednje nedvomno sodijo fenotip, dolžina telomer, sposobnost proizvodnje želenih citokinov in afiniteta TCR do izbranih tumorskih antigenov (10).

Za večjo uspešnost zdravljenja z adoptivnim prenosom celic NK bo potrebna optimizacija priprave celic NK za uporabo v zdravljenju (aktivacija, gojenje *ex vivo*, izbor specifičnih celičnih podvrst), veliko pozornost bo treba nameniti tudi izboru darovalcev (fenotipizacija in genotipizacija KIR ter delež aloreaktivnih celic NK) (6).

Pri zdravljenju z DC cepivi bo z namenom izboljšanja učinkovitosti potrebno opredeliti naslednje kriterije: različni načini priprave DC (iz monocitov ali iz krvotvornih matičnih celic CD34<sup>+</sup>); zrelost in migracija DC (nezrele DC praviloma delujejo kot zelo učinkovite antigene zajemajoče in predelujoče celice, medtem ko so zrele DC najučinkovitejše antigen predstavitevne celice) (15). Stopnja zrelosti DC *in vivo* je tesno povezana s sposobnostjo njihove migracije iz perifernih

tkiv v bezgavke. Zaradi tega moramo posebno pozornost posvetiti tudi načinu in mestu njihove aplikacije (11).

Med najpomembnejše dejavnike lahko vsekakor štejemo določitev kriterijev za izbiro bolnikov ter vrst tumorjev, dovzetnih za omenjeno zdravljenje, saj je znano, da so določene vrste raka, na primer melanom in rak prostate, bolj imunogene in zato bolj dovzetne za celično zdravljenje. Prav tako ostaja odprto tudi vprašanje optimalnega števila in časovnih intervalov aplikacij takšnega zdravljenja ter izbere najboljših kombinacij z drugimi načini zdravljenja (6), (11), (18).

### 3.5 Novi pristopi na področju imunskega zdravljenja raka

Kot smo omenili, lahko ACT izvajamo s pomočjo TIL z visoko afiniteto do avtolognih TA, pri čemer je ta možnost primerna le za razmeroma majhno število bolnikov z rakom, pri katerih lahko TIL osamimo v zadostnih količinah. Zato razvijajo postopke za pripravo takšnih limfocitov T *in vitro*, ki bi reagirali na široko paleto znanih in neznanih TA, izraženih na različnih vrstah tumorjev. Z vnosom različnih vrst genov v cirkulirajoče človeške limfocite, lahko te opremimo z različnimi receptorji tako za prepoznavo TA kot tudi z drugimi molekulami, ki lahko izboljšajo predvsem njihove aktivacijske in efektorske lastnosti, nujne za uspešno ACT. Tako lahko iz redkih celičnih klonov, ki izjemno učinkovito prepoznavajo TA, osamimo njihove T-celične receptorje TCR in jih z uporabo vektorjev vnesemo v nezrele/neaktivirane limfocite T. Takšne TCR lahko pridobimo tudi iz celic T transgenih miši, potem ko jih imuniziramo s človeškimi TA, s čimer se elegantno izognemo nastanku tolerance, ki pogosto močno zavira razmnoževanje učinkovitih protitumorskih limfocitov T pri bolnikih z rakom. Tako so na primer uspeli pripraviti limfocite s transficiranimi TCR z visoko afiniteto do epitopov p53, CEA (Carcino-Embryonic Antigen), NY-ESO-1 (antigen raka testisov), ki so izraženi na različnih vrstah rakavih celic, ter specifičnih melanomskih antigenov gp100 in MART1. Nekatere izmed njih, na primer limfocite T, transficirane z geni za visokoafinitetne TCR za gp100 in MART1, so že preizkusili v kliničnih preizkušanjih (3), (4).

Med novejšje pristope za izboljšanje učinkovitosti zdravljenja s celicami NK poleg uporabe specifičnih citokinov, ki pospešujejo proizvodnjo endogenih citokinov v omenjenih celicah, sodi tudi genska manipulacija. Z njo želijo doseči obsežnejše izražanje ligandov za aktivacijske receptorje celic NK na tarčnih celicah oziroma povečati učinkovitost njihovega prepoznavanja s strani naravnih celic ubijalk, kar je nujen pogoj za njihovo uničenje (6), (22). Poleg specifičnih protiteles, s katerimi lahko blokirajo KIR, so v ta namen uporabili tudi majhno interferenčno RNA (si-RNA - Small Interfering RNA). Poskušajo tudi s povečevanjem obsega izražanja aktivirajočih receptorjev na celicah NK ali z uvedbo novih himernih receptorjev, ki so sposobni prepoznavati določene ligande, izražene le na tumorjih (6).

Pri cepivih, izdelanih na osnovi DC, skušajo njihovo učinkovitost povečati tako, da uporabijo čimvečjo paleto naravnih TA, ki jih DC nato predelajo v peptide in jih, vezane na molekule MHC razredov I in II, ponujajo v prepoznavo TCR, izraženim na limfocitih T. Tako lahko izzovejo nastanek raznolikega imunskega odziva, ki ga izvaja večje število klonov celic. V ta namen lahko uporabijo rekombinantne, za tumorje značilne proteine, tumorske eksosome, transdukcijo DC z virusnimi vektorji, ki vsebujejo kodirajoče genske informacije o TA, transfekcijo DC s tumorsko RNA ali

ustrezno pripravljeno plazmidno DNA, inkubacijo DC z imunskimi kompleksi ali s specifičnimi protitelesi, ki prepoznavajo določene površinske molekule DC (11), (23).

K novim odkritjem na tem področju pomembno prispevajo tudi slovenski avtorji, ki z rezultati svojih raziskav na živalskih modelih dokazujejo uspešnost imunskega zdravljenja raka (24), (25). Kot primer lahko navedemo zanimiv pristop zdravljenja s kombiniranim cepivom, sestavljenim iz obsevanih tumorskih celic in oligonukleotidov s CpG motivom (CpG ODN) razreda C, ki statistično značilno poveča preživetje pri testirani skupini miši (25).

## 4 Imunsko zdravljenje raka in avtoimunost

Pri katerikoli obliki imunskega zdravljenja raka se moramo zavedati, da je za sprožitev in vzdrževanje učinkovite protitumorske imunosti potrebno izzvati praktično enake odzive, kot jih opazimo pri avtoimunosti, saj gre tudi v tem primeru za reaktivnost na rahlo modificirane (mutirane) lastne antigene. To pomeni, da imunski sistem bolnika z rakom pri tovrstnem zdravljenju neizogibno spravimo iz ravnotežja, saj pomembno vplivamo na bistvene mehanizme, ki vzdržujejo toleranco do lastnega in skrbijo za učinkovito obrambo pred mikroorganizmi (4). Praviloma TA niso izraženi le na rakavo spremenjenih celicah, temveč tudi na določenih normalnih tkivih. Pri imunskem zdravljenju melanoma z aktivnim cepljenjem proti TA ali z ACT s TIL pogosto opazijo nastanek vitiliga in/ali celo reakcije, zelo podobne avtoimunskemu uveitisu. Vitiligo sicer lahko v takih primerih jemljemo kot povsem sprejemljiv stranski učinek, česar pa ne moremo trditi za uveitis. Na žalost se bodo morali bolniki in zdravniki odločiti med relativno manjšim ali večjim zlom, torej med poslabšanjem ali celo izgubo vida in smrtjo zaradi raka (4).

## 5 Pregled novejših kliničnih preizkušanj

V preglednici 2 smo strnili trenutno dosegljive podatke o novejših kliničnih preizkušanjih, z namenom, da bi poudarili pomen imunskega zdravljenja raka, ki je glede na navedena dejstva nedvomno avtoimunska bolezen, do katere lahko pride zaradi najrazličnejših endogenih in eksogenih vzrokov.

## 6 Prihodnost celičnega zdravljenja v onkologiji

Poleg optimizacije postopkov izdelave zdravilnih celičnih pripravkov sta pomembni vprašanja kdaj in v kolikšnem obsegu bo v prihodnosti ta oblika zdravljenja uvrščena med stroške zdravstvene blagajne, še posebej zato, ker gre za obliko zdravljenja, namenjenega vsakemu bolniku posebej in terja zahtevno in visoko specializirano interdisciplinarno znanje. Ker so celična zdravila narejena praktično po meri, je takšne pripravke težko komercializirati. Farmacevtska in biotehnoška podjetja namreč že od nekdaj iščejo takšna zdravila, ki jih je mogoče proizvajati, pakirati, uporabljati in nadzirati serijsko. Najprimernejše ustanove, ki imajo na razpolago ustrezno opremo in znanje za proizvodnjo protitumorskih imunskih celic so nedvomno krvne banke, v katerih med drugim pripravljajo tudi krvotvorne matične celice za rutinsko klinično uporabo (3).

**Preglednica 2:** Primeri kliničnih preizkušanj s področja celičnega zdravljenja, ki trenutno potekajo oziroma so bili zaključeni pred nedavnim (8).

**Table 2:** Some examples of current and recent clinical studies based on anti-tumor immunotherapies (8).

NASLOV KLINIČNEGA PREIZKUŠANJA	FAZA	TRAJANJE	OZNAKA (ClinicalTrials.gov)
Imunsko zdravljenje z intratumorskim injiciranjem nezrelih DC, skupaj s pripravkom iz S. Pyogenes (OK-432), pri bolnikih z resektabilnim rakom pankreasa	I/II	2003 - 2012	NCT00795977
Imunsko zdravljenje z DC, predhodno inkubiranimi s tumorskim lizatom pri bolnikih z atipičnimi in malignimi, primarnimi ali metastatskimi tumorji centralnega živčnega sistema	II	2001 - 2008	NCT00576537
Limfodeplecija in adoptivni T-celični prenos z ali brez imunizacije z DC, v kombinaciji z visokimi odmerki IL-2, pri bolnikih z metastatskim melanomom	II	2006 - 2010	NCT00338377
Cepljenje bolnikov z limfomom z imunohibidomi (dendritične celice /celice limfoma), v primerjavi z DC, inkubiranimi s tumorskimi lizati	I/II	2003 - 2010	NCT00937183
Cepljenje bolnikov z ne-Hodgkinovim limfomom z DC, predhodno inkubiranimi s tumorskimi lizati, po zdravljenju z visokimi odmerki kemoterapevtikov	III	2000 - 2005	NCT00006434
Randomizirano klinično preizkušanje z uporabo DC, pripravljenih iz celic CD34+ ali z DC, pripravljenih iz perifernih monocitov, inkubiranih z melanomskima antigenoma MART-1 in gp100, pri bolnikih z metastatskim melanomom v III. fazi, v primerjavi z bolniki s kirurško popolnoma odstranjenim metastatskim melanomom	II	- 2007	NCT00019890
Modulacija imunskega sistema z definiranimi citokinskimi mešanici pred uporabo cepiv, pripravljenih na osnovi DC (imunohibidomi in DC po predhodni inkubaciji z apoptotičnimi tumorskimi celicami) pri bolnikih s trdnimi tumorji	II	2006 - 2009	NCT00521287
Zdravljenje z adoptivnim prenosom celic pri bolnikih z akutno mieloblastno levkemijo z visokim tveganjem, z uporabo haploidentičnih celic NK, ob načrtnem upoštevanju neujemanj v ligandih KIR med prejemniki in darovalci naravnih celic ubijalk	I	2005 - 2009	NCT00799799
Zdravljenje bolnikov z napredovalim rakom s celicami po presaditvi KMC istega alogenskega darovalca	I/II	2009 - 2012	NCT00823524
Zdravljenje bolnikov po resekciji jetrnega raka s celicami ubijalkami, predhodno induciranimi s citokini (CIK - Cytokine-Induced Killer Cells)	III	2008 - 2013	NCT00769106
Zdravljenje bolnikov s ponovnim izbruhom (relapsom) limfoma, pozitivnega na virus Epstein-Barr, s citotoksičnimi celicami T (CD8+)	I	2006 - 2025	NCT00675571
Zdravljenje bolnikov z relapsom Hodgkinovega limfoma, povezanega z virusom Epstein-Barr, ne-Hodgkinovim limfomom ali z limfoproliferativnimi motnjami, z limfociti T in monoklonskimi protitelesi proti molekulam CD45	I	2006 - 2013	NCT00608478
Zdravljenje bolnikov z relapsom ali refraktarnimi hematološkimi malignimi obolenji ter bolnikov s trdnimi tumorji, po predhodni presaditvi KMC, z infuzijami obsevanih limfocitov istega darovalca	II	2000 -	NCT00161187
Provenge (TM) za zdravljenje hormonsko občutljivega raka prostate (PROTECT)	III	2001 - 2006	NCT00779402

**Preglednica 2:** Primeri kliničnih preizkušanj s področja celičnega zdravljenja, ki trenutno potekajo oziroma so bili zaključeni pred nedavnim (8).

**Table 2:** Some examples of current and recent clinical studies based on anti-tumor immunotherapies (8).

NASLOV KLINIČNEGA PREIZKUŠANJA	FAZA	TRAJANJE	OZNAKA (ClinicalTrials.gov)
Provenge® (Sipuleucel-T) celično imunsko zdravljenje metastaznega raka prostate, ki se ne odziva na hormonsko zdravljenje	III	2000 - 2009	NCT00065442
Zdravljenje mieloidne levkemije in mielodisplastičnega sindroma z adoptivnim prenosom avtolognih celic ubijalk, predhodno induciranih s citokini	II	2006 -	NCT00394381
Zdravljenje refraktarne ali ponovljene akutne mieločne levkemije (AML) s kemoterapijo, obsevanjem celotnega telesa, infuzijo dajalčevih celic ubijalk, aldesleukinom in presaditvijo matičnih celic iz popkovnične krvi	II	2009 - 2015	NCT00871689
Zdravljenje bolnikov z metastaznim melanomom z laboratorijsko obdelanimi celicami T z ali brez dodatka ipilimumaba	II	2009 - 2012	NCT00871481
Haploidentične celice ubijalke za zdravljenje refraktarne ali ponovljene akutne mieločne levkemije (AML)	II	2010 - 2014	NCT01106950
Haploidentična presaditev z zgodnjim adoptivnim prenosom celic ubijalk CD56+CD3-	II	2001 - 2011	NCT01220544
Zdravljenje razsejanega raka s proti-VEGFR2 gensko obdelanimi CD8+ limfociti T	II	2010 - 2016	NCT01218867

## 7 Sklep

Celično imunsko zdravljenje počasi, a vztrajno pridobiva na pomenu in obeta učinkovito in naravno zdravljenje številnih bolezni. Vendar pa nas od njegove vsakdanje klinične uporabe loči še kar nekaj časa, ki ga bo potrebno izkoristiti za odpravo določenih pomanjkljivosti, zlasti neželenih stranskih učinkov, optimizacijo postopkov priprave, načinov in pogostnosti aplikacij ter spremljanja učinkovitosti in varnosti protitumorskih zdravil, izdelanih iz različnih vrst imunskih celic *ex vivo*.

## 8 Literatura

- Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2003 Sep; 3(9): 666-675.
- Vozelj M. Temelji imunologije. 1. izd., 1. natis. ed. Ljubljana: DZS; 2000: 513.
- Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 2008 Apr; 8(4): 299-308.
- Caspi RR. Immunotherapy of autoimmunity and cancer: the penalty for success. *Nat. Rev. Immunol* 2008 Dec; 8(12): 970-976.
- Obermajer N. Priprava protitumorskih cepiv na osnovi dendritičnih celic. *Farm Vest* 2011 Apr; 62(1): 9-14.
- Ljunggren H, Malmberg K. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat. Rev. Immunol* 2007 May; 7(5): 329-339.
- Rosenberg S, Lotze M, Muul L, Leitman S, Chang A, Ettinghausen S, Matory Y, Skibber J, Shiloni E, Vetto J, et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 1985 Dec; 313(23): 1485-1492.
- ClinicalTrials.gov. <http://www.clinicaltrials.gov/>. Dostop: 27-04-2011.
- Rosenberg SA, Dudley ME. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr. Opin. Immunol* 2009 Apr; 21(2): 233-240.
- Gattinoni L, Powell DJ, Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat. Rev. Immunol* 2006 May; 6(5): 383-393.
- Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat. Rev. Immunol* 2005 Apr; 5(4): 296-306.
- Tacken PJ, de Vries IJM, Torensma R, Figdor CG. Dendritic-cell immunotherapy: from *ex vivo* loading to *in vivo* targeting. *Nat. Rev. Immunol* 2007 Oct; 7(10): 790-802.

- Bergant M. Dendritične celice transficirane s celokupno tumorsko RNA - učinkoviti aktivatorji specifičnih protitumorskih imunskih odzivov *in vitro*. Doktorska disertacija. Ljubljana; 2006: 3-4.
- Štrukelj B. Celično in tkivno inženirstvo. In: Biološka zdravila: od gena do učinkovine. 1st ed. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo; 2007: 633.
- Jeras M, Bergant M, Repnik U. *In vitro* preparation and functional assessment of human monocyte-derived dendritic cells-potential antigen-specific modulators of *in vivo* immune responses. *Transpl. Immunol* 2005 Aug; 14(3-4): 231-244.
- Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med* 2004 Sep; 10(9): 909-915.
- Shu S, Zheng R, Lee WT, Cohen PA. Immunogenicity of dendritic-tumor fusion hybrids and their utility in cancer immunotherapy. *Crit. Rev. Immunol* 2007; 27(5): 463-483.
- Koido S, Hara E, Homma S, Ohkusa T, Gong J, Tajiri H. Cancer immunotherapy by fusions of dendritic cells and tumor cells [Internet]. 2008; Available from: <http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/1750743X.1.1.49> Dostop: 20-3-2010.
- Gabrijel M, Repnik U, Kreft M, Grlic S, Jeras M, Zorec R. Quantification of cell hybridoma yields with confocal microscopy and flow cytometry. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004 Feb; 314(3): 717-723.
- Kim T-B, Park HK, Chang JH, Choi IH, Kim KH, Yoon SJ, Lee MS, Jung H, Kim C-S. The establishment of dendritic cell-tumor fusion vaccines for hormone refractory prostate cancer cell. *Korean J Urol* 2010 Feb; 51(2): 139-144.
- Gabrijel M, Bergant M, Kreft M, Jeras M, Zorec R. Fused late endocytic compartments and immunostimulatory capacity of dendritic-tumor cell hybridomas. *J. Membr. Biol* 2009 May; 229(1): 11-18.
- Zhang T, Barber A, Sentman CL. Generation of Antitumor Responses by Genetic Modification of Primary Human T Cells with a Chimeric NKG2D Receptor. *Cancer Res* 2006 Jun; 66(11): 5927-5933.
- Bergant M, Meden L, Repnik U, Sojar V, Stanisavljević D, Jeras M. Preparation of native and amplified tumour RNA for dendritic cell transfection and generation of *in vitro* anti-tumour CTL responses. *Immunobiology* 2006; 211(3): 179-189.
- Stegel V, Kopitar A, Jezersek Novaković B, Ihan A, Novaković S. Dendritic cells incubated with irradiated tumor cells effectively stimulate T lymphocyte activation and induce enhanced expression of CD69, CD25 as well as production of IFN $\gamma$  and IL4. *Int. Immunopharmacol* 2006 Jan; 6(1): 79-89.
- Novaković S, Stegel V, Kopitar A, Ihan A, Novaković BJ. Preventive and therapeutic antitumor effect of tumor vaccine composed of CpG ODN class C and irradiated tumor cells is triggered through the APCs and activation of CTLs. *Vaccine* 2007 Nov; 25(49): 8241-8256.