

**Konferencia Slovenskej imunologickej spoločnosti
a
Neuroimunologického ústavu Slovenskej akadémie vied**

BIOLOGICKÁ LIEČBA V TEÓRII A PRAXI



**SLOVENSKÁ
IMUNOLOGICKÁ
SPOLOČNOSŤ**



II. ročník

Bratislava, Dúbravská cesta 9

23. september 2015

**Konferencia
Slovenskej imunologickej spoločnosti
a
Neuroimunologického ústavu
Slovenskej akadémie vied**

BIOLOGICKÁ LIEČBA V TEÓRII A PRAXI



II. ročník

Bratislava, Dúbravská cesta 9
23. september 2015

*Spojenie teoretických disciplín a klinickej praxe
povedie v blízkej budúcnosti k výraznému pokroku v liečbe ľudských ochorení.*

*Vývoj a aplikácia biologík s vysokou špecificitou a efektivitou,
bez vedľajších účinkov, je nádejou v boji proti celému spektru chorôb.*

Je to spoločná ambícia výskumných i klinických tímov.

*Byť v kontakte s najnovšími poznatkami v tomto procese
je cieľom konferencie „Biologická liečba v teórii a praxi“,
ktorá je spoločným projektom Slovenskej imunologickej spoločnosti
a Neuroimunologického ústavu SAV.*

Organizátori

Slovenská imunologická spoločnosť – Slovenská akadémia vied
Neuroimunologický ústav – Slovenská akadémia vied

Prezident konferencie

Novák Michal Neuroimunologický ústav – Slovenská akadémia vied
predseda Slovenskej imunologickej spoločnosti

Organizačný výbor

Buc Milan	Imunologický ústav LFUK, Bratislava
Martin ČENTE	Neuroimunologický ústav SAV, Bratislava
Peter FILIPČÍK	Neuroimunologický ústav SAV, Bratislava
Martin HRUBÍŠKO	OKIA OÚSA a ÚLM SZU & OÚSA, Bratislava
Rostislav ŠKRABANA	Neuroimunologický ústav SAV, Bratislava
Elena TIBENSKÁ	Medirex a. s., člen MEDIREX GROUP, Bratislava
Zuzana REVICKÁ	Neuroimunologický ústav SAV, Bratislava

Adresa sekretariátu

Daniela Stiel Podmajerská
Neuroimunologický ústav – Slovenská akadémia vied
Dúbravská cesta 9, Bratislava
Tel: 0254788100
Fax: 0254774276
Email: daniela.podmajerska@savba.sk

PROGRAM

8:15 – 8:20 Otvorenie konferencie

*prof. MVDr. M. Novák, DrSc., Dr.h.c.,
predseda SIMS a riaditeľ NIU SAV*

8:20 – 10:00 BIOLOGIKÁ V NEUROIMUNOLÓGII

8:20 – 8:40 Novák M. Imunoterapia Alzheimerovej choroby

8:40 – 9:00 Novák P. Vakcíny pre liečbu neurodegeneračných ochorení

9:00 – 9:20 Škrabana R. 3D analýza interakcie antigénu a protilátky:
význam pre klinickú prax

9:20 – 9:40 Weissová P. Malé neurotrofické molekuly a ich potenciál pri liečení
neurodegeneračných ochorení

9:40 – 10:00 Lisý L. Súčasný stav biologickej liečby v neurológii

10:00 – 10:10 Diskusia

10:10 – 10:30 *Prestávka*

10:30 – 12:40 BIOLOGIKÁ V DERMATOLÓGII

10:30 – 10:50 Šimaljaková M. Prehľad biologickej liečby na Dermatovenerologickej
klinike LFUK a UN Bratislava

10:50 – 11:10 Gulanová B. Infliximab v liečbe psoriázy: výhody a nevýhody

11:10 – 11:30 Rajczyová Z. Biologická liečba dermatóz mimo indikačného
obmedzenia

11:30 – 11:50 Šustrová E. Chronická spontánna urtikária

11:50 – 12:00 Diskusia

12:00 – 13:00 *Prestávka*

13.00 – 14:10 BIOLOGIKÁ V ONKOLÓGII A GASTROENTEROLÓGII

- 13:00 – 13:20 Špánik S.** Imunoterapia v onkológii
13:20 – 13:40 Hrubíško M. Lokálny imunoprofil karcinómov – nová éra
klasifikácie tumorov
13:40 – 14:00 Oltman M. Črevná mikrobiota a pečeň
14:00 – 14:10 Diskusia

14:30 – 15:40 VARIA

- 14:30 – 14:50 Hrubíško M.** Očkovanie dospelých a seniorov – nová éra
vakcinácie
14:50 – 15:10 Buc M. Interleukín 2 v liečbe autoimunitných chorôb
15:10 – 15:30 Filipčík P. Nukleové kyseliny ako biologiká: renesancia alebo
nový trend?
15:30 – 15:40 Diskusia

15:40 Záver konferencie

ABSTRAKTY
Z PREDNÁŠOK

IMUNOTERAPIA ALZHEIMEROVEJ CHOROBY

Novák M., Novák P., Kontseková E., Kováčech B., Škrabana R., Žilka N.

Axon Neuroscience SE, Bratislava

Alzheimerova choroba (ACh) sa vyznačuje progresívnou akumuláciou patologických proteínov, a stratou synapsí, neurónov a mozgového tkaniva. Neurofibrilárna patológia, pozostávajúca z post-translačne modifikovaného proteínu tau, koreluje s progresiou ACh a je spoločným menovateľom mnohých ďalších neurodegeneratívnych ochorení, takzvaných tauopatií.

Imunoterapie zamerané na patologický tau proteín v sebe zlučujú schopnosť zachytiť široké spektrum rozlične modifikovaných molekúl tau proteínu, a vytriediť ich spomedzi zdravých variant potrebných pre funkciu bunky.

V našom výskume sme odhalili molekulárnu doménu, ktorá je spoločným menovateľom patologických foriem tau proteínu, a zároveň je potrebná pre jeho agregáciu a tvorbu neurofibrilárnej patológie. Vyvinuli sme monoklonálnu protilátku DC8E8, ktorá zabraňuje agregácii tau *in vitro*, a taktiež (použitá ako pasívna vakcína) redukuje množstvo patologického tau proteínu a neurofibrilárnej patológie v mozgu transgénnych myší.

Protilátka DC8E8 bola schopná diskriminácie medzi zdravými a chorými formami tau proteínu, a taktiež reagovala s ranými i neskorými štádiami neurofibrilárnej patológie v mozgovom tkanive pacientov s Alzheimerovou chorobou.

Túto protilátku sme použili ako „odliatok“ pri tvorbe imunogénu aktívnej vakcíny. Výslednú peptidovú vakcínu sme testovali v potkaňom modeli ACh za účelom ohodnotenia jej dopadu na klinický, histopatologický a biochemický fenotyp transgénnych zvierat. Vakcinácia indukovala robustnú imunitnú odpoveď, a redukovala množstvo tau oligomérov a rozsah neurofibrilárnej patológie; taktiež odstránila okolo 95% patologicky hyperfosforylovaných foriem tau, a zlepšila klinický obraz zvierat.

V toxikologických štúdiách preukázala vakcína veľmi kladný bezpečnostný profil a pod menom „AADvac1“ postúpila do fázy klinického skúšania.

VAKCÍNY PRE LIEČBU NEURODEGENERAČNÝCH OCHORENÍ

Novák P., Kontseková E., Kováčech B., Škrabana R., Žilka N., Novák M.

Axon Neuroscience SE, Bratislava

Neurofibrilárna patológia je najbližším korelátom kognitívneho úpadku a progresie ochorenia v Alzheimerovej chorobe (ACh). Vakcína AADvac1, určená na terapiu ACh, je prvou aktívnou vakcínou zacielenou proti neurofibrilárnej tau patológii, ktorá bola testovaná na ľuďoch.

Vykonalí sme 3-mesačnú, dvojito zaslepenú, randomizovanú, placebom kontrolovanú štúdiu fázy 1 s trojmesačným predĺžením bez použitia placebo na 30 pacientoch s miernou až stredne závažnou formou Alzheimerovej choroby (MMSE 15-26).

Pacienti obdržali 3 dávky AADvac1 alebo placebo v mesačných odstupoch; v predĺžení štúdie obdržali všetci pacienti ďalšie 3 dávky AADvac1 v mesačných odstupoch.

Primárnymi cieľmi skúšania bolo vyhodnotenie bezpečnosti a imunogenicity AADvac1. Bezpečnosť vakcíny bola hodnotená pomocou neurologických a fyzických vyšetrení, hodnotenia vitálnych funkcií, magnetickej rezonancie mozgu, EKG, a štandardných laboratórnych panelov (hematológie, koagulácie, krvnej biochémie a rozboru moču). Kognícia bola hodnotená exploratívne pomocou testov ADAS-Cog11, COWAT a CFT.

Vakcína AADvac1 v štúdií preukázala kladný bezpečnostný profil; jediným nežiadúcim účinkom boli prechodné reakcie v mieste vpichu. Meningoencefalitída, mozgové edémy a mikro-krvácania známe z imunoterapií proti β -amyloidu neboli pozorované.

AADvac1 bola vysoko imunogénna. 29 z 30 vakcinovaných pacientov vyvinulo imunitnú odpoveď proti patologickému epitopu tau proteínu obsiahnutému v AADvac1, pričom každá zo 6 dávok vakcíny zvýšila množstvo vygenerovaných protilátok. Napriek tomu, že vakcína bola podávaná seniorom, bol dosiahnutý geometrický priemerný titer 1:48661. Kognícia pacientov bola stabilná po dobu trvania štúdie.

Vakcína AADvac1 vykázala kladný bezpečnostný profil a vysokú imunogenicitu. Ďalšie štúdie sú potrebné na dokázanie účinnosti vakcíny v liečbe ACh.

3D ANALÝZA INTERAKCIE ANTIGÉNU A PROTILÁTKY: VÝZNAM PRE KLINICKÚ PRAX

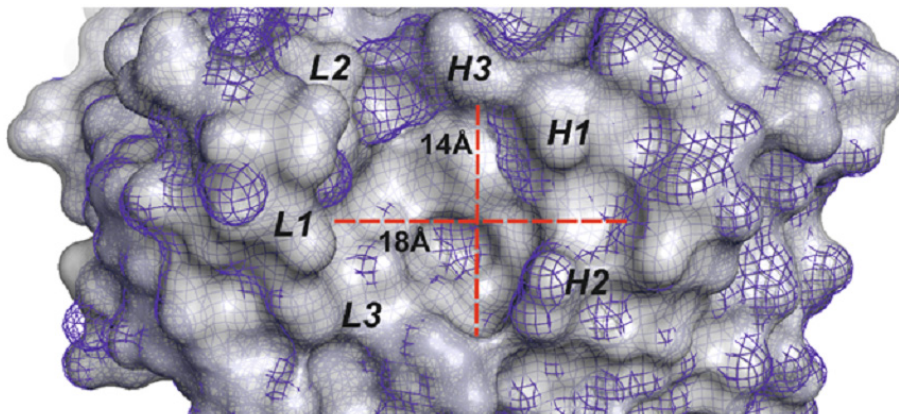
Škrabana R., Kontseková E., Žilka N., Cehlár O., Hanes J., Novák M.
Neuroimunologický ústav SAV, Bratislava, Axon Neuroscience SE, Bratislava

Prítomnosť nerozpustných agregovaných foriem neuronálneho proteínu tau pri Alzheimerovej chorobe a príbuzných tauopátiách koreluje s kognitívnym úpadkom pacientov [1]. Aktívna vakcinácia vakcínou AADvac1 [2], ktorá vstupuje do druhej fázy klinického skúšania, je zacielená proti špecifickému epitopu na proteíne tau, ktorý leží v tesnej blízkosti agregáčnych aminokyselinových motívov VQIINK a VQIVYK [3, 4]. Tento epitop bol identifikovaný vďaka špecifickej myšej monoklónovej protilátke DC8E8, ktorá vykazuje silnú inhibíciu polymerizácie proteínu tau *in vitro* [5]. Imunizácia AADvac1 má za cieľ indukovať anti-tau protilátky s rovnakou konformačnou špecificitou a inhibičnou aktivitou, ako má DC8E8. V prednáške predstavíme predklinický vývoj AADvac1, a to mapovanie epitopu DC8E8 na molekulovej úrovni, charakterizáciu jeho interakčných vlastností s protilátkou DC8E8, ďalej interakčné vlastnosti imúnneho séra po vakcinácii laboratórnych zvierat s AADvac1 a štruktúrnú analýzu inhibičného miesta protilátky DC8E8 založenú na meraniach röntgenovej difrakcie monokryštálu Fab fragmentu protilátky DC8E8.

Ďakovanie: táto práca bola podporená grantom Axon Neuroscience SE a grantom VEGA 2/0177/15.

Referencie:

1. Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, Castellani RJ, Crain BJ, Davies P, Del Tredici K, et al. (2012) Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol* **71**, 362-381, doi: 10.1097/NEN.0b013e31825018f7.
2. Kontseková E, Žilka N, Kovacech B, Novak P & Novak M (2014) First-in-man tau vaccine targeting structural determinants essential for pathological tau-tau interaction reduces tau oligomerisation and neurofibrillary degeneration in an Alzheimer's disease model. *Alzheimers Res Ther* **6**, 44, doi: 10.1186/alzrt278.
3. Novak M, Kabat J & Wischik CM (1993) Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament. *Embo J* **12**, 365-370.
4. von Bergen M, Friedhoff P, Biernat J, Heberle J, Mandelkow EM & Mandelkow E (2000) Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5129-5134.
5. Kontseková E, Žilka N, Kovacech B, Škrabana R & Novak M (2014) Identification of structural determinants on tau protein essential for its pathological function: novel therapeutic target for tau immunotherapy in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* **6**, 45, doi: 10.1186/alzrt277.



Molekulový povrch aktívneho miesta protilátky DC8E8.

MALÉ NEUROTROFICKÉ MOLEKULY A ICH POTENCIÁL PRI LIEČENÍ NEURODEGENERAČNÝCH OCHORENÍ

Weissová P.

Axon Neuroscience SE, Bratislava

Keďže priemerná dĺžka života sa zvyšuje, prevalencia neurodegeneračných ochorení narastá, čo následne vedie ku vážnym socio-ekonomickým dôsledkom. S nárastom výskytu neurologických ochorení súvisí aj zvýšenie nákladov na zdravotnú starostlivosť pacientov a ich poskytovateľov zdravotnej starostlivosti. Napriek veľkým pokrokom v objasňovaní patofyziológie týchto ochorení ako aj so zvyšujúcim sa počtom klinických skúšok prebiehajúcich v súčasnosti, doposiaľ neexistuje efektívna liečba týchto ochorení. Väčšina testovaných neuroprotektívnych stratégií v klinických skúškach doposiaľ úplne zlyhala alebo preukázala len minimálny účinok.

Alzheimerova choroba ako príklad neurodegenerácie s najväčším výskytom, ktorá je úzko spojená so starnutím, spôsobuje nielen veľkú sociálnu a ekonomickú záťaž, ale je zároveň aj obrovskou výzvou pre vedeckú komunitu. V súčasnosti asi 25-35 miliónov ľudí po celom svete trpí týmto ochorením a predpokladá sa až ztrojnásobenie do roku 2050. Vzhľadom na vysokú mieru prevalencie a multifaktoriálny charakter tohto ochorenia sa v posledných rokoch výskum prevažne zameriava nielen na inhibíciu samotnej neurodegenerácie, ale hlavne aj na stimuláciu a podporu neuroregenerácie.

V posledných rokoch došlo k významnému posunu v testovaní potenciálu nových neuroregeneratívnych prístupov v liečbe neurologických ochorení. Koncept použitia

tzv. malých neurotrofických molekúl (small molecule compound) a ich aplikácia na terapeutické účely existuje už viac rokov, avšak objavenie nových spôsobov ich doručenia do organizmu, detailnejšia charakterizácia a objasňovanie mechanizmu ich účinku na molekulárnej úrovni, významne posunuli hranicu ich aplikácie a zdôraznili ich potenciál v klinických štúdiách.

SÚČASNÝ STAV BIOLOGICKEJ LIEČBY V NEUROLOGII

Lisý Ľ.

Neurologická klinika LF SZU a UNB, Bratislava Ružinov

Cielená biologická liečba v neurologii pokročila v posledných rokoch vďaka pokroku etiopatogenetickej diagnostiky mnohých ochorení, čo bolo umožnené použitím nových metód molekulárnej genetiky a imunológie. Dôležitou cestou pokroku sa stala dostupnosť vyšetrovania biomarkerov za účelom ďalšieho špecifikovania jednotlivých podtypov neurologických ochorení. V odbore neurologia nadobúda biologická liečba svoje miesto nielen u imúnne a degeneratívne podmienených ochorení nervového systému, ale tiež u širokého spektra mnohých ďalších stavov ako sú napríklad nádorové ochorenia, cievne ochorenia CNS, neuropsychiatrické ochorenia a bolesti. Imunologické metódy sa dnes takto používajú nielen vo výskume, ale už aj v širokej klinickej praxi. Dotýka sa to nielen v diagnostiky, ale aj liečby už zistenej konkrétnej poruchy. V prednáške na príklade hlavne ochorenia typu sclerosis multiplex je demonštrovaný súčasný pokrok v neurologii v tejto oblasti.

PREHĽAD BIOLOGICKEJ LIEČBY NA DERMATOVENEROLOGICKEJ KLINIKE LFUK A UN BRATISLAVA

Šimaljaková M.

Dermatovenerologická klinika LFUK a UN Bratislava

Dermatológia je jedna zo špecializácií, ktorá tiež využíva biologickú liečbu. Na Slovensku sa biologickou liečbou lieči asi 800 pacientov trpiacich na *psoriasis vulgaris*. „Off label“ sa biologikami liečia aj ťažké formy *hidradenitis suppurativa* a *granuloma anulare*. Nové molekuly – secukinumab, omalizumab – rozširujú možnosti liečby psoriázy a chronickej spontánnej urtikárie. Dermatovenerologická klinika má súbor 186 pacientov liečených na psoriázu biologickou liečbou, z nich je 65 % mužov a 35 % žien vo veku $49,1 \pm 11,8$ rokov. Okrem psoriázy sa u pacientov zistili pridružené choroby:

v 43 % psoriatická artritída, v 61 % iné komorbidity, ako je hypertenzia (25 %), obezita (22 %) hepatopatia (18 %) a ďalšie.

Prvým biologikom sa lieči 61 % pacientov, 30 % druhým, 7 % tretím, dvaja pacienti štvrtým a jeden pacient šiestym. Štandardná systémová liečba, najčastejšie metotrexát, bola v 41 % pridaná k infliximabu, v 20 % k ustekinumabu a v 5 % k adalimumabu a etanerceptu a to z dôvodu tvorby neutralizačných protilátok a z nedostatočnej účinnosti. Priemerné zotrvanie na biologickej liečbe, bez ohľadu na liek, bolo 59,8 mesiacov, 25 % pacientov ukončilo liečbu do 19 mesiacov. Priemerné trvanie ukončených terapií bolo 14,2 mesiaca. Terapiu na etanercepte ukončilo 41 %, na adalimumabe 35 %, na infliximabe 26 % a na ustekinumabe 23 % pacientov. Najčastejším dôvodom bola nedostatočná účinnosť alebo postupná strata účinnosti a nežiaduce účinky liekov. PASI skóre na začiatku liečby bolo 10 – 65,8. Do 12 mesiacov dosiahlo zlepšenie klinického nálezu na úrovni PASI 75 85 % pacientov.

Biologiká majú vynikajúci efekt v liečbe chronickej ložiskovej psoriázy. Účinnosť liečby sa znižuje s jej dĺžkou a v dôsledku tvorby neutralizujúcich protilátok. Efekt biologickej liečby zvyšuje kombinácia so štandardnou liečbou, najmä metotrexátom. V súbore neboli medzi jednotlivými biologikami zistené významné rozdiely v účinnosti ani v adherencii k liečbe. Zaznamenali sme minimum nežiaducich účinkov, najviac pri aplikácii infliximabu.

INFLIXIMAB V LIEČBE PSORIÁZY: VÝHODY A NEVÝHODY

Gulanová B., Šimaljaková M.

Dermatovenerologická klinika LFUK a UN Bratislava

Psoriasis vulgaris (PsV) je chronická zápalová choroba kože, ktorá sa vyvíja na podklade autoimunitných procesov. V jej liečbe sa v ostatnej dobe začali používať aj chimérové monoklonové protilátky anti-TNF – infliximab. Infliximab je schválený na liečbu ťažkej psoriázy a stredne ťažkej až ťažkej psoriatickej artritídy. Schválenie liečby poisťovňou a ministerstvom zdravotníctva pre konkrétneho pacienta je podmienené neúčinnosťou, alebo kontraindikáciami dostupnej celkovej liečby (cyklosporín A, metotrexát, acitretín), postihnutím viac ako 10 % povrchu tela (BSA – *body surface area*) alebo PASI (*psoriasis area severity index*) viac ako 10. Dávkovanie je 5 mg na kg hmotnosti pacienta v infúzii v týždni 1, 2, 6 a potom každých 6 – 8 týždňov; interval sa môže prispôbiť. Odpoveď na liečbu je rýchla: 50 % pacientov dosiahne PASI 75 už v 2. týždni, 80 % pacientov v 10. týždni. Z dlhodobého hľadiska 61 % pacientov dosahuje PASI 75 v 50. týždni liečby. Medzi nevýhody liečby patrí, že po istom čase môže dochádzať k znižovaniu účinnosti preparátu, pretože niektorí pacienti môžu tvoriť proti inflixima-

bu neutralizačné protilátky. Tieto sú často aj dôvodom nežiaducich účinkov v podobe infúzných reakcií. Podávanie metotrexátu ako adjuvantného liečiva tvorbu protilátok znižuje, a tým predlžuje a zlepšuje účinnosť infliximabu. Na Dermatovenerologickej klinike LFUK a UN Bratislava sa doteraz liečilo biologickou liečbou 186 pacientov, v súčasnosti sa infliximabom lieči 36 pacientov so psoriázou, jeden pacient má psoriázu aj *hidradenitis suppurativa*, 5 pacientov má *hidradenitis suppurativa*, jeden pacient má *granuloma perforans*. Pacienti so psoriázou mali pri začatí liečby PASI v priemere 22,0; v súčasnosti 0,5 až 1,0. 19 psoriatických pacientov je na kontinuálnej liečbe infliximabom už viac ako 8 rokov. Pre neúčinnosť muselo liečbu prerušiť 6 pacientov, z toho 4 muži a 2 ženy, pre nežiaduce účinky 5 mužov a dve ženy. Zmenu biologickkej liečby z iného preparátu na infliximab malo spolu 20 pacientov a z toho 15 mužov a 5 žien. Metotrexát ako adjuvantnú liečbu malo pridaný 8 mužov a 2 ženy.

Neutralizácia TNF vyzerá byť užitočná v liečbe mnohých autoimunitných a iných chorôb. Infliximab je efektívnou liečbou pre pacientov so stredne ťažkou až ťažkou psoriázou. Pri kontinuálnom podávaní možno dosiahnuť aj jej dlhšiu remisiu.

BIOLOGICKÁ LIEČBA DERMATÓZ MIMO INDIKAČNÉHO OBMEDZENIA

Rajczyová Z., Gulanová B., Šimaljaková M.

Dermatovenerologická klinika LF UK a UN, Bratislava

Biologická liečba sa uplatňuje u pacientov, ktorí netolerujú štandardnú systémovú liečbu alebo u ktorých táto liečba zlyhala. V súčasnosti sú na Slovensku pre biologickú liečbu v dermatológii k dispozícii infliximab, etanercept, adalimumab, ustekinumab, omalizumab a secukinumab. Indikácie biologickkej liečby v dermatológii sú stredne závažná až závažná ložisková psoriáza a chronická spontánna urtikária. Podľa literatúry sa biologická liečba ojedinele používa i pri iných dermatózach. K diagnózam, u ktorých sa uplatnila biologická liečba patrí napr. chronická spontánna urtikária, bulózne dermatózy, *hidradenitis suppurativa*, malígne nádory kože a iné.

Na Dermatovenerologickej klinike v Bratislave máme skúsenosti s „off label“ použitím infliximabu (IFX) u pacientov s *hidradenitis suppurativa* a *granuloma annulare*. *Hidradenitis suppurativa* (HS) je autoimunitná zápalová choroba vznikajúca na podklade dysregulácie vrodenej imunity. V liečbe sa indikujú rôzne protizápalové a imunomodulačné prípravky. Z biologík je to anakinra, antagonist receptoru pre IL-1 a canakinumab, humánna monoklonová protilátka (mAb) proti IL-1 β . Zvýšené hladiny IL-17A a p19 IL-23 mRNA pri HS, poukazujú na vhodnosť liečby ustekinumabom, humánnou mAb proti p40-reťazcu IL-12 a IL-23. 10F8 je plne humánna protilátka proti IL-8, ktorá blokuje aktiváciu a migráciu neutrofilov vo vysokej miere zastúpených v abscesoch

HS. Z dostupných preparátov sú to anti-TNF prípravky. Infliximab (IFX) bol indikovaný u 8 pacientov so stredne závažnou až závažnou formou *hidradenitis suppurativa* (HS); jeden z pacientov mal okrem HS aj *psoriasis vulgaris*. U všetkých pacientov boli pred nastavením na biologickú liečbu vyčerpané dostupné liečebné možnosti (antibiotiká – doxycyklín, rifampicin v kombinácii s klindamycínom, retinoidy – izotretinoín, acitretín, kortikosteroidy, dapson a chirurgické ošetrenie). V súbore sú 4 muži a 4 ženy, s priemerným vekom 43,5 roka. Všetci pacienti s HS majú rizikové faktory – nadváhu až obezitu, fajčili alebo stále fajčia. Dĺžka liečby je doteraz 39 – 321 týždňov v intervale podávania infúzie 8 týždňov u dvoch pacientov, u 4 pacientov je režim intenzifikovaný na 6 týždňov a u dvoch pacientov na 4 týždne. Kompletná terapeutická odpoveď bola dosiahnutá u jednej pacientky, temer úplná odpoveď u troch pacientov, čiastočná terapeutická odpoveď bola dosiahnutá tiež u troch 3 pacientov a málo výrazné zlepšenie u jedného pacienta. U dvoch pacientok sa liečba pre prítomnosť protilátok proti IFX a infúzne reakcie musela ukončiť.

Infliximab sa použil i v liečbe 54-ročného pacienta s *granuloma annulare perforans*. Pacient bol predtým opakovane liečený cyklosporínom A, imunostimulanciami, metizoprinoloma dapsonom bez výraznejšieho efektu. Interval podávania infliximabu u pacienta je 8 týždňov. V priebehu 22 týždňov liečby u pacienta nastalo výrazné zlepšenie kožného nálezu.

Biologická liečba je alternatívnou možnosťou u pacientov s HS, u ktorých zlyhajú všetky dostupné liečebné možnosti. Možnou komplikáciou liečby je tvorba protilátok proti infliximabu. Klinické štúdie a dlhšie skúsenosti s biologickou liečbou dermatóz mimo indikačného obmedzenia nám umožnia rozšíriť použitie biologickej liečby i u pacientov s inými dermatózami, ktoré nereagujú na štandardnú dostupnú liečbu.

CHRONICKÁ SPONTÁNNÁ URTIKÁRIA

Šustrová E., Šimaljaková M.

Dermatovenerologická klinika LFUK a UN, Mickiewiczova 13, 813 69 Bratislava

Urtikária je ochorenie charakterizované výskytom urtik, angioedému alebo oboch. Je dôležité odlíšiť iné stavy od urtikárie, kedy sa môžu vyskytnúť urtiky a/alebo angioedém. Chronická urtikária trvá viac ako 6 týždňov, jej prevalencia je 0,5 %. Urtiky sú charakterizované centrálnym edémom rôznej veľkosti, takmer vždy s reflexným erytematóznym lemom, sú spojené so svrbením, niekedy pálením a v priebehu 1 – 24 hodín sa vstrebú bez stopy. Angioedém je charakterizovaný náhlym edémom spodnej časti dermy a hypodermys s častým výskytom na slizniciach a trvá do 72 hodín. Pacienti sa sťažujú na svrbenie a bolestivosť.

Chronická urtikária sa delí na chronickú spontánnu urtikáriu a chronickú indukovateľnú urtikáriu. Podtypy chronickej indukovateľnej urtikárie sú: symptomatický dermografizmus, chladová urtikária, oneskorená tlaková urtikária, solárna urtikária, tepelná urtikária, vibračný angioedém, cholinergická urtikária, kontaktná urtikária a akvagénna urtikária. Chronická spontánnu urtikária je vyvolaná známymi alebo neznámymi príčinami. Okolo 45 % pacientov má protilátky typu IgG proti IgE alebo proti IgE receptoru na mastocytoch. Na hodnotenie aktivity ochorenia sa odporúča jednoduchý bodový systém UAS7; pacient hodnotí urtiky a pruritus počas 7 po sebe nasledujúcich dní. Diagnostika chronickej spontánnej urtikárie sa opiera o dôslednú anamnézu a typický klinický obraz. Odporúča sa vyšetriť sedimentáciu erytrocytov, CRP a diferenciál z krvného obrazu. Ďalšie vyšetrenia sa indikujú podľa anamnézy. Podľa odporúčaní EAACI/GA²LEN/EDF/WAO z roku 2013 sa liečba chronickej spontánnej urtikárie indikuje v troch líniách. Prvá línia predstavuje podanie druhej generácie H1-antihistaminík raz denne. Ak symptómy po dvoch týždňoch pretrvávajú, treba zvýšiť dávku druhej generácie H1-antihistaminík až štvornásobne. Ak symptómy pretrvávajú po ďalších 1 – 4 týždňoch, k liečbe treba pridať lieky z druhej línie – omalizumab alebo cyklosporín A alebo lieky tretej línie – montelukast. Pri exacerbácii prejavov je možné pridať do liečby systémové kortikosteroidy krátkodobo (3 – 7 dní). Druhá generácia H1-antihistaminík vo viacnásobnom dávkovaní, podanie cyklosporínu A alebo montelukastu je v indikácii chronickej urtikárie mimo rámca ich SPC (off-label). Cieľom liečby pacientov s chronickou spontánnou urtikáriou je zbaviť ich akýchkoľvek príznakov.

IMUNOTERAPIA V ONKOLÓGII

Špánik S.

*Interná – onkologická klinika, Onkologický ústav sv. Alžbety,
I. Onkologická klinika OÚSA a LFUK*

Imunoterapia v onkológii nie je novinka. Skúšala sa vo forme aplikácie atenuovaných nádorových buniek, niekoľko rokov bola štandardná liečba renálneho karcinómu a malígneho melanómu cytokínmi (interferón, interleukín 2). V súčasnosti ide predovšetkým o ovplyvnenie negatívnych regulačných faktorov imunitnej odpovede ako je CTLA-4 (antigén 4 cytotoxického T lymfocyty – cytotoxic T lymphocyte antigen 4), PD-1 (programmed cell death protein 1 – protein 1 programovanej smrti bunky) a ligandov PD-L1 a PD-L2 (ligandy 1 a 2 programovanej smrti bunky). Mnohé lieky, ktoré účinkujú uvedenými mechanizmami sú už v klinickej praxi a mnohé v rôznych fázach klinického skúšania.

Kľúčové slová: imunoterapia, regulačné mechanizmy – „checkpointy“ (strážne body), CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2

LOKÁLNY IMUNOPROFIL KARCINÓMOV – NOVÁ ÉRA KLASIFIKÁCIE TUMOROV

Hrubiško M.

Onkologický ústav svätej Alžbety, Bratislava

Text približuje aktuálne poznatky o mechanizmoch, ktorými imunitný systém na jednej strane bráni vzniku a vývoju tumorov, na druhej strane ktorými naopak ich vzniku a rozvoju prispieva. V ďalšej časti sa autor zamýšľa, či a ako môže k zhodnoteniu stavu pacienta a jeho prognóze prispieť meranie imunitných parametrov z periférnej krvi. Upozorňuje sa na relatívne obmedzenú výpovednú hodnotu periférnych parametrov a zdôrazňuje sa potreba ich sledovanie v dynamike. V tretej časti autor približuje novo vznikajúcu oblasť imuno-onkológie, ktorou je stanovovanie lokálneho imunitného infiltrátu, tzv. imunoscóre, ktoré môže významne spresniť klasifikáciu pacientov v čase stanovania diagnózy, aj počas liečby. Na rozdiel od zaužívanej TNM klasifikácie nádorov môže lokálny imunoprofil pomôcť odhadnúť odpoveď pacienta na liečbu.

Kľúčové slová: malígny nádory, lokálny imunitný infiltrát, lokálne imunoscóre.

ČREVNÁ MIKROBIOTA A PEČEŇ

Oltman M., Smutný M.

Gastroenterologicko-hepatologické centrum THALION, Bratislava

Komenzálne mikroorganizmy (mikrobiota) predstavujú populáciu rôznorodých mikrobiálnych, prevažne baktériových druhov, obývajúcich určitú časť organizmu. Črevo s jeho mikrobiotou je jedným z najkomplexnejších ekosystémov spoločnej existencie baktérií a našich buniek. Sú „odsúdené“ na večnú spoluprácu a pri výpadku funkcie/funkcií jedného z nich dochádza k vzniku porúch až vážnych chorôb.

Existuje množstvo údajov potvrdzujúcich rozhodujúcu úlohu zmenenej mikroflóry pri vývoji nielen organických chorôb čreva ako sú IBD (chronické nešpecifické choroby čriev), ale aj funkčných ako je napr. IBS (syndróm dráždivého tračníka). Ďalším nevyhnutným účastníkom tohto magického trojuholníku je pečeň, a to nielen z anatomickeho hľadiska. Akceptuje sa, že masa mikroorganizmov v čreve, okrem veľmi podobnej hmotnosti akú má pečeň, má minimálne rovnakú metabolickú aktivitu ako pečeň samotná. Preto nie je žiadnym prekvapením, že táto metabolická aktivita priamo alebo nepriamo imuno-biochemickými mechanizmami ovplyvňuje zdravie čreva, pečene a nakoniec aj celého organizmu. Steatóza pečene, NASH (nealkoholová steatohepatitída), ALD (alkoholová choroba pečene), cirhóza a HCC (hepatocelulárny kar-

cinóm) sú všetko stavy, pri ktorých pribúdajú vedomosti potvrdzujúce vplyv črevnej mikrobioty na ich vývoj.

Manipuláciou zloženia črevných mikroorganizmov, resp. manipuláciou rôznych faktorov ako je druh diéty, alkohol, obezita, slizničný imunitný systém, črevná bariéra a permeabilita, možno predchádzať alebo prispievať k vzniku vyššie uvedených chorôb. Práve na počiatku vzniku, rozvoja a udržiavania metabolického syndrómu stojí črevná mikrobiota, na ktorú „nasadá“ náš tragicky nevhodný životný štýl a životné prostredie. Zdá sa, že črevná mikrobiota môže byť jednou z hlavných príčin iniciácie chorôb rôznych orgánových systémov, a teda nenaplnenia genetickej predispozície z hľadiska dĺžky života pre tzv. civilizačné choroby.

OČKOVANIE DOSPELÝCH A SENIOROV – NOVÁ ÉRA VAKCINÁCIE

Hrubiško M.

Onkologický ústav sv. Alžbety, Bratislava

Jednou z úloh medicíny 21. storočia bude vyrovnáť sa so starnutím svetovej populácie, zvlášť vo vyspelých krajinách. Popri kardiovaskulárnych, onkologických či chorobách pohybového aparátu treba riešiť aj infekčnú morbiditu a mortalitu, ktorá sa po 50 roku života významne zvyšuje. V tejto súvislosti sa vynára význam očkovania dospelaj populácie. V príspevku približujeme očkovanie proti herpesu zoster, ktorý sa stáva preventabilnou chorobou a očkovanie proti ľudským papilómavírusom, z ktorých mnohé majú výrazný proonkogénny potenciál. Očkovanie ako prevencia rakoviny je novou a perspektívnou oblasťou medicíny.

Kľúčové slová: očkovanie, herpes zoster, ľudské papilómavírusy.

INTERLEUKÍN 2 V LIEČBE AUTOIMUNITNÝCH CHORÔB

Buc M.

Imunologický ústav LFUK, Bratislava

Viaceré autoimunitné choroby sa vyznačujú tým, že je pri nich nedostatočný počet alebo nedostatočná aktivita regulačných T-lymfocytov. Z uvedeného vyplýva, že ak by sa podporila ich aktivita, došlo by aj k útlmu alebo aj úplnému zastaveniu autoimunitných procesov. Zatiaľ však neexistuje prípravok, ktorý by zvyšoval aktivitu nTreg-lymfocytov. Na druhej strane však pribudli poznatky o biologickej funkcii regulačných T-lymfocytov, z ktorých vyplynulo, že interleukín 2 je principiálnym faktorom, ktorý zabezpečuje ich prežívanie na periférii a tak umožňuje, aby presadzovali svoju imunosupresívnu funkciu. Navyše nTreg-lymfocyty odpovedajú na IL-2 vo veľmi nízkych koncentráciách. Uvedená vlastnosť nTreg-lymfocytov privedla vedeckých a klinických pracovníkov na myšlienku využiť nízkodávkové podávanie interleukínu 2 v liečbe niektorých autoimunitných chorôb. Predbežné výsledky sú veľmi nádejné, a tak dochádza k ďalšiemu rozšíreniu spektra disponibilných biologík.

Kľúčové slová: autoimunitné choroby, IL-2, IL-2 receptor, nTreg-lymfocyty

NUKLEOVÉ KYSELINY AKO BIOLOGIKÁ: RENESANCIA ALEBO NOVÝ TREND?

Filipčík P., Fečík M., Čente M., Novák M.

Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, Bratislava

Biologiká na báze nukleových kyselín sú predmetom experimentálneho výskumu už veľmi dlhú dobu. Prvá oficiálne povolená a úspešná génová terapia bola vykonaná takmer presne pred štvrtým storočím (14. septembra 1990) a išlo o liečbu syndrómu ťažkej kombinovanej imunodeficiencie. Avšak po prvotnej eufórii došlo následkom niekoľkých experimentov s tragickým koncom k zákazu klinického testovania génovej terapie. Explózívny vývoj technológií z konca minulého a začiatku dvadsiateho prvého storočia však predznamenal jej návrat.

Jedným zo základných míľnikov tohoto vývoja bolo uvedenie novej generácie sekvenovania nukleových kyselín, zníženie nákladov a skrátenie času potrebného na osekvenovanie celého ľudského genómu na prijateľnú úroveň. Ďalším prelomom bolo objavenie nových spôsobov editovania genómu pomocou nukleoproteínov alebo génovo špecifickej sekvencie pomerne krátkych oligonukleotidov a s nimi asociovaných nukleáz [1], ako aj vyvinutie bezpečných systémov na prenos genetickej informácie do rôznych typov deliacich sa i nedeliacich sa buniek [2]. Vývoj však išiel

ešte ďalej, možno až za hranice, ktoré by nemali byť prekročené, a na jar v roku 2015 bolo po prvýkrát v histórii publikované editovanie ľudskej zárodočnej línie [3,4].

V tomto príspevku sa zaoberáme popisom a analýzou súčasnej situácie v oblasti novovzniknutých experimentálnych možností molekulárneho editovania ľudského genómu. Predpokladáme, že je veľmi dôležité poukázať na skutočnosť, že technické výtobytky a pokroky v molekulárnej biológii nás posunuli na hranicu možností, kde najpodstatnejším nebude technologický pokrok, ale etický rozmer vykonávaných experimentov v laboratóriách základného výskumu a v klinickej praxi.

Referencie:

1. Jinek M. et al. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*. 2014 Mar 14;343(6176):1247997. doi: 10.1126/science.1247997. Epub 2014 Feb 6.
2. Pierce EA, Bennett J., The Status of RPE65 Gene Therapy Trials: Safety and Efficacy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015 Jan 29;5(9). pii: a017285. doi: 10.1101/cshperspect.a017285.
3. Liang P et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*. 2015 May;6(5):363-72. doi: 10.1007/s13238-015-0153-5.
4. Baltimore D et al. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science*. 2015 Apr 3;348(6230):36-8. doi: 10.1126/science.aab1028. Epub 2015 Mar 19. *Biotechnology*.

**PREHĹADNÉ
ČLÁNKY**

IMUNOTERAPIA ALZHEIMEROVEJ CHOROBY

¹Michal Novák, ¹Eva Kontseková, ¹Norbert Žilka,

^{1,2}Branislav Kováčech, ¹Petr Novák

¹ AXON Neuroscience, Dvořákovo nábrežie 10, 811 02, Bratislava

² Neuroimunologický ústav SAV, 84510, Bratislava

Abstrakt

V priebehu niekoľkoročného výskumu sme identifikovali špecifické časti molekuly tau proteínu, ktoré sú esenciálne pre reguláciu patologickej interakcie s inými molekulami tau. Objavili sme ich pomocou monoklonálnej protilátky DC8E8 a ukázali sme, že sú novým a originálnym cieľom pre terapiu Alzheimerovej choroby (demencia Alzheimerovho typu, DAT). Súčasne sme vyvinuli aktívnu vakcínu AADvac1, pomocou ktorej sme overili správnosť pôvodnej hypotézy a dôležitosti tejto časti molekuly tau pre patogenézu DAT. Efektívnosť vakcíny bola otestovaná na potkaňom modeli ľudských tauopatií. Toxikologické a bezpečnostné štúdie vakcíny boli vykonané na niekoľkých druhoch experimentálnych zvierat. Naše výsledky ukázali, že vakcína vedie k indukcii robustnej protektívnej protilátkovej imunitnej odpovede indukujúcej tvorbu protilátok schopných diskriminovať fyziologickú a patologickú formu proteínu tau. Aktívna imunoterapia spôsobila redukciu hladiny oligomérneho tau proteínu, ako aj rozsah neurofibrilárnej patológie v mozgu transgénnych zvierat. Hyperfosforylácia tau proteínu bola redukovaná o 95%. Klinický fenotyp zvierat bol taktiež vylepšený. Záverom možno konštatovať, že aktívna vakcinácia viedla k eliminácii agregácie tau proteínu a neurofibrilárnej patológie. Aktívna imunizácia viedla k odstráneniu všetkých hlavných znakov neurofibrilárnej patológie čo sa odrazilo na významnom zlepšení klinického stavu imunizovaných transgénnych zvierat. Vakcína má veľmi dobrý bezpečnostný profil v preklinických štúdiách, a to z nej robí atraktívneho kandidáta pre použitie v profilaxii DAT. Vakcína už úspešne absolvovala I. fázu klinického testovania pod menom AADvac1.

Kľúčové slová: Alzheimerova choroba, tau proteín, anti-tau vakcína, aktívna imunoterapia, neurofibrilárne kľbká

Úvod

V priebehu Alzheimerovej choroby dochádza v mozgu pacienta k šíreniu patológie, čo postupne znefunkčňuje zasiahnuté oblasti a vedie k poklesu kognitívnych funkcií. Priestorová distribúcia a veľkosť neurofibrilárnych lézií veľmi dobre korelujú s kognitívnym poškodením a atrofiou mozgu pozorovanou u pacientov s DAT [1-3]. V situácii, keď neexistuje efektívna terapia a populácia postupne starne, počet pacientov prudko narastá. V dnešnom svete je viac ako 30 miliónov ľudí postihnutých demenciou a prepokladá sa, že počet pacientov do roku 2050 stúpne na 100 miliónov [4]. Súčasná farmakologická liečba je založená na podávaní inhibítorov acetylcholinesterázy a umožňuje potlačenie symptómov na približne 12 mesiacov [5], avšak nezastavuje progresiu ochorenia. Je dôležité si uvedomiť, že žiadny nový liek proti DAT nebol uvedený na trh už takmer 17 rokov. Aj z tohoto dôvodu existuje obrovský dopyt pre vývoj choroby modifikujúcich liečiv pre DAT, teda takých, ktoré by mohli zmierniť alebo dokonca zvrátiť neurodegeneratívny proces tým, že zasahujú hlavnú príčinu ochorenia – ako je neurofibrilárna patológia.

Koncept imunoterapie získal silnú pozíciu v oblasti liečby DAT [6]. Doteraz boli imunoterapeutické prístupy testované v klinických štúdiách s cieľom pôsobiť proti amyloidovej patológii, a tým zlepšiť kognitívne parametre [7]. Napriek tomu, že aktívna aj pasívna imunizácia proti beta-amyloidu (β -A4), bola schopná vyčistiť mozgové plaky a zlepšiť kognitívnu výkonnosť v početných štúdiách na myších modeloch [8], klinické štúdie niekoľkých imunoterapeutík zameraných na β -A4 ukázali malú alebo žiadnu kognitívnu účinnosť [6]. Preto sa teraz veľká pozornosť zameriava na imunoterapiu zacielenú na tau proteín [9-12]. Niekoľko nezávislých štúdií na experimentálnych modeloch ukázalo, že aktívna a pasívna imunizácia proti tau bola účinná a znižovala záťaž mozgu spôsobenú neurofibrilárnymi kľbkami (NTFs), viedla k spomaleniu progresie behaviorálneho fenotypu alebo k oddialeniu nástupu motorických defektov ako aj nástupu chudnutia v myších modeloch neurofibrilárnej patológie [13-19].

V súčasnosti navrhované anti-tau imunoterapeutické prístupy sú selektívne zacielené na jednotlivé fosforylované epitopy tau ako napríklad fosfo-Ser396 / fosfo-Ser404 [13, 14, 16], fosfo-Thr231 / fosfo-Ser235 [20] alebo fosfo-Ser422 [19]. Avšak, tau je fosfoproteín, ktorý obsahuje 85 možných serín, treonín a tyrozín-fosforylačných miest. Hmotnostná spektrometrická analýza v kombinácii s Edmanovou sekvenáciou a špecifickou reaktivitou protilátok ukázala, že v normálnom mozgu môže byť detekovaných takmer 10 fosforylačných miest na tau

proteíny (Ser46, Thr181, Ser199, Ser-202, Thr-231, Ser-404, Ser412 / Ser413 / Thr414, Ser416), kým v mozgu pacientov s DAT to je približne 45 fosforylačných miest [21, 22]. Tieto výsledky naznačujú, že niektoré z fosforylačných miest, na ktoré sú zacielené spomínané imunoterapie sú prítomné aj u zdravých ľudí. Toto zistenie vyvoláva obavy o bezpečnosť vakcín špecializovaných na fosfoepitopy tau proteínu. Na druhej strane, tieto terapeutické prístupy sú selektívne zacielené iba na jeden alebo dva z celkového množstva 45 identifikovaných fosfoepitopov v mozgu pacientov s DAT. Okrem toho platí, že funkčný význam cieľových fosfoepitopov je zatiaľ stále nejasný. Rovnako nie je známe, či všetky z patologických DAT fosfoepitopov sú prítomné na rovnakej molekule tau, alebo či sa odlišné poddruhy patologického tau proteínu premietajú do radu rôznych fosforylačných vzorcov. Na základe týchto obmedzení možno predpokladať, že účinná imunoterapia proti chorej forme tau by mala byť zameraná na spoločného menovateľa choreho tau proteómu – teda na zraniteľnú oblasť na tau zodpovednú za jeho oligomerizáciu, a to nezávisle od jej rôznych fosforylačných vzorcov. Preto sme zamerali náš imunoterapeutický prístup na štrukturálne faktory potrebné pre patologickú intermolekulárnu tau-tau interakciu s úmyslom zabrániť tau hyperfosforylácii, oligomerizácii a následnému rozvoju neurofibrilárnej degenerácie práve prostredníctvom blokovania kľúčových oblastí regulujúcich túto interakciu.

Výsledky

Aktívna vakcína (tau peptid) obsahuje štrukturálne determinanty na proteíny tau, ktoré sú nevyhnutné pre jeho patologické interakcie a indukuje tvorbu protilátok, rozpoznávajúcich patologickú formu tau

Monoklonálna protilátka DC8E8 rozpoznáva motív HVPGGG, ktorý je kľúčový pre reguláciu patologickej medzimolekulovej interakcie tau proteínu. Tento motív je preto vhodným cieľom pre terapiu Alzheimerovej choroby a iných tauopatií. Vychádzajúc z tohto predpokladu, skonštruovali sme aktívnu peptidickú vakcínu ako konjugát peptidu 294KDNIKHVPGGGS305 a nosiča (KLH), pričom na konjugáciu slúžil cysteín dizajnovaný na N-koniec tau peptidu. Jedna dávka vakcíny obsahovala 100 µg konjugátu.

Transgénné potkany línie SHR72 boli imunizované piatimi dávkami pripravenej aktívnej tau-vakcíny, Imunizácia začala u dva mesiace starých potkanov, pokračovala po troch týždňoch od prvej aplikácie, a ďalej v mesačných intervaloch. Po skončení experimentu, v 6,5 mesiaci života, bola transgénnym zvieratám odobratá krv zo srdcovej komory. Špecifické anti-tau protilátky v imúnnej sére boli kvantifikované pomocou nepriamej ELISA proti syntetickému

tau peptidu 294KDNIKHVPGGS305, ďalej proti skrátenému tau 151-391/4R a najdlhšej tau izoforme 2N4R. Vakcína vyvolala silnú špecifickú odpoveď u imunizovaných zvierat. Zatiaľ čo kontrolné séra zvierat imunizovaných samostatne iba adjuvantom nevykazovali žiadnu špecifickú reaktivitu, geometrické priemery titrov (GMT) zvierat imunizovaných tau vakcínou vykazovali vysokú reaktivitu voči tau peptidu (21 000) a skrátenému tau (15 000). Je pozoruhodné, že titre voči najdlhšej izoforme tau (4 000) boli v priemere približne päťkrát nižšie, ako voči skrátenému tau alebo tau peptidu. Tento rozdiel bol štatisticky významný s $p=0,0039$ pre tau peptid a $p=0,0355$ pre skrátené tau. Možno konštatovať, že vakcinácia konjugátom tau peptidu indukuje protilátky špecificky zacielené proti skrátenému tau, a tak rozlišuje medzi fyziologickou a patologickou formou tau proteínu.

Na stanovenie izotypového profilu špecifických protilátok indukovaných vakcináciou konjugátom tau peptidu boli sériové riedenia imúnneho séra analyzované v ELISA naviazaním na skrátený tau proteín a identifikované anti-izotypovými sekundárnymi protilátkami. V imúnnom sére boli prítomné v najväčšom množstve špecifické protilátky triedy IgG1, čo znamená prevládajúci Th2 typ imunitnej odpovede. Naopak, IgM protilátky boli prítomné iba v malom množstve.

Aktívna vakcinácia indukovala terapeutické mechanizmy, ktoré sa prejavili vo forme niekoľkých fenoménov:

1. Výrazné zníženie oligomerizácie a patologickej fosforylácie tau proteínu
2. Zníženie zastúpenia transgénnych potkanov s plne rozvinutou neurofibrilárnou patológiou
3. Zlepšenie senzomotorických funkcií transgénnych potkanov (stanovené podľa série testov výskumu správania – NeuroScale)
4. Vakcináciou generovaná potkania protilátka, rozpoznáva neurofibrilárnu degeneráciu v mozgu pacientov s DAT
5. Aktívna vakcína (tau peptid AADvac1) má priaznivý bezpečnostný profil a je dobre tolerovaná vo všetkých toxikologických testoch a štúdiách bezpečnostnej farmakológie, ktoré s ňou boli vykonané

Okrem týchto vlastností neboli u nej zistené žiadne účinky toxikologického významu pri klinickom pozorovaní, hematologickom vyšetrení a biochemickom vyšetrení krvi. Taktiež koagulačné analýzy, rozbor moču, pitva, histopatologické analýzy CNS a kardiorespiračného systému neukázali žiadne znaky toxicity. Podobne ako aj iné vakcíny obsahujúce hydroxid hlinitý ako adjuvans, subkutánne podanie indukovalo vznik reverzibilných podkožných hrčiek.

Diskusia

Neurofibrilárna patológia vyvolaná patologicky pozmeneným tau proteínom priamo koreluje so stupňom kognitívneho poškodenia pri demencii Alzheimerovho typu [1, 3, 29]. V nedávnej minulosti sme zaznamenali niekoľko terapeutických prístupov zameraných na zablokovanie tau kaskády pri neurodegenerácii. Viaceré tímy potvrdili, že aktívna alebo pasívna imunoterapia zacielená na tau proteín môže znížiť jeho hyperfosforyláciu, inhibovať tvorbu oligomérov a znižovať rozsah neurofibrilárnej patológie [13-16, 18, 19]. Avšak až doteraz žiadny imunoterapeutický prístup cielený na tau proteín neprešiel do klinického výskumu. V našej práci po prvýkrát prinášame predklinickú charakterizáciu aktívnej tau vakcíny, ktorá je predmetom klinického skúšania na ľudských pacientoch. Aktívna vakcína AADvac1 bola testovaná v prvej fáze klinického skúšania (www.clinicaltrials.gov, NCT01850238 and NCT02031198).

Nevyhnutným predpokladom vývoja vakcíny AADvac1 bola identifikácia oblasti tau proteínu, ktorá priamo ovplyvňuje jeho patologickú konformáciu a agregáciu [23]. Sekvencia tejto regulujúcej oblasti bola následne optimalizovaná a použitá pri syntéze aktívnej vakcíny zacielenej proti tauopátiám. Na zvýšenie imunitnej odpovede bol výsledný tau peptid kovalentne spojený s nosičovým proteínom KLH. Keďže predchádzajúce skúšky aktívnej imunizácie zacielenej proti amyloid beta peptidu boli bohužiaľ sprevádzané vážnymi vedľajšími účinkami spôsobenými nežiadúcou Th1 imunitnou odpoveďou [32, 33], našu tau vakcínu sme navrhli tak, aby bunkový komponent imunitnej odpovede bol aktivovaný výhradne sekvenciami cudzorodými ľudskému organizmu, pochádzajúcimi z nosičového proteínu (KLH). Ďalej sme použili adjuvantnú látku špecificky napomáhajúcu Th2 imunitnej odpovedi [34]. Vakcína AADvac1 teda obsahuje B-bunkové epitopy odvodené zo sekvencie tau proteínu a epitopy pomocných T-lymfocytov odvodené výhradne z nosičového proteínu, v kombinácii s Th2-stimulačným účinkom adjuvantu. Th2 humorálna imunitná odpoveď vakcíny bude zacielená výhradne voči pozmenenému tau proteínu.

Vakcína AADvac1 vyvoláva u imunizovaných zvierat robustnú tvorbu špecifických protilátok, ktoré sú namierené voči patologickému tau proteínu. Okrem toho, imunitná odpoveď na aktívnu vakcínu je posunutá smerom k Th2 fenotypu, čo podčiarkuje jej bezpečnosť. Celkovo naše výsledky ukazujú veľmi priaznivý bezpečnostný profil prezentovanej vakcíny, čo bolo potvrdené aj podrobnými toxikologickými štúdiami.

Prehľad literatúry so zameraním na koreláciu AD neuropatologických zmien s kognitívnymi poruchami jasne ukázal, že závažnosť kognitívnych porúch naj-

lepšie koreluje so záťažou spôsobenou neokortikálnymi neurofibrilárnymi kľbkami (NFT) [3]. Okrem toho počet NFT koreluje aj s trvaním ochorenia, čo podporuje myšlienku progresívnej akumulácie tau patológie. Nedávna štúdia ukázala, že NFT koreluje s dobou trvania ochorenia v typických aj atypických prípadoch DAT, čo naznačuje, že distribúcia tau patológie v rôznych oblastiach mozgu určuje špecifický klinický obraz demencie [2]. Okrem toho bolo zistené, že tau patológia je často prítomná aj v podkôrových jadrách mozgu [35], a že motorické zmeny umožňujú predvídať kognitívne a funkčné zmeny ako aj nástup a mortalitu u Alzheimerovej choroby [36].

Na našom pracovisku sme už v minulosti ukázali, že tau patológia je distribuovaná v niekoľkých oblastiach mozgu „tau transgénnych“ potkanov, vrátane predného mozgu a podkôrných oblastiach podobne, ako je to v prípade DAT [24, 27, 37]. Podobne ako u AD, aj v tomto prípade distribúcia patológie v mozgu určuje klinický výsledok. Meraním pomocou série špecifických testov sme zistili, že transgénne potkany trpia neurobehaviorálnym poškodením [26, 38]. Zaujímavé je, že aktívna imunizácia transgénnych potkanov s vakcínou tau peptidu ukázala terapeutický účinok na niekoľkých úrovniach. Po prvé, vakcína efektívne modifikovala progresiu ochorenia, a to tak, že znižovala množstvo tau oligomérov, ktoré sú hlavnými patologickými znakmi DAT, a ktoré dobre korelujú s klinickým výsledkom. Znížila množstvo skorých (oligomérnych) a neskorých (PHF) prejavov tau patológie, čím sa zlepšil zdravotný stav transgénnych potkanov. Po druhé, imunizácia viedla k významnému poklesu patologickej fosforylácie tau proteínu na niekoľkých fosfoepitopoch súvisiacich s DAT, ako napríklad pThr181, Ser202, pThr205, pThr217 a pThr231. Je dôležité poznamenať, že vo väčšine doteraz publikovaných štúdií predklinické vakcíny voči tau proteínu ukázali zníženie fosforylácie tau v transgénnych myšiach mozgov hlavne na tých epitopoch, ktoré boli súčasťou pôvodného imunogénu [13, 18, 19]. Na rozdiel od týchto štúdií, naša imunoterapia je zameraná na veľmi skoré štádium tau oligomerizácie, ktoré predchádza tau hyperfosforylácii, čím odstraňuje tzv. „misdisordered tau“, ktorý je substrátom pre hyperfosforyláciu. To je v súlade s predstavou, že liečba DAT by nemala byť zameraná iba na jeden alebo dva fosfoepitopy, predovšetkým pre výraznú rôznorodosť fosfo-tau v mozgu pacientov s DAT, ktoré sa zúčastňujú na oligomerizácii tau.

Bolo zistené, že u myší môže aktívna imunizácia zlepšiť rôzne neurobehaviorálne parametre. Očkovanie voči tau zlepšuje nielen motorické schopnosti, [13] ale zlepšuje aj krátkodobú pamäť [19]. V našej štúdii sme testovali účinnosť peptidovej vakcíny proti tau pomocou tzv. „NeuroScale“ teda pomocou

batérie behaviorálnych testov, predstavujúcej nový bodovací systém pre fenotypizáciu transgénného modelu tauopátií u potkanov [26].

Naše výsledky jasne ukázali, že vakcinácia zlepšila sensorimotorické poškodenie transgénnych potkanov. V neposlednom rade je dôležité si uvedomiť, že očkovanie vyvolalo špecifické potkanie protilátky, ktoré boli schopné rozpoznať lézie tau vrátane neurofibrilárnych klobiek a neuropilu v mozgu pacientov s DAT. Je preto odôvodnené očakávať, že indukované protilátky budú vykazovať rovnaký vzorec terapeutickej aktivity aj u pacientov s DAT.

Záver

V tejto štúdií sme detailne charakterizovali nový typ aktívnej vakcíny voči tau proteínu. Preukázali sme, že sa vakcína je (a) imunogénna - indukuje silnú protilátkovú odpoveď; (b) špecifická – má len jedno antigénne miesto na tau; (c) selektívna - rozlišuje medzi patologickým a fyziologickým tau; (d) bezpečná – T bunkové epitopy sú odvodené výhradne z nosného proteínu (KLH) a imunitná odpoveď je posunutá na stranu Th2 fenotypu; (e) terapeuticky účinná - redukuje patologickú fosforyláciu tau proteínu a znižuje množstvo patologických oligomérov tau a súčasne zlepšuje neurobehaviorálne parametre imunizovaných zvierat. Aktívna vakcína voči tau, AADvac1, odvodená podľa peptidu 294KDNKHVPGGGS305, po úspešných výsledkoch toxikologických testoch a priaznivých výsledkoch štúdií bezpečnostnej farmakológie, už ukončila I. fázu klinických testov.

Skratky

DAT: demencia Alzheimerovho typu; A β : amyloid beta peptide; KLH: kevhole limpet hemocyanin; NFT: neurofibrillary tangle; PBS: fosfátom tlmený fyziologický roztok; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; PHF: paired helical filaments

Literatúra

1. Braak H, Braak E: Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991, 82:239-259.
2. Murray ME, Graff-Radford NR, Ross OA, Petersen RC, Duara R, Dickson DW: Neuropathologically defined subtypes of Alzheimer's disease with distinct clinical characteristics: a retrospective study. *Lancet Neurol* 2011, 10:785-796.
3. Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, Castellani RJ, Crain BJ, Davies P, Del Tredici K, et al: Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol* 2012, 71:362-381.

4. Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP: The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association* 2013, 9:63-75 e62.
5. Shah S, Reichman WE: Treatment of Alzheimer's disease across the spectrum of severity. *Clin Interv Aging* 2006, 1:131-142.
6. Lemere CA: Immunotherapy for Alzheimer's disease: hoops and hurdles. *Mol Neurodegener* 2013, 8:36.
7. Mangialasche F, Solomon A, Winblad B, Mecocci P, Kivipelto M: Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet neurology* 2010, 9:702-716.
8. Lemere CA, Spooner ET, Leverone JF, Mori C, Iglesias M, Bloom JK, Seabrook TJ: Amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease transgenic mouse models and wildtype mice. *Neurochem Res* 2003, 28:1017-1027.
9. Castillo-Carranza DL, Lasagna-Reeves CA, Kaye R: Tau aggregates as immunotherapeutic targets. *Front Biosci (Schol Ed)* 2013, 5:426-438.
10. Gu J, Sigurdsson EM: Immunotherapy for tauopathies. *J Mol Neurosci* 2011, 45:690-695.
11. Panza F, Frisardi V, Solfrizzi V, Imbimbo BP, Logroscino G, Santamato A, Greco A, Seripa D, Pilotto A: Immunotherapy for Alzheimer's disease: from anti-beta-amyloid to tau-based immunization strategies. *Immunotherapy* 2012, 4:213-238.
12. Yoshiyama Y, Lee VM, Trojanowski JQ: Therapeutic strategies for tau mediated neurodegeneration. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013, 84:784-795.
13. Asuni AA, Boutajangout A, Quartermain D, Sigurdsson EM: Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements. *J Neurosci* 2007, 27:9115-9129.
14. Bi M, Ittner A, Ke YD, Gotz J, Ittner LM: Tau-targeted immunization impedes progression of neurofibrillary histopathology in aged P301L tau transgenic mice. *PLoS One* 2011, 6:e26860.
15. Boimel M, Grigoriadis N, Loubopoulos A, Haber E, Abramsky O, Rosenmann H: Efficacy and safety of immunization with phosphorylated tau against neurofibrillary tangles in mice. *Exp Neurol* 2010, 224:472-485.
16. Boutajangout A, Quartermain D, Sigurdsson EM: Immunotherapy targeting pathological tau prevents cognitive decline in a new tangle mouse model. *J Neurosci* 2010, 30:16559-16566.
17. Chai X, Wu S, Murray TK, Kinley R, Cella CV, Sims H, Buckner N, Hanmer J, Davies P, O'Neill MJ, et al: Passive immunization with anti-Tau antibodies in two transgenic models: reduction of Tau pathology and delay of disease progression. *J Biol Chem* 2011, 286:34457-34467.
18. Theunis C, Crespo-Biel N, Gafner V, Pihlgren M, Lopez-Deber MP, Reis P, Hickman DT, Adolfsson O, Chuard N, Ndao DM, et al: Efficacy and safety of a liposome-based vaccine against protein Tau, assessed in tau.P301L mice that model tauopathy. *PLoS One* 2013, 8:e72301.
19. Troquier L, Caillierez R, Burnouf S, Fernandez-Gomez FJ, Grosjean ME, Zommer N, Sergeant N, Schraen-Maschke S, Blum D, Buee L: Targeting phospho-Ser422 by active Tau Immunotherapy in the THY Tau22 mouse model: a suitable therapeutic approach. *Curr Alzheimer Res* 2012, 9:397-405.
20. Richter M, Hoffmann R, Singer D: T-cell epitope-dependent immune response in inbred (C57BL/6J, SJL/J, and C3H/HeN) and transgenic P301S and Tg2576 mice. *J Pept Sci* 2013, 19:441-451.

21. Hanger DP, Byers HL, Wray S, Leung KY, Saxton MJ, Seereeram A, Reynolds CH, Ward MA, Anderton BH: Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. *J Biol Chem* 2007, 282:23645-23654.
22. Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Yoshida H, Titani K, Ihara Y: Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J Biol Chem* 1995, 270:823-829.
23. Kontsekova E, Zilka N, Kovacech B, Skrabana R, Novak M: Identification of Structural Determinants on Tau Protein Essential for its Pathological Function - Novel Therapeutic Target for Tau Immunotherapy in Alzheimer's Disease. *Alzheimer's Research & Therapy* 2014.
24. Filipcik P, Zilka N, Bugos O, Kucerak J, Koson P, Novak P, Novak M: First transgenic rat model developing progressive cortical neurofibrillary tangles. *Neurobiol Aging* 2012, 33:1448-1456.
25. Ivanovova N, Handzusova M, Hanes J, Kontsekova E, Novak M: High-yield purification of fetal tau preserving its structure and phosphorylation pattern. *J Immunol Methods* 2008, 339:17-22.
26. Korenova M, Zilka N, Stozicka Z, Bugos O, Vanicky I, Novak M: NeuroScale, the battery of behavioral tests with novel scoring system for phenotyping of transgenic rat model of tauopathy. *J Neurosci Methods* 2009, 177:108-114.
27. Zilka N, Filipcik P, Koson P, Fialova L, Skrabana R, Zilkova M, Rolkova G, Kontsekova E, Novak M: Truncated tau from sporadic Alzheimer's disease suffices to drive neurofibrillary degeneration in vivo. *FEBS Lett* 2006, 580:3582-3588.
28. Zilka N, Korenova M, Kovacech B, Iqbal K, Novak M: CSF phospho-tau correlates with behavioural decline and brain insoluble phospho-tau levels in a rat model of tauopathy. *Acta Neuropathol* 2010, 119:679-687.
29. Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR: Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 2000, 33:95-130.
30. Gotz J, Ittner A, Ittner LM: Tau-targeted treatment strategies in Alzheimer's disease. *Br J Pharmacol* 2012, 165:1246-1259.
31. Zilka N, Kontsekova E, Novak M: Chaperone-like antibodies targeting misfolded tau protein: new vistas in the immunotherapy of neurodegenerative foldopathies. *J Alzheimers Dis* 2008, 15:169-179.
32. Hawkes CA, McLaurin J: Immunotherapy as treatment for Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother* 2007, 7:1535-1548.
33. Robinson SR, Bishop GM, Lee HG, Munch G: Lessons from the AN 1792 Alzheimer vaccine: lest we forget. *Neurobiol Aging* 2004, 25:609-615.
34. Wilson-Welder JH, Torres MP, Kipper MJ, Mallapragada SK, Wannemuehler MJ, Narasimhan B: Vaccine adjuvants: current challenges and future approaches. *J Pharm Sci* 2009, 98:1278-1316.
35. Attems J, Thal DR, Jellinger KA: The relationship between subcortical tau pathology and Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans* 2012, 40:711-715.
36. Scarmeas N, Albert M, Brandt J, Blacker D, Hadjigeorgiou G, Papadimitriou A, Dubois B, Sarazin M, Wegesin D, Marder K, et al: Motor signs predict poor outcomes in Alzheimer disease. *Neurology* 2005, 64:1696-1703.

37. Koson P, Zilka N, Kovac A, Kovacech B, Korenova M, Filipcik P, Novak M: Truncated tau expression levels determine life span of a rat model of tauopathy without causing neuronal loss or correlating with terminal neurofibrillary tangle load. *Eur J Neurosci* 2008, 28:239-246.
38. Hrnkova M, Zilka N, Minichova Z, Koson P, Novak M: Neurodegeneration caused by expression of human truncated tau leads to progressive neurobehavioural impairment in transgenic rats. *Brain Res* 2007, 1130:206-213.

IMUNOTERAPEUTIKÁ PRE LIEČBU NEURODEGENERATÍVNYCH OCHORENÍ

Petr Novák

¹AXON Neuroscience, Dvořákovo nábrežie 10, 811 02, Bratislava

²Neuroimunologický ústav SAV, 84510, Bratislava

Úvod

Alzheimerova choroba je multifaktorálnym ochorením; v jej priebehu dochádza ku akumulácii neurofibrilárnej patológie pozostávajúcej z proteínu tau, sprievodnému neurozápalu, úbytku synapsí a ukladaniu amyloidu- β do plakov [1, 2]. Následne možno pozorovať atrofiu mozgového tkaniva a kognitívny úpadok.

V priebehu ochorenia dochádza k postupnému šíreniu patologických zmien tau proteínu mozgom; tento postup napreduje v charakteristických definovaných štádiách [3]. Postihnutie mozgových oblastí sa odzrkadľuje v deficite kognitívnych funkcií, za ktoré je daná oblasť zodpovedná – napríklad skoré a výrazné zahmlenie hipokampu tau patológiou sa premieta do rovnako skorého a výrazného postihnutia pamäťových funkcií [4]. V rámci postihnutých mozgových oblastí Alzheimerova choroba napáda špecifické neuronálne siete, čo vedie k charakteristickým deficitom neurotransmiterov, napríklad výraznému deficitu cholinergickej inervácie postihujúcemu viac-menej celý telencephalon [1, 5].

Komplexnosť neuropatológie viedla nutne ku vzniku viacerých hypotéz o príčinách vzniku Alzheimerovej choroby, ktoré v súčasnosti koexistujú. Na základe týchto hypotéz takisto prebieha viacero súbežných prúdov výskumu (základného i klinického).

Vývoj pochopenia ochorenia tiež viedol k vývinu hypotéz, od monofaktorálnych po multifaktorálne, snažiace sa zahrnúť viacero z menovaných neuropatologických aspektov do modelov.

Cholinergická hypotéza

Uvedomenie, že podkladom akéhokoľvek kognitívneho úpadku v senu sú patologické procesy v mozgu viedlo k odhaleniu reálnej prevalencie Alzheimerovej choroby, predtým ukrytej pod pojmom „prirodzenej stareckej demencie“. V 70-tych a 80-tych rokoch 20. storočia vznikla cholinergická hypotéza Alzheimerovej choroby, majúca za centrálny postulát, že kognitívny deficit

v Alzheimerovej chorobe je spôsobený nedostatkom neurotransmiterov, presnejšie acetylcholínu [6, 7].

Cholinergický systém nie je primárne zapojený do patogenézy ochorenia; je taktiež obeťou neurodegeneratívneho procesu v Alzheimerovej chorobe. Počas postupu neurofibrilárnej patológie mozgom je *nucleus basalis Meynerti* napadnutý pomerne skoro – už v 2. či 3. Braakovom štádiu [1]. Úpadok funkcie tohoto jadra sa sekundárne prejaví nedostatkom cholinergickej inervácie hemisféry, a tým globálnym zhoršením kognície. Blokováním acetylcholinesterázy sa zvýši dostupnosť acetylcholínu v synapsiách; tento mechanizmus prináša kognitívne zlepšenie, kým postupujúce patologické zmeny neeliminujú posledné zvyšky funkcie tohto cholinergického jadra [7, 8].

Inhibítory acetylcholinesterázy sú súčasťou štandardu symptomatickej liečby Alzheimerovej choroby. Taktiež ilustrujú dva hlavné prúdy vývoja liečiv pre neurodegeneratívne ochorenia – na jednej strane stoja symptomatická, majúce za cieľ kompenzovať poškodenie spôsobené chorobou; na druhej liečivá zamerané na zastavenie postupu patologických zmien ako takých – tzv. chorobu modifikujúce terapie. Imunoterapeutiká sa radia všeobecne do druhej kategórie, no úspešná imunoterapia ACh sekundárne povedie takisto ku zachovaniu cholinergickej funkcie *nucleus basalis Meynerti*.

Centrálne hypotézy v Alzheimerovej chorobe: Tau a Amyloid

Viac-menej súčasne vznikli v 80-tych rokoch dve hypotézy o patogenéze Alzheimerovej choroby – tau hypotéza [9, 10] a amyloidová hypotéza [11]. Centrálnym postulátom amyloidovej hypotézy je, že chybné spracovanie APP proteínu a vznik amyloidogénnych peptidov buď priamo vedie ku poškodeniu neurónov, alebo spúšťa ďalšie patologické zmeny – tau patológiu a zápal [12]. Tau hypotéza sa opiera o skutočnosť, že neurofibrilárna patológia chronologicky predchádza tvorbe amyloidovej patológie [1, 4, 13], a jej množstvo a distribúcia sú priamo úmerne kognitívnemu postihnutiu pacienta [14]. Jej centrálnou ideou je, že dysfunkcia tau proteínu vedie k chorobným post-translačným zmenám (hyperfosforylácii a proteolýze) tejto molekuly [15, 16], a následne k agregácii, toxicite, a šíreniu patológie pomocou mechanizmov podobným priónom [17-19]; neurozápal a amyloidová patológia sú vnímané ako následky tau patológie [2].

Obidve hypotézy sa zameriavajú na chorobne zmenené proteíny, ktoré prešli post-translačnými zmenami a tvoria agregáty; je dôležité, že vďaka zmenám konformácie, proteolýze, a funkčným modifikáciám (ako napríklad fosfo-

rylácii tau proteínu) sa tieto bielkoviny líšia tvarom i nábojom, a tým pádom i štruktúrou epitopov od svojich zdravých variant [16, 20]. To ich robí zaujímavými cieľmi pre imunoterapiu – imunoterapie, či už pasívne alebo aktívne, je možno veľmi presne zacieliť na patologické epitopy proteínov, a tým tieto chorobné varianty vyloviť spomedzi ich zdravých náprotivkov.

Vývoj imunoterapií proti Alzheimerovej chorobe má síce už vyše pätnásť-ročnú históriu, ale zatiaľ priniesol viac poučení ako úspechov [7, 21].

Imunoterapie proti amyloidu- β

Intenzívne klinické skúšania imunoterapií proti amyloidu- β začali v roku 2001 aktívnou vakcínou AN1972. Tento prípravok využíval amyloid- β_{1-42} ako imunogén, saponín QS21 ako adjuvans, a polysorbát-80 ako pomocnú látku. Použitie celého proteínu obsahujúceho T-bunkové i B-bunkové epitopy v kombinácii s adjuvansom podporujúcim imunitnú odpoveď typu T_H1 viedlo k meningoencefalitíde u ca. 6% vakcinovaných pacientov [22]. Poučenie plynúce z tohto skúšania je, že je nielen dôležité, aby vakcína efektívne prezentovala imunitnému systému cieľový epitop, ale i kontrolovať, aké iné epitopy sú prezentované, akým spôsobom, a či je použitý správny adjuvans, aby imunitný systém reagoval na vakcináciu žiaducim spôsobom. Všeobecne je T_H2 typ imunitnej odpovede žiadaný ak vakcína má pôsobiť pomocou protilátok, a T_H1 typ pri vakcínach proti neoplastickým ochoreniam, a proti intracelulárnym patogénom [23].

Skúšanie prípravku AN1972 výrazne ovplyvnilo vývoj imunoterapií proti Alzheimerovej chorobe. Za účelom vyhnúť sa podobným nežiaducim účinkom boli testované pasívne vakcíny (humanizované a od ľudských odvodené monoklonálne a polyklonálne protilátky), aktívne vakcíny využívajúce mimotopy (t.j. peptidy vytvorené za účelom vyskladania žiadúceho epitopu bez použitia sekvencie ľudského proteínu) a aktívne vakcíny používajúce len časť A β proteínu ako imunogén [21, 24].

Viacere z pasívnych imunoterapií proti A β boli testované v klinických štúdiách fázy 3, napríklad bapineuzumab a gantenerumab zamerané proti fibrilárnemu amyloidu, či solanezumab a crenezumab cieliace na rozpustné a oligomericke formy [7, 25, 26]. Za zmienku stojí, že použité protilátky sa líšili čo sa izotypu týka. Izotyp vplýva na efektorové funkcie F_c domény protilátky, a určuje škálu mechanizmov imunitného systému, ktoré je protilátka schopná zapojiť do odpovede proti cieľovému antigénu. Vo všeobecnosti protilátky, ktoré mali za cieľ efektorové funkcie angažovať využívali izotyp IgG1, kým tie,

ktorých účinkov mal byť sprostredkovaný čisto väzbou na antigén skôr využívali izotyp IgG4, ktorého sekundárne efektorové funkcie sú podľa všetkého minimálne [27, 28].

Mimotopové vakcíny zahŕňajú napríklad Affitope AD02 a AD03, krátke peptidy napodobujúce natívny A β , ktoré sú naviazané na makromolekulárne nosiče (keyhole limpet haemocyanin) za účelom zvýšenia imunogenicity týchto hapténov .

Rozsiahle predklinické a klinické skúšania terapií založených na amyloidovej hypotéze doposiaľ neprinesli validovaný cieľ pre terapie Alzheimerovej choroby ani vytúženú liečbu modifikujúcu priebeh ochorenia. Menovite, nie je potvrdené, že by inhibícia alebo modulácia sekretáz – enzýmov zodpovedných za produkciu amyloidu- β – či inhibícia tvorby A β -agregátov, alebo použitie protilátok proti rozličným formám amyloidu boli efektívnymi terapeutickými stratégiami. Absenciu účinnosti skúšaných terapií proti amyloidu- β autori vo všeobecnosti vysvetľujú neskorým zásahom do patogenézy ochorenia. Amyloidová hypotéza sa na základe spomínaných neúspechov pretavila z tvrdenia, že A β priamo sprostredkuje toxicitu, do vnímania tohto proteínu ako iniciátora ochorenia, proti ktorému treba zasiahnuť ideálne v ranných či predklinických štádiách ochorenia [7, 29]. Na základe tejto zmeny hypotézy boli spustené rozsiahle štúdie v ranných fázach ochorenia – napríklad DIAN, A4, či API.

Imunoterapie proti tau patológii

O desaťročie neskôr vstúpili do klinických skúšaní imunoterapie proti tau patológii. Patogenéza neurofibrilárnej tau patológie prebieha vo viacerých krokoch, a vedie k rozsiahlym molekulárnym zmenám tau proteínu. Táto diverzita patologických zmien a mnohopočetnosť krokov vedúcich v konečnom dôsledku k dysfunkcii a úhynu neurónov je logicky odzrkadlená v množstve potenciálnych imunologických terapeutických prístupov.

V prvom rade ako na počiatku, tak i v priebehu ochorenia dochádza k seminálnym zmenám tau proteínu, pričom dochádza k opakovaniu patologického cyklu v narastajúcej mierke. Rannými zmenami sú patologické skrátenie („truncation“) [15, 30], hyperfosforylácia [16] a zmena konformácie molekuly [31, 32]. Tieto javy sú na jednej strane prvým krokom, kde by imunoterapia mohla teoreticky zakročiť (napríklad zabránením prístupu kináz či kaspáz ku tau proteínu) [33], ale predovšetkým slúžia ako odlišujúci znak medzi zdravým a chorým tau proteínom.

Voči týmto znakom je možné zacieliť imunoterapeutiká, no výzvou zostáva voľba správnych imunologických determinánt. Lákavým cieľom sú napríklad fosforylované epitópy. Tau proteín je bielkovinou s jedným z najvyšších pomerov fosforylačných miest v porovnaní s dĺžkou molekuly – obsahuje približne 50 potvrdených a 85 teoreticky možných fosforylačných miest na tyrosínových, treonínových a serínových reziduách [34]. Zdravý tau proteín a tau proteín v Alzheimerovej chorobe sa líšia množstvom fosfátu na molekulu, ako i fosforylačným vzorcom [16, 35, 36]. Mnohí autori zamerali svoje imunoterapeutiká vo forme aktívnych a pasívnych vakcín práve proti jednotlivým s ACh asociovaným fosfo-epitópom [37, 38].

Potenciálne nevýhody imunoterapie proti jednotlivým fosforylačným miestam je možno zhrnúť do dvoch kategórií. V prvom rade sa fosfo-epitópy vrátane tých využívaných pre odlišenie patologického a zdravého tau (napríklad pS202/pT205) vyskytujú ako na zdravých tak i na chorých molekulách tau proteínu [35]. Čo sa líši je väčšinou kvantitatívne zastúpenie daného epitópu v populácii chorých či zdravých molekúl tau. Takisto je pomerne jednoduché pomocou externých vplyvov (napríklad psychologický stres či chrípka) privodiť prechodnú fosforyláciu tau proteínu na mnohých epitópoch [39], čo by mohlo viesť k variabilnému bezpečnostnému profilu týchto liečiv.

Nemenej dôležitým aspektom je, že nebol doposiaľ objavený žiaden fosfo-epitóp, ktorý by sa vyskytoval na každej jednej patologickej molekule tau. Tým pádom sú monoepitopové imunoterapie proti jednotlivým fosfo-epitópom vystavené riziku, že minú signifikantnú množinu patologických tau molekúl, a ako monoterapia budú neefektívne.

V klinickom vývoji sa v súčasnosti nachádza aktívna i pasívna imunoterapia proti patologickým fosfo-epitópom tau proteínu. Za zmienku stoja napríklad aktívna vakcína ACI-35 (zameraná proti epitópu pS396/pS404) [40] či pasívna vakcína RG7345 (proti pS422) [37].

Podstatnou patologickou zmenou, ktorú tau proteín v Alzheimerovej chorobe podstupuje, je proteolýza – štiepenie vedúce ku stratám dôležitých funkčných domén, a konformačnej zmene proteínu [15, 30]. Patologické konformácie tau proteínu vedia nadobudnúť črty podobné príónom, a konvertovať zdravý tau proteín na chorobné varianty; šírenie patológie je podľa všetkého sprostredkované prestupom týchto príónom podobných foriem medzi neurónmi [19].

Niektoré patologické konformácie a zlomové body sú vysoko špecifické pre patologický tau proteín, a umožňujú presnú diskrimináciu medzi zdravý-

mi formami [15, 31, 32, 41]. Prirodzene sa tieto imunologické diskriminanty núkajú ako ciele pre imunofarmaceutiká, no pri vývoji terapie je nutno rozlišovať medzi protilátkami, ktoré väzbou na antigén tento neutralizujú, a protilátkami, ktoré stabilizujú jeho patologickú konformáciu, a tým umocňujú jeho priónové vlastnosti [31]. Neutralizácia patologickej tau molekuly môže prebiehať cez opsonizáciu a ďalšie spracovanie imunitným systémom, inhibíciu agregácie alebo cez blokovanie toxicky pôsobiacich motívov. Imunoterapeutiká zamerané proti patologickým konformáciám tau proteínu zahŕňajú napríklad aktívnu vakcínu AADvac1; tento prípravok je kombináciou peptidu nesúceho patologickú konformačnú doménu tau proteínu derivovanú z neurofibrilárnej patológie v ACh, naviazaný na keyhole limpet haemocyanin slúžiaci ako nosič tohto hapténu. Hydroxid hliníka slúži ako adjuvans [42].

Imobilizácia či neutralizácia extracelulárnych tau fibríl je taktiež sľubným terapeutickým mechanizmom, keďže by tým bolo zabránené postupu tau patológie do zdravých neurónov [43].

Tau proteín v ACh ďalej môže byť acetylovaný, glykovaný, glykosylovaný, nitrovaný, O-GlcNA-cylovaný i ubiquitinovaný, čo dáva ďalší priestor pre hľadanie imunologických determinánt vhodných ako ciele pre imunoterapiu [17, 44]. Agregácia tau proteínu do oligomérov, fibríl, a párových špirálových vlákien takisto vytvára podmienky pre vznik epitóпов zahŕňajúcich viaceré molekuly tau proteínu [45]. Imunoterapia tým pádom môže byť zacielená proti ranným formám patologického tau, či špecificky proti zrelším agregátom.

Prekrytie pôsobnosti jednotlivých anti-tau imunoterapií je pravdepodobné – tá istá molekula patologického tau proteínu môže naraz obsahovať napríklad početné fosfo-epitópy, dva patologické zlomy, a niekoľko konformačných domén. Výskum koexistencie týchto zmien je základným predpokladom pre vývoj kombinačných anti-tau imunoterapií a polyvalentných vakcín.

Ďalším dôležitým bodom anti-tau imunoterapií je vyhodnotenie ich použiteľnosti nielen v ACh, ale i v spriaznených tauopátiách, ochoreniach vykazujúcich rozličné druhy tau patológie. V ideálnom prípade by účinné imunoterapeutikum pre ACh prinieslo úžitok i pacientom týchto individuálne zriedkavých ochorení, ktoré v ale súčte spôsobujú signifikantný počet prípadov demencie. Medzi potenciálne ovplyvniteľné ochorenia sa rátajú napríklad progresívna supranukleárna paréza, kortikobazálna degenerácia, primárne progresívne afázie, Pickova choroba, frontotemporálna demencia, chronická traumatická encefalopátia, a mnohé ďalšie [46].

Pre imunoterapie pôsobiace na patologický tau proteín a neurofibrilárnu

patológiu je, okrem správnej voľby cieľového epitópu / epitópov, takisto nutná obozretnosť čo sa týka vyhnutia sa škodlivej bunkovej odpovede na antigén, správna voľba nosiča pre haptény, adjuvansu, a spôsobu podania. Aktívne imunoterapie sa stretávajú s tými istými výzvami ako iné vakcíny – voľbou dávky antigénu, dávky adjuvansu, dávkovacieho režimu, cieľovej populácie, a metód pre odčítanie farmakodynamiky [47]. Istou výzvou je tiež imunosenescencia častá v cieľovej populácii [48]. Pasívne vakcíny sa naopak stretávajú s nutnosťou dlhodobo udržiavať hladinu protilátok u pacienta, ako i so nežiadúcou imunogénnosťou podávanej protilátky, ktorá môže viesť k jej precipitácii či inaktivácii, čím dochádza ku strate účinku [49].

Prvá generácia imunoterapií proti tau proteínovej patológii sa v súčasnosti nachádza v predklinickom vývoji či prvej fáze klinického skúšania. Výsledky týchto počiatkových skúšaní bezpečnosti sa dajú očakávať v najbližších rokoch. Klinické skúšania účinnosti týchto liečiv (a, vo všeobecnosti, i akýchkoľvek iných liečiv snažiacich sa o spomalenie či zastavenie priebehu ACh) budú vyžadovať dlhodobé klinické pozorovania na početných populáciách pacientov [7, 50, 51].

Súhrn

Druhá generácia anti-amyloidových a prvá generácia anti-tau imunoterapií sa nachádza v klinickom skúšaní. Súbežne s vývojom týchto liečiv prebieha vývoj metodológie – biochemických a rádiologických biomarkerov, klinických a neuropsychologických testov, a tiež samotnej metodológie klinického skúšania v chronicky progresívnych neurodegeneratívnych ochoreniach, ktorá si vyžaduje jedinečný prístup. Poučenia plynúce zo súčasného stavu tejto oblasti výskumu poukazujú na nutnosť ďalšieho základného výskumu pôvodu ACh, a mechanizmov patogenézy tohto ochorenia. Takisto poukazujú na nutnosť kritickej interpretácie dát zo zvieracích modelov, a prehodnotenie, nakoľko verne ktorý zvierací model replikuje dianie v mozgu pacienta, a či je schopný vypovedať o potenciáli účinnosti daného liečiva u ľudí.

Vďaka diverzite rozličných terapií skúmaných pre liečbu ACh sa dajú v najbližších rokoch očakávať bohaté poznatky o patologických mechanizmoch ochorenia, a o pôsobení imunoterapie na proteínopátie CNS. V konečnom dôsledku je ale pre pretavenie hypotéz do teórie Alzheimerovej choroby nutné aspoň jedno úspešné chorobu modifikujúce liečivo, ktoré by empiricky potvrdilo správnosť použitých metodík a hypotéz, na ktorých je založené, a tým pôsobilo ako priekopník pre optimalizované terapie ďalších generácií.

Literatúra

1. Braak, H. and E. Braak, *Neuropathological staging of Alzheimer-related changes*. Acta Neuropathol, 1991. **82**(4): p. 239-59.
2. Zilka, N., et al., *Who fans the flames of Alzheimer's disease brains? Misfolded tau on the crossroad of neurodegenerative and inflammatory pathways*. J Neuroinflammation, 2012. **9**: p. 47.
3. Alafuzoff, I., et al., *Staging of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease: a study of the BrainNet Europe Consortium*. Brain Pathol, 2008. **18**(4): p. 484-96.
4. Nelson, P.T., et al., *Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature*. J Neuropathol Exp Neurol, 2012. **71**(5): p. 362-81.
5. Braak, H. and E. Braak, *Development of Alzheimer-related neurofibrillary changes in the neocortex inversely recapitulates cortical myelogenesis*. Acta Neuropathol, 1996. **92**(2): p. 197-201.
6. Birks, J., *Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2006(1): p. CD005593.
7. Schneider, L.S., et al., *Clinical trials and late-stage drug development for Alzheimer's disease: an appraisal from 1984 to 2014*. J Intern Med, 2014. **275**(3): p. 251-83.
8. Rockwood, K., *Size of the treatment effect on cognition of cholinesterase inhibition in Alzheimer's disease*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2004. **75**(5): p. 677-85.
9. Grundke-Iqbal, I., et al., *Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments*. J Biol Chem, 1986. **261**(13): p. 6084-9.
10. Wischik, C.M., et al., *Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(13): p. 4884-8.
11. Hardy, J. and D. Allsop, *Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease*. Trends Pharmacol Sci, 1991. **12**(10): p. 383-8.
12. Mattson, M.P., *Pathways towards and away from Alzheimer's disease*. Nature, 2004. **430**(7000): p. 631-9.
13. Braak, H. and K. Del Tredici, *The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty*. Acta Neuropathol, 2011. **121**(2): p. 171-81.
14. Murray, M.E., et al., *Clinicopathologic and 11C-Pittsburgh compound B implications of Thal amyloid phase across the Alzheimer's disease spectrum*. Brain, 2015. **138**(Pt 5): p. 1370-81.
15. Novak, M., J. Kabat, and C.M. Wischik, *Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament*. EMBO J, 1993. **12**(1): p. 365-70.
16. Grundke-Iqbal, I., et al., *Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(13): p. 4913-7.
17. Novak, P., M. Prcina, and E. Kontseikova, *Tauons and prions: infamous cousins?* J Alzheimers Dis, 2011. **26**(3): p. 413-30.
18. Clavaguera, F., et al., *Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(7): p. 909-13.
19. Levarska, L., et al., *Of rodents and men: the mysterious interneuronal pilgrimage of misfolded protein tau in Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis, 2013. **37**(3): p. 569-77.
20. Jadhav, S., N. Zilka, and M. Novak, *Protein truncation as a common denominator of human neurodegenerative foldopathies*. Mol Neurobiol, 2013. **48**(3): p. 516-32.

21. Winblad, B., et al., *Active immunotherapy options for Alzheimer's disease*. *Alzheimers Res Ther*, 2014. **6**(1): p. 7.
22. Gilman, S., et al., *Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial*. *Neurology*, 2005. **64**(9): p. 1553-62.
23. Wilson-Welder, J.H., et al., *Vaccine adjuvants: current challenges and future approaches*. *J Pharm Sci*, 2009. **98**(4): p. 1278-316.
24. Winblad, B., et al., *Safety, tolerability, and antibody response of active Abeta immunotherapy with CAD106 in patients with Alzheimer's disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, first-in-human study*. *Lancet Neurol*, 2012. **11**(7): p. 597-604.
25. Siemers, E.R., et al., *Phase 3 solanezumab trials: Secondary outcomes in mild Alzheimer's disease patients*. *Alzheimers Dement*, 2015.
26. Salloway, S., et al., *Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease*. *N Engl J Med*, 2014. **370**(4): p. 322-33.
27. Bournazos, S., D.J. DiLillo, and J.V. Ravetch, *The role of Fc-FcγR interactions in IgG-mediated microbial neutralization*. *J Exp Med*, 2015. **212**(9): p. 1361-9.
28. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, *Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding*. *Science*, 2005. **310**(5753): p. 1510-2.
29. Wischik, C.M., C.R. Harrington, and J.M. Storey, *Tau-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease*. *Biochem Pharmacol*, 2014. **88**(4): p. 529-39.
30. Novak, M., et al., *Difference between the tau protein of Alzheimer paired helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of monoclonal antibodies 423 and 7.51*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(13): p. 5837-41.
31. Kontsekova, E., et al., *Identification of structural determinants on tau protein essential for its pathological function: novel therapeutic target for tau immunotherapy in Alzheimer's disease*. *Alzheimer's Research & Therapy*, 2014. **6**(4): p. 45.
32. Vechterova, L., et al., *DC11: a novel monoclonal antibody revealing Alzheimer's disease-specific tau epitope*. *Neuroreport*, 2003. **14**(1): p. 87-91.
33. Rissman, R.A., et al., *Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology*. *J Clin Invest*, 2004. **114**(1): p. 121-30.
34. Hanger, D.P., B.H. Anderton, and W. Noble, *Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease*. *Trends Mol Med*, 2009. **15**(3): p. 112-9.
35. Gong, C.X., et al., *Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease*. *J Neural Transm (Vienna)*, 2005. **112**(6): p. 813-38.
36. Iqbal, K., et al., *Mechanisms of tau-induced neurodegeneration*. *Acta Neuropathol*, 2009. **118**(1): p. 53-69.
37. Troquier, L., et al., *Targeting phospho-Ser422 by active Tau Immunotherapy in the THY Tau22 mouse model: a suitable therapeutic approach*. *Curr Alzheimer Res*, 2012. **9**(4): p. 397-405.
38. Boutajangout, A., D. Quartermain, and E.M. Sigurdsson, *Immunotherapy targeting pathological tau prevents cognitive decline in a new tangle mouse model*. *J Neurosci*, 2010. **30**(49): p. 16559-66.
39. Rissman, R.A., *Stress-induced tau phosphorylation: functional neuroplasticity or neuronal vulnerability?* *J Alzheimers Dis*, 2009. **18**(2): p. 453-7.
40. Theunis, C., et al., *Efficacy and safety of a liposome-based vaccine against protein Tau, assessed in tau.P301L mice that model tauopathy*. *PLoS One*, 2013. **8**(8): p. e72301.

41. Bright, J., et al., *Human secreted tau increases amyloid-beta production*. *Neurobiol Aging*, 2015. **36**(2): p. 693-709.
42. Kontsekova, E., et al., *First-in-man tau vaccine targeting structural determinants essential for pathological tau-tau interaction reduces tau oligomerisation and neurofibrillary degeneration in an Alzheimer's disease model*. *Alzheimer's Research & Therapy*, 2014.
43. Kfoury, N., et al., *Trans-cellular propagation of Tau aggregation by fibrillar species*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(23): p. 19440-51.
44. Pedersen, J.T. and E.M. Sigurdsson, *Tau immunotherapy for Alzheimer's disease*. *Trends Mol Med*, 2015. **21**(6): p. 394-402.
45. Jicha, G.A., et al., *Alz-50 and MC-1, a new monoclonal antibody raised to paired helical filaments, recognize conformational epitopes on recombinant tau*. *J Neurosci Res*, 1997. **48**(2): p. 128-32.
46. Spillantini, M.G. and M. Goedert, *Tau pathology and neurodegeneration*. *Lancet Neurol*, 2013. **12**(6): p. 609-22.
47. Della Cioppa, G., I. Jonsdottir, and D. Lewis, *Challenges in early clinical development of adjuvanted vaccines*. *Vaccine*, 2015. **33 Suppl 2**: p. B47-51.
48. Siegrist, C.A. and R. Aspinall, *B-cell responses to vaccination at the extremes of age*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(3): p. 185-94.
49. Bartelds, G.M., et al., *Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up*. *JAMA*, 2011. **305**(14): p. 1460-8.
50. Vellas, B., et al., *Disease-modifying trials in Alzheimer's disease: a European task force consensus*. *Lancet Neurol*, 2007. **6**(1): p. 56-62.
51. Cedarbaum, J.M., et al., *Rationale for use of the Clinical Dementia Rating Sum of Boxes as a primary outcome measure for Alzheimer's disease clinical trials*. *Alzheimers Dement*, 2013. **9**(1 Suppl): p. S45-55.

ŠTÚDIUM INTERAKCIE TAU PROTEÍNOV S PROTILÁTKOU S EPITOPOM V C-KONCOVEJ DOMÉNE TAU

^{1,2}Ondrej Cehlár, ²Mária Janubová, ^{1,2}Rostislav Škrabana, ^{1,2}Michal Novák

¹ Neuroimunologický ústav SAV, 84510, Bratislava

² AXON Neuroscience, Dvořákovo nábrežie 10, 811 02, Bratislava

Abstrakt

Prirodzene neusporiadaný proteín tau zohráva úlohu v patogenéze demencia Alzheimerového typu (DAT). Kinetika interakcií prirodzene neusporiadaných proteínov sa líši od kinetiky interakcií štruktúrovaných proteínov a nie je ešte dôkladne preskúmaná. Preto sme sa v tejto práci zamerali na meranie interakcie protilátky DC39C s epitopom na C-konci tau molekuly s tau izoformami a s formami tau proteínu skracovanými od N-konca.

Úvod

Proteín tau je typickým predstaviteľom prirodzene neusporiadaných proteínov (PNP), ktoré za fyziologických podmienok nenadobúdajú pevnú trojrozmernú štruktúru, ale oscilujú medzi rôznymi konformáciami. PNP sú hojne zastúpené v prírode, prevažne u eukaryotických organizmov, pričom u 50% proteínov ľudského proteómu sa predpokladá výskyt dlhých (viac ako 30 aminokyselín) nespořiadaných segmentov (Oates et al., 2013). Po interakcii s väzobným partnerom sú prirodzene neusporiadané proteíny schopné nadobudnúť pevnú štruktúru, aj keď niektoré PNP prenášajú istú mieru neusporiadanosti aj do komplexu (Tomba and Fuxreiter, 2008). Predpokladá sa, že PNP sú v porovnaní so štruktúrovanými proteínmi schopné väčšej modulácie kinetických rýchlostných konštánt interakcie (vyššie hodnoty asociačnej a disociačnej konštanty k_o a k_d) pre zabezpečenie optimálnej afinity (Zhou, 2012).

Tau prináleží medzi proteíny asociované s mikrotubulmi. Alternatívnym zosťrihom MAPT génu vzniká v CNS 6 izoformami tau proteínu, ktoré sa líšia zastúpením N-koncových insertov (žiadny, jeden alebo dva) a prítomnosťou troch (3R izoformy) alebo štyroch (4R izoformy) mikrotubuly viažúcich repetitívnych oblastí (Goedert et al., 1989). Najdlhšia izoforma tau proteínu prítomná v CNS človeka obsahuje 441 aminokyselinových zvyškov. V molekule tau proteínu môžeme identifikovať prevažne kyslú N-koncovú doménu nasledovanú bázickou prolínovou doménou. Za ňou sa začínajú mikrotubuly viažúce repetitívne oblasti a molekula končí C-koncovou doménou obsahujúcou kyslú aj bázickú aminokyselinové zvyšky.

Spoznanie atómovej štruktúry a interakčných vlastností tau proteínu môže napomôcť pri objasňovaní základných otázok patogenézy DAT a iných taopatií. Medzi oblasti, na ktoré je potrebné upriamiť pozornosť, patrí osobitne jeho C-koncová doména, keďže sa zistilo, že významne inhibuje agregáciu tau proteínu do amyloidových štruktúr (Abraha et al., 2000; Gamblin et al., 2003). Pomocou NMR meraní v roztoku bola pre aminokyseliny ⁴²⁸LADEVASLA⁴³⁷ C-koncovej domény tau proteínu zistená preferencia nadobúdať α -helikálnu štruktúru (Mukrasch et al., 2009; Schwalbe et al., 2014) a tento úsek bol metódou phage display zároveň určený ako jedno z miest na molekule tau proteínu, ktoré zohráva úlohu pri väzbe tau na mikrotubuly (Cao & Mao, 2009). Protilátky špecifické proti fosforylovaným aminokyselinám v C-koncovej doméne tau proteínu (pS396, pS404, pS409, pS413, pS422) sa v súčasnosti testujú ako možné biologické lieky pre terapiu DAT (Pedersen and Sigurdsson, 2015).

V našej práci sme sa zamerali na meranie interakcie protilátky DC39C s epitopom na C-konci tau molekuly s tau izoformami a s formami tau proteínu skracovanými od N-konca.

Metódy

Rekombinantné tau proteíny boli exprimované v *E.Coli* a purifikované z bakteriálneho lyzátu pomocou iónomeničovej a gélovej chromatografie (Csokova et al., 2004). Ich koncentrácia bola stanovená meraním absorbancie pri 205 nm s absorbným koeficientom odvodeným z aminokyselinovej sekvencie charakterizovaného proteínu (Anthis and Clore, 2013). Fab fragment monoklónovej protilátky DC39C bol pripravený papaínovým štiepením molekuly protilátky a následnou purifikáciou štiepnej zmesi pomocou afinitnej a gélovej chromatografie (Cehlar et al., 2012).

Interakcia Fab fragmentu protilátky s tau proteínmi bola monitorovaná metódou rezonancie povrchového plazmónu pomocou prístroja BIACORE3000 na čípoch CM5 pri 22°C. Fab fragment bol imobilizovaný na povrch čipu a tau proteín bol nastrekovaný ako analyt v rôznych koncentráciách. Vyhodnotením senzogramov pomocou modelu pre interakciu 1:1 boli získané rýchlostné konštanty interakcie. Asociačná a disociačná fáza boli fitované samostatne, s použitím priemernej hodnoty pre disociačnú konštantu a globálnej hodnoty parametra R_{\max} pri fitovaní asociačnej fázy.

Výsledky a diskusia

Metódou rezonancie povrchového plazmónu sme merali interakciu Fab fragmentu protilátky DC39C, ktorá má epitop na úplnom C-konci molekuly tau proteínu (aminokyseliny 431-441), so všetkými ľudskými izoformami tau proteínu (tri 4R izoformy a tri 3R izoformy) a s formami tau proteínu odvodenými zo sekvencie najdlhšej ľudskej 4R izoformy, postupne skracovanými od N-konca.

Získali sme rôzne hodnoty kinetických parametrov pre rôzne tau izoformy a skrátene tau konštrukty. Hodnoty asociačnej rýchlostnej konštanty ležia v rozmedzí od $1,38 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pre tau140-441 (najrýchlejšia asociácia) po $2,18 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (najpomalšia asociácia) pre tau327-441. Hodnoty disociačnej rýchlostnej konštanty ležia v rozmedzí od $1,14 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (najpomalšia disociácia) pre tau40 po $3,20 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (najrýchlejšia disociácia) pre tau343-441. Najnižšiu hodnotu rovnovážnej disociačnej konštanty K_D (najvyššia afinita) majú najdlhšia ľudská izoforma tau40 a konštrukt tau140-441. Na druhej strane najnižšiu afinitu vykazujú najkratšie tau konštrukty tau327-441, tau343-441 a ľudská 3R izoforma s jedným N koncovým inzertom tau37 (**Obrázok 1, Tabuľka 1**). Interakcie protilátky DC39C s prirodzene neusporiadaným proteínom tau sa vo všeobecnosti vyznačujú nižšou hodnotou disociačnej rýchlostnej konštanty, ako je priemerná hodnota pre interakcie prirodzene neusporiadaných proteínov, ktoré sa vyznačujú krátkou životnosťou s disociačnou konštantou v rozmedzí $0,1 - 1000 \text{ s}^{-1}$ (Dogan et al., 2014).

Rozdielne hodnoty kinetických parametrov môžeme pripisovať zmenám v súbore konformácií rôznych tau izoform a konštruktov, ktoré spôsobujú rozdielnu prístupnosť C-koncového epitopu protilátky DC39C. Napríklad najdlhšia 4R izoforma tau40 vykazuje približne stokrát vyššiu afinitu ako najdlhšia 3R izoforma tau39. Rozdielne vlastnosti 4R a 3R izoform boli pozorované tiež pri regulácii dynamiky miktotubulov (Panda et al., 2003) a ovplyvňovaní kinetického transportu po mikrotubuloch (Peck et al., 2011). Pre skracovanie tau molekuly od N-konca pozorujeme pokles afinity od konštrukt tau140-441 po najkratšie konštrukty tau327-441 a tau343-441. Dlhšie konštrukty tau31-441, tau99-441 a tau127-441 majú podobné hodnoty K_D porovnateľné s tau221-441, a teda nižšie ako tau140-441. Pre skracovanie tau molekuly od N-konca boli popísané rozdiely pri stabilizácii mikrotubulov medzi plnodĺžkovým tau proteínom a konštruktom tau124-441, pričom skrátene tau124-441 vykazoval vyššiu schopnosť viazať a stabilizovať mikrotubuly (Derisbourg et al., 2015). Zmeny v súbore konformácií tau proteínu boli nedávno pozorované

aj medzi nefosforylovaným tau a enzýmom GSK-3 β hyperfosforylovaným tau proteínom, pomocou kombinácie deutériovej výmeny v mikrofuidickom usporiadaní a hmotnostnej spektrometrie s elektrosprejovou ionizáciou – TRESI-HDX (Zhu et al., 2015).

Dogan a kol. porovnávali kinetiku interakcie neusporiadaného proteínu NCBD vyskytujúceho sa v stave roztopenej gule (molten globule state, Kjaergaard et al., 2010) so štyrmi neusporiadanými a dvomi štrukturovanými proteínmi pri rôznych hodnotách iónovej sily roztoku. Konštatovali, že rýchlostné asociačné konštanty interakcií prirodzene neusporiadaných proteínov sú závislé na iónovej sile a ich hodnoty sú na hornej hranici alebo prevyšujú spektrum hodnôt štrukturovaných proteínov. Jedným z vysvetlení je, že prirodzene neusporiadané proteíny sa môžu počiatocne naviazať rôznymi spôsobmi, čo má za následok vyšší počet produktívnych zrážok vedúcich k vzniku prechodového komplexu, ktorý môže byť značne nešpecifický, a neskôr sa preskupí do konečnej väzbovej konformácie (Blochliger et al., 2015; Dogan et al., 2015). Závislosť asociačných rýchlostných konštánt na iónovej sile poukazuje na významnú úlohu elektrostatických interakcií v kinetike reakcií prirodzene neusporiadaných proteínov. Elektrostatické sily môžu nielen urýchľovať zrážky proteínov, ale aj navodzovať konformáciu výhodnú pre nadobudnutie štruktúry, a tým zvyšovať efektivitu skladania PNP po jeho naviazaní na väzobného partnera (Ganguly et al., 2013). Na druhej strane sa tiež ukazuje podstatná úloha hydrofóbných interakcií pri väzbe prirodzene neusporiadaných proteínov, a to napriek tomu, že prirodzene neusporiadané proteíny sú ochudobnené o hydrofóbné aminokyseliny tryptofán, fenylalanín, izoleucín, valín a leucín (Lawrence et al., 2014).

Záver

Konformačný súbor C-koncovej domény neuronálneho tau proteínu je výrazne modulovaný vzdialenejšími časťami jeho molekuly, čo sa výrazne prejavuje pri sledovaní kinetiky interakcie rôzne dlhých variantov tau s protilátkou zacielenou voči C-koncu molekuly. Ide teda o ďalšie miesto tau proteínu, ktoré je regulované proteolytickým štiepením tau pri jeho patofyziologických funkciách.

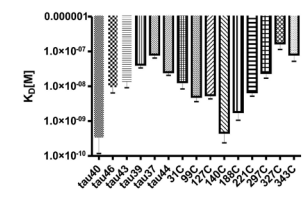
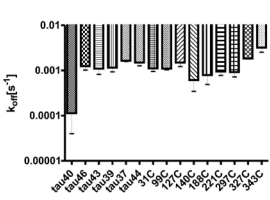
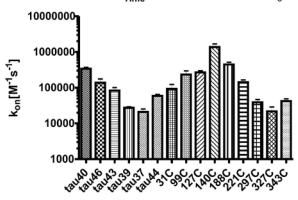
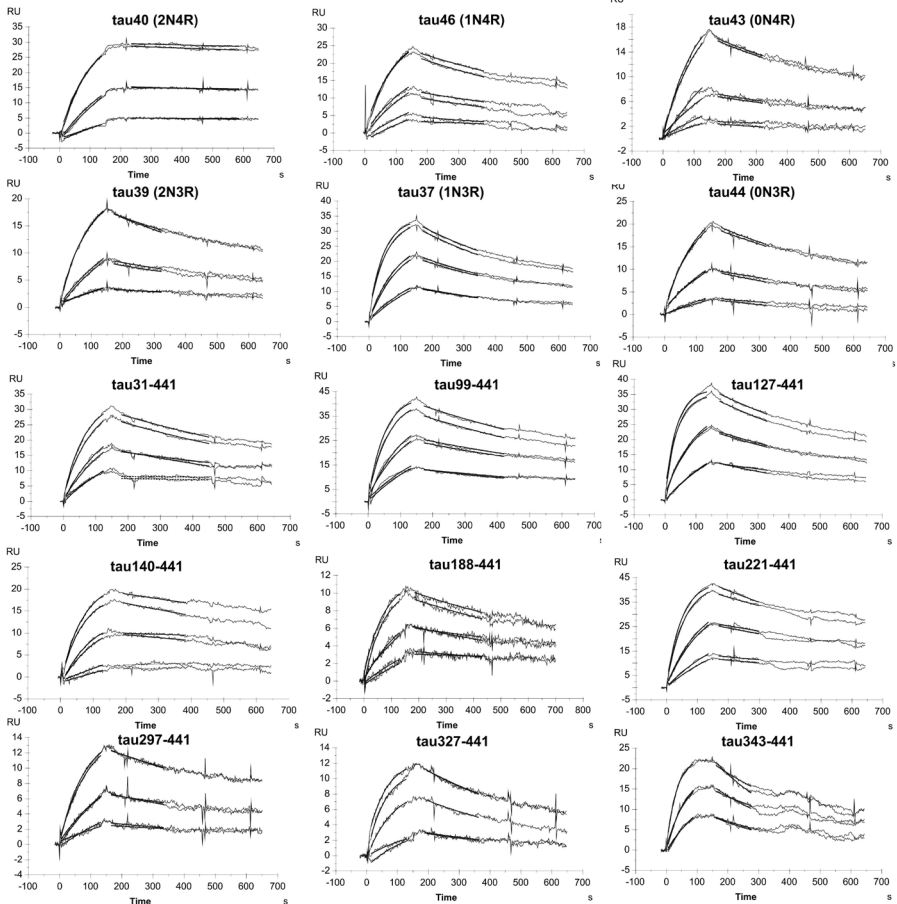
Tabuľka 1
Kinetické parametre väzby Fab fragmentu protilátky DC39C s tau proteínmi

Tau proteín	Mw	k_a [$M^{-1} \cdot s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	K_D [M]
Tau40 (2N4R)	45851	$(3,41 \pm 0,30) \times 10^5$	$(1,14 \pm 0,74) \times 10^{-4}$	$(3,37 \pm 2,20) \times 10^{-10}$
Tau46 (1N4R)	42698	$(1,39 \pm 0,37) \times 10^5$	$(1,24 \pm 0,22) \times 10^{-3}$	$(9,43 \pm 3,02) \times 10^{-9}$
Tau43 (0N4R)	40008	$(8,36 \pm 1,74) \times 10^4$	$(1,10 \pm 0,28) \times 10^{-3}$	$(1,36 \pm 0,45) \times 10^{-8}$
Tau39 (2N3R)	42604	$(2,75 \pm 0,17) \times 10^4$	$(1,15 \pm 0,22) \times 10^{-3}$	$(4,20 \pm 0,86) \times 10^{-8}$
Tau37 (1N3R)	39721	$(2,11 \pm 0,43) \times 10^4$	$(1,65 \pm 0,06) \times 10^{-3}$	$(8,15 \pm 1,68) \times 10^{-8}$
Tau44 (0N3R)	36761	$(5,90 \pm 0,57) \times 10^4$	$(1,50 \pm 0,24) \times 10^{-3}$	$(2,55 \pm 0,48) \times 10^{-8}$
Tau31-441	42479	$(9,27 \pm 3,10) \times 10^4$	$(1,11 \pm 0,16) \times 10^{-3}$	$(1,32 \pm 0,48) \times 10^{-8}$
Tau99-441	35555	$(2,34 \pm 0,63) \times 10^5$	$(1,10 \pm 0,07) \times 10^{-3}$	$(5,01 \pm 1,40) \times 10^{-9}$
Tau127-441	32703	$(2,68 \pm 0,30) \times 10^5$	$(1,50 \pm 0,28) \times 10^{-3}$	$(5,58 \pm 1,24) \times 10^{-9}$
Tau140-441	31451	$(1,38 \pm 0,30) \times 10^6$	$(6,15 \pm 2,71) \times 10^{-4}$	$(4,65 \pm 2,27) \times 10^{-10}$
Tau188-441	26737	$(4,48 \pm 0,71) \times 10^5$	$(7,94 \pm 3,04) \times 10^{-4}$	$(1,82 \pm 0,76) \times 10^{-9}$
Tau221-441	23457	$(1,43 \pm 0,22) \times 10^5$	$(9,45 \pm 1,68) \times 10^{-4}$	$(6,75 \pm 1,58) \times 10^{-9}$
Tau297-441	15277	$(3,90 \pm 0,76) \times 10^4$	$(9,20 \pm 2,01) \times 10^{-4}$	$(2,43 \pm 0,72) \times 10^{-8}$
Tau327-441	12240	$(2,18 \pm 0,71) \times 10^4$	$(1,85 \pm 0,04) \times 10^{-3}$	$(1,71 \pm 0,57) \times 10^{-7}$
Tau343-441	10699	$(4,22 \pm 0,67) \times 10^4$	$(3,20 \pm 0,67) \times 10^{-3}$	$(8,15 \pm 2,93) \times 10^{-8}$

Obrázok 1 – Primárna sekvencia najdlhšej ľudskej tau izoformy (tau40-2N4R) a senzogramy interakcie protilátky DC39C s rôznymi tau proteínmi. V boxoch sú označené inzerty a repetitívne oblasti. Druhá repetitívna oblasť, ktorá chýba u 3R izoform, je označená v bielom boxe.

```

1 MAEPRQEFEV 11 MEDHAGTYGL 21 GDRKDQGGYT 31 MHQDQEGDTD 41 AGLKESPLQT 51 PTFEDGSEEPG 61 SETSDAKSTP 71 TAEDVTAPLV 81 DEGAPGKQAA 91 AOPHTEIPEG
101 IVEEAGIGD 111 TPSLEDEAAG 121 HVTQARMVSK 131 SKDGTGSDDK 141 KAKGADGKTK 151 IATPRGAAPP 161 GQKQANATR 171 IPAKTTPAPK 181 TPPSSGPEPK 191 SGDRSGYSSP
201 GSPGTPGSR 211 RTPSLPTPPT 221 REPKVAVVR 231 TPKPSPSAK 241 SRLQTAPEVM 251 PDLKNVSKLI 261 GSTENLKHQP 271 GGGKVIINK 281 KLDLSNVQSK 291 CGSKDNIKHV
301 FGGSSVQIVY 311 KPVDLKSVTS 321 KCSGLNLIHH 331 KPGGSGVEVK 341 SEKLDPKDRV 351 QSKIGSLDNI 361 THVPGGNKK 371 IETHKLTFRE 381 NAKAKTDHGA 391 EIVKSPVVS
401 GDTSPRHLSN 411 VSSGTSIDMV 421 DSPQLATLAD 431 EVSASLAKQG 441 I
    
```



Podakovanie

Táto práca vznikla za podpory grantu agentúry APVV pod grantovým číslom APVV-0677-12.

Literatúra

- Abraha, A., Ghoshal, N., Gamblin, T.C., Cryns, V., Berry, R.W., Kuret, J., and Binder, L.I. (2000). C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. *J Cell Sci* 113 Pt 21, 3737-3745.
- Anthis, N.J., and Clore, G.M. (2013). Sequence-specific determination of protein and peptide concentrations by absorbance at 205 nm. *Protein Sci* 22, 851-858.
- Blochliker, N., Xu, M., and Caflisch, A. (2015). Peptide Binding to a PDZ Domain by Electrostatic Steering via Nonnative Salt Bridges. *Biophys J* 108, 2362-2370.
- Cehlar, O., Skrabana, R., Kovac, A., Kovacech, B., and Novak, M. (2012). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of tau protein microtubule-binding motifs in complex with Tau5 and DC25 antibody Fab fragments. *Acta Crystallogr F* 68, 1181-1185.
- Csoková, N., Skrabana, R., Liebig, H.D., Mederlyova, A., Kontsek, P., and Novak, M. (2004). Rapid purification of truncated tau proteins: model approach to purification of functionally active fragments of disordered proteins, implication for neurodegenerative diseases. *Protein Expres Purif* 35, 366-372.
- Derisbourg, M., Leghay, C., Chiappetta, G., Fernandez-Gomez, F.J., Laurent, C., Demeyer, D., Carrier, S., Buee-Scherrer, V., Blum, D., Vinh, J., *et al.* (2015). Role of the Tau N-terminal region in microtubule stabilization revealed by new endogenous truncated forms. *Sci Rep-Uk* 5.
- Dogan, J., Gianni, S., and Jemth, P. (2014). The binding mechanisms of intrinsically disordered proteins. *Phys Chem Chem Phys* 16, 6323-6331.
- Dogan, J., Jonasson, J., Andersson, E., and Jemth, P. (2015). Binding Rate Constants Reveal Distinct Features of Disordered Protein Domains. *Biochemistry-US* 54, 4741-4750.
- Gamblin, T.C., Chen, F., Zambrano, A., Abraha, A., Lagalwar, S., Guillozet, A.L., Lu, M., Fu, Y., Garcia-Sierra, F., LaPointe, N., *et al.* (2003). Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10032-10037.
- Ganguly, D., Zhang, W.H., and Chen, J.H. (2013). Electrostatically Accelerated Encounter and Folding for Facile Recognition of Intrinsically Disordered Proteins. *Plos Comput Biol* 9.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., and Crowther, R.A. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3, 519-526.
- Kjaergaard, M., Teilum, K., and Poulsen, F.M. (2010). Conformational selection in the molten globule state of the nuclear coactivator binding domain of CBP. *P Natl Acad Sci USA* 107, 12535-12540.
- Lawrence, C.W., Kumar, S., Noid, W.G., and Showalter, S.A. (2014). Role of Ordered Proteins in the Folding-Upon-Binding of Intrinsically Disordered Proteins. *J Phys Chem Lett* 5, 833-838.
- Mukrasch, M.D., Bibow, S., Korukottu, J., Jeganathan, S., Biernat, J., Griesinger, C., Mandelkow, E., and Zweckstetter, M. (2009). Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution. *PLoS Biol* 7, e34.

- Oates, M.E., Romero, P., Ishida, T., Ghalwash, M., Mizianty, M.J., Xue, B., Dosztanyi, Z., Uversky, V.N., Obradovic, Z., Kurgan, L., *et al.* (2013). (DP2)-P-2: database of disordered protein predictions. *Nucleic Acids Research* *41*, D508-D516.
- Panda, D., Samuel, J.C., Massie, M., Feinstein, S.C., and Wilson, L. (2003). Differential regulation of microtubule dynamics by three- and four-repeat tau: implications for the onset of neurodegenerative disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 9548-9553.
- Peck, A., Sargin, M.E., LaPointe, N.E., Rose, K., Manjunath, B.S., Feinstein, S.C., and Wilson, L. (2011). Tau Isoform-Specific Modulation of Kinesin-Driven Microtubule Gliding Rates and Trajectories as Determined with Tau-Stabilized Microtubules. *Cytoskeleton* *68*, 44-55.
- Pedersen, J.T., and Sigurdsson, E.M. (2015). Tau immunotherapy for Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* *21*, 394-402.
- Schwalbe, M., Ozenne, V., Bibow, S., Jaremko, M., Jaremko, L., Gajda, M., Jensen, M.R., Biernat, J., Becker, S., Mandelkow, E., *et al.* (2014). Predictive Atomic Resolution Descriptions of Intrinsically Disordered hTau40 and alpha-Synuclein in Solution from NMR and Small Angle Scattering. *Structure* *22*, 238-249.
- Tompa, P., and Fuxreiter, M. (2008). Fuzzy complexes: polymorphism and structural disorder in protein-protein interactions. *Trends Biochem Sci* *33*, 2-8.
- Zhou, H.X. (2012). Intrinsic disorder: signaling via highly specific but short-lived association. *Trends Biochem Sci* *37*, 43-48.
- Zhu, S.L., Shala, A., Bezginov, A., Sljoka, A., Audette, G., and Wilson, D.J. (2015). Hyperphosphorylation of Intrinsically Disordered Tau Protein Induces an Amyloidogenic Shift in Its Conformational Ensemble. *Plos One* *10*.

Recenzoval

Mgr. Ivana Nemčovičová, PhD.

Virologický ústav SAV

LOKÁLNY IMUNOPROFIL KARCINÓMOV – NOVÁ ÉRA KLASIFIKÁCIE TUMOROV

Hrubiško M.

Onkologický ústav svätej Alžbety, Bratislava

Súhrn

Text približuje aktuálne poznatky o mechanizmoch, ktorými imunitný systém na jednej strane bráni vzniku a vývoju tumorov, na druhej strane ktorými naopak ich vzniku a rozvoju prispieva. V ďalšej časti sa autor zamýšľa, či a ako môže k zhodnoteniu stavu pacienta a jeho prognóze prispieť meranie imunitných parametrov z periférnej krvi. Upozorňuje sa na relatívne obmedzenú výpovednú hodnotu periférnych parametrov a zdôrazňuje sa potreba ich sledovanie v dynamike. V tretej časti autor približuje novo vznikajúcu oblasť imuno-onkológie, ktorou je stanovovanie lokálneho imunitného infiltrátu, tzv. imunoscóre, ktoré môže významne spresniť klasifikáciu pacientov v čase stanovania diagnózy, aj počas liečby. Na rozdiel od zaužívanej TNM klasifikácie nádorov môže lokálny imunoprofil pomôcť odhadnúť odpoveď pacienta na liečbu.

Kľúčové slová: malígny nádory, lokálny imunitný infiltrát, lokálne imunoscóre.

LOCAL IMMUNE PROFILE OF CARCINOMAS – NEW ERA OF TUMOUR CLASSIFICATION

Summary

Text explains actual knowledge about immune mechanisms protecting us from the formation and development of malignant tumours and also about immune mechanisms contributing to tumour genesis and progression. In the next part author critically discusses the importance of measuring immune parameters from peripheral blood. Significance of peripheral immune parameters is in malignant patient limited. Assessment of these parameters in dynamics is emphasised. In the third part author outlines new field of immuno-oncology, which is assessment of local immune infiltrate, so called local immune score. This local immune parameter of tumours may give more precision to patient usual TNM classification, to their prognosis and the possible therapeutic answer.

Key words: malignant tumours, local immune infiltrate, immunoscore.

1. Vznik, vývoj a prognóza malígneho nádoru z pohľadu biologických markerov

Okrem základných genetických a environmentálnych predpokladov podmieňuje vznik a ďalší vývoj nádoru komplexné mikroprostredie v ktorom sa vyvíja. Tu sa odohrávajú interakcie nádorových buniek s hostiteľskými, s ich produktmi (cytokíny, chemokíny, produkty bunkového metabolizmu) a s krvnými a lymfatickými cievami. Prognózu pacienta (vývoj nádoru, odpoveď na liečbu) predurčuje vrodenná komplexnosť tohto multifaktorového procesu. Pozornosť výskumu sa dlhodobo venuje úlohe zápalu a imunitného dohľadu v mikroprostredí vznikajúcich nádorov. Chronický zápal v tkanive, ktorý spôsobujú chemické látky (tzv. kancerogény), fyzikálne vplyvy (napr. žiarenie), aj infekčné agens (napr. HPV, vírusy hepatitídy B a C, *Helicobacter pylori*), môže viesť v bunkách k zmenám, ktoré v konečnom dôsledku môžu viesť k nekontrolovanej proliferácii buniek.

Poznanie mechanizmov, ktorými tukové tkanivo aktívne vstupuje do procesu chronického zápalu, pomohlo pochopiť už dlhšie známu negatívnu úlohu obezity v patogenéze rôznych chorôb. Tukové tkanivo je aktívny endokrinný orgán, ktorý vylučuje mastné kyseliny, peptidové hormóny a adipokíny. Tieto biologicky aktívne faktory pôsobia lokálne aj periférne a ovplyvňujú viacero procesov, vrátane metabolizmu glukózy, mastných kyselín, citlivosti na inzulín, diferenciácie buniek, zápalu a imunitnej odpovede. Obezitu charakterizuje zvýšená veľkosť, počet aj aktivita adipocytov. Niektoré adipokíny (leptín, rezistín, adiponektín) ovplyvňujú bunkovú proliferáciu, apoptózu a angiogenezu, známe to rizikové faktory rozvoja rakoviny. Vznik postmenopauzálny rakoviny prsníkov či endometriového karcinómu obéznych žien sa pripisoval nadmernej produkcii estrogénov v tukovom tkanive, teraz sa však viac poukazuje na zmeny v hladinách adipokínov vylučovaných adipocytmi, infiltrujúcimi makrofágmi a strómovými bunkami (1, 2).

Fungujúci imunitný systém (IS) by mal dokázať tento zápal kontrolovať. Súčasný výskum sa zameriava na spoznanie mechanizmov, ktoré nás môžu pred vznikom rakoviny chrániť a rovnako aj tých, ktoré môžu rozvoj nádoru podporiť. Niektoré zložky neadaptívnej imunity v prípade nadmernej aktivácie môžu onkogenezu podporiť. Na nežiaducej imunitnej supresii podporujúcej vznik a rozvoj nádoru sa podieľajú viaceré typy imunitných aj štruktúrových buniek, ako sú s nádormi asociované fibroblasty, makrofágy fenotypu M2, T-regulačné bunky, NKT bunky typu 2 a myeloidné supresorické bunky MDSC (*myeloid-derived suppressor cells*).

Ukazuje sa, že spomedzi uvedených buniek zohrávajú v progresii nádorov kľúčovú úlohu supresívne pôsobiace MDSC bunky (3). Ide o heterogénnu populáciu nezrelých myeloidných buniek pochádzajúcich z progenitorových myeloidných buniek. MDSC charakterizuje schopnosť potláčať adaptívnu aj neadaptívnu imunitu, dominante priamou inhibíciou cytotoxických funkcií T lymfocytov a NK buniek. Stanovovanie týchto buniek by v klinickej praxi mohlo prispieť ku klasifikácii štádia onkologickej choroby, aj pri meraní odpovede na liečbu. Zvýšené množstvo MDSC sa spája s “chemorezistentným fenotypom” pacienta. Prípadné ovplyvnenie MDSC by mohlo predstavovať jednu z možných liečebných stratégií liečby nádorov. Aj T-regulačné bunky potlačením špecifickej adaptívnej protinádorovej imunity zohrávajú pri onkogenéze negatívnu úlohu (4).

Nádorové bunky sú aj producentmi viacerých zložiek komplementu, pričom sa ukazuje, že viaceré zložky komplementovej kaskády môžu vývoj nádoru podporiť (5). Významnú úlohu pri tom zohrávajú aj genetické polymorfizmy, napr. je známa asociácia medzi SNP komplementového receptora 1 (CR1) a vývojom nádoru žalúdka (6).

Lekárska veda hľadá užitočné diagnostické a prognostické biomarkery, ktoré by pomohli včas odhaliť chorobou ohrozeného človeka a napovedať jeho prognózu a odpoveď na liečbu. Keďže tumory sú infiltrované bunkami IS, skúmajú sa aj imunologické markery, ktoré by k uvedenému prispeli. Štandardne sa biomarkery, vrátane parametrov IS, merajú v periférnej krvi. Ukazuje sa však, že periférne imunitné parametre nedokážu špecificky a dostatočne citlivo zachytiť vznik a vývoj tumoru. Pre IS je typické, že odráža všetky vplyvy na organizmus, teda aj tie ktoré so sledovanou chorobou nemajú v danej chvíli nič spoločné.

Reakcia IS na akýkoľvek stresový podnet je do značnej miery univerzálna. Parametre namerané z periférnej krvi nás viac informujú o celkovom stave organizmu v čase odberu, ako o stave choroby ktorú vyšetrojeme. Periférna hodnota humorálnych parametrov ako sú cytokíny a chemokíny nevytvorí o tom, čo sa deje v oblasti tumoru. Ide o informačné molekuly s veľmi krátkym biologickým polčasom, ktorých koncentrácia usmerňuje medzibunkovú komunikáciu a influx zápalových buniek do ložiska zápalu (vrátane tumoru). Záujem sa preto presúva k meraniu imunitných parametrov lokálne priamo v nádore a jeho bezprostrednom okolí.

2. Periférne parametre

Napriek uvedenému, meranie celkového stavu imunity má u onkologického pacienta zmysel. Pri hodnotení tzv. imunitného profilu pacienta okrem bežných znakov zápalu (leukogram, sedimentácia, CRP, zložky komplementu a jeho aktivačné dráhy, celková hladina protilátok tried IgG, IgA, IgM) stanovujeme aj zastúpenie jednotlivých populácií a subpopulácií lymfocytov (pomocné, cytotoxické, regulačné T-lymfocyty, NK- a NKT-bunky), ich aktiváciu (expresia molekúl HLA-DR, CD25, CD38 a CD69) a tiež expresiu znakov regulačných T-lymfocytov (CD4, CD25, CD127, FoxP3). Komplexné posúdenie týchto parametrov môže pomôcť zhodnotiť aktuálny stav pacienta a jeho prognózu, ako sme ukázali na súbore žien s nemalígnymi a malígnymi léziami prsníkov v rôznom štádiu (7). IS každého pacienta reaguje na chorobu aj liečbu jedinečne a tak je vhodné poznať imunitný profil ešte pred začatím liečby. Vyšetrenie stavu imunity pred operáciou pomôže vytypovať jedincov, u ktorých je vhodná imunologická predoperačná príprava. Výpovednú informáciu poskytne najmä vyšetrenie imunoprofilu v dynamike.

Prietoková cytometria, ktorou môžeme naraz merať niekoľko parametrov, slúži pri onkohematologických nozologických jednotkách (lymfómy/leukémie) na priamu diagnostiku a klasifikáciu, aj na vyhodnotenie prípadnej recidívy choroby, možno ju však využiť aj na meranie množstva DNA v nádorových bunkách. U pacientov s nádormi prsníka, močového mechúra alebo prostaty môže abnormálne množstvo DNA poukazovať na recidívu choroby (8). Táto metóda je perspektívna aj na diagnostiku rádiosenzitivity a cirkulujúcich endotelových a progenitorových buniek (9, 10).

Adipokínový panel stanovuje metódou ELISA leptín, rezistín a adiponektín v sérach od pacientov. Stanovuje sa predovšetkým tzv. LAR (*leptin to adiponectin ratio*). Ukazuje sa, že stúpajúce hladiny leptínu a rezistínu a klesajúca hladina adiponektínu majú u onkologických pacientov negatívnu prognostickú hodnotu. Opačné pohyby koncentrácií týchto troch adipokínov predstavujú protektívny faktor ku vzniku hormonálne dependentných nádorov (11).

V praxi sa často zabúda na sledovanie celkovej hladiny imunoglobulínov (IgG, IgA, IgM). U onkologických pacientov vplyvom choroby, ale najmä podávanej cytotoxickkej liečby, vzniká často deficiencia B-lymfocytov s následným poklesom tvorby imunoglobulínov. Diskrétnejšiu poruchu môže odhaliť meranie podtried imunoglobulínov a najmä špecifických antiinfekčných, resp. anti-vakcinačných protilátok. Z oblasti nešpecifickej humorálnej imunity má zmysel sledovanie aktivačných dráh komplementu, ktoré bývajú deficientné.

Vrodená schopnosť imunitnej odpovede a jej reakcia na chorobu a on-

kologickú cytotoxickú liečbu je však natoľko rôznorodá a merané periférne parametre natoľko závislé od mnohých na pacienta vplyvajúcich (vonkajších aj vnútorných) okolností, že sa len ťažko dajú robiť všeobecne platné závery. Toto je aj rozhodujúci dôvod, prečo zatiaľ nemáme k dispozícii všeobecne akceptovaný univerzálny „periférny imunologický onkomarker“. Sledovanie periférneho imunitného profilu je zmysluplné len v dynamike, u konkrétneho jedinca.

3. Lokálny imunitný infiltrát

Lokálny imunitný infiltrát nádoru tvoria makrofágy, dendritové bunky (DC), mastocyty, prirodzené zabíjače (NK), naivné, efektorové (pomocné T_H1 , T_H2 , T_H17 , cytotoxické, regulačné) a pamäťové T-lymfocyty a B-lymfocyty. Uvedené bunky sa môžu nachádzať v jadre tumoru (*tumor center* – CT), v jeho invázivnom okraji (*invasive margin* – IM) a / alebo v príľahlých novo sa tvoriacich terciárnych lymfatických štruktúrach. Analýza týchto infiltrátov ukázala veľkú heterogenitu nie iba medzi jednotlivými typmi nádorov, ale aj medzi jednotlivými pacientmi s rovnakým histologickým typom nádoru (12).

Nádory sa v čase diagnózy rutinne charakterizujú tzv. TNM-skóre vychádzajúcim z rozsahu nádoru (T), postihnutia lymfatických uzlín (N) a prítomnosti metastáz (M). Napriek nespornému významu tejto klasifikácie poznáme jej obmedzenia. Prognóza pacientov s rovnakým TNM-štádiom toho istého histologického typu nádoru sa môže významne líšiť, okrem toho táto klasifikácia nič nehovorí o možnej odpovedi na liečbu (12). Do popredia preto vystupujú genetické a imunologické charakteristiky nádorov - výskum v tejto oblasti je veľmi dynamický a prináša neustále nové poznatky.

Pri rôznych typoch nádorov (melanóm, kolorektálny karcinóm, karcinóm ovárií, hlavy a krku, močového mechúra, prsnej žľazy, obličiek, prostaty, pľúc) sa opakovane potvrdilo, že výrazná lymfocytová infiltrácia sa asocjuje s antitumorovou odpoveďou a lepšou prognózou pacienta. Väčšina štúdií ukázala, že najmä vysoký počet $CD3^+CD8^+$ cytotoxických lymfocytov a $CD45RO^+$ pamäťových lymfocytov sa spája s dlhšou periódou bez príznakov choroby (po primárnom chirurgickom zákroku) a s celkovo dlhším prežívaním pacientov (13). Na základe týchto štúdií sa navrhla nová klasifikácia nádorov vychádzajúca z hodnotenia zastúpenia uvedených dvoch bunkových populácií v jadre nádoru a na jeho invázivnom okraji, tzv. imunoskóre. Imunoskóre 0 vyjadruje nízky počet cytotoxických T-lymfocytov a pamäťových buniek v jadre tumoru, aj na jeho invázivnom okraji; na opačnej strane spektra je imunoscóre 4, ktoré vyjadruje

vysoké počty uvedených bunkových typov v obidvoch oblastiach. Samozrejme jeden bunkový typ môže byť vysoko zastúpený iba v jednej oblasti, prípadne v oboch, ale druhý nie (skóre 1, 2, alebo 3). Okrem imunoscóre sa ešte hodnotí terciárne lymfatické tkanivo - čím viac je zastúpené, tým je prognóza prežitia lepšia. Naopak, väčšia infiltrácia tumoru makrofágmi typu M2 (antiinflamačný, ale aj imunosupresívny fenotyp) favorizuje rast a šírenie tumoru.

Prognostický význam imunoscóre preverila štúdia u pacientov s kolorektálnym karcinómom TNM štádia I - II, v ktorej sa sledovali relapsy a prežívanie po stanovení diagnózy a operačnom odstránení tumoru (14). Medzi 5 skupinami imunoscóre (0, 1, 2, 3, 4) sa zistili dramatické rozdiely. Zatiaľ čo behom 5 rokov sledovania relabovalo iba 4,8 % a preživalo 86,2 % pacientov skupiny 4, v skupine 0 relabovalo 75 % pacientov a preživalo iba 27,5 %. Následne sa potvrdila univerzálnosť imunoscóre pri karcinómoch rôznych iných orgánov a bunkových typov (15). V súčasnosti je k dispozícii metaanalýza 124 prác zaoberajúcich sa významom lymfocytových subpopulácií infiltrujúcich tumory, ktorá jednoznačne potvrdila prognostický význam $CD8^+CD45RO^+$ a $CD3^+T_H1$ -lymfocytov (13). U pacientov v remisii sa pozorovala významná inverzná korelácia $CD8^+$ lymfocytových infiltrátov s TNM-skóre, zatiaľ čo u pacientov s relapsom choroby sa pozoroval nízky počet $CD8^+$ -buniek nezávisle od TNM-štádia tumoru (16). Lokálne imunoscóre tak nezávisle na TNM-klasifikácii poskytujú dôležitú prognostickú informáciu o šanci na prežívanie bez choroby, aj na celkové prežívanie.

Úloha ostatných subpopulácií (T_H2 , T_H17 , T_{reg}) a NK-buniek je podstatne menej jasná. Pri niektorých typoch nádorov sa pozorovala v súvislosti s vyššou mierou ich zastúpenia dobrá prognóza, pri iných žiaden vplyv, pri niektorých negatívny vplyv. Čo sa týka regulačných T-lymfocytov, problémom je rôznorodosť tejto bunkovej populácie. Bežne sa nestanovuje čo T_{reg} -lymfocyty suprimujú. Ak pôsobia tlmivo na efektorové antitumorové T bunky, ich vplyv je negatívny, naopak, ak suprimujú chronický zápal, môžu mať pozitívny vplyv. NK-bunkám sa všeobecne pripisuje protektívna antitumorová úloha. Ukazuje sa však, že takto sa prirodzené zabíjače môžu uplatniť iba pri veľmi včasných (predklinických) štádiách tumoru, v prípade už detekovateľného tumoru je ich úloha obmedzená (13).

Vyvíjajú aj ďalšie metódy vychádzajúce z merania lokálneho zastúpenia imunitných buniek v tumore. Brazílski autori opísali unikátnu metódu, pri ktorej sa paralelne s klasickým histologickým, resp. imunohistochemickým vyšetrením tumorového tkaniva z rovnakých vzoriek robili aj bunkové suspen-

zie, ktoré sa vyšetrili pomocou prietokovej cytometrie (17). Autori vyšetrili 52 vzoriek od 40 pediatrických pacientov s podozrením na malígnu chorobu a jednoznačne potvrdili, že multiparametrová prietoková cytometria poskytuje rýchle a užitočné doplnkové dáta k rutinným histopatologickým metódam pri skríningu a klasifikácii nádorov.

Aj meranie zložiek komplementu priamo v tkanive tumoru môže poskytnúť užitočnejšiu informáciu o aktuálnom stave a prognóze tumoru, ako ich meranie v periférnej krvi. Tak napríklad u pacientov s nádormi pľúc alebo vaječníkov sa vyššie hodnoty C3 (merané v tumore pomocou mRNA) spájali so zhoršeným prežívaním (18).

V blízkej budúcnosti sa dá očakávať široké využitie stanovovania lokálneho imunoscóre: môže napríklad pomôcť rozhodnúť, ktorý pacient by už v ranom štádiu tumoru mal dostať k štandardnej liečbe nádorovú vakcínu, alebo môže napríklad u geriatrického pacienta s obrazom výrazného cytotoxického infiltrátu pomôcť rozhodnúť, že je zbytočné ho zaťažiť chemoterapiou. Imunofenotypizácia ako súčasť rutinného diagnostického a prognostického hodnotenia tumorov (popri tradičnej klasifikácii TNM) môže poskytnúť kľúčovú informáciu umožňujúcu optimálnu stratifikáciu pacientov z hľadiska prognózy vývoja choroby, aj z hľadiska predikcie odpovede na liečbu a tak presnejšieho určenia liečebnej stratégie (19). Nové horizonty môže otvoriť digitálne zobrazovanie lokálnej imunitnej odpovede – umožňuje nie iba opísať zastúpenie cytotoxických buniek v centre a invazívnom okraji tumoru, ale aj ich spočítať.

Literatúra

- KARAPANAGIOTOU, E.M., TSOCHATZIS, E.A., DILANA K.D. et al.: *The significance of leptin, adiponectin, and resistin serum levels in non-small cell lung cancer (NSCLC)*. *Lung Cancer* 2008; 61(3): 391–397.
- DIAKOWSKA, D., MARKOCKA-MACZKA, K, SZELACHOWSKI P., GRABOWSKI K.: *Serum Levels of Resistin, Adiponectin, and Apelin in Gastroesophageal Cancer Patients*. *Disease markers* 2014; Article ID 619649, 8 pp. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/619649>.
- KATOH, H., WATANABE, M. *Myeloid-Derived Suppressor Cells and Therapeutic Strategies in Cancer*. *Mediators of Inflammation* 2015; Article ID 159269, 12 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/159269>
- CURIEL, T.J.: *Regulatory T cells and treatment of cancer*. *Curr Opin Immunol* 2008; 20(2): 241–246.
- RUTKOWSKI, M., SUGHRUE, M.E., KANE, A.J. et al.: *Cancer and Complement cascade*. *Mol cancer Res* 2010 8; 1453-1465.
- ZHAO, L., ZHANG, Z., LIN, J. et al.: *Complement Receptor 1 Genetic Variants Contribute to the Susceptibility to Gastric Cancer in Chinese Population*. *Cancer* 2015; 6(6):525-530.

- HRUBIŠKO, M., SANISLÓ, L., ZUZULOVÁ, M. et al.: Immunity profile in breast cancer patients. *Bratisl. Lek. Listy* 2010; 111(1): 20-25.
- BÖCKING, A., MAURITS, M., DIETZ, J., BIESTERFELD, S.: DNA-cytometric grading of prostate cancer systematic review with descriptive data analysis. *Pathology Discovery* 2014; 2 (Article7): 1-20.
- ROODHART, J.M., LANGENBERG, M.H., VERMAAT, J.S. et al.: Late release of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells after chemotherapy predicts response and survival in cancer patients. *Neoplasia* 2010; 12(1): 87-94.
- MATSUSAKA, S.M., MISHIMA, Y., SUENAGA, M. et al.: Circulating Endothelial Progenitors and CXCR4-Positive Circulating Endothelial Cells Are Predictive Markers for Bevacizumab. *Cancer* 2011; 117(17): 4026-4032.
- KANG, J.H., YU, B.Y., YOUN, D.S.: Relationship of Serum Adiponectin and Resistin Levels with Breast Cancer Risk. *J Korean Med Sci* 2007; 22: 117-21
- ANGELL H., GALON J.: From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer. *Current opin Immunol* 2013; 25(2): 261-267.
- FRIDMAN W.H., PAGES F., SAUTES-FRIDMAN C., GALON J.: The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rec Cancer* 2012; 12: 298-306.
- PAGES F., KIRILOVSKI A., MLECNIK B. et al.: In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early stage colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5944-5951.
- GALON J., PAGES F., MARINCOLA F.M. et al. The Immune score as a New Possible Approach for the Classification of Cancer. *J Transl Med* 2012; 10: 1.
- MLECNIK B., TOSOLINI M., KIRILOWSKI A. et al.: Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol* 2011, 29: 610-618.
- FERREIRA-FACIO, C.S., MILITO, C., BOTAFOGO, V. et al.: Contribution of Multiparameter Flow Cytometry Immunophenotyping to the Diagnostic Screening and Classification of Pediatric Cancer. *PLoS ONE* 2013; 8(3): e55534.
- CHO, M.S., VASQUEZ, H.G., HAN, H.D., et al. Complement promotes growth of ovarian cancer. *Proceedings of the 104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. Cancer Res* 2013; 73(Abtract 4990).
- GAJEWSKI T.F., LOUAHED J., BRICHARD V.G.: Gene signature in melanoma associated with clinical activity: a potential clue to unlock cancer immunotherapy. *Cancer J* 2010, 16: 399-403.

Recenzoval

Prof. MUDr. Milan Buc, DrSc.

Imunologický ústav LFUK

INTERLEUKÍN 2 V LIEČBE AUTOIMUNITNÝCH CHORÔB

Buc M.

Imunologický ústav, Lekárska fakulta UK, Bratislava

Viacere autoimunitné choroby sa vyznačujú tým, že je pri nich nedostatočný počet alebo nedostatočná aktivita regulačných T-lymfocytov. Z uvedeného vyplýva, že ak by sa podporila ich aktivita, došlo by aj k útlmu alebo aj úplnému zastaveniu autoimunitných procesov. Zatiaľ však neexistuje prípravok, ktorý by zvyšoval aktivitu nTreg-lymfocytov. Na druhej strane však pribudli poznatky o biologickej funkcii regulačných T-lymfocytov, z ktorých vyplynulo, že interleukín 2 je principiálnym faktorom, ktorý zabezpečuje ich prežívanie na periférii a tak umožňuje, aby presadzovali svoju imunosupresívnu funkciu. Navyše nTreg-lymfocyty odpovedajú na IL-2 vo veľmi nízkych koncentráciách. Uvedená vlastnosť nTreg-lymfocytov priviedla vedeckých a klinických pracovníkov na myšlienku využiť nízkodávkové podávanie interleukínu 2 v liečbe niektorých autoimunitných chorôb. Predbežné výsledky sú veľmi nádejné a tak dochádza k ďalšiemu rozšíreniu spektra disponibilných biologík.

Kľúčové slová: autoimunitné choroby, IL-2, IL-2 receptor, nTreg-lymfocyty

Základnou vlastnosťou imunitného systému je jeho schopnosť rozlíšiť vlastné molekuly buniek, tkanív a orgánov (*self*) od nevlastných (*not-self*), vlastné tolerovať a cudzie likvidovať. Táto schopnosť nie je imunitnému systému *a priori* daná, musí sa ju naučiť. Deje sa to počas dozrievania T-lymfocytov v týmuse. Diferencujúce sa T-lymfocyty tu rozpoznávajú vlastné antigény na bunkách prezentujúcich antigén (najvýznamnejšia sú dendritové bunky), ktoré im ich prezentujú prostredníctvom svojich HLA-molekúl druhej triedy. A je interakcia medzi T-lymfocytmi a bunkami prezentujúcimi antigén silná, tak takéto T-lymfocyty hynú apoptotickým procesom a do periférie, do sekundárnych lymfoidných orgánov, sa nedostávajú. Tento proces, ktorý označujeme ako centrálna (novšie – recesívna) tolerancia, nie je absolútny, časť autoreaktívnych T-lymfocytov svojej záhube uniká a v periférii predstavujú potenciálne nebezpečenstvo, že po svojej prípadnej aktivácii začnú vyvíjať autoimunitné procesy. Samozrejme príroda na túto možnosť odpovedala vytvorením mechanizmov, ktoré im v takejto aktivácii zabránia. Týchto mechanizmov, ktoré poznáme pod názvom periférna (novšie – dominantná) tolerancia, je viacero; medzi nimi najdôležitejšie sú tie, ktoré zabezpečujú prirodzené regulačné T-lymfocyty (pre prehľad pozri Buc 2012, Rose a Mackay 2014).

Prirodzené regulačné T-lymfocyty (nTreg) sa vyvíjajú dreni týmusu ako nezávislá, samostatná populácia buniek. Diferenciácia nTreg-lymfocytov si vyžaduje aktiváciu špecifického génu – *FOXP3* (*forkhead box P3*; Xp11.23-q13.3.), ktorý kóduje rovnomený transkripčný faktor. O jeho veľkom biologickom význame svedčí skutočnosť, že ak dôjde k mutácii *FOXP3*-génu vznikne komplex autoimunitných chorôb, ktoré zahrňujeme pod pojem IPEX-syndróm (IPEX = *immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy*); je nezlučiteľný so životom. Okrem *FOXP3*, nTreg-lymfocyty potrebujú pre svoj vývoj v týmuse a hlavne prežívanie na periférii interleukín-2 (IL-2) (1, 2).

2. IL-2, jeho receptor a funkcia

IL-2 je cytokín, ktorý produkujú aktivované pomocné T-lymfocyty (Th1), v menšej miere aj aktivované cytotoxické T-lymfocyty, aktivované dendritové bunky, NK- a NKT bunky (3). IL-2 sa nadväzuje na svoj špecifický receptor (IL-2R). Tento sa skladá sa z troch reťazcov: alfa, beta a gama. Alfa-reťazec sa v membráne Th-lymfocytu objavuje iba po jeho aktivácii, a preto sa pôvodne označoval Tac (**T** activation; dnes – CD25). Nadviazanie IL-2 na alfa-reťazec však nevedie k nijakej biologickej odpovedi, musí sa najprv spojiť s beta-reťazcom (CD122), ktorý sa exprimuje súčasne s tretím, gama-reťazcom (CD132). Bunky, ktoré majú IL-2 receptor zložený zo všetkých troch reťazcov, ako napr. aj Treg-lymfocyty, viažu IL-2 s vysokou afinitou, približne 10^{-11} M; označujeme ho ako vysokoafinitný receptor. Pokojné Th-lymfocyty exprimujú iba receptor beta/gama, ktorý viaže IL-2 iba nízkoafinitne (10^{-9} M). Po aktivácii Th-lymfocytov sa však v membráne bunky rýchlo objaví alfa-reťazec. Vzniknutý vysokoafinitný receptor podstatnou mierou zníži prah aktivácie potrebný na indukciu proliferácie Th-lymfocytov a špecifická imunitná odpoveď sa môže rozbehnúť (3, 4).

IL-2 je pleiotropný cytokín, čo znamená, že má viaceré funkcie. Ako sa píše vyššie, je potrebný na diferenciáciu nTreg-lymfocytov v týmuse, hoci v tejto činnosti ho môže zastúpiť IL-7 alebo IL-15. Je však absolútne nevyhnutný pre ich funkčnú stabilitu na periférii (5). Je zaujímavé, že samotné nTreg-lymfocyty IL-2 neprodukujú (6). Z ďalších funkcií IL-2 treba uviesť, že podporuje polarizáciu naivných Th-lymfocytov do subpopulácií Th1 (7), Th2 (8) a Th9 (9); na druhej strane však IL-2 potláča ich diferenciáciu do subpopulácií Th17 (10) a Tfh (11); principiálne cytokíny, ktoré produkujú jednotlivé subpopulácie pomocných T-lymfocytov sa uvádzajú v tab. 1. IL-2 zabezpečuje aj terminálnu diferenciáciu cytotoxických CD8⁺ T-lymfocytov (12).

NK-bunky exprimujú vo veľkom množstve nízkoafinitný IL-2 receptor. IL-2 stimuluje ich proliferáciu a zvyšuje ich cytotoxickú aktivitu ako aj produkciu cytokínov, hoci v menšom rozsahu ako sa to je pod vplyvom IL-12 (13). ILC2-bunky (ILC = *innate lymphoid cells*) exprimujú vysokoafinitný IL-2R. IL-2 v nich indukuje syntézu IL-5, ktorý následne zodpovedá za expanziu eozinofilov (14). Napokon gama/delta T-lymfocyty pod vplyvom IL-2 začnú produkovať interferón gama a zvyšuje sa ich cytotoxická aktivita (15).

Z hľadiska imunoterapie interleukínom 2 je dôležité zdôrazniť, že regulačne T-lymfocyty v porovnaní s efektorovými T-lymfocytmi majú prah aktivácie 10 až 20-krát nižší. Je to dané tým, že jednak exprimujú vysokoafinitný IL-2 receptor a jednak tým, že ich signalizačné dráhy mediované kinázami JAK1 a JAK-3 a transkripčnými faktormi STAT5 sú vysoko efektívne (16, 17). Z uvedeného vyplýva, že hlavná biologická úloha IL-2, nie je v aktivácii T-lymfocytov, ako sme boli o tom presvedčení ešte donedávna, ale v udržovaní funkcie Treg-lymfocytov. Napokon svedčia o tom pokusy aj na myšiach. Ak sa vytvoria myši, ktoré neprodukujú IL-2, resp. neexprimujú IL-2R, vyvinú ulceróznu kolitídu alebo tvoria početné autoprotílátky (18, 19). Aj u človeka poznáme mutáciu v géne pre CD25 a takíto jedinci tiež vyvinú autoimunitné procesy (20). Napokon u jedincov, ktorí trpia na autoimunitné choroby, v porovnaní so zdravými, sa zistí znížená produkcia IL-2, čo môže viesť k zníženej funkcii nTreg-lymfocytov. Potvrdilo sa to pri autoimunitnom diabetes mellitus (21), reumatoidnej artritíde (22) a systémovom *lupus erythematosus* (23).

2. IL-2 ako imunoterapeutikum

Prvé biologické vlastnosti, ktoré sa spájali s IL-2 po jeho objavení v 60-tych rokoch minulého storočia sa spájali s jeho schopnosťou aktivovať T-lymfocyty, najmä cytotoxické a NK-bunky. Pomerne skoro sa identifikoval aj jeho gén a za krátko na to bol aj molekulo vo klonovaný, čo umožnilo od r. 1992 aj komerčnú prípravu IL-2 (aldesleukin /Proleukin®/) a následné využitie v klinickej praxi. Prirodzene IL-2 bol predurčený pre liečbu tých chorôb, kde bolo potrebné zvýšiť cytotoxickú aktivitu buniek imunitného systému. V USA ho FDA (*Food and Drug Administration*) schválilo pre liečbu renálneho karcinómu a malígneho melanómu. Podávali sa vysoké dávky IL-2, 42 až 50 miliónov i. u. (*international units*; MIU) každých 8 hodín, aby sa boli k dispozícii dostatočne vysoké hladiny cytokínu, ktoré by vždy zabezpečovali jeho väzbu vysokoafinitné receptory (IL-2 je podmieňuje expresiu alfa-reťazca, a tým aj existenciu vysokoafinitného receptora). Vyhodnotenie rozsiahlych štúdií ukázalo 15 % odpoveď na liečbu

a u 7 až 9 % liečených pacientov liečba mala aj dlhotrvajúci efekt (24). Vysokodávková terapia IL-2 sa nezaobišla bez vedľajších účinkov, pričom k najväčším komplikáciám patrilo vaskulárny presakujúci syndróm (*vascular leakage syndrome*). Je spôsobený väzbou IL-2 na CD25 v membránach endotelových buniek, čo ich aktivuje a dochádza k zvýšeniu priepustnosti kapilár a unikajúci albumín potom vedie k hypotenzii a edémom. Výsledkom bolo zlyhanie viacerých orgánov, s mortalitou do 4 % (25). Z uvedených dôvodov a nízkej účinnosti sa táto liečba v súčasnosti aplikuje iba výnimočne, nahradili ju monoklonové protilátky anti-CTLA4 (ipilimumab) (26) a anti-PD1 (nivolumab, lambrolizumab) (27).

Účinok IL-2 na regulačné T-lymfocyty poznáme už od polovice 90. rokov, ale trvalo viac ako 10 rokov kým sa začalo s klinickými skúškami sledujúcimi vplyv IL-2 na Treg-lymfocyty u pacientov trpiacich na autoimunitné choroby. Všeobecné vnímanie IL-2 lekármi totiž bolo, že ide o veľmi toxický liek, ktorý možno použiť iba v terminálnych štádiách liečby niektorých malignít. Navyše IL-2 sa vnímal ako cytokín, ktorý primárne stimuluje efektorové bunky, čo by mohlo zhoršiť prebiehajúce autoimunitné procesy.

Roku 2006 sa hľadal spôsob ako stimulovať Treg-lymfocyty u pacientov, ktorí trpeli vaskulitídou vyvolanou vírusom hepatitídy C (VHC). Z predchádzajúcich štúdií bolo totiž známe, že takíto pacienti majú znížené počty Treg-lymfocytov (28) a že liečba antivirotikami a monoklonovými protilátkami anti-CD20 (rituximab) viedla k normalizácii ich počtu (29). Na základe pozorovaní, že u pacientov liečených vysokými dávkami IL-2 dochádza k zvýšeniu počtu T-lymfocytov, rozhodlo sa v liečbe VHC vaskulitídy použiť IL-2. Aby sa vyhlí nepriaznivým vedľajším účinkom a zabránili pokiaľ možno čo najviac aktivácii efektorových buniek, rozhodlo sa, že sa bude podávať IL-2 v nízkych dávkach. Pacienti dostávali IL-2 v dávke 1,5 až 3,0 miliónov i. u. denne. Kumulatívne to za dva mesiace predstavovalo 50 miliónov i. u., čo korešponduje 1/3 dennej dávky pri vysokodávkovej liečbe pacientov s malignitami. Liečba bola dobre tolerovaná, došlo k dvojnásobnému vzostupu nTreg-lymfocytov a známky aktivácie efektorových T-lymfocytov vymizli (30).

Nízкодávková liečba autoimunitných chorôb IL-2

Úspech nízкодávkovej liečby IL-2 pri liečbe vaskulitídy indukovanej vírusom hepatitídy C podmienuje, že sa táto začala podávať aj pri iných autoimunitných chorobách, konkrétne pri autoimunitnom *diabetes mellitus*, *alopecia areata* a systémovom *lupus erythematosus*. Každá štúdia použila rozdielne dávkovanie IL-2, od 0,09 až do 5,4 miliónov i. u. (MIU) a kumulatívna dávka

sa pohybovala od 1,5 do 52,5 MIU a na základe týchto skúseností sa v súčasnosti odporúča začať 5-dňovú liečbu IL-2 v dávke 1 MIU/deň, po ktorej sa táto dávka opakuje v dvojtýždňových intervaloch. Úvodná liečba zvyšuje počty nTreg-lymfocytov v periférnej krvi na dvojnásobok ich počtu v periférnej krvi a udržiavacie dávky spôsobia, že počty nTreg-lymfocytov sa pohybujú medzi 20 až 60 % nad základné hodnoty (31). Ukázalo sa, že pacienti liečbu dobre tolerujú, z nepriaznivých účinkov sa pozorovali miestne reakcie v mieste vpichu a konštitučné symptómy (únava, zvýšená teplota, nevoľnosť a artralgie) (32).

Hlavný biologický účinok liečby nízkymi dávkami IL-2 sa prejavil predovšetkým na nTreg-lymfocytoch, a to nielen na ich zvýšenom počte v periférnej krvi a v mieste prebiehajúcich autoimunitných procesov (dokázané v bioptických vzorkách pri *alopecia areata*) (33), ale aj zvýšením ich charakteristických membránových znakov CD25, GITR (*glucocorticoid-induced TNFR-related protein*) a CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*) (34). Zaujímavé zistenie bolo, že došlo aj zvýšeniu CD8⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg-lymfocytov, dokonca 2- až 5-krát vyššom ako pri CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg-lymfocytov. Tieto bunky sú *in vitro* pokusoch značne imunosupresívne, či pôsobia tak aj *in vivo* ešte nevieme (31).

NK-bunky tak isto odpovedajú na nízke dávky IL-2, najmä regulačné CD56⁺, hoci nie až tak ako nTreg-lymfocyty. U pacientov s chronickou GvH chorobou (GvHD – *graft versus host disease*) liečených IL-2 sa počet periférnych NK-buniek sa v priebehu 8 týždňov sa zdvojnásobil kým nTreg-lymfocyty stúpili 6 až 8-násobne (35).

U pacientov liečených nízkymi dávkami IL-2 sa pozorovalo tiež zvýšenie počtu eozinofilov v periférnej krvi, eozinofília dosahovala až 10 % (35). Tento účinok zrejme zabráni požívaniu tejto liečby u alergických pacientov, tým skôr, že ILC2-bunky exprimujú vysokoafinitný IL-2 receptor. Aktivované ILC2-bunky produkujú IL-13 (35) hlavný cytokín, ktorý je potrebný na polarizáciu Th2-lymfocytov a IL-5, čo je maturačný a aktivačný cytokín pre eozinofily (14).

Významným zistením je aj zníženie počtu CD19⁺ B-lymfocytov a to aj B-lymfocytov marginálnej zóny (B2 B-lymfocyty). Tento efekt je významný najmä z hľadiska možnosti využitia nízkodávkovej liečby IL-2 pre tie choroby, pri ktorých v patogenéze hrajú významnú úlohu najmä autoprotilátky. Práve prebiehajúce klinické štúdie liečby SLE túto skutočnosť potvrdzujú; dokázal sa pokles hladín anti-DNA špecifických protilátok (30, 35).

nTreg-lymfocyty kontrolujú aj priebeh imunitnej odpovede na infekčné zárodky. Vzniká tak oprávnená otázka či zvýšenie počtu a imunosupresívnej aktivity nTreg-lymfocytov negatívne neovplyvní antimikrobiálnu imunitu. Predk-

linické a klinické údaje to zatiaľ nepotvrdzujú. U pacientov s chronickou infekciou VHC sa nepozoroval vzostup množstva vírusov napriek zvýšenému počtu nTreg-lymfocytov, naopak, vírusová záťaž bola na konci sledovaného obdobia o niečo nižšia v porovnaní s pôvodnými hodnotami zo začiatku liečby IL-2 (30).

Pozitívny účinok liečby IL-2 v nízkych dávkach sa odráža nielen v laboratórnych testoch, ale a hlavne v priaznivej odpovedi pacientov na túto liečbu. Pacienti trpiaci na vaskulitídu indukovanú HCV trpia na glomerulonefritídu, neuropatie, artralgie, purpuru a sú unavení. Ak sa podrobia uvedenej liečbe klinické príznaky sa výrazne zlepšujú a to už po druhom či treťom kole liečby (30). U pacientov s *alopecia areata*, sa pozoruje rast vlasov a zvýšenie ochlpenia (33). Napokon predbežné výsledky liečby pacientov SLE tiež poukazujú na priaznivý efekt tejto terapie (31, 36).

Sumárne možno konštatovať, že do biologickej liečby pribúda ďalšia modalita a ukazuje sa, že bude rovnako úspešná ako je liečba monoklonovými protilátkami, imunoadhezínmi či blokátormi signalizačných dráh (pre prehľad pozri Buc 2012 a Rose a Mackay 2014). Keďže kombinačná liečba autoimunitných chorôb, ktoré majú komplexnú imunopatogénu je často efektívnejšia ako monoterapia, je možné, že aj nízkodávková liečba IL-2 sa v budúcnosti bude môcť kombinovať s niektorou s doteraz už osvedčených imunoterapeutických postupov.

Tab. 1 – Charakteristická produkcia cytokínov jednotlivými subpopuláciami pomocných T-lymfocytov

Cytokín	Th1	Th2	Th17	Th9	Th22	Tfh
IFN- γ	++	-	+	-	-	-
IL-2	++	-	-	-	-	-
TNF	++	+	+	-	-	-
IL-4	-	++	-	-	-	+
IL-5	-	++	-	-	-	-
IL-6	-	++	+	-	-	-
IL-13	-	++	-	-	-	-
IL-9	-	-	+	++	-	-
IL-10	+	++	+	++	+	-
IL-17	-	-	++	-	-	-
IL-21	-	-	+	-	-	++
IL-22	-	-	+	-	++	-

Literatúra

Literatúra mimo databázy PubMed

Buc M. Základná a klinická imunológia. Bratislava: Veda, 2012: 1 – 831 s.

Rose NR, Mackay IR (Eds). The autoimmune diseases. 5. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Tokyo: Academic Press 2014: 1 – 1267.

Literatúra z databázy PubMed

1. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(7):490-500.
2. Li X, Zheng Y. Regulatory T cell identity: formation and maintenance. *Trends Immunol.* 2015;36(6):344-53.
3. Liao W, Lin JX, Leonard WJ. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity.* 2013;38(1):13-25.
4. Willerford DM, Chen J, Ferry JA, Davidson L, Ma A, Alt FW. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity.* 1995;3(4):521-30.
5. Vang KB, Yang J, Mahmud SA, Burchill MA, Vegoe AL, Farrar MA. IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoietin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development. *J Immunol.* 2008;181(5):3285-90.
6. Feng Y, Arvey A, Chinen T, van der Veecken J, Gasteiger G, Rudensky AY. Control of the inheritance of regulatory T cell identity by a cis element in the Foxp3 locus. *Cell.* 2014;158(4):749-63.
7. Liao W, Lin JX, Wang L, Li P, Leonard WJ. Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. *Nat Immunol.* 2011;12(6):551-9.
8. Cote-Sierra J, Foucras G, Guo L, Chiodetti L, Young HA, Hu-Li J, et al. Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(11):3880-5.
9. Liao W, Spolski R, Li P, Du N, West EE, Ren M, et al. Opposing actions of IL-2 and IL-21 on Th9 differentiation correlate with their differential regulation of BCL6 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(9):3508-13.
10. Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity.* 2007;26(3):371-81.
11. Ballesteros-Tato A, Leon B, Graf BA, Moquin A, Adams PS, Lund FE, et al. Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper cell differentiation. *Immunity.* 2012;36(5):847-56.
12. Williams MA, Tzgnik AJ, Bevan MJ. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature.* 2006;441(7095):890-3.
13. Malek TR. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:453-79.
14. Roediger B, Kyle R, Yip KH, Sumaria N, Guy TV, Kim BS, et al. Cutaneous immunosurveillance and regulation of inflammation by group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol.* 2013;14(6):564-73.
15. Ribot JC, Ribeiro ST, Correia DV, Sousa AE, Silva-Santos B. Human gammadelta thymocytes are functionally immature and differentiate into cytotoxic type 1 effector T cells upon IL-2/IL-15 signaling. *J Immunol.* 2014;192(5):2237-43.

16. Yu A, Zhu L, Altman NH, Malek TR. A low interleukin-2 receptor signaling threshold supports the development and homeostasis of T regulatory cells. *Immunity*. 2009;30(2):204-17.
17. Yu A, Snowwhite I, Vendrame F, Rosenzweig M, Klatzmann D, Pugliese A, et al. Selective IL-2 responsiveness of regulatory T cells through multiple intrinsic mechanisms supports the use of low-dose IL-2 therapy in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2015;64(6):2172-83.
18. Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell*. 1993;75(2):253-61.
19. Suzuki H, Kundig TM, Furlonger C, Wakeham A, Timms E, Matsuyama T, et al. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science*. 1995;268(5216):1472-6.
20. Sharfe N, Dadi HK, Shahar M, Roifman CM. Human immune disorder arising from mutation of the alpha chain of the interleukin-2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(7):3168-71.
21. Zier KS, Leo MM, Spielman RS, Baker L. Decreased synthesis of interleukin-2 (IL-2) in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*. 1984;33(6):552-5.
22. Kitas GD, Salmon M, Farr M, Gaston JS, Bacon PA. Deficient interleukin 2 production in rheumatoid arthritis: association with active disease and systemic complications. *Clin Exp Immunol*. 1988;73(2):242-9.
23. Lieberman LA, Tsokos GC. The IL-2 defect in systemic lupus erythematosus disease has an expansive effect on host immunity. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:740619.
24. Rosenberg SA. IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J Immunol*. 2014;192(12):5451-8.
25. Krieg C, Letourneau S, Pantaleo G, Boyman O. Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(26):11906-11.
26. Morales RE, Shoushtari AN, Walsh MM, Grewal P, Lipson EJ, Carvajal RD. Safety and efficacy of ipilimumab to treat advanced melanoma in the setting of liver transplantation. *J Immunother Cancer*. 2015;3:22.
27. Hamid O, Robert C, Daud A, Hodi FS, Hwu WJ, Kefford R, et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med*. 2013;369(2):134-44.
28. Boyer O, Saadoun D, Abriol J, Dodille M, Piette JC, Cacoub P, et al. CD4+CD25+ regulatory T-cell deficiency in patients with hepatitis C-mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Blood*. 2004;103(9):3428-30.
29. Landau DA, Rosenzweig M, Saadoun D, Trebeden-Negre H, Klatzmann D, Cacoub P. Correlation of clinical and virologic responses to antiviral treatment and regulatory T cell evolution in patients with hepatitis C virus-induced mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Arthritis Rheum*. 2008;58(9):2897-907.
30. Saadoun D, Rosenzweig M, Joly F, Six A, Carrat F, Thibault V, et al. Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *N Engl J Med*. 2011;365(22):2067-77.
31. Klatzmann D, Abbas AK. The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(5):283-94.
32. Edwards IR, Aronson JK. Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management. *Lancet*. 2000;356(9237):1255-9.

33. Castela E, Le Duff F, Butori C, Ticchioni M, Hofman P, Bahadoran P, et al. Effects of low-dose recombinant interleukin 2 to promote T-regulatory cells in alopecia areata. *JAMA Dermatol.* 2014;150(7):748-51.
34. Ito S, Bollard CM, Carlsten M, Melenhorst JJ, Biancotto A, Wang E, et al. Ultra-low dose interleukin-2 promotes immune-modulating function of regulatory T cells and natural killer cells in healthy volunteers. *Mol Ther.* 2014;22(7):1388-95.
35. Koreth J, Matsuoka K, Kim HT, McDonough SM, Bindra B, Alyea EP, 3rd, et al. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N Engl J Med.* 2011;365(22):2055-66.
36. Humrich JY, von Spee-Mayer C, Siegert E, Alexander T, Hiepe F, Radbruch A, et al. Rapid induction of clinical remission by low-dose interleukin-2 in a patient with refractory SLE. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(4):791-2.

Recenzoval

Prof. MUDr. Jozef Rovenský, DrSc., FRCP
Národný ústav reumatických chorôb Piešťany
riaditeľ ústavu

OČKOVANIE DOSPELÝCH A SENIOROV – NOVÁ ÉRA OČKOVANIA

Hrubiško M.

Onkologický ústav sv. Alžbety, Bratislava

Súhrn

Jednou z úloh medicíny 21. storočia bude vyrovnávať sa so starnutím svetovej populácie, zvlášť vo vyspelých krajinách. Popri kardiovaskulárnych, onkologických či chorobách pohybového aparátu treba riešiť aj infekčnú morbiditu a mortalitu, ktorá sa po 50 roku života významne zvyšuje. V tejto súvislosti sa vynára význam očkovania dospelých populácie. V príspevku približujeme očkovanie proti herpesu zoster, ktorý sa stáva preventabilnou chorobou a očkovanie proti ľudským papilómavírusom, z ktorých mnohé majú výrazný proonkogénny potenciál. Očkovanie ako prevencia rakoviny je novou a perspektívnou oblasťou medicíny.

Kľúčové slová: očkovanie, herpes zoster, ľudské papilómavírusy.

VACCINATION OF ADULTS AND SENIORS – NEW ERA OF VACCINATION

Abstract

One of challenges of 21st century medicine is to deal with senescence of world population, especially in developed countries. Beside cardiovascular, malignant and locomotive diseases, it will be necessary to deal with infectious morbidity and mortality, which is progressively increased after 50 years of age. In this contexture the meaning of vaccination of adult population is increasing. In this contribution we elucidate the vaccination against herpes zoster, which is becoming a preventable disease, and the vaccination against human papilloma viruses (HPVs). Many of HPVs are causing malignant diseases and vaccination as the possible prevention of malignancies is very perspective field of medicine.

Key words: vaccination, herpes zoster, human papilloma viruses.

1. Úvod

Pri pojme očkovanie si nie iba laici, ale aj väčšina lekárov predstaví profylaktický postup určený deťom a mladistvým. Podľa toho sa aj očkovanie zvykne definovať ako postup pri ktorom sa “imunologicky naivný” imunitný systém stimuluje k vytvoreniu obranyschopnosti voči infekčnému agens, s ktorým sa ešte nestretol. Očkovanie sa však neobmedzuje iba na deti a adolescentov: vo všetkých vekových kategóriách, vrátane seniorov, sa indikuje napr. očkovanie proti chrípke, pneumokokom, hemofilom. Takisto sa nám asi vybaví očkovanie proti rôznym cudzokrajným chorobám v súvislosti s cestovaním alebo pri možnosti kontaktu s kliešťovou encefalitídou. V súvislosti so zavedením vakcíny proti herpesu zoster však bude treba zmeniť aj definíciu očkovania v zmysle imunologicky naivného organizmu – tu totiž ide o očkovanie už infikovaného organizmu. Novú oblasť – profylaktickú a liečebnú vakcináciu dospelých – si priblížime na príklade 2 príkladoch: herpes zoster a choroby asociované s HPV.

2. Starnutie ľudstva, starnutie imunity

Starnutie ľudstva sa spája s mnohými medicínskymi výzvami – od kardiovaskulárnych chorôb, cez onkológiu, infekčné choroby, až po choroby pohybového aparátu. Tak ako starne celý organizmus, starne aj imunitný systém. Starnutie imunity sa dokonca pokladá za primárnu príčinu viacerých so starnutím spájaných chorobných procesov. U starších ľudí sa ruka v ruke s postupným oslabovaním imunitných mechanizmov pozoruje zvýšená vnímavosť k infekciám a k ich ťažšiemu a protrahovanému priebehu. Mnohé infekcie môžu mať fatálny priebeh - napr. úmrtnosť na pneumóniu a chrípku je v geriatrickej populácii oproti mladším osobám zvýšená až 89-násobne ⁽¹⁾! Pripisuje sa to zníženému množstvu a aktivite T-lymfocytov a autoidiotypovým protilátkam, ktoré majú inhibičný efekt na imunitnú odpoveď.

V súvislosti s postupným starnutím svetovej populácie sa vynára nová oblasť medicíny, ktorou je očkovanie dospelšej populácie. Schopnosť reagovať na očkovanie ostáva dostatočná aj vo vyššom veku, i keď oproti bežne očkovanej detskej populácii treba rátať s rozdielnou odpoveďou (2). Po očkovaní antigénmi, voči ktorým je tvorba protilátok závislá od týmusu (primárna odpoveď je T-lymfocytová) je odpoveď znížená, preto treba pre dospelých použiť vyššiu antigénnu nálož. Pri očkovaní antigénmi, voči ktorým je odpoveď nezávislá od týmusu, ako sú napr. pneumokokové polysacharidy, je odpoveď seniorov relatívne krátkodobá, preto býva potrebná revakcinácia.

3. Herpes zoster

Vírus varicela - zoster (VZV, humánny herpesový vírus typu 3 - HHV3) je jedným z ôsmich známych ľudských herpesových vírusov (HHV1-8) ⁽³⁾. Týmto vírusom sa infikuje takmer celá populácia (odhaduje sa až 98%) ešte v predpubertálnom veku. Primoinfekcia sa prejaví chorobou ovčie kiahne - varicella. Počas viremické fázy intracelulárne inkorporovaný vírus preniká do epidermálnych buniek a spôsobuje typické vyrážky. Špecifikom tejto infekcie je skutočnosť, že VZV imunitný systém nedokáže z tela vylúčiť - vírusom napadnuté bunky ešte predtým než zahynú, založia pri bunkovom delení ďalšiu generáciu vírusu. Hoci nie sú známe všetky mechanizmy rozhodujúce o trvalom prežívaní vírusu v organizme, vieme, že VZV "cestuje" cez retrográdne axóny do zadných miechových koreňov, kde dlhodobo prežíva v gangliách ⁽⁴⁾. VZV je počas tejto latentnej formy neinfekčný, ale môže sa kedykoľvek reaktivovať ⁽⁵⁾ - začne vytvárať nové virióny následne migruje pozdĺž axónov do kože, kde sa znova šíri z bunky do bunky, penetruje až do epidermis a vytvára obraz známy ako pásový opar - herpes zoster (HZ).

Vo vyspelých krajinách sa v súčasnosti pozoruje vzostup incidencie HZ. Príčin je viac, prispieva k postupnému predlžovaniu priemernej dĺžky života a zvyšujúci sa počet ľudí užívajúcich z rôznych dôvodov imunosupresívne pôsobiace farmaká. Podľa štatistík až 1,8 milióna Európanov ročne prekoná HZ. Celková incidencia HZ sa u imunokompetentných dospelých uvádza 4 prípady na 1000 osobo-rokov ⁽⁶⁾. Do 40 rokov života je výskyt nízky - do 9 % populácie, medzi 40. - 50. rokom postupne stúpa a po 60. roku života dosahuje takmer u 20 % populácie ⁽⁷⁾. 68% prípadov sa vyskytne u 50-ročných a starších. Pretože herpes zoster je prejavom reaktívácie latentnej VZV infekcie, primárny rizikový faktor je predošlá infekcia VZV. Podľa údajov z USA 99,5% tamojšej populácie staršej ako 40 rokov má sérológickú evidenciu predošlej infekcie, čo znamená, že takmer celá populácia v tejto vekovej skupine je ohrozená HZ ⁽⁸⁾.

U inak zdravého človeka je HZ síce nepríjemné, ale väčšinou samolimitujúce ochorenie. Kožná diseminácia nie je život ohrozujúca, je však znakom virémie, pri ktorej môže dôjsť ku komplikáciám, ktoré sa vyskytujú v 10–50 % prípadov. Spektrum komplikácií HZ je pestré ⁽⁹⁾: infekčné (sekundárna infekcia postihnutej kože), neurologické, očné a viscerálne (encefalitída, hepatitída, myokarditída, pneumónia, intravaskulárna koagulopatia). U pacientov po HZ sa pozoruje zvýšený výskyt infarktov myokardu a tranzientných mozgových trombotických atakov a iktov ⁽¹⁰⁾. Predpokladá sa, že ide o následok chronickej vaskulitídy, ktorú VZV vyvolá. Napriek antivírusovej liečbe je úmrtnosť pri

viscerálnej diseminácii 5-15%, pričom najčastejšou príčinou smrti býva pneumónia ⁽⁹⁾.

Riziko neurologických komplikácií HZ sa zvyšuje u imunokompromitovaných jedincov s deficienciou špecifickej bunkovej imunity. Tieto komplikácie môžu byť závažné (myelitída, chronická encefalitída, ventrikulitída, meningoencefalitída). Všetky môžu viesť k rôznemu stupňu parézy a môžu sa končiť fatálne ⁽⁶⁾. Najčastejšou komplikáciou ktorá najviac a dlhodobo zasahuje do kvality života postihnutých, je postherpetická neuralgia (PHN). Vyskytuje sa u každého 3.-4. postihnutého VZV, s vekom jej výskyt významne stúpa ⁽⁷⁾. PHN máva zdĺhavý priebeh - môže trvať mesiace až roky. Antivirotiká síce skracujú akútne štádium choroby, ale dostatočne neovplyvňujú výskyt PHN.

3.1. Očkovanie proti HZV

Po infekcii herpesovými vírusmi, aj po očkovaní proti varicelle, respektíve HZ, zohráva v nasledujúcej fáze odolnosti voči reinfekcii či reaktivácii rozhodujúcu úlohu špecifická bunková imunita. Protilátky nemajú v prevencii reaktívacie HZ pravdepodobne žiadnu úlohu ⁽¹¹⁾. Pamäťové bunky sa držia na úrovni dostatočnej pre kontrolu vzplanutia manifestnej choroby približne do 50 rokov života. Neskôr sa u mnohých jedincov dostávajú pod hranicu ochranného prahu a pri akomkoľvek ďalšom oslabení organizmu môže dôjsť k reaktivácii vírusu a vzplanutiu HZ. Vek je teda najvýznamnejším rizikovým faktorom pre vznik HZ. Zatiaľ čo výskyt HZ je u detí mladších ako 10 rokov 0,74 na 1000 osobo-rokov, u osôb vo veku nad 80 rokov je to 10,1 na 1000 osobo-rokov. Prakticky každý druhý človek, ktorý sa dožije 85 rokov, prekoná HZ ^(9, 12).

Opakovaný kontakt s infekciou väčšinou voči nej zvyšuje odolnosť. Toto platí aj v prípade VZV. Napríklad, keď dieťa prekonáva varicellu, dochádza k stimulácii matkiných pamäťových T buniek. Aj signifikantne nižší výskyt HZ vo viacpočetných, viacgeneračných rodinách v porovnaní s ostatnou populáciou svedčí pre stimuláciu anti-HZV imunity pri opakovanom kontakte s infekciou ^(13, 14). Z princípu opakovaného kontaktu s infekciou stimulujúcou imunologickú pamäťovú stopu vychádza aj očkovanie proti VZV.

Vakcína proti VZV využíva rovnaký kmeň vírusu ako vakcína proti varicelle ⁽¹⁵⁾. Rozdiel oproti bežnej varicellovej vakcíne je 14-násobné množstvo atenuovaných kmeňov obsiahnutých v jednej dávke. Takáto dávka je potrebná pre stimuláciu imunity u dospelých jedincov s postupnou prirodzenou depresiou bunkovej imunity. Účinnosť HZ vakcíny sa overila v randomizovanej, placebom kontrolovanej klinickej štúdii fázy 3, realizovanej na vzorke 38 546 zdravých

dospelých starších ako 60 rokov ⁽¹⁶⁾. Zo štúdie boli vylúčení jedinci s anamnézou prekonaného HZ, alergickí na niektorú zo zložiek vakcíny a imunokompromitovaní. Vakcína redukovala riziko vzniku HZ o 51% a riziko vzniku PHN o približne 70%. U jedincov, ktorí napriek očkovaniu následne prekonali HZ, bol priebeh choroby výrazne miernejší ⁽¹⁷⁾.

Následne sa u 1 395 osôb realizovala subanalýza venovaná špecifickej anti-HZV imunite pred očkovaním a 6 týždňov po očkovaní. Autori sledovali dynamiku špecifických protilátok a počet pamäťových T buniek. Oba parametre sa signifikantne zmenili iba u probandov v aktívnom ramene ^(18, 19). Pri dlhodobom sledovaní dynamiky sa v prvom roku pozoroval pokles odpovede, v ďalších 2 rokoch však ďalej neklesala. Sledovala sa aj bezpečnosť VZV vakcíny ⁽¹⁶⁾. Výskyt vedľajších účinkov bol v aktívnom a placebovom ramene porovnateľný. V aktívnej skupine sa očakávané častejšie vyskytli lokálne reakcie (erytém, bolesť, opuch, svrbenie, lokálne zvýšenie teploty) v mieste aplikácie injekcie (48 verus 17 %); väčšina reakcií bola miernych a ustúpila v priebehu 4 dní ⁽²⁰⁾.

Z vyššie uvedených epidemiologických a imunologických poznatkov vychádza indikácia vakcíny proti herpes zoster: dospelá populácia staršia ako 50 rokov. Ide o profylaxiu, preto ideálnym kandidátom je zdravý človek. Úlohou zdravotníkov je presvedčiť zdravého, aby sa dal zaočkovať. Hlavnými argumenty sú pravdepodobnosť prekonania HZ s následnou PHN a skutočnosť, že vôbec nejde o banálnu chorobu. Anamnéza prekonaného HZ nie je kontraindikáciou očkovania; odporúča sa však odstup od epizódy HZ aspoň rok ⁽⁹⁾. Pred podaním HZ vakcíny sa netreba pýtať na anamnézu prekonania varicelly a je zbytočné vykonávať rutinné sérologické testy na anti-VZV protilátky. Vakcinácia osôb očkovaných proti varicelle sa neodporúča, avšak v indikovanej populácii osôb starších ako 50 rokov sa zatiaľ nenachádzajú zaočkovaní jedinci. Na Slovensku je varicellová vakcína k dispozícii od r. 2009, a tak táto otázka nebude aktuálna ešte minimálne 30 rokov. Okrem toho, očkovanie proti varicelle patrí u nás medzi dobrovoľné a zdravotné poisťovne ho nehradia, preto ani v budúcnosti nebude preočkovaná celá populácia.

Antivirotiká účinné proti herpesovým vírusom (acyklovir, famcyklovir, valacyklovir) môžu interferovať s replikáciou atenuovanej živej HZ vakcíny. Všetky tri uvedené antivirotiká majú krátky sérový polčas, rýchlo sa z eliminujú, a tak liečbu stačí prerušiť (minimálne) 24 hodín pred očkovaním. Spätné nasadenie (ak je potrebné) sa neodporúča skôr ako 14 dní po vakcinácii ^(9, 21).

V prípade anamnézy chronickej choroby (napr. chronická renálna či hepatická insuficiencia, diabetes mellitus, chronické pľúcne choroby, autoimunitné

choroby, onkologický pacient) volíme individuálny a obozretný prístup. Uvedené stavy nie sú absolútnou kontraindikáciou očkovania HZ vakcínou. Treba posúdiť stav imunity, resp. zvážiť prípadnú imunosupresiu pacienta. Samozrejme, riziko HZ aj jeho komplikácií je u imunokompromitovaných jedincov zvýšené. Rozdiel je, či pacient trpí chorobou, ktorá vedie k imunosupresii, alebo ide o imunosupresiu navodenú farmakologickou liečbou. Tu je žiaduca predvídavosť a pacienta je potrebné zaočkovať ešte pred začatím imunosupresívnej liečby. Vakcína by sa mala podať najneskôr 14 dní pred plánovaným začiatkom podávania imunosupresív⁽⁹⁾.

4. Choroby súvisiace s infekciou ľudskými papilomavírusmi

Ľudský papilomavírus (HPV) je ubikvitne rozšírený DNA vírus prenášaný z jedinca na jedinca priamym kožným a / alebo slizničným kontaktom, predilekčne napádajúci karatinocyty a bunky slizničných membrán. HPV infekcia je celosvetovo najčastejšia pohlavne prenášaná choroba⁽²²⁾. Poznáme vyše 170 typov HPV vírusov, z nich viac ako 40 infikuje anogenitálnu oblasť.

Väčšina HPV infekcií je subklinických a nespôsobuje žiadne ťažkosti, avšak u niektorých jedincov sa subklinický priebeh zmení na symptomatický. Prejavy sú v závislosti na dispozícii jedinca a type HPV vírusu veľmi pestré: od benígnych papilómov (bradavice, kondylómy) až po rakovinu cervixu, vulvy, vagíny, penisu, orofarynxu a anusu⁽²³⁾. I keď 70% klinicky manifestných HPV infekcií u mladých mužov a žien regreduje behom 1 roka a 90% v horizonte 2 rokov, u 5-10% infikovaných žien infekcia perzistuje⁽²⁴⁾. Perzistujúca infekcia vysoko-rizikovými typmi HPV (HRHPV) môže progredovať do prekancerózných lézií a plynule do invazívnej rakoviny - zodpovedá za prakticky všetky prípady cervikálnej rakoviny⁽²⁵⁾. Najprv sa potvrdila proonkogénna aktivita typov HPV 16 a 18, neskôr sa medzi vysoko-rizikové kmene zaradili aj typy 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 a 82, a pravdepodobne kancerogénne sú aj typy 26, 53 a 66⁽²⁶⁾.

4.1. Očkovanie proti HPV

Vakcinácia proti vírusu hepatitídy B (HBV) nám ukázala, ako očkovanie novorodencov a detí môže znížiť nosičstvo tohto vírusu v populácii a následne aj s ním spájaných chorôb - hepatitídy B, cirhózy pečene a pečeneového karcinómu⁽²⁷⁾. Proonkogénne pôsobenie HRHPV je dôvodom, prečo sa do praxe zaviedlo aj očkovanie proti HPV.

V súčasnosti máme k dispozícii bivalentnú vakcínu pripravenú z HRHPV kmeňov 16 a 18 a kvadrivalentnú vakcínu z kmeňov HPV 6 a 11 (spôsobujú-

cich genitálne bradavice a papilomatózu laryngu) a z kmeňov 16 a 18. Dokázalo, sa že imunita navodená voči HRHPV 16 a 18 chráni aj proti viacerým ďalším proonkogénnym HRHPV 31, 33, 45 a 51⁽²⁸⁾. Ukazuje sa však, že táto skrížená ochrana nie je minimálne u časti z uvedených kmeňov HPV kompletná a že nechráni voči ďalším kmeňom, a tak sa pripravila nonavalentná vakcína, ktorá čoskoro tiež vstúpi do klinickej praxe. V nonavalentnej vakcíne sa ku kmeňom obsiahnutým v kvadruvalentnej vakcíne pridali HRHPV kmene 31, 33, 45, 52 a 58. Očakáva sa, že touto vakcínou bude možné preventívne predísť 90% prípadov rakoviny krčka maternice⁽²⁹⁾. Navyše, vzhľadom k významnej úlohe HPV vírusov aj v iných prípadoch rakoviny (viď. vyššie), sa dá očakávať ešte väčší význam očkovania nonavalentnou vakcínou.

Základnou cieľovou skupinou pre očkovanie proti HPV je predpubertálna mládež (nie iba dievčatá!). Vzhľadom k tomu, že masovejšie sa vo svete HPV vakcinácia používa niečo vyše 10 rokov, zatiaľ možno konštatovať, že sa v zaočkovanej populácii jednoznačne potvrdilo zníženie výskytu premalígných a malígných lézií krčka maternice. Na očakávaný pokles mortality v súvislosti s HPV iniciovanou rakovinou si ešte bude treba istý čas počkať, veľká nádej sa vkladá do práve prichádzajúcej nonavalentnej vakcíny. Potešujúce však je, že už teraz dostupné HPV vakcíny majú potvrdenú protirakovinovú profylaktickú účinnosť.

Už v roku 2009 sa publikovali výsledky štúdie zameranej na použitie kvadruvalentnej HPV vakcíny u dospelých žien (40-45 rokov). Na jednej strane sa v štúdiu potvrdila účinnosť vakcinácie aj v tejto vekovej kategórii, na druhej strane sa ukázalo, že vakcína je dostatočne účinná iba u žien ktoré nejavia v čase vakcinácie známky HPV infekcie⁽³⁰⁾. Dodatočná analýza pacientok zaradených do štúdie PATRICIA priniesla podobný výsledok s bivalentnou vakcínou potencovanou účinným adjuvans⁽³¹⁾. Do tejto štúdie sa zaradili zdravé ženy vo veku 15-25 rokov s ≤ 6 sexuálnymi partnermi / život, nezávisle na vstupnom HPV DNA stave, HPV-16 alebo HPV-18 sérologii, alebo cytológii. Ženy randomizovali v pomere 1:1 na skupinu očkovanú HPV-16/18 vakcínou (s obsahom adjuvans) a na skupinu očkovanú proti hepatitíde A, skupiny boli zaslepené pre probandky aj investigátorov. Po 4 rokoch sa vyhodnotila frekvencia patologických prekancerózných nálezov štádia CIN3+ a nálezu *carcinoma in situ*; zvlášť sa vyhodnotila celá skupina žien očkovaných proti HPV (očkovaných 9319, kontroly 9325), t.j. skupina, v ktorej už boli ženy s aktívnym sexuálnym životom, oproti kohorte žien, ktoré mali vstupný HPV status negatívny (očkovaných 5824, kontroly 5820).

Účinnosť vakcíny proti nálezu CIN3+ asociovanému s HPV-16/18 bola 100% v skupine žien s negatívnym vstupným HPV statusom oproti 45,7% v celej skupine očkovaných, a to nezávisle na vekovej kategórii. Účinnosť vakcíny proti nálezu CIN3+ nezávisle na type HPV bola 93,2% v skupine žien s negatívnym vstupným HPV statusom oproti 45,6% v celej skupine očkovaných. V skupine žien s pozitívnym vstupným HPV nálezom účinnosť progresívne klesala s vekom. Účinnosť vakcíny proti *carcinoma in situ* bola 100% respektíve 76,9% (v uvedených dvoch skupinách). Táto štúdia nám jasne ukázala nedostatočný terapeutický potenciál stávajúcich vakcín, a to aj v prípade, ak vakcína obsahuje účinné adjuvans monofosforyl lipid.

5. Záver

Pretože sa v súčasnosti množia rôzne odborne nepodložené antivakcinačné aktivity, a to žiaľ aj medzi zdravotníkmi, nezaškodí pripomenúť, že podľa údajov Svetovej zdravotníckej organizácie vakcinácia globálne zachraňuje 2-3 milióny životov ročne ⁽³²⁾. Pretože mnohé infekcie majú vo vyššom veku závažnejší priebeh, resp. môžu komplikovať priebeh inej choroby, je potrebné upozorniť na význam očkovania v dospelom a geriatrickom veku. U chronicky chorých by malo byť samozrejmosťou očkovanie proti chrípke, pneumokokom a hemofilom.

Prakticky celá dospelá populácia (najmä po 50. roku života) patrí z pohľadu pravdepodobnosti prekonania HZ a PHN do rizikovej skupiny, preto treba v tejto vekovej skupine myslieť aj na očkovanie zosterovou vakcínou. Viac treba propagovať očkovanie HPV vakcínou, spolu s vakcínou proti hepatitíde B jedinou, ktorá má potenciál znížiť výskyt rôznych foriem rakoviny.

Slovensko patrí v Európe medzi krajiny s najnižšou preočkovanosťou HPV vakcínou. Pri uvádzaní očkovania proti HPV do praxe sa s spravila chyba: medializovalo sa ako očkovanie proti rakovine krčka maternice - a takto sa vníma podnes. Vzhľadom k tomu, že s perzistujúcou infekciou HRHPV sa spája aj rad iných prípadov rakoviny a aj ďalšie choroby významne ovplyvňujúce kvalitu života, potenciál očkovania proti HPV je oveľa širší. Vystáva otázka, či by sa nemalo zväziť povinné celoplošné očkovanie predpubertálnej mládeže, nie iba dievčat ^(27, 32). Keďže zatiaľ dostupné anti-HPV vakcíny majú predovšetkým profylaktickú účinnosť, je na všeobecných lekároch, gynekológoch, urológoch, imunológoch, ORL a ďalších, aby odporúčali očkovanie proti HPV u jedincov, ktorí zatiaľ zjavnou HPV infekciou netrpia. Od výskumných tímov sa očakáva vývoj terapeutickéj anti-HPV vakcíny.

Zdravotná, sociálna aj ekonomická záťaž HZ a ešte viac chorôb spojených s HPV infekciou je obrovská. Podľa reprezentatívnych štúdií je očkovanie proti uvedeným infekčným chorobám bezpečné a účinné, preto ho treba realizovať častejšie ako je tomu doteraz.

Literatúra

1. Troen BR. The Biology of Aging. The Mount Sinai Journal of Medicine 2003; 70(1): 3-22.
2. Bartůňková J. Imunodeficiencie. Grada Publishing s.r.o. 2002, 282 s.
3. C.Health. Herpes virus: 8 types. Stiahnuté 26. 12. 2014 z: http://chealth.canoe.ca/channel_section_details.asp?text_id=1364&channel_id=1020&relation_id=71057
4. Arvin A. Varicella-zoster virus. Clin Microbiol Rev 1996; 9: 361–81.
5. Arvin A. Aging, immunity, and the varicella-zoster virus. N Engl J Med 2005; 352: 2266–7.
6. Gilden DH, Kleinschmidt-DeMasters BK, LaGuardia JJ, et al. Neurologic Complications of the reactivation of varicella-zoster virus. N Engl J Med 2000; 342: 635–45.
7. Yawn BP, Gilden D. The global epidemiology of herpes zoster. Neurology 2013; 81(10): 928-930.
8. Kilgore PE, Kruszon-Moran D, Seward JF, et al. Varicella in Americans from NHANES III: implications for control through routine immunization. J Med Virol 2003; 70 (Suppl 1): S111–8.
9. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of Herpes Zoster Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Early Release 2008; 57 [Recommendations and Reports 5]: 1-37.
10. Breuer J, Pacou M, Gauthier A, Brown M. Herpes zoster as a risk factor for stroke and TIA. A retrospective cohort study in the UK. Neurology 2014; 82(3): 206-212.
11. Webster A, Grint P, Brenner MK, Prentice HG, Griffiths PD. Titration of IgG antibodies against varicella zoster virus before bone marrow transplantation is not predictive of future zoster. J Med Virol 1989; 27: 117–9.
12. Schmader K. Herpes zoster in older adults. Clin Infect Dis 2001; 32: 1481–6.
13. Thomas SL, Wheeler JG, Hall AJ. Contacts with varicella or with children and protection against herpes zoster in adults: a case-control study. Lancet 2002; 360: 678–82.
14. Brisson M, Gay NJ, Edmunds WJ, Andrews NJ. Exposure to varicella boosts immunity to herpes-zoster: implications for mass vaccination against chickenpox. Vaccine 2002; 20: 2500–7.
15. Takahashi M, Otsuka T, Okuno Y, et al. Live vaccine used to prevent the spread of varicella in children in hospital. Lancet 1974; 2: 1288–90.
16. Oxman MN, Levin MJ, Johnson GR, et al. Zoster Prevention Study Group. A vaccine

- to prevent herpes zoster and postherpetic neuralgia in older adults. *N Engl J Med* 2005; 352: 2271-84.
17. Schmader K, Saddier P, Johnson G, et al. The effect of a zoster vaccine on interference of herpes zoster with activities of daily living (ADL) [Abstract 859]. 44th Annual Meeting of IDSA, Oct. 12–15, 2006, Toronto.
 18. Sperber SJ, Smith BV, Hayden FG. Serologic response and reactogenicity to booster immunization of healthy seropositive adults with live or inactivated varicella vaccine. *Antiviral Res* 1992; 17: 213–22.
 19. Schlienger K, Lange J, Tying SK, et al. Immunogenicity, kinetics of VZV-Specific CD4+ T-cell g-IFN production and safety of a live attenuated Oka/Merck zoster vaccine in healthy adults >60 years of age [Abstract 857]. 44th Annual Meeting of IDSA, Oct. 12–15, 2006, Toronto.
 20. Food and Drug Administration. Biological Products Advisory Committee, Available at http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/05/slides/5-4198S2_1.pdf.
 21. Ihara T, Kamiya H, Torigoe S, Sakurai M, Takahashi M. Viremic phase in a leukemic child after live varicella vaccination. *Pediatrics* 1992; 89: 147–9.
 22. Jena AB, Boldman DP, Seabury SA. Incidence of sexually transmitted infections after human papillomavirus vaccination among adolescent females. *JAMA Intern Med* 2015; 175(4): 617-23.
 23. Stanley MA, Winder DM, Sterling JC, Goon PKC (J). HPV infection, anal intra-epithelial neoplasia (AIN) and anal cancer: current issues. *BMC Cancer* 2012; 12 (1): 398.
 24. Goldstein MA, Goodman A, del Carmen MG, et al. Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 10-2009. A 23-year-old woman with an abnormal Papanicolaou smear. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360 (13): 1337–44.
 25. Schiffman M, Castle PE. Human papillomavirus: epidemiology and public health. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127 (8): 930–4.
 26. Muñoz M, Bosch XF, de Sanchosé S, et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518-27.
 27. Bosch XF, Tsu V, Vorsters A, et al. Reframing Cervical Cancer Prevention. Expanding the Field Towards Prevention of Human Papillomavirus Infections and Related Diseases. *Vaccine* 2012; 30(Suppl.5): F1-F11.
 28. Wheeler CM, Castellsagué X, Garland SM, et al. Cross-protective efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by non-vaccine oncogenic HPV types: 4-year end-of-study analysis of the randomized, double-blind PATRICIA trial. *The Lancet Oncology* 2012; 13(1): 100-110.
 29. Serrano B, Alemany L, Tous S, et al. Potential impact of a nine-valent vaccine in human papillomavirus related cervical disease. *Infectious Agents and Cancer* 2012; 7(38): 1-13.
 30. Muñoz N, Manalastas, R, Pitisuttithum P, et al. Safety, immunogenicity, and efficacy of quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, 18) recombinant vac-

cine in women aged 24-45 years: a randomised, double-blind trial. *Lancet* 2009; 373 (9679): 1949-57.

31. Lehtinen M, Paavonen J, Wheeler CM, et al. Overall efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against grade 3 or greater cervical intraepithelial neoplasia: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. *The Lancet Oncology* 2012; 13(1): 89-99.
32. Summary of the WHO Position Paper on Vaccines against Human Papillomavirus (HPV). World Health Organisation 2014. http://www.who.int/immunization/position_papers/pp_hpv_oct2014_summary.pdf?ua=1#

Recenzoval

Prof. MUDr. Milan Buc, DrSc.
Imunologický ústav LFUK

IMUNOTERAPIA V ONKOLÓGII

Špánik S.

*Interná-onkologická klinika, Onkologický ústav sv. Alžbety
a I. onkologická klinika OÚSA a LFUK*

Súhrn

Imunoterapia v onkológii nie je novinka. Skúšala sa vo forme aplikácie atenuovaných nádorových buniek, niekoľko rokov bola štandardná liečba renálneho karcinómu a malígneho melanómu cytokínmi (interferón, interleukín 2). V súčasnosti ide predovšetkým o ovplyvnenie negatívnych regulačných faktorov imunitnej odpovede ako je CTLA-4 (antigén 4 cytotoxického T lymfocyту – cytotoxic T lymphocyte antigen 4), PD-1 (programmed cell death protein 1 – protein 1 programovanej smrti bunky) a ligandov PD-L1 a PD-L2 (ligandy 1 a 2 programovanej smrti bunky). Mnohé lieky, ktoré účinkujú uvedenými mechanizmami sú už v klinickej praxi a mnohé v rôznych fázach klinického skúšania.

Kľúčové slová: imunoterapia, regulačné mechanizmy – „checkpointy“ (strážne body), CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2

Summary

Immunotherapy is not a new type of therapy. Some years ago, it was used as an application of attenuated tumor cells. Also, the standard therapy of renal cell carcinoma and malignant melanoma were performed by cytokines (interferon, interleukin 2). Nowadays, the targets are negative regulatory factors of immune response like CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4), PD-1 (programmed cell death protein 1) and ligands PD-L1 a PD-L2 (ligands 1 and 2 of programmed cell death). Few of the drugs exploiting these mechanisms of action are already used in clinical practice and many others are in different phases of clinical trials.

Key words: immunotherapy, regulatory mechanisms – checkpoint inhibitors, CTLA-4, PD-1 PD-L1, PD-L2

Imunita v onkológii

Imunoterapia je v súčasnosti považovaná za kľúč k účinnej protinádorovej liečbe. Imunitný systém zohráva rozhodujúcu úlohu v boji organizmu proti nádorovým chorobám. Eliminácia nádorových buniek je sprostredkovaná predovšetkým CD8⁺ cytotoxickými T-lymfocytmi (CTL). Cytotoxické T-lymfocyty môžu

byť izolované z nádorovej strómy rôznych tumorov, nazývajú sa TIL (*tumor infiltrating lymphocytes* – lymfocyty infiltrujúce tumor). Aktivácia CTL vyžaduje kostimuláciu pomocnými CD4⁺ T-lymfocytmami. Tieto sa musia najprv „stretnúť“ s nádorovým antigénom. V tom zohrávajú rozhodujúcu úlohu prezentujúce bunky antigén (APC – *antigen presenting cells*). Takúto úlohu majú predovšetkým dendritové bunky, Langerhansove bunky kože, makrofágy a pod., ale napr. aj B-lymfocyty a v stave patologickej aktivácie asi aj celý rad ďalších buniek. Dendritová bunka (alebo iná APC) prezentuje nádorový antigén naivnému CTL, ten sa aktivuje v lymfatickej uzline, aktivovaný vycestuje do oblasti nádorového tkaniva a tam likviduje nádorovú bunku produkciou cytolytických látok a indukciou apoptózy (1). Takto imunitný systém reaguje všeobecne na „cudzorodé“ bunky (antigény). Táto reakcia je preto regulovaná viacerými mechanizmami, imunitnými „checkpointami“ (strážnymi bodmi), aby sa zabránilo autoimunitnej reakcii. Medzi doteraz známe hlavné „checkpointy“ patrí CTLA-4 (antigén 4 cytotoxického T lymfocytu – *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), PD-1 (*programmed cell death protein 1* – proteín 1 programovanej smrti bunky), LAG-3 (*lymphocyte-activation gene 3* – gén aktivácie lymfocytov 3) a TIM-3 (*T-cell immunoglobulin and mucin protein 3*). Tieto látky pôsobia na dvoch kľúčových miestach a to vo fáze aktivácie T-lymfocytov v lymfatických uzlinách a v periférnom tkanive, kde T-lymfocyty vykonávajú svoju efektorovú funkciu (2). Práve CTL-4 pôsobí vo včasnej fáze imunitnej reakcie, v zdravom tkanive pôsobí ako „vypínač“ aktivácie CTL v lymfatických uzlinách, aby sa predišlo autoimunitnej reakcii. PD-1 pôsobí v efektorovej fáze. V zdravom tkanive pôsobí PD-1 ako limitujúci faktor aktivity antigénovo-špecifických T-lymfocytov, aby zabránil paralelnému poškodeniu tkaniva pri infekcii.

Nádorové bunky exprimujú ligandy PD-L1 a PD-L2 (ligandy 1 a 2 programovanej smrti bunky), ktoré väzbou na PD-1 (ako receptor na efektorovom CTL) negatívne znižujú („downregulate“) aktivitu T-lymfocytov v efektorovej fáze imunitnej odpovede. Imunitné „checkpointy“ pôsobia cez interakciu receptor – ligand, kde receptor sa exprimuje na T-lymfocyte a ligand na bunke prezentujúcej antigén alebo na bunke periférneho tkaniva. Práve imunitné „checkpointy“ predstavujú jednu z oblastí, ktoré využívajú nádorové bunky, aby sa vyhli imunitnej reakcii. Cieľmi protinádorovej imunoterapie sú jednak ciele monoklonové protilátky anti-PD-1 (3) a monoklonové protilátky anti-PD-L1 a anti-PD-L2, zatiaľ iba v klinických štúdiách (4).

Inhibítory imunitných „checkpointov“

V klinickej praxi sa ako štandardná liečba používa zatiaľ len niekoľko preparátov. Jedným z dôvodov je vysoká cena tejto inovatívnej imunoterapie.

Ipilimumab (Yervoy®) je plne humánna IgG1 monoklonová protilátka anti-CTLA-4. V klinických štúdiách v liečbe pokročilého a metastatického malígneho melanómu v jednej štúdii preukázal, v porovnaní s DTIC (dakarbazín), resp. samotnou peptidovou protimelanómovou vakcínou gp100, lepšiu klinickú odpoveď, prežívanie bez progresie ako aj samotné celkové prežívanie.

Liečba sa podáva v 4 cykloch, intravenózne v infúzii, odporúča sa pre pacientov s pomalou progresiou choroby, nástup účinku je pomalý (niekedy trvá 30 mesiacov do vymiznutia lézií), pacienti, ktorí dosiahli kompletnú alebo takmer kompletnú odpoveď, sú v remisii choroby niekoľko rokov. Zdá, že krivky dlhodobého prežívania sa stabilizujú okolo 20 % liečených pacientov (5).

Na základe výsledkov klinických skúšaní bol ipilimumab schválený FDA v roku 2011 na liečbu pokročilého malígneho melanómu. Klinické skúšania prebiehali aj v ďalších onkologických indikáciách, ako napríklad liečba metastatického nemalobunkového a malobunkového pľúcneho karcinómu, metastatického karcinómu prostaty alebo obličky.

Nežiaduce účinky ipilimumabu vyplývajú z mechanizmu účinku, sú pomerne časté, treba na ne myslieť a venovať im pozornosť. Dôležité je včasné rozpoznanie prítomnosti autoimunitnej reakcie a včasné podanie kortikoterapie. Z toxicity v tráviacom trakte býva častá hnačka, bolesti brucha, z kožnej toxicity „rash“, svrbenie, pluzgiere, slizničná toxicita vo forme stomatitídy, postihnutie pečene ako žltáčka, nauzea a vracanie, tiež sa vyskytujú CNS-symptómy, ako slabosť v končatinách, strnulosť, poruchy citlivosti, zmeny správania, spomalenosť, precitlivenosť, endokrinné poruchy, tyreoiditída, hypofyzitída (ireverzibilná), poruchy videnia, rozmazané videnie, bolesť a červené oči.

V súčasnosti tiež prebiehajú klinické skúšania s ďalšou anti-CTLA4 monoklonovou protilátkou, **tremelimumabom**, ktorá na rozdiel od ipilimumabu patrí k triede IgG2 (6).

Nivolumab (Opdivo®) je plne humánna anti-PD-1 IgG4 monoklonová protilátka, ktorá blokuje väzbu PD-L1 ligandu na receptor PD-1 na T-lymfocytoch a tým umožňuje ich aktiváciu a protinádorovú aktivitu. Nivolumab sa podáva intravenózne, schválený je v liečbe NSCLC (nemalobunkový pľúcny karcinóm) a malígneho melanómu (7), ďalšie indikácie sú predmetom prebiehajúcich klinických štúdií. Toxicita je podobná ako pri iných blokátoroch imunitných „checkpointov“, dermatitída, kolitída, hepatitída, pneumonitída, tyreoiditída, hypofyzitída.

Pembrolizumab (Keytruda®) (predtým MK-3475, lambrolizumab) je humanizovaná monoklonová protilátka anti-PD-1 triedy IgG4. Podáva sa v intravenózne infúzii; schválená je v liečbe pokročilého malígneho melanómu po predchádzajúcej liečbe. Pozitívne výsledky sa zaznamenali v liečbe NSCLC (8) a ďalšie indikácie sú predmetom prebiehajúcich klinických štúdií. Toxicita je pomerne častá, ale len menšia časť je závažného stupňa. Najdôležitejšia je kolitída, hepatitída, pneumonitída, tyreoiditída, hypofyzitída.

Atezolizumab (MPDL3280A) je monoklonová protilátka anti-PD-L1. V klinických štúdiách v liečbe melanómu, renálneho karcinómu, NSCLC a urotelového karcinómu močového mechúra dosiahla sľubné výsledky.

Existujú aj ďalšie anti-PD-1 monoklonové protilátky, ktoré sa skúšajú v liečbe širokého spektra nádorových chorôb. Jedným z problémov imunoterapie je otázka prognostických a prediktívnych faktorov. Predbežne sa ukazuje, že PD-1, PD-L1 a PD-L2 status, prípadne aj jeho kvantifikácia, by mohli byť prediktívnym faktorom klinickej odpovede imunoterapie.

Nádorové vakcíny

Ako nádorové vakcíny označujeme jednak očkovacie látky, ktorých cieľom je prevencia nádorových chorôb spôsobených známymi infekčnými agensmi, a tak vakcinácia je namierená proti týmto špecifickým infekčným agensom, a jednak vakcíny, ktorých cieľom je liečba, alebo prevencia nádorových chorôb s cieľom pôsobenia na určité nádorové štruktúry. Príkladom nádorov so známou príčinnou súvislosťou s infekciou, ktorá sa využíva vo vakcinácii, je karcinóm krčku maternice, kde príčinnú úlohu vo vzniku nádorových zmien zohráva infekcia vírusom HPV (*human papilloma virus*) alebo hepatocelulárny karcinóm, kde etiologicky sa uplatňujú vírusy hepatitídy B a C. Infekčná etiológia je však známa aj pri iných nádoroch (tak napr. s HPV infekciou súvisia aj mnohé karcinómy, penisu, rekta, hrtana a asi aj mnohé iné nádory).

Špecifickou oblasťou vývoja nádorových vakcín sú tie, ktoré sa zameriavajú buď priamo na určité špecifické nádorové štruktúry alebo na štruktúry, ktoré majú dôležitú úlohu v organizme počas reakcie zameranej na eradikáciu nádoru. Antigény nádorov rozdeľujeme na tzv. spoločné, ktoré exprimujú viaceré nádory alebo tzv. unikátne, ktoré sa vyskytujú iba v individuálnych tumoroch. Možnosťou pri vývoji nádorových vakcín je použitie buď celých nádorových buniek, alebo iba určitých špecifických epitopov ich antigénov. Ďalším spôsobom použitia vakcinácie je použitie očkovacej látky, ktorá by viedla k imunit-

nej reakcii v hostiteľskom organizme, ktorej výsledkom by mala byť eradikácia patogénu, ktorý vyvolal vznik nádoru a tým aj jeho samotného .

Vývoj vakcín je komplexným procesom, kde musíme brať do úvahy nielen antigén, ktorý daná vakcína obsahuje , ale tiež samotný hostiteľský organizmus, ktorého reakcia v rámci účinnosti vakcinácie je dôležitá. Ukazuje sa, že význam má použitie vakcíny vo včasnom štádiu nádorového procesu , kedy nádorová populácia je malá a nie až v štádiu metastáz , kedy rozsiahla nádorová masa pôsobí výrazne proti imunitnému systému a tak bráni uplatneniu žiaduceho účinku podanej vakcíny. Väčšina klinických skúšaní však zatiaľ prebehla práve u pacientov v pokročilom štádiu choroby.

To, že nie je jednoduché vytvoriť účinnú vakcínu, súvisí aj s tým, že nádorová populácia je takmer vždy značne heterogénna a tak vakcína namierená proti špecifickému antigénu nemusí byť účinná pre eradikáciu, lebo ostatné nádorové bunky prežívajú. Predpokladalo sa, že choroby, u ktorých sa pozorovali spontánne remisie, ako je napríklad renálny karcinóm alebo malígný melanóm, kde imunitný systém zohráva väčšiu úlohu ako pri iných nádorových chorobách, bude vakcinácia účinná. Účinné vakcíny sa však vyvinuli aj pre iné nádory, ako je napr. karcinóm prostaty (Sipuleucel-T) alebo folikulový B-lymfóm a lymfóm z plášťovej zóny (BiovaxID), čo povzbudilo ďalší vývoj vakcín (9)

Sipuleucel-T (Provenge), je predstaviteľom bunkovej imunoterapie, ide o “personalizovanú” liečbu, kedy sa pacientov imunitný systém “naprogramuje”, aby vyhľadával a likvidoval nádorové bunky rozšírené v organizme, ako by to boli cudzie bunky. Liečba sa pripravuje špecificky pre každého pacienta. Pacientove biele krvinky, predovšetkým APC (napr. dendritové bunky, makrofágy), sa získajú leukaferézou. Takto získaný krvný produkt sa inkubuje s fúznym proteínom, ktorý pozostáva z antigénu kyslej prostatickej fosfatázy (*prostate acid phosphatase* – PAP), ktorý je prítomný na povrchu 95 % buniek karcinómu prostaty a rastového faktoru GM-CSF (faktor stimulujúci kolónie granulocytov a makrofágov /*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*/), ktorý pomáha vyzrievaniu APC. Aktivovaný krvný produkt sa reinfunduje pacientovi, aby navodil imunitnú odpoveď proti nádorovým bunkám karcinómu prostaty, ktoré majú na povrchu antigén PAP (10). Najčastejšími vedľajšími účinkami je bolesť močového mechúra, opuchy tváre, rúk, nôh, bolesť na hrudníku, triaška, zmätenosť, kašeľ, hnačka, bolesť pri močení, sťažené dýchanie, poruchy reči, zraku, nespavosť, poruchy pohyblivosti.

Záver

Imunoterapia znamená nesporný pokrok v liečbe onkologických pacientov. Napriek dosiahnutým výsledkom, je jej podanie spojené stále s mnohými limitáciami či už z hľadiska efektivity alebo toxicity. Predovšetkým v liečbe metastatického malígneho melanómu sa už ukazujú ako najefektívnejšie kombinácie viacerých látok s rôznymi mechanizmami účinku na imunitný systém, potvrdila sa účinnosť následnej liečby po zlyhaní predchádzajúcej, takže sa opakuje situácia napr. z liečby kolorektálneho karcinómu, kde sa zatiaľ nenašiel „najlepší“ liek, ale významné predĺženie prežívania sa podarilo dosiahnuť využitím „všetkých“ dostupných liekov postupne, v sekvencii.

Asi najzávažnejším problémom (okrem finančného) je hľadanie (nájdienie) jednoznačných prognostických a prediktívnych faktorov. Veľkým problémom je aj postupný vývoj rezistencie na jednotlivé preparáty. Otázniky ostávajú aj ohľadom dĺžky trvania liečby. Napriek pretrvávaniu mnohých neobjasnených otázok je používanie imunoterapie v onkologickej liečbe nesporným krokom vpred. Mnohé inkurabilné choroby sa stávajú „chronickými“, pacienti prežívajú mnoho rokov, nie sú však vyliečení, ale choroba zostáva stabilizovaná. To dáva šancu do budúcnosti, že pri pomerne dynamickom vývoji nových liečebných stratégií sa podarí pacientov aj vyliečiť.

Literatúra:

1. MAY, K.F. JR., JINUSHI, M., DRANOFF, G.: Immunosurveillance: Innate and Adaptive Antitumor Immunity. In: Prendergast GC et al. Cancer Immunotherapy. 2nd ed. Elsevier; 2013:101–113.
2. PARDOLL, D.M.: The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12 (4):252–264.
3. Ribas, A.: Tumor Immunotherapy Directed at PD-1 *N Engl J Med* 2012; 366: 2517–2519.
4. TOPALIAN, S.L., DRAKE, C.G., PARDOLL, D.M.: Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol*. 2012;24:207–212.
5. HODI, F. S., LEE, S., MCDERMOTT, D. F. et al.: Ipilimumab Plus Sargramostim vs Ipilimumab Alone for Treatment of Metastatic Melanoma A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2014;312(17):1744-1753.
6. RIBAS, A., HANSON D. C., NOE D. A. et al.: Tremelimumab (CP-675,206), a Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4 Blocking Monoclonal Antibody in Clinical Development for Patients with Cancer. *The Oncologist* 2007;12:873–883.
7. ROBERT, C., KARASZEWSKA, B., SCHACHTER, J. et al.: Improved Overall Survival in Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib. *N Engl J Med* 2015; 372:30-39.
8. GARON, E. B., RIZVI, N., HUI, R. et al.: Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2015; 372:2018-2028.
9. REČKOVÁ, M. a kol.: Vybrané kapitoly z klinickej onkológie. 1. vydanie, ROWEX, spol. s r. o., Bratislava, 2014, 228.

10. KANTOFF, P. W., HIGANO, C. S., SHORE, N. D. et al.: Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2010; 363:411-422.

Recenzoval

Prof. MUDr. Milan Buc, DrSc.

Imunologický ústav LFUK

INDEX

AUTOROV

Buc M.	18, 58	Oltman M.	17
Cehlár O.	10, 42	Rajczyová Z.	14
Čente M.	19	Smutný M.	17
Fečík M.	19	Šimaljaková M.	12, 13, 14, 15
Filipčík P.	19	Škrabana R.	8, 9, 10, 42
Gulanová B.	13, 14	Špánik S.	16, 78
Hanes J.	10	Šustrová E.	15
Hrubiško M.	17, 18, 50, 67	Weissová P.	11
Kontseková E.	8, 9, 10, 22	Žilka N.	8, 9, 10, 22
Kováčech B.	8, 9, 22		
Lisý Ľ.	12		
Novák M.	8, 9, 10, 19, 22, 42		
Novák P.	8, 9, 22, 32		

**Konferencia Slovenskej imunologickej spoločnosti
a Neuroimunologického ústavu Slovenskej akadémie vied**

BIOLOGICKÁ LIEČBA V TEÓRII A PRAXI

Bratislava, Dúbravská cesta 9,
23. september 2015

Konferencia bola zorganizovaná s podporou grantovej agentúry APVV ako aktivita formálneho a neformálneho vzdelávania v rámci projektu číslo APVV-0677-12.

V zmysle zákona NR SR č. 578/2004 Z. z. o poskytovateľoch zdravotnej starostlivosti, zdravotníckych pracovníkoch, stavovských organizáciách v zdravotníctve a o zmene a doplnení niektorých zákonov, nariadenia vlády Slovenskej republiky č. 322/2006 Z. z. o spôsobe ďalšieho vzdelávania zdravotníckych pracovníkov, sústave špecializačných odborov a sústave certifikovaných pracovných činností bolo Slovenskou komorou iných zdravotníckych pracovníkov konferencii pridelených 6 kreditov.

Vydalo vydavateľstvo AHO5, Dunajská Lužná,
v decembri 2015 ako svoju 1. publikáciu.

Spoluvydavateľ:
Neuroimunologický ústav SAV

Editor: Peter Filipčík

Sadzba: Peter Blaho

ISBN 978-80-971357-1-3

ISBN 978-80-971357-1-3



9 788097 135713