

## Metody immunoterapeutyczne w leczeniu nowotworów

### Immunotherapeutic methods for cancers treatment

Sylwia Bilsk, Karolina Okła, Anna Wawruszak

sylwia.bilsk@gmail.com, Katedra i Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.umlub.pl

karolinaokla@gmail.com, I Katedra i Zakład Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.umlub.pl

anna\_wawruszak@interia.pl, Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, www.umlub.pl

Jednym z zadań układu immunologicznego jest ochrona organizmu przed rozwojem nowotworów. Obniżenie sprawności układu odpornościowego niesie ze sobą ryzyko powstania nieprawidłowych, transformowanych komórek, które w normalnych warunkach są szybko rozpoznawane i usuwane. Jednak komórki nowotworowe wykształciły wiele mechanizmów umożliwiających im ucieczkę spod nadzoru nawet sprawnego układu immunologicznego. Od pewnego czasu dużo uwagi poświęca się strategii immunoterapii nowotworów, tzn. pobudzaniu układu odpornościowego do samodzielnej walki z transformowanymi komórkami. Ogólnie schematy leczenia można podzielić na immunoterapie bierne i immunoterapie czynne. Obie strategie są intensywnie badane, co daje nadzieję na rozwój nowej, skutecznej metody leczenia przeciwnowotworowego.

One of the immune system function is to protect the organism against the development of cancers. Reduction in the immune system efficiency involves the risk of abnormal, transformed cells development, which normally are quickly recognized and removed. However, cancer cells have developed several mechanisms allowing them to escape from the surveillance even efficient immune system. From some time, a lot of attention is given to cancer immunotherapy strategies, i.e. stimulating the immune system alone to fight out transformed cells. In general, treatment regimens can be divided into passive immunotherapy and active immunotherapy. Both strategies are intensively explored, which gives hope for the development of new, efficient method of anticancer treatment.

### 1. Wprowadzenie

Od dawna aktywacja układu odpornościowego w celu uzyskania korzyści terapeutycznych u osób cierpiących na choroby nowotworowe była celem immunologów i onkologów. Po latach niepowodzeń sytuacja zmieniła się dzięki sukcesowi przeprowadzonych badań klinicz-

nych, które udowodniły skuteczność działania środków immunoterapeutycznych. Jednym z najbardziej znanych preparatów jest ipilimumab – przeciwciało anty-CTLA4, którego zastosowanie znacznie wydłużyło czas przeżycia pacjentów z czerniakiem przerzutowym, podczas gdy

# Review and Research on Cancer Treatment

Volume 1, Issue 1 (2015)

standardowe terapie zawodziły. Dzięki coraz lepszemu zrozumieniu wpływu tolerancji, odporności i immunosupresji na mechanizmy regulacji przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej, możliwe jest zasto-

sowanie skutecznej terapii celowanej. Dotychczasowe wyniki sugerują, że immunoterapia może okazać się nową metodą dla uzyskania silnej i długotrwałej odpowiedzi u pacjentów onkologicznych [1, 2].

## 2. Cel pracy

Celem pracy jest przegląd aktualnych metod immunoterapeutycznych, obecnie stosowanych oraz mogących w przyszłości znaleźć zastosowanie w leczeniu przeciwnowotworowym.

Przeglądu dokonano na podstawie analizy najnowszych danych literaturowych z zakresu immunoterapii nowotworów.

## 3. Układ odpornościowy a nowotwory

Układ odpornościowy człowieka posiada zdolność do adaptacji, co pozwala mu specyficznie rozpoznawać nawet do  $10^{12}$  różnych antygenów. Umożliwia to limfocytom T odróżnianie komórek transformowanych od prawidłowych komórek organizmu. W badaniach na zwierzętach wykazano, że sprawny układ immunologiczny potrafi wybiórczo usuwać komórki nowotworowe i chronić przed rozwojem nowotworów. U ludzi fakt ten potwierdza częstsza zapadalność na nowotwory osób z upośledzoną odpornością, np. chorych na AIDS czy biorców przeszczepów allogenicznych. Jednak mimo zdolności układu immunologicznego do usuwania nieprawidłowych komórek, nowotwory rozwijają się również u osób ze sprawnym układem odpornościowym [3, 4].

W odpowiedzi immunologicznej przeciwko komórkom nowotworowym wyróżnia się trzy etapy: eliminację, równowagę i ucieczkę. Mają one na celu usunięcie transformowa-

nych komórek z organizmu, zachodzą zanim nowotwór rozwinię się do postaci klinicznej. W fazie eliminacji nieprawidłowe komórki są rozpoznawane przez odpowiednie limfocyty T cytotoksyczne CD8+ (*cytotoxic T-lymphocytes* – CTLs) i ulegają szybkiej likwidacji w wyniku uruchomienia mechanizmów cytotoxicności, np. interakcji Fas/FasL czy uwolnieniu granzymu/perforyn. Etap ten trwa, dopóki pewna część transformowanych komórek ewoluuje w sposób umożliwiający im uniknięcie cytotoksycznego działania CTLs. Kiedy całkowita eliminacja komórek nowotworowych staje się niemożliwa, ciągła aktywacja układu odpornościowego może utrzymywać stan równowagi. Najprawdopodobniej faza równowagi trwa od momentu powstania klonów komórek nowo transformowanych do ich efektywnego niszczenia przez CTLs. W komórkach nowotworowych zdolnych do uniknięcia cytotoksycznego działania CTLs zachodzą dalsze mutacje, w

wyniku których wykształcają one zdolność do niekontrolowanego wzrostu, rozprzestrzeniania się po organizmie i dawania przerzutów. Faza ucieczki jest czasem wzrostu nowotworu, w którym nieprawidłowe komórki z powodzeniem unikają interwencji układu odpornościowego. Każdy z wymienionych etapów wiąże się z aktywną ucieczką transformowanych komórek spod kontroli układu immunologicznego [3, 5, 6].

Do rozwinięcia się efektywnej, przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej, konieczne jest zajście szeregu kolejnych etapów. Na początku antygen nowotworowy musi zostać wychwycony i przetworzony przez komórkę prezentującą antygen (*antigen-presenting cell* – APC). Do APCs należą makrofagi, limfocyty B oraz komórki dendrytyczne (*dendritic cells* – DCs). Najbardziej efektywne są DCs, ponieważ dendryty zwiększają ich zdolność do zbierania antygenów, które następnie są przez nie

prezentowane. Po rozpoznaniu antygeny APCs wędrują do węzłów chłonnych, gdzie prezentują przetworzony antygen związany z białkami głównego układu zgodności tkankowej (*major histocompatibility complex* – MHC) limfocytom T. W celu aktywacji i przygotowania limfocytów T na fazę efektorową, na przykład w odpowiedzi przeciwko antygenom nowotworowym, muszą zostać przekazane dwa sygnały. Pierwszym z nich jest związanie receptora limfocyty T (*T cell receptor* – TCR) z antygenem połączonym z MHC. Jednocześnie jest przekazywany drugi sygnał, który polega na interakcji między cząsteczkami kostymulującymi, takimi jak: B7 na aktywowanych APCs, a antygenem różnicowania komórkowego (*cluster of differentiation* – CD) 28 na limfocytach T. Połączenie tych dwóch sygnałów umożliwia proliferację i aktywację limfocytów T [5, 7].

#### 4. Mechanizmy ucieczki spod nadzoru układu immunologicznego

Do modulacji i unikania przeciwnowotworowej odpowiedzi układu immunologicznego komórki nowotworowe wykorzystują cały genom, a ich ucieczka zwykle odbywa się wielokierunkowo. Jedną z metod ucieczki, wykorzystywaną zarówno przez nowotwory jak i przez wirusy, jest hamowanie lub inaktywacja mechanizmów komórkowych odpowiedzialnych za obróbkę i prezentację antygeny przez MHC klasy I (MHC-I). Jeśli antygeny peptydowe nowotworu nie są prezentowane przez MHC-I, CTLs nie mogą rozpoznać

i zniszczyć transformowanych komórek, jakkolwiek zahamowanie MHC sprawia, że komórki nowotworowe są bardziej wrażliwe na cytotoksyczne działanie komórek NK [3, 8].

Innym częstym mechanizmem, zakłócającym odpowiedź immunologiczną, jest utrudnianie aktywacji CTLs, głównie poprzez modyfikacje DCs naciekających guza. DCs wewnątrz guza często posiadają fenotyp komórek niedojrzałych lub regulatorowych, co skutkuje prezentacją antygenów nowotworowych bez przesłania sygnału kostymulującego,

## Review and Research on Cancer Treatment

Volume 1, Issue 1 (2015)

a to z kolei powoduje anergię limfocytów T i powstanie tolerancji krzyżowej. Znaczenie tego mechanizmu w ucieczce komórek nowotworowych spod nadzoru układu immunologicznego obrazuje ścisła korelacja, potwierdzona przez kilka niezależnych grup badawczych. Wykazano bowiem bliski związek czasowy między stanem tolerancji limfocytów T CD4+ i CD8+ specyficznych wobec komórek nowotworowych, a rozwojem nowotworu. Dodatkowo, regulatorowe DCs (regDCs) mogą bezpośrednio wpływać na ucieczkę nowotworu spod nadzoru układu immunologicznego, ponieważ zaobserwowano, że wszczepienie regDCs myszy chorej na nowotwór stymuluje rozwój guza i przyspiesza powstawanie przerzutów [3, 9].

Prawdopodobnie najczęstszym i najbardziej skutecznym sposobem zakłócania przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej jest blokowanie funkcji efektorowej CTLs. Może ono zachodzić z wykorzystaniem różnych mechanizmów. Nowotwory stymulują powstawanie mikrośrodowiska immunosupresyjnego poprzez ściąganie z obwodu Tregs i komórek linii mieloidalnej – przede wszystkim makrofagów związanych z nowotworem (*tumor-associated macrophages* – TAMs) oraz komórek supresorowych pochodzących z linii mieloidalnej (*myeloid-derived suppressor cells* – MDSCs), które wydzielają TGF- $\beta$  i IL-10. Te cytokiny przeciwzapalne osłabiają odporność przeciwnowotworową przez hamowanie aktywności cytolytycznej CTLs. Ponadto, TAMs i MDSCs zmieniają otoczenie metabolicz-

ne mikrośrodowiska nowotworu produkując arginazę i NO, które zubożają pulę L-argininy – podstawowego składnika odżywczego, niezbędnego dla prawidłowego funkcjonowania limfocytów T. Powyższe supresorowe komórki mieloidalne generują też powstawanie reaktywnych form tlenu i azotu, które modyfikują receptory dla chemokin i antygenów na CTLs, zarówno w narządach limfatycznych, jak i w guzie nowotworowym. Osłabia to zdolność CTLs do kierowania się w miejsce rozwoju nowotworu i zabijania nieprawidłowych komórek [3, 10].

Ważną rolę w rozregulowaniu działania układu immunologicznego wywołanym przez nowotwór pełni unaczynienie guza. Intensywne podziały komórek nowotworowych i zwiększanie się objętości guza, którym nie towarzyszy jednoczesna angiogeneza, czyli tworzenie nowych naczyń krwionośnych lub towarzysząca angiogeneza jest niewystarczająca, prowadzą do niedokrwienia i niedotlenienia komórek nowotworowych. To z kolei zapoczątkowuje rekrutację immunosupresyjnych komórek mieloidalnych. Niska prężność tlenu w miejscu guza indukuje wytwarzanie czynnika wzbudzanego hipoksją typu 1 (*hypoxia inducible factor-1* – HIF-1), który stymuluje produkcję czynnika pochodzenia stromalnego typu 1 (*stromal-derived factor-1* – SDF-1). SDF-1 pełni funkcję chemokiny, przyciągającej komórki pochodzenia mieloidalnego poprzez pobudzenie receptora chemokinowego CXCR4. Ponadto unaczynienie nowotworu pełni rolę strażnika na granicy krwi – mikro-

środowisko guza, przez co bierze bezpośredni udział w modulacji przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej. Rekrutacja immunosupresyjnych TAMs, MDSCs, regD-Cs, Tregs oraz przeciwnowotworowych CTLs wymaga czynnościowego zaangażowania śródbłonka naczyń w miejscu guza. Podczas gdy gradient chemokinowy przyciąga komórki układu immunologicznego do miejsca rozwoju nowotworu, proces ich wychodzenia z naczyń wymaga ekspresji selektyn i integryn, takich jak: E-selektyna, ICAM-1 oraz VCAM-1, biorących udział w toczeniu się, aktywacji, zatrzymaniu i przechodzeniu komórek. Komórki śródbłonka potrafią nawet wybiórczo pozyskiwać

subpopulacje leukocytów, na przykład Tregs, co zostało opisane w raku wątrobowokomórkowym oraz raku trzustki. Dodatkowo komórki nowotworowe i komórki śródbłonka naczyń mogą bezpośrednio hamować aktywację oraz zaburzać działanie efektorowych CTLs, wytwarzając na swojej powierzchni PD-1L i aktywując receptor programowanej śmierci 1 (*Programed Death-1* – PD-1). Powyższe mechanizmy są aktualnymi celami dla strategii immunoterapeutycznych, które dążą do uniemożliwienia komórkom nowotworowym ucieczki spod nadzoru układu immunologicznego oraz przywrócenia pełnej sprawności układu odpornościowego w walce z nowotworami [3, 11, 12].

### 5. Immunoterapia nowotworów

W ciągu ostatnich kilku lat immunoterapia przykuła uwagę wielu badaczy jako ważna metoda leczenia pacjentów onkologicznych. Początkowo nowotworami podatnymi na immunoterapię okazały się czerniak i rak nerki. Jednak ostatnie badania kliniczne wykazały, że wiele innych typów nowotworów również dobrze reaguje na wybór tej metody leczenia [13].

Immunoterapie przeciwnowotworowe ogólnie są dzielone na „bierne” lub „czynne”, w zależności od ich zdolności do aktywacji układu odpornościowego gospodarza w celu zwalczania nieprawidłowych komórek. Zgodnie z tą klasyfikacją do metod immunoterapii biernej są zaliczane m.in. przeciwciała monoklonalne (*monoclonal antibodies* – mAbs) specyficzne wobec komórek nowo-

tworowych oraz transfer adocytywny limfocytów T, ponieważ posiadają one zdolność do samodzielnego działania przeciwnowotworowego. Z kolei szczepionki przeciwnowotworowe i inhibitory punktów kontrolnych cyklu komórkowego wywołują efekt przeciwnowotworowy jedynie we współpracy z układem odpornościowym gospodarza, należą więc do metod immunoterapii czynnej. Inny podział przeciwnowotworowych, immunoterapeutycznych schematów leczenia uwzględnia specyficzność antygenową. W tym przypadku mAbs zalicza się do środków wykazujących specyficzność antygenową, natomiast cytokiny stymulujące układ odpornościowy i inhibitory punktów kontrolnych cyklu komórkowego aktywują niespecyficzną przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną [14, 15].

## 5.1. Immunoterapia bierna

### 5.1.1. mAbs swoiste wobec nowotworu

Przeciwciała monoklonalne swoiste wobec nowotworu są najlepiej poznaną i prawdopodobniej najczęściej stosowaną formą immunoterapii przeciwnowotworowej. Określenie „swoiste wobec nowotworu” odnosi się do mAbs, które: specyficznie modyfikują funkcje sygnalizacyjne receptorów na powierzchni komórek nowotworowych; wiążą, jednocześnie neutralizując, przekaźniki sygnałów przeżyciowych, wytwarzane przez komórki nowotworowe lub przez komórki podścieliska w miejscu zmiany nowotworowej; selektywnie rozpoznają nieprawidłowe komórki na podstawie ekspresji antygenów związanych z nowotworem (*tumor-associated antigens* – TAAs), tzn. antygenów obecnych głównie lub też wyłącznie na komórkach nowotworowych [14, 16]. mAbs specyficzne wobec nowotworu występują w co najmniej pięciu wariantach funkcjonalnych:

- nagie mAbs hamujące szlaki sygnałowe konieczne do przeżycia i rozwoju komórek nowotworowych, nie wpływające na komórki prawidłowe, np. cetuksymab – mAb specyficzne wobec receptora naskórkowego czynnika wzrostu (*epidermal growth factor receptor* – EGFR), zatwierdzone przez amerykański Urząd ds. Żywności i Leków (*Food and Drug Administration* – FDA) do leczenia raka głowy i szyi (*head and neck cancer* – HNC) oraz raka jelita grubego

(*colorectal carcinoma* – CNC);

- nagie mAbs aktywujące potencjalne receptory śmierci na powierzchni komórek nowotworowych, nie wpływające na komórki prawidłowe, np. tigatuzumab – mAb z grupy 10B (inne nazwy: TNFRSF.10B, TRAILR2, DR5), specyficzne wobec białek z nadrodziny receptora czynnika martwicy nowotworu (*tumor necrosis factor receptor* – TNFR), obecnie znajduje się na etapie badań klinicznych;
- immunokoniugaty, tzn. mAbs specyficzne wobec TAA, sprzężone z toksyną lub radioizotopem, np. gemtuzumab ozogamycyny – mAb anty-CD33 połączone z kalicheamycyną, stosowane dawniej w leczeniu ostrej białaczki szpikowej;
- nagie mAbs specyficzne wobec TAA, które opłaszczają komórki nowotworowe, tym samym aktywując cytotoksyczność komórkową zależną od przeciwciał (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* – ADCC), fagocytozę komórkową zależną od przeciwciał oraz cytotoksyczność zależną od układu dopełniacza (*complement-dependent cytotoxicity* – CDC), np. rytuksymab – mAb anty-CD20, stosowane obecnie w leczeniu przewlekłej białaczki limfocy-

towej (*chronic lymphocytic leukemia* – CLL) i chłoniaków nieziarniczych (*non-Hodgkin lymphoma* – NHL);

- dwuswoiste przeciwciała mobilizujące limfocyty T (*bispecific T-cell engagers* – BiTEs), tzn. białka chimeryczne składające się z dwóch jednołańcuchowych regionów zmiennych, pochodzących z różnych mAbs. Jeden fragment rozpoznaje TAA, a drugi – antygen

powierzchniowy limfocytów T, np. blinatumomab – BiTE rozpoznające CD19 i CD3, stosowane obecnie w leczeniu ostrej białaczki limfoblastycznej z komórek prekursorowych limfocytów B bez obecności chromosomu Filadelfia.

Na chwilę obecną FDA dopuściło do użytku 18 różnych mAbs rozpoznających komórki nowotworowe. Ukazuje to niezwykle sukces tej metody immunoterapii [14, 17].

### 5.1.2. Transfer adoptywny limfocytów T

Określenie „transfer adoptywny limfocytów T” (*adoptive cell transfer* – ACT) odnosi się do metody biernej immunoterapii nowotworów, która na ogół obejmuje: zbiorę limfocytów krążących lub naciekających guza, ich selekcję/modyfikację/rozwój/aktywację *ex vivo* oraz podanie limfocytów pacjentom, najczęściej poprzedzone limfodeplecją oraz w połączeniu ze środkami immunostymulującymi. W wyniku ACT wprowadzona zostaje populacja komórek wzbogaconych w efektorowe komórki immunologiczne, potencjalnie reaktywne wobec nowotworu [14, 18].

Jak dotąd opracowano kilka strategii mających na celu poprawę potencjału terapeutycznego ACT. Dzięki zastosowaniu metod inżynierii genetycznej, limfocytom krwi obwodowej (*peripheral blood lymphocytes* – PBLs) nadano takie cechy jak: wyjątkowa specyficzność antygenowa, wyższy potencjał proliferacyjny i dłuższa trwałość *in vivo*, ulepszony profil wydzielniczy, podwyższona

zdolność naciekania nowotworu oraz większa cytotoksyczność. Dzięki modyfikacjom genetycznym można zmienić swoistość PBLs przed podaniem ich pacjentowi. W ten sposób pobudza się ekspresję TCRs rozpoznających TAA lub tzw. chimerycznych receptorów antygenowych (*chimeric antigen receptors* – CARs), czyli białek przez-błonowych, zawierających domenę immunoglobulinową wiążącą TAA połączoną z jedną lub kilkoma domenami immunostymulującymi. Druga z wymienionych modyfikacji ma tę zaletę, że czyni limfocyty T zdolnymi do rozpoznawania, a więc potencjalnie również do niszczenia komórek posiadających TAA w sposób niezależny od MHC. Potencjał terapeutyczny limfocytów T wytwarzających CARs został udowodniony w licznych badaniach klinicznych, a wyjątkowo dobrą odpowiedź uzyskano u pacjentów cierpiących na nowotwory hematologiczne. Przeciwnowotworowy efekt terapeutyczny odnotowano również po podaniu pacjentom limfocytów T

## Review and Research on Cancer Treatment

Volume 1, Issue 1 (2015)

wytwarzających TCRs specyficznych wobec TAA [14, 19].

W innych badaniach wykazano, że transfer adocytywny komórek NK (*natural killer*) przynosi niewielki efekt terapeutyczny. Z kolei transfer adocytywny limfocytów B nie został jeszcze zbadany w warunkach klinicznych. Limfocyty B, a przynajm-

niej niektóre z ich podtypów, mogą powodować silny efekt immunosupresyjny, co może tłumaczyć brak zainteresowania tą populacją komórek. Na chwilę obecną żaden z protokołów ACT nie został zatwierdzony przez FDA do leczenia przeciwnowotworowego [14, 20].

### 5.1.3. Wirusy onkolityczne

Określenie „wirusy onkolityczne” odnosi się do niepatogennych szczepów wirusowych, które swoiście zarażają komórki nowotworowe, powodując ich śmierć. Nie należy mylić wirusów onkolitycznych z wirusami onkotropicznymi, czyli wirusami wykazującymi preferencyjny tropizm do komórek nowotworowych, ale nie działającymi (lub w bardzo małym stopniu) cytotoksycznie. Potencjał przeciwnowotworowy wirusów onkolitycznych może być wrodzony i wynikać po prostu z efektu cytopatycznego, czyli przeciążenia metabolizmu komórkowego wynikającego z masowej produkcji wirusa, co prowadzi do śmierci komórki. Istnieje również możliwość, że te wirusy wykazują pośrednią aktywność onkolityczną, będącą skutkiem syntezy produktów endo- lub egzogennych, letalnych dla komórki gospodarza, niezależnie od zdolności wirusa do intensywnej replikacji i wywoływanego efektu cytopatyczne-

go. Dzięki zastosowaniu metod inżynierii genetycznej do wirusów onkolitycznych wprowadzono dodatkowe, użyteczne sekwencje kodujące: enzymy, przekształcające nieszkodliwy prolek w substancję o działaniu cytotoksycznym, białka, które (przynajmniej teoretycznie) uruchamiają w komórkach nowotworowych letalne kaskady sygnałowe oraz krótkie cząsteczki RNA o strukturze spinki do włosów, które rozpoznają czynniki konieczne do przeżycia komórek nowotworowych, nie ingerując w metabolizm komórek prawidłowych. Na chwilę obecną żaden z wirusów onkolitycznych nie został zatwierdzony przez FDA do leczenia przeciwnowotworowego. Natomiast w Chinach już od 2005 roku dopuszczono do użycia rekombinowany adenowirus H101, znany pod nazwą handlową Oncorine®. H101 jest stosowany w połączeniu z chemioterapią do leczenia HNC [14, 21].



### 5.2. Immunoterapia czynna

#### 5.2.1. Immunoterapie z wykorzystaniem DCs

W ciągu ostatnich 20 lat wiele uwagi poświęcono rozwojowi metod immunoterapeutycznych opartych na DCs. Większość z tych strategii opiera się na zastosowaniu komórek autologicznych. Duża liczba prowadzonych badań przedklinicznych i klinicznych odzwierciedla kluczową rolę, jaką pełnią DCs na granicy między odpornością wrodzoną a nabytą oraz zdolność części podtypów DCs do wyzwania silnej, istotnej terapeutycznie, przeciwnowotworowej odpowiedzi układu immunologicznego. Do tej pory opracowano wiele różnych metod immunoterapeutycznych wykorzystujących DCs. Większość z nich polega na izolacji krążących monocytów, pochodzących od pacjenta lub od dawcy oraz ich namnożeniu/zróżnicowaniu *ex vivo*, koniecznie w obecności czynników stymulujących dojrzewanie DCs, np. czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor* – GM-CSF). Jest to niezbędny składnik, ponieważ niedojrzałe DCs wykazują działanie immunosupresyjne zamiast immunostymulującego. Zazwyczaj autologiczne DCs po ekspozycji na źródło TAA są ponownie podawane pacjentowi. Źródłem antygenów mogą być m.in.: peptydy zawierające TAA, mRNA kodujące jeden lub kilka określonych TAA, wektory ekspresyjne kodujące jeden lub kilka określonych TAA, lizaty komórek nowotworowych pochodzenia autolo-

gicznego lub heterologicznego czy też mRNA komórek nowotworowych. Można też przeprowadzić fuzję *ex vivo* DCs z inaktywowanymi komórkami nowotworowymi, otrzymując tzw. dendrytomy. We wszystkich powyższych metodach do DCs dostarcza się *ex vivo* TAAs lub cząsteczki je kodujące, dzięki czemu po ponownym podaniu komórek pacjentowi, DCs są w stanie uruchomić odpowiedź immunologiczną przeciwko TAAs. Inne strategie immunoterapii przeciwnowotworowych, wykorzystujących DCs, uwzględniają: ukierunkowanie TAAs swoistych wobec DCs *in vivo*, zastosowanie egzosomów pochodzących z DCs oraz podawanie pacjentom DCs autologicznych lub allogenicznych, poddanych uprzednio procesom dojrzewania, jeśli istnieje taka potrzeba również modyfikacjom genetycznym, w warunkach *ex vivo*. W tym przypadku jednak do DCs nie dostarcza się TAAs. Aby skierować TAAs swoiste wobec DCs, TAAs są sprzęgane z mAbs, polipeptydami lub węglowodanami, które selektywnie wiążą się z DCs; zamykane w immunoliposomach rozpoznających DCs lub kodowane na wektorach swoistych wobec DCs. Z kolei zastosowanie DCs lub ich egzosomów jest metodą o stosunkowo niespecyficznym działaniu immunostymulującym [14, 22, 23].

Na chwilę obecną dopuszczono do użytku tylko jeden preparat komórkowy, w skład którego wchodzi DCs. Środek ten jest znany jako sipu-

leucel-T (nazwa handlowa Provenge®). Sipuleucel-T już w 2010 roku został zatwierdzony przez FDA i Europejską Agencję leków (*European Medicines Agency* – EMA) do leczenia przerzutowego raka prostaty opornego na kastrację, jednak w listopadzie 2014 roku producent preparatu ogłosił bankructwo. Odzwierciedla to niekorzystny stosunek kosztów do korzyści terapii komór-

kowej, której przygotowanie wymaga stosunkowo dużych ilości komórek jednojądrzastych krwi obwodowej. Obecnie prowadzone są badania kliniczne dotyczące bezpieczeństwa i skuteczności wielu preparatów komórkowych na bazie DCs, innych niż sipuleucel-T. Jak dotąd dostarczają one bardzo obiecujących wyników, co daje nadzieję na dalszy rozwój tej metody immunoterapii [14, 24].

### 5.2.2. Szczepionki przeciwnowotworowe na bazie peptydów i DNA

DCs i inne APCs są celami również dla szczepionek przeciwnowotworowych na bazie peptydów i DNA. W przypadku szczepionek peptydowych, pacjentom podaje się rekombinowane TAAs lub ich peptydy o pełnej długości sekwencji. Najczęściej aplikuje się je domięśniowo, podskórnie lub śródskórnie, razem z jednym lub kilkoma środkami immunostymulującymi, określanymi mianem adiuwantów, które silnie stymulują dojrzewanie DCs. Powyższa metoda wykorzystuje fakt, że osiadłe DCs i inne APCs podczas dojrzewania zyskują zdolność do prezentowania epitopów pochodzących od TAAs, dzięki czemu zapoczątkowują silną odpowiedź immunologiczną przeciwko TAAs. Mechanizmy leżące u podstaw rozwinięcia się przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej, zapoczątkowanej przez szczepionki peptydowe, a tym samym ich skuteczność, zależy (przynajmniej częściowo) od wielkości peptydu. Krótkie peptydy (8-12 reszt aminokwasowych) bezpośrednio wiążą się do cząsteczek MHC na powierzchni APCs, natomiast długie,

syntetyczne peptydy (25-30 reszt aminokwasowych), aby wywołać odpowiedź immunologiczną muszą zostać wchłonięte, przetworzone i zaprezentowane przez APCs. Aktywność terapeutyczna długich, syntetycznych peptydów zwykle jest wyższa niż aktywność ich krótkich odpowiedników, szczególnie kiedy zawierają epitopy rozpoznawane zarówno przez limfocyty T cytotoksyczne, jak i limfocyty T pomocnicze oraz gdy długie peptydy są połączone z efektywnymi adiuwantami. Niedawne badania wykazały, że niektóre powszechnie używane immunostymulanty, takie jak tzw. niekompletny adiuwant Freund, obniżają skuteczność szczepionek przeciwnowotworowych na bazie peptydów, skłaniając do stosowania alternatywnych immunostymulantów. Szczególny rodzaj szczepionek peptydowych stanowią lizaty autologicznych komórek nowotworowych, połączonych z chaperonami. Białka te wykazują działanie immunostymulujące, najczęściej należą do rodziny białek szoku cieplnego (*heat-shock proteins* – HSP). Główną zaletę tej metody stanowi

## Review and Research on Cancer Treatment

Volume 1, Issue 1 (2015)

fakt, że nie opiera się ona na pojedynczym TAA ale (przynajmniej teoretycznie) na wszystkich TAA, które wiążą się do HSPs, również tych specyficznych dla konkretnego pacjenta, tzw. neo-TAAs. Jednak należy pamiętać, że wytwarzanie personalizowanych szczepionek przeciwnowotworowych wiąże się ze znacznym zwiększeniem kosztów produkcji [14, 25, 26].

Szczepionki przeciwnowotworowe na bazie DNA opierają się na nagich lub umieszczonych w wektorach, konstrukcjach kodujących TAA. Jako wektory służą cząstki wirusowe, niepatogenne bakterie lub komórki drożdży. W przypadku zastosowania wektorów bakteryjnych lub grzybowych, szczepionki na bazie DNA stanowią źródło TAA, natomiast nagie konstrukty i wektory wirusowe zmieniają APCs lub komórki mięśniowe w ten sposób, że wytwarzają one TAA. Teoretycznie pobudza to osiadłe DCs lub inne APCs do zapoczątkowania odpowiedzi immunologicznej przeciwko TAA. Rozmiar odpowiedzi może zwiększyć obecność odpowiedniego adiuwantu. Szczególnie interesujące podejście w tym zakresie stanowią tzw. szczepionki onkolityczne, czyli wirusy onkolityczne zmienione genetycznie

w ten sposób, że kodują TAA. Obiecujące wyniki uzyskano również po doustnym podaniu szczepionek na bazie DNA. W tym modelu terapeutycznym żywe, atenuowane bakterie, wytwarzające TAA o pełnej długości, są wychwytywane przez APCs w śluzówce jelita, co skutkuje rozwinięciem silnej odpowiedzi immunologicznej przeciwko TAA w tkance limfatycznej związanej z błonami śluzowymi (*mucosa-associated lymphoid tissue – MALT*) [14, 27].

Zarówno szczepionki peptydowe, jak i szczepionki na bazie DNA, wykazały aktywność w organizmach pacjentów onkologicznych. Jednak na chwilę obecną żadna ze szczepionek przeciwnowotworowych nie została zatwierdzona przez FDA czy EMA do leczenia ludzi. Natomiast w Rosji już od 2008 roku stosuje się vitespen (nazwa handlowa Oncophage®). Jest to szczepionka przeciwnowotworowa na bazie HSP o masie 90 kDa, zatwierdzona do leczenia raka nerki (*renal cell carcinoma – RCC*) u pacjentów ze średnim ryzykiem nawrotu. Ponadto trzy szczepionki przeciwnowotworowe na bazie DNA zostały dopuszczone do użytku weterynaryjnego. W jednej z nich rolę TAA pełni ludzkie białko tyrozynaza [14, 28].

### 5.2.3. Inne

Wiele innych przeciwnowotworowych strategii immunoterapeutycznych zostało zaakceptowanych przez władze na całym świecie. Obecnie są już stosowane u pacjentów onkologicznych, część metod jest nadal testowana w badaniach przedklinik-

nych i klinicznych pod kątem bezpieczeństwa i skuteczności.

Do pozostałych metod immunoterapii czynnej można zaliczyć m.in.: cytokiny immunostymulujące, mAbs o działaniu immunomodulującym, inhibitory metabolizmu immunosu-

## Review and Research on Cancer Treatment

Volume 1, Issue 1 (2015)

presyjnego, agonistów receptorów rozpoznających wzorce (*pattern recognition receptors* – PRR), immunogenne induktory śmierci komórki

czy też konkretne środki zatwierdzone do użytku, takie jak: Revlimid®, Pomalyst®, Ontak®, Yondelis® [14].

### 6. Podsumowanie

W ciągu ostatnich lat immunoterapia zyskała uznanie jako skuteczna metoda leczenia przeciwnowotworowego. Obecnie, obok chirurgii, radioterapii i chemioterapii, immunoterapia jest uznawana za czwarty filar leczenia zaawansowanych nowotworów.

Metody immunoterapeutyczne reprezentują interesujące podejście do kwestii leczenia chorób nowotworowych. Głównym celem tego rodzaju leczenia jest pobudzenie i przywrócenie prawidłowej aktywności układu odpornościowego pacjenta, aby ten mógł samodzielnie i skutecznie zwalczać nieprawidłowe, transformowane komórki. Najogólniej, metody immunoterapeutyczne można podzielić na bierne, m.in.: zastosowanie mAbs swoistych wobec nowotworu, wirusów onkologicznych i transfer adoptywny limfocytów T oraz czynne, np.: wykorzystanie DCs czy szczepionki przeciwnowotworowe na bazie peptydów i DNA. Niektóre z metod

zostały już zatwierdzone do leczenia pacjentów onkologicznych, wiele innych pozostaje w fazie badań przedklinicznych i klinicznych.

Głównym założeniem immunoterapii jest modyfikacja układu immunologicznego i przywrócenie jego pełnej funkcji odpornościowej, a celem leczenia nie jest nowotwór, lecz układ immunologiczny pacjenta. Do rozwoju przeciwnowotworowych strategii immunoterapeutycznych konieczne są dalsze badania nad właściwymi biomarkerami, leczeniem skojarzonym z najnowszymi środkami lub innymi immunoterapeutykami oraz optymalnym dawkowaniem i czasem trwania leczenia. Metody immunoterapeutyczne są obecnie obiektem zainteresowania wielu grup badawczych, co daje nadzieje na dalszy, efektywny rozwój tych metod leczenia, co w przyszłości może przyczynić się do poprawy skuteczności leczenia przeciwnowotworowego.

### Literatura

1. Mellman I., Coukos G., Dranoff G. *Cancer immunotherapy comes of age*, Nature., 480 (2011), s. 480-489
2. Hodi F.S., O'Day S.J., McDermott D.F., Weber R.W., Sosman J.A., Haanen J.B., Gonzalez R., Robert C., Schadendorf D., Hassel J.C., Akerley W., van den Eertwegh A.J., Lutzky J., Lorigan P., Vaubel J.M., Linette G.P., Hogg D., Ottensmeier C.H., Lebbé C., Peschel C., Quirt I., Clark J.I., Wolchok J.D., Weber J.S., Tian J., Yellin M.J., Nichol G.M., Hoos A., Urba W.J. *Improved survival*

## Review and Research on Cancer Treatment

Volume 1, Issue 1 (2015)

- with ipilimumab in patients with metastatic melanoma*, The New England Journal of Medicine., 363 (2010), s. 711-723
3. R.E. Vatner, B.T. Cooper, C. Vanpouille-Box, S. Demaria, S.C. Formenti *Combinations of immunotherapy and radiation in cancer therapy*, Frontiers in Oncology., 4 (2014), s. 1-15
  4. Willimsky G., Blankenstein T. *Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance*, Nature., 437 (2005), s. 141-146
  5. Momtaz P., Postow M.A. *Immunologic checkpoints in cancer therapy: focus on the programmed death-1 (PD-1) receptor pathway*, Pharmacogenomics and Personalized Medicine., 7 (2014), s. 357-365
  6. Koebel C.M., Vermi W., Swann J.B., Zerafa N., Rodig S.J., Old L.J., Smyth M.J., Schreiber R.D. *Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state*, Nature., 450 (2007), s. 903-907
  7. Raval R.R., Sharabi A.B., Walker A.J., Drake C.G., Sharma P. *Tumor immunology and cancer immunotherapy: summary of the 2013 SITC primer*, Journal for ImmunoTherapy of Cancer., 2 (2014), s. 14
  8. Poschke I., Mougiakakos D., Kiessling R. *Camouflage and sabotage: tumor escape from the immune system*, Cancer Immunology, Immunotherapy., 60 (2011), s. 1161-1171
  9. Seliger B., Massa C. *The dark side of dendritic cells: development and exploitation of tolerogenic activity that favor tumor outgrowth and immune escape*, Frontiers in Immunology., 4 (2013), s. 419
  10. Ostrand-Rosenberg S., Sinha P., Beury D.W., Clements V.K. *Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression*, Seminars in Cancer Biology., 22 (2012), s. 275-281
  11. Martin B.J. *Inhibiting vasculogenesis after radiation: a new paradigm to improve local control by radiotherapy*, Seminars in Radiation Oncology., 23 (2013), s. 281-287
  12. Shetty S., Weston C.J., Oo Y.H., Westerlund N., Stamataki Z., Youster J., Hubscher S.G., Salmi M., Jalkanen S., Lalor P.F., Adams D.H. *Common lymphatic endothelial and vascular endothelial receptor-1 mediates the transmigration of regulatory T cells across human hepatic sinusoidal endothelium*, The Journal of Immunology., 186 (2011), s. 4147-4155
  13. Kovacsovics-Bankowski M., Chisholm L., Vercellini J., Tucker C.G., Montler R., Haley D., Newell P., Ma J., Tseng P., Wolf R., Vetto J.T., Hammill C., Hansen P., Weinberg A.D. *Detailed characterization of tumor infiltrating lymphocytes in two distinct human solid malignancies show phenotypic similarities*, Journal for ImmunoTherapy of Cancer., 2 (2014), s. 1-12
  14. Galluzzi L., Vacchelli E., Bravo-San Pedro J.M., Buqué A., Senovilla L., Baracco E.E., Bloy N., Castoldi F., Abastado J.P., Agostinis P., Apte R.N., Aranda F., Ayyoub M., Beckhove P., Blay J.Y., Bracci L., Caignard A., Castelli C., Cavallo F., Celis E., Cerundolo V., Clayton A., Colombo M.P., Coussens L., Dhodapkar M.V., Eggermont A.M., Fearon D.T., Fridman W.H., Fučíková J., Gabrilovich

## Review and Research on Cancer Treatment

Volume 1, Issue 1 (2015)

- D.I., Galon J., Garg A., Ghiringhelli F., Giaccone G., Gilboa E., Gnjatic S., Hoos A., Hosmalin A., Jäger D., Kalinski P., Kärre K., Kepp O., Kiessling R., Kirkwood J.M., Klein E., Knuth A., Lewis C.E., Liblau R., Lotze M.T., Lugli E., Mach J.P., Mattei F., Mavilio D., Melero I., Melief C.J., Mittendorf E.A., Moretta L., Odunsi A., Okada H., Palucka A.K., Peter M.E., Pienta K.J., Porgador A., Prendergast G.C., Rabinovich G.A., Restifo N.P., Rizvi N., Sautès-Fridman C., Schreiber H., Seliger B., Shiku H., Silva-Santos B., Smyth M.J., Speiser D.E., Spisek R., Srivastava P.K., Talmadge J.E., Tartour E., Van Der Burg S.H., Van Den Eynde B.J., Vile R., Wagner H., Weber J.S., Whiteside T.L., Wolchok J.D., Zitvogel L., Zou W., Kroemer G. *Classification of current anticancer immunotherapies*, *Oncotarget.*, 5 (2014), s. 12472-12508
15. Lesterhuis W.J., Haanen J.B., Punt C.J. *Cancer immunotherapy – revisited*, *Nature Reviews Drug Discovery.*, 10 (2011), s. 591-600
  16. Vacchelli E., Eggermont A., Galon J., Sautès-Fridman C., Zitvogel L., Kroemer G., Galluzzi L. *Trial watch: Monoclonal antibodies in cancer therapy*, *Oncoimmunology.*, 2 (2013), s. e22789
  17. Galluzzi L., Vacchelli E., Fridman W.H., Galon J., Sautès-Fridman C., Tartour E., Zucman-Rossi J., Zitvogel L., Kroemer G. *Trial Watch: Monoclonal antibodies in cancer therapy*, *Oncoimmunology.*, 1 (2012), s. 28-37
  18. Humphries C. *Adoptive cell therapy: Honing that killer instinct*, *Nature.*, 504 (2013), s. S13-15
  19. Vacchelli E., Eggermont A., Fridman W.H., Galon J., Tartour E., Zitvogel L., Kroemer G., Galluzzi L. *Trial Watch: Adoptive cell transfer for anticancer immunotherapy*, *Oncoimmunology.*, 2 (2013), s. e24238
  20. Fremd C., Schuetz F., Sohn C., Beckhove P., Domschke C. *B cell-regulated immune responses in tumor models and cancer patients*, *Oncoimmunology.*, 2 (2013), s. e25443
  21. Vacchelli E., Eggermont A., Sautès-Fridman C., Galon J., Zitvogel L., Kroemer G., Galluzzi L. *Trial watch: Oncolytic viruses for cancer therapy*, *Oncoimmunology.*, 2 (2013), s. e24612
  22. Palucka K., Banchereau J. *Cancer immunotherapy via dendritic cells*, *Nature Reviews Cancer.*, 12 (2012), s. 265-277
  23. Banchereau J., Palucka A.K. *Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer*, *Nature Reviews Immunology.*, 5 (2005), s. 296-306
  24. Kantoff P.W., Higano C.S., Shore N.D., Berger E.R., Small E.J., Penson D.F., Redfern C.H., Ferrari A.C., Dreicer R., Sims R.B., Xu Y., Frohlich M.W., Schellhammer P.F. *Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer*, *The New England Journal of Medicine.*, 363 (2010), s. 411-422
  25. Aranda F., Vacchelli E., Eggermont A., Galon J., Sautès-Fridman C., Tartour E., Zitvogel L., Kroemer G., Galluzzi L. *Trial Watch: Peptide vaccines in cancer therapy*, *Oncoimmunology.*, 2 (2013), s. e26621
  26. Melief C.J., van der Burg S.H. *Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines*, *Nature Reviews Cancer.*, 8 (2008), s. 351-360

## Review and Research on Cancer Treatment

Volume 1, Issue 1 (2015)

27. Liu M.A. *DNA vaccines: an historical perspective and view to the future*, Immunological Reviews., 239 (2011), s. 62-84
28. Wood C., Srivastava P., Bukowski R., Lacombe L., Gorelov A.I., Gorelov S., Mulders P., Zielinski H., Hoos A., Teofilovici F., Isakov L., Flanigan R., Figlin R., Gupta R., Escudier B. *An adjuvant autologous therapeutic vaccine (HSPPC-96; vitespen) versus observation alone for patients at high risk of recurrence after nephrectomy for renal cell carcinoma: a multicentre, open-label, randomised phase III trial*, Lancet., 372 (2008), s. 145-154