

## Imunsko zdravljenje tumorjev Immunotherapy of tumors

Alojz Ihan\*

Deskriptorji  
novotvorbe-zdravljenje  
imunsko zdravljenje

Descriptors  
neoplasms-therapy  
immunotherapy

**Izvleček.** Prvi objavljeni poskusi imunskega zdravljenja malignih obolenj so stari že več kot stoletje. V zadnjih petnajstih letih pa sta zlasti tehnologija izdelave monoklonskih protiteles in genska tehnologija omogočili, da se je imunsko zdravljenje raka začelo razvijati na trdnejših osnovah. V sledečem pregledu so povzete nekatere prevladujoče imunoterapevtske usmeritve, ki vsaka s svoje smeri skušajo pobuditi imunski odziv proti tumorskemu tkivu. Omenjeni so poskusi izdelave protitumorskih cepiv, poskusi zdravljenja raka s citokini in njihovimi analogi, z monoklonskimi protitelesi in z imunskimi celicami, gojenimi »in vitro«.

**Abstract.** Immune interventions were introduced in the treatment of human cancer about 100 years ago. Thanks to the development of monoclonal antibodies and molecular gene technology during the past 15 years, cancer immunotherapy has changed dramatically, making an exceptionally rapid progress. The paper reviews briefly the major advances in cancer immunotherapy, including various immunisation techniques, treatment with cytokines and their analogues, and the use of monoclonal antibodies and immune cells cultured in vitro.

### Uvod

Poskusi imunskega zdravljenja človeških tumorjev so stari že več kot stoletje. Vendar so vse do uvedbe novejših tehnologij v biomedicinsko raziskovanje (monoklonska protitelesa, genska tehnologija) poskusi ostajali na ravni slepega tipanja, pri čemer raziskovalci niso imeli niti približnega vpogleda v imunska dogajanja, ki so sledila njihovim terapevtskim postopkom. V to obdobje štejemo poskuse, pri katerih so obolelim za rakom vbrizgavali razne bakterijske in virusne izvlečke, toksine, serume in serumske izvlečke, tumorske izvlečke (1). V zvezi s tem obstajajo poročila o nekaterih uspešnih zdravljenjih, vendar nobeno od zdravljenj ni bilo tako učinkovito in ponovljivo, da bi se širše in za dlje časa uveljavilo. Zaradi naglega razvoja kemoterapije, radioterapije in kirurških tehnik je bilo imunsko zdravljenje tumorjev v petdesetih letih tega stoletja za nekaj desetletij potisnjeno v stran. Nekako v začetku osemdesetih let se je učinkovitost kirurškega zdravljenja, radioterapije in kemoterapije tumorjev približala meji, preko katere ne bo mogoče stopiti brez izrazito drugačnih terapevtskih pristopov (2). V teh letih pa je tudi razvoj raziskovalnih metod v imunologiji omogočil, da so mehanizmi imunskega odgovora vsaj v obrisih postali opredeljeni in v mnogih primerih tudi eksperimentalno obvladljivi.

Tako so v zvezi s tumorsko imunostjo postale opredeljene celice, ki so zmožne neposredno uničevati tumorske celice, bodisi preko specifične imunske prepoznavne tumorskih antigenov (citotoksični limfociti T), bodisi preko imunsko nespecifičnega razloče-

\* Doc. dr. sc. Alojz Ihan, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo, Medicinska fakulteta, Korytkova 2, 61000 Ljubljana.

vanja tumorskih celic od zdravih celic (naravne celice ubijalke, makrofagi). Opredeljeni so bili številni mediatorji, med temi zlasti interlevkini, ki so zmožni neposredno ali posredno (preko aktivacije drugih celic) spodbuditi imunske celice k uničenju tumorskih celic. Razvoj genske tehnologije je omogočil proizvodnjo velikih količin zelo čistih pripravkov učinkovin (interlevkini, TNF-tumor necrosis factor-tumorski nekrotizirajoči dejavnik, interferoni), s katerimi lahko »in vitro« ali »in vivo« spodbujamo imunske celice k protitumorski aktivnosti (3).

### Imunsko zdravljenje tumorjev s cepljenjem

Ker mora imunski sistem tumorsko celico najprej »prepoznati« kot tujek, mnogi raziskovalci menijo, da imunski sistem že v tej prvi fazi ni dovolj učinkovit. Zato po zgledu cepiv proti nalezljivim boleznim skušajo izdelati cepiva, ki bi sprožila protitumorsko imunsko reakcijo (4, 5). Cepiva, ki so vsebovala mrtve tumorske celice in prečiščene tumorske antigene, so se večidel izkazala kot neuspešna. Eden od vzrokov njihovega neuspeha je verjetno v tem, da je tumor že povzročil nastanek imunske tolerance do svojih antigenov. V zvezi s tem se je v nekaterih poskusih obneslo, če je poskusna žival pred cepljenjem najprej prejela majhne odmerke ciklofosfamida ali obsevalne terapije. Tak postopek naj bi škodil zlasti zaviralnim limfocitom T, ki omogočajo vzdrževanje tolerance do tumorja (6, 7).

Raziskovalci skušajo tudi na različne načine gojiti tumorske celice »in vitro« in jih z različnimi postopki pripraviti do tega, da bi ponovno vnešene v telo vzbudile čim močnejši imunski odgovor proti tumorju. Tumorske celice gojijo v prisotnosti različnih citokinov (interferon gama, TNF, interlevkin 4), ki povečajo sintezo molekul poglavitnega kompleksa tkivne skladnosti (MHC) in s tem povečajo predstavljanje tumorskih antigenov imunskim celicam. Isto skušajo doseči tudi s transfekcijo MHC genov v tumorske celice. Tumorske celice tudi inficirajo z različnimi virusi, da bi bile bolj imunogene. V iste namene tumorskim celicam s kemičnimi ali encimskimi postopki spreminjajo površinske molekule (8–10).

V zadnjih letih so bili doseženi obetavni rezultati z imunizacijo z antiidiotipskimi protitelesi. Antiidiotipska protitelesa dobimo tako, da s protitelesi proti tumorskim antigenom imuniziramo žival in iz njenega seruma dobimo protitelesa, ki so usmerjena proti tistemu delu protitumorskega protitelesa, ki reagira neposredno z molekulo tumorskega antigena. Če si tumorski antigen predstavljamo kot model, je protitelo proti tumorskemu antigenu negativ modela (antigenske determinante tumorskega antigena), antiidiotipsko protitelo pa je negativ negativna, se pravi pozitiv, kopija modela (antigenske determinante tumorskega antigena) (11).

### Nespecifično zdravljenje tumorjev s citokini

Citokini so tkivni hormoni, ki se pomembno vpletajo v organizacijo in delovanje tkiv. Zaenkrat je zadovoljivo opredeljenih (na farmakodinamskem, biokemičnem in genskem nivoju) več kot dvajset različnih citokinov. Med njimi sestavljajo največjo skupino interlevkini (opredeljenih jih je 14), ki so tkivni hormoni imunskega sistema (izdelujejo jih imun-

ske celice in imajo vpliv nanje). Že zdaj pa je jasno, da je hormonska organizacija tkiv izredno kompleksna in so dosedaj odkriti citokini verjetno le neznamenit del mozaika informacijskih molekul, ki omogočajo usklajeno delovanje posameznih tkiv. Slehernega, od dosedaj znanih citokinov, lahko izloča več različnih tipov celic in posamezna celica lahko izloča veliko različnih citokinov. Posamezen citokin ima navadno številne biološke učinke. Izločeni citokin navadno deluje na kratke razdalje, tj. na samo celico, ki je citokin sintetizirala (avtokrino delovanje) in/ali na celice v neposredni okolici (12–14).

Zaradi vpliva citokinov na celične funkcije (na celično rast, diferenciacijo, proliferacijo, smrt) so citokini potencialno izredno zanimive molekule za zdravljenje tumorjev. Citokini lahko neposredno vplivajo na tumorsko tkivo in povzročajo smrt tumorskih celic, zavirajo njihov razrast, pospešujejo njihovo diferenciacijo, povzročijo poškodbe tumorskega žilja. Po drugi strani pa lahko citokini (predvsem interlevkini) vplivajo na imunski sistem, s tem pa na protitumorsko imunsko reakcijo (15–17).

Zaradi zapletenega in večidel še neodkritega mozaika medsebojnega delovanja celic, ki jih uravnavajo citokini, so mehanizmi njihovega protitumorskega vpliva v glavnem nepojasneni. Z interferoni je bilo konec sedemdesetih let zdravljenih že tisoče bolnikov z rakom. Pri številnih so bili doseženi nedvomni zdravilni učinki (zlasti pri limfomih, melanomih, levkemiji lasastih celic, hepatocelularnemu karcinomu, Kaposijevemu sarkomu), vendar ni mogoče reči, če so bili zdravilni učinki posledica antiproliferativnega, imunomodulatornega ali protivirusnega učinka uporabljenih interferonov (11).

Sredi osemdesetih let so začeli prvi poskusi zdravljenja raka z interlevkinom 2 (IL-2). V prvih poročilih se je interlevkin 2 izkazal kot izjemno učinkovito zdravilo pri zdravljenju karcinoma ledvic in malignega melanoma (18). Ker je kazalo, da bo interlevkin 2 pomenil povsem novo dobo pri zdravljenju tumorjev, so bile opravljene številne klinične študije po vsem svetu. Študije so v glavnem potrdile učinkovitost zdravljenja omenjenih tumorjev (karcinoma ledvic in malignega melanoma), vendar le pri manjšem delu zdravljenih bolnikov, poleg tega pa je bilo zdravljenje z interlevkinom 2 spremljano s številnimi stranskimi pojavi (vročina, slabost, bruhanje, hipovolemijski šok). Privlačnost tovrstnega zdravljenja zaenkrat zmanjšuje tudi izredno velika cena (11).

Poleg interferonov in interlevkina 2 je TNF tretji citokin, ki se je izkazal kot zelo učinkovito zdravilo proti raznovrstnim eksperimentalnim živalskim tumorjem. TNF ima (podobno kot interferoni) citostatičen in citotoksičen učinek na tumorske celice, poveča izražanje MHC I molekul na tumorskih celicah in s tem poveča predstavljanje tumorskih antigenov imunskim celicam. Imunske celice (citotoksični limfociti T) zato lažje prepoznajo tumorske celice kot tujke in jih uničijo. TNF povzroči tudi okvaro tumorskega žilja in s tem hemoragično nekrozo tumorja (19–21).

Vnos citokinov v telo povzroči kaskado celičnih reakcij. Celice začno izražati različne receptorske molekule za citokine, obenem začno izločati druge citokine, od katerih vsak spet povzroča nove celične reakcije. Pri bolnikih, zdravljenih z IL-2, so na primer ugotovili močno povečane plazemske koncentracije interlevkina 1, interlevkina 6, TNF alfa in interferona gama. Zaradi opisanih kaskadnih reakcij je zelo težko opredeliti, katera učinkovina ima bolj in katera manj neposredne zdravilne učinke. Odgovori na ta vpra-

šanja pa bodo nedvomno odločilno prispevali k bolj usmerjenemu tumorskemu zdravljenju.

Ker ima zdravljenje s citokini lahko tudi nevarne stranske učinke, ki so navadno sorazmerni z doseženo plazemsko koncentracijo citokina, potekajo številne raziskave, v katerih skušajo s kombiniranjem različnih citokinov doseči boljši učinek, obenem pa zaradi nižjih odmerkov posameznih citokinov zmanjšati njihove toksične učinke. Odlični klinični rezultati so bili na primer doseženi s kombinacijo IL-2 in IFN alfa pri zdravljenju malignega melanoma in ledvičnega karcinoma. Z enakim zdravljenjem, a podkožnim dajanjem učinkovin, so bili doseženi enako dobri rezultati, pri tem pa so bili stranski pojavi manj izraženi. Tudi kombinacija IL-2 in TNF alfa je pokazala zelo dobre učinke pri zdravljenju karcinoma ledvic (11).

Poleg prizadevanj, da bi pri citokinskem zdravljenju odkrili boljše kombinacije učinkovin in boljše protokole zdravljenja, je veliko raziskovalnih naporov usmerjenih v izboljšanje načina aplikacije citokinov. Problem je zlasti v tem, da po i.v. dajanju plazemska koncentracija citokinov zelo hitro pada, razpolovni čas je od nekaj minut do kvečjemu nekaj ur. Razen tega se v tem primeru citokini nespecifično razporedijo po telesu. Zato je za zdravljenje potrebna velika količina citokinov, ki imajo poleg velike cene lahko tudi znatne stranske učinke. Rešitve teh problemov se v glavnem iščejo v treh smereh:

- lokalnem dajanju citokinov,
- vgraditvi citokinov v liposome in
- proizvodnji citokinskih analogov.

Veliko **lokalno koncentracijo citokinov** je mogoče enostavno doseči pri tumorjih, ki jih obdaja peritonealna votlina (tumorji jajčnikov, debelega črevesa) ali se razrastejo po peritoneju (mezotelium). Pri tumorjih mehurja je mogoče intravezikalno dajanje. Z uporabo katetrov in infuzijskih pump je mogoče dajati citokine v žile, ki prehranjujejo tumor. Tudi injiciranje citokinov ob in/ali v tumor je tako pri živalih kot pri ljudeh pokazalo dobre učinke.

Z **vgraditvijo citokinov v liposome** je mogoče v določeni meri usmerjati porazdelitev citokinov po telesu. S spreminjanjem maščobne sestave liposomov (dodatki različnih količin specifično pripravljenih glikolipidov, fosfolipidov, holesterola) je mogoče vplivati na obstojnost liposomov v krvotoku, na njihovo razporeditev po telesnih organih in razdelkih. Na ta način je mogoče doseči koncentriranje učinkovin v tkivih, ki jih je zajel tumor. Liposome je mogoče tudi opremiti s protitelesi proti tumorskim antigenom (imunoliposomi). Zaradi vezave protiteles (in obenem liposomov) na tumorske celice je mogoče na ta način močno povečati koncentracijo liposomov v tumorju. Enako kot protitelesa proti tumorskim antigenom lahko opravljajo nalogo »usmerjevalcev« tudi v liposome vgrajeni ligandi za receptorje, ki jih določeni tumorji izražajo v močno povečani količini (receptorji za estrogen, transferin, EGF – epidermal growth factor, epidermalni rastni dejavnik). »Usmerjeni« liposomi seveda niso primerni le za transport citokinov temveč tudi kemoterapevtikov in nasploh učinkovin, pri katerih bi z bolj usmerjeno porazdelitvijo dosegli bistveno boljše učinke zdravljenja.

Citokini imajo številne biološke učinke. Nekateri so pri zdravljenju zaželjeni, drugi pa celo škodljivi. Zato obstajajo številni poskusi, da bi **citokine kemično spremenili** tako, da bi obdržali (ali celo izboljšali) njihove željene biološke lastnosti, znebili pa bi se njihovih neželjenih stranskih učinkov. Uspelo je npr. že izdelati spremenjeno molekulo interleukina 1, ki ohranja svoje imunske učinke, pri aplikaciji v poskusno žival pa nima toksičnih učinkov. Potencialno je TNF ena najbolj obetavnih učinkovin za protitumorsko zdravljenje, obenem pa ima nevarne stranske učinke. Zato potekajo številne raziskave, kako bi z biokemičnimi metodami ali z gensko tehnologijo spremenili molekulo TNF, da bi imela boljše protitumorsko delovanje in blažje stranske učinke.

### Imunsko zdravljenje tumorjev z uporabo monoklonskih protiteles

Imunski sistem je ob prepoznanju tujih molekul zmožen izdelati izredno specifične reagente – protitelesa, ki se z močno afiniteto vežejo na prepoznane tuje molekule in sprožijo njihovo odstranitev iz telesa. Zato je že desetletja ena najprivlačnejših idej tumorske imunologije ta, da bi za zdravljenje tumorja uporabili protitelesa, ki bi specifično prepoznavala tumorske celice (ne pa ostalih telesnih celic), se vezala nanje in povzročila njihovo odstranitev iz organizma. Nekako od petindvajsetih let tega stoletja so potekale številne klinične raziskave, v katerih so s pripravki protiteles skušali zdraviti tumorje, predvsem limfome in levkemije. Iz tega obdobja obstaja precejšnje število poročil o dobrih rezultatih takega zdravljenja, vendar tehnologija pridobivanja protitelesnih pripravkov še ni omogočala dobro nadzorovanih raziskav. Pripravki protiteles so izhajali iz človeških ali živalskih serumov, zato so bili na razpolago v majhnih količinah. Vprašljiva je bila njihova čistost in specifičnost za tumor. Vsebovali so lahko primesi (interleukine, ostale citokine), ki so same imele protitumorski učinek ali pa so bile toksične za bolnika. Zato so bila opisana zdravljenja težko ponovljiva in med seboj neprimerljiva (22–26).

Tehnologija izdelave monoklonskih protiteles je omogočila, da je v skoraj neomejenih količinah mogoče izdelati pripravke monoklonskih protiteles (27). V posameznem pripravku so vse protitelesne molekule med seboj enake, imajo enako specifičnost. Zato se je z uvedbo te tehnologije zdelo, da je mogoče izdelati idealen reagent, ki se bo vezal na tumor in povzročil njegovo uničenje.

Za zdravljenje tumorjev obstajata dva poglobitna načina uporabe monoklonskih protiteles. Monoklonska protitelesa je mogoče enostavno vbrizgati v organizem in pričakovati, da se bodo vezala na tumorske celice ter povzročila njihovo uničenje preko mehанизmov, ki v organizmu običajno sledijo vezavi protiteles na antigen (28):

- ob vezavi na tumorsko celico protitelesa aktivirajo kaskado komplementa, ki povzroči poškodbo membrane tumorske celice,
- na tumorske celice vezana protitelesa so receptorske strukture za citotoksične celice, ki se na ta način aktivirajo in ubijajo tumorske celice z vezanimi protitelesi (ADCC),
- protitelesa lahko direktno reagirajo z receptorji, pomembnimi za življenje tumorskih celic (transferinski receptorji, receptorji za epidermalni rastni faktor (EGF)). Na ta način spremenijo delovanje teh receptorjev in s tem aktivnost tumorskih celic.

Od kliničnih raziskav zdravljenja malignomov z monoklonskimi protitelesi so zlasti omembe vredni poskusi zdravljenja malignomov, zraslih iz limfoidnih celic B ali T. Ker tumorske celice predstavljajo en sam celični klon, v takih primerih vse tumorske celice izražajo enake receptorje za antigen. Zato je mogoče izdelati monoklonska protitelesa, ki se specifično vežejo le na antigenske receptorje tumorskih celic (antiidiotipska protitelesa), ne pa na antigenske receptorje ostalih limfocitov. V nekaterih objavljenih raziskavah s tega področja so bili doseženi dobri rezultati pri zdravljenju malignomov, zraslih iz celic B (29, 30). Kot kaže pa je tako zdravljenje še primernejše za zdravljenje malignomov, zraslih iz celic T (31). Ker se med dozorevanjem limfocitov B njihov antigen-ski receptor še nekoliko preoblikuje (somatska hipermutacija), populacija tumorskih celic B ni povsem homogena glede zgradbe antigenškega receptorja. Zato se lahko zgodi, da se antiidiotipska protitelesa ne vežejo na vse tumorske celice B. Nasprotno pa limfociti T med dozorevanjem več ne mutirajo svojega antigenškega receptorja in je zato populacija tumorskih limfoidnih celic T povsem homogena glede zgradbe antigenškega receptorja.

V nasprotju z omenjenimi uspešnimi zdravljenji pa poskusi zdravljenja izvenkrvnih malignomov z monoklonskimi protitelesi niso bili tako uspešni (32). Mogoče je, da so pogoji za uspešno delovanje protitumorskih protiteles v krvotoku mnogo ugodnejši (večja koncentracija protiteles, večja koncentracija imunskih efektorskih celic) kot je to v trdnih tkivih. Zato je zdravljenje izvenkrvnih tumorjev z monoklonskimi protitelesi še povsem na začetku razvoja. Morda predstavljajo prvo obetavno usmeritev poskusi, ob katerih se poskuša poleg monoklonski protiteles v tumor aplicirati še nekatere citokine (IL-2, GM-CSF), ki naj bi aktivirali efektorske imunske celice, da bi bolj učinkovito napadale tumorske celice, obložene z monoklonskimi protitelesi.

Mnogi raziskovalci pa menijo, da se monoklonska protitelesa lahko sicer uspešno in zelo specifično vežejo na tumorske celice, vendar pa učinek te vezave ne sproži dovolj imunskih efektorskih funkcij, da bi tako zdravljenje zadostovalo za odstranitev tumorja. Zato so bili razviti novi načini uporabe monoklonskih protiteles pri zdravljenju tumorjev. Sem štejemo predvsem sinteze konjugatov monoklonskih protiteles (33). Pri tem je na molekulo monoklonskega protitelesa mogoče vezati molekulo toksina, kemoterapevtika ali radioizotopa. Specifična vezava monoklonskih protiteles na tumorske celice omogoči, da se konjugati po aplikaciji v organizem skoncentrirajo v tumorju. Na ta način toksini (ricin A, rastlinski in bakterijski toksini), kemoterapevtiki (metotreksat, antraciklini, vinka alkaloidi) in radioizotopi (jod 131, indij 111) delujejo selektivno in lokalno. S tem je povečan njihov učinek, stranski pojavi pa so manjši.

V fazi razvoja so še drugi načini uporabe monoklonskih protiteles v protitumorski terapiji. Monoklonska protitelesa je mogoče vgraditi v liposome in na ta način liposome »usmeriti«, da se skoncentrirajo v tumorju. Z uporabo genske tehnologije pri izdelavi monoklonskih protiteles je mogoče izdelati bispecifična monoklonska protitelesa. To so monoklonska protitelesa, ki imajo specifična vezišča za dva različna antigena. Eno vezišče se npr. veže na antigen tumorske celice, drugo pa na antigen imunske celice. Na ta način bispecifično protitelo poveže med seboj imunsko in tumorsko celico (naredi most), obenem pa tudi aktivira imunsko celico, da le-ta uniči tumorsko celico (34, 35).

## Uporaba gojenih imunskih celic za zdravljenje tumorjev

Z razvojem »in vitro« tehnik v imunologiji (kloniranje posameznih vrst imunskih celic, »in vitro« imunizacija, hibridomska tehnologija, transfekcija imunskih celic z različnimi geni) je dozorela tudi ideja, da bi bilo mogoče bolnikove imunske celice gojiti v inkubatorju, jih tam ustrezno namnožiti, ustrezno aktivirati, nato pa jih ponovno injicirati v bolnika. Ta ideja je zlasti atraktivna pri bolnikih z rakom. Veliko imunologov namreč meni, da poskusi imunoterapije tumorjev niso dovolj učinkoviti zato, ker je imunski sistem do tumorja že vzpostavil tolerančno reakcijo, ki je običajni imunoterapevtski protokoli ne morejo preusmeriti. »In vitro« gojenje celic omogoča korenitejšo manipulacije (uporaba močno koncentriranih citokinov, selekcijski postopki, transfekcije celic z geni za citokine), ki »in vivo« zaradi škodljivosti za organizem niso mogoče.

O prvih tovrstnih uspešnih kliničnih poskusih je konec devetdesetih let poročal Rosenberg (18). Raziskovalci so iz venske krvi onkoloških bolnikov osamili limfocite. Limfocite so gojili v inkubatorju in gojišču dodajali interlevkin 2. Pod vplivom interlevkina 2 so se limfociti razmnoževali, obenem se je močno povečala njihova zmožnost ubijanja tumorskih celic. Razmnožene in aktivirane limfocite so nato vbrizgali nazaj v žilje bolnikov. S takim zdravljenjem so dosegli nekaj ozdravitev bolnikov z napredovalim melanomom in karcinomom ledvic.

Za limfocite, razmnožene »in vitro« na pravkar opisani način, se je uveljavilo ime »celice LAK« (z limfokini aktivirane celice ubijalke – »lymphokine activated killers«). Celice LAK niso homogena populacija celic, njihova sestava je močno odvisna od pogojev gojenja celic (časa gojenja, koncentracije uporabljenih citokinov), pa tudi limfociti različnih posameznikov se različno odzivajo na »in vitro« gojenje. Navadno pa med celicami LAK pravladujejo naravne celice ubijalke in limfociti T.

Celice LAK lahko škodujejo tumorju bodisi direktno z ubijanjem tumorskih celic ali indirektno s sproščanjem imunostimulatornih citokinov (IL-2, IL-6, IFN gama) in molekul, ki zavirajo proliferacijo tumorskih celic ali celo povzročajo njihovo smrt (TNF, TGF beta, perforin, serinske esteraze). Pri miših z relativno majhnimi tumorji je hkratno dajanje celic LAK in IL-2 delovala sinergistično. Uporaba celic LAK brez dodajanja IL-2 »in vivo« pa ni imela učinkov na tumor (36–38).

V kliničnih poskusih so raziskovalci navadno zdravili bolnike z aplikacijo kombinacije interlevkina 2 in celic LAK. Mnoge raziskave dokazujejo sinergističen vpliv interlevkina 2 in celic LAK na zdravljenje tumorjev, obstajajo pa tudi raziskave, v katerih je bilo zdravljenje s samim IL-2 enako uspešno kot z omenjeno kombinacijo, in torej celice LAK niso prispevale k uspehu zdravljenja (11).

Ker so klinični uspehi zdravljenja s celicami LAK slabši, kot je sprva kazalo, so se raziskave v nekaj zadnjih letih bolj usmerile v »in vitro« gojenje limfocitov, ki jih je po operaciji primarnega tumorja mogoče osamiti iz tumorskega tkiva. Pri tem je potrebno tumorsko tkivo mehansko in encimsko razgraditi v celično suspenzijo, iz nje osamiti limfocite, limfocite pa razmnoževati v inkubatorju. Tako pripravljene limfocite se imenujejo celice TIL (tumor infiltrirajoči limfociti – tumour Infiltrating lymphocytes). V populaciji celic



TIL naj bi bili za protitumorske učinke najbolj odločilni citotoksični limfociti T, specifični za tumorske celice. Prvi poskusi na miših so pokazali, da so celice TIL petdeset do stokrat učinkovitejše pri odstranjevanju metastaz kot celice LAK. V kliničnih raziskavah so se celice TIL pokazale mnogo manj učinkovite kot v živalskih poskusih. Verjeten razlog za to je, da so za zdravljenje človeških tumorjev potrebne velike količine celic TIL. Zato je potrebno limfocite, pridobljene iz tumorskega tkiva, relativno dolgo časa razmnoževati »in vitro«. Med dolgotrajnim »in vitro« razmnoževanjem pa se delež citotoksičnih limfocitov T, usmerjenih proti tumorju, močno zmanjša, kajti kulturo prerastejo celice, ki se v »in vitro« pogojih pač najbolj razmnožujejo, to so predvsem naravne celice ubijalke (39, 40).

Pri zdravljenju tumorjev s celicami LAK ali TIL je zaenkrat očitno, da dosedaj razvita metodologija še ne omogoča zadovoljivih uspehov. Zato so raziskovalni naporji usmerjeni v to, da bi s primerno izbirno metodo iz tumorjev osamili samo določene limfocitne populacije (npr. citotoksične limfocite T); med gojenjem celic v inkubatorju bi bilo potrebno spodbuditi predvsem razmnoževanje limfocitov, ki so specifično usmerjeni proti tumorskim celicam; na gojene celice bi bilo potrebno vplivati s pravo kombinacijo citokinov (TNF, IL-2, IL-4, IFN alfa ali gama) in ne le z IL-2 kot v večini dosedanjih poskusov (11, 35, 41).

## Zaključki

Številni poskusi imunskega zdravljenja so bili presenetljivo učinkoviti pri zdravljenju eksperimentalnih tumorjev, povzročenih v poskusnih živalih. Ti uspehi so vzbudili veliko upov glede uporabnosti imunskega zdravljenja za zdravljenje onkoloških bolnikov. Vendar so klinične raziskave v večini primerov pokazale mnogo manjše učinke, kot bi jih glede na rezultate poskusov pričakovali. Zato je očitno, da bodo raziskovalci v prihodnje morali poiskati živalske tumorske modele, ki bodo po lastnostih bolj podobni spontano vzraslim človeškim tumorjem.

Klinične izkušnje kažejo, da imunsko zdravljenje navadno ni učinkovito pri močno razraslih tumorjih in je v takih primerih mogoče le kot dodatno zdravljenje po kirurški, radio- in/ali kemoterapiji. Zdi se, da je klinične raziskave obetavneje izvajati pri bolnikih, ki imajo manj razrasle tumorje, vendar je v takih primerih poskusno imunsko zdravljenje težko opravičljivo, zlasti, če ima lahko pomembne stranske učinke.

Zaenkrat je očitno, da obstoječi protokoli imunskega zdravljenja ugodno učinkujejo pri razmeroma majhnem deležu rakastih bolnikov (okoli 20%). Zato bi bilo koristno ugotoviti, iz katerih lastnosti tumorja in bolnikovega imunskega sistema bi bilo mogoče sklepati, ali bi bila pri določenem bolniku imunoterapija uspešna ali ne. Nove vrste bolj ciljane imunoterapije (imunoliposomi, bispecifična protitelesa, transfekcije specifičnih limfocitov T z geni za citokine) pa lahko po drugi strani povečajo delež bolnikov, ki bi ugodno reagirali na imunsko zdravljenje.



## Literatura

1. Oldham RK, Smalley RV. Immunotherapy: The old and the new. *J Biol Res Modif* 1983; 2: 1–8.
2. Oldham RK. Biotherapy: General Principles. In: Oldham RK. *Principles of cancer biotherapy*. Raven Press, New York 1987: 1–20.
3. Malkovska V, Sondel PM, Malkovsky M. Tumor immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 1989; 1: 883–90.
4. Hoover HC, Peters LC, Brandhorst JS. Therapy of spontaneous metastases by an autologous tumor vaccine. *J Surg Res* 1981; 30: 409–14.
5. Bartlett GL, Zbar B. Tumor specific vaccine containing Mycobacterium Bovis and tumor cells: Safety and efficacy. *J Natl Cancer Inst* 1972; 48: 1709–16.
6. Naor D. Suppressor cells: permitters and promoters of malignancy? *Adv Cancer Res* 1979; 29: 45–125.
7. Hellstrom KE, Hellstrom I. Tumors, immunological escape of. In: Roit IM, Delves PJ, eds. *Encyclopedia of Immunology*. Academic Press, London 1992: 1530–1.
8. Bergers JJ, Den Otter W, De Groot JW, et. al. Reconstituted membranes of tumor cells (proteoliposomes) induce specific protection to murine lymphoma cells. *Cancer Immunol Immunother* 1992; 34: 233–40.
9. Bernards R, Destree A, McKenzie S, Gordon E, Weinberg RA, Panicali D. Effective tumor immunotherapy directed against an oncogene-encoded product using a vaccinia virus vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 6854–9.
10. Zou JP, Shimizu J, Ikegami K, Takiuchi H, Fujiwara H, Hamaoka T. Tumor immunotherapy with the use of tumor antigen pulsed antigen presenting cells. *Cancer Immunol Immunother* 1992; 35: 1–6.
11. Kedar E, Klein E. Cancer immunotherapy: Are the results discouraging? Can they be improved. *Adv Cancer Res* 1992; 59: 245–322.
12. Lang RA, Burgess AV. Autocrine growth factors and tumorigenic transformation. *Immunol Tod* 1990; 11: 244–7.
13. Chantry D, Feldmann M. Role of cytokines in autoimmunity. *Biotechnol Therapeut* 1991; 1: 361–4.
14. Smith KA. Interleukin 2. *Ann Rev Immunol* 1984; 2: 319–33.
15. Kelso A. Cytokines: structure, function and synthesis. *Curr Opin Immunol* 1989; 2: 215–9.
16. Trinchieri G. Interleukin 12 and its role in the generation of Th1 cells. *Immunol Tod* 1993; 14: 335–9.
17. Pestka S. Interferons and their actinons. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 727–77.
18. Rosenberg S, Lotze M. Cancer Immunotherapy using IL-2 and IL-2 activated lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1985; 4: 681–711.
19. Beutler B, Cerami A. Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 1986; 322: 977–8.
20. Old LJ. Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 1985; 230: 630–1.
21. Paul NL, Ruddle NH. Lymphotoxin. *Ann Rev Immunol* 1988; 6: 407–38.
22. Acerbis G, Cleris L, Rodolfo M, Parmiani G, Formelli F. Postsurgical adjuvant chemioimmunotherapy with recombinant interleukin 2 and 1,3-bis-(2-chloretyl)-1-nitrosurea on spontaneous metastases of non-immunogenic murine tumour. *Cancer Immunol Immunother* 1992; 34: 383–8.
23. Gazit Z, Weis DW, Shouval D, et. al. Chemo-adoptive immunotherapy of nude mice implanted with human colorectal carcinoma and melanoma cell lines. *Cancer Immunol Immunother* 1992; 35: 135–9.
24. Currie GA. Eighty years of immunotherapy: a review of immunological methods used in the treatment of cancer. *Int J Cancer* 1972; 26: 141–65.
25. Ritz J, Pesando JM, Sallan SE. Serotherapy of acute lymphoblastic leukemia with monoclonal antibody. *Blood* 1981; 58: 141–9.
26. Wright PW, Hellstrom KE, Hellstrom IE. Serotherapy of malignant disease. *Med Clin North Am* 1976; 60: 607–13.
27. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predetermined specificity. *Nature* 1975; 256: 495–9.
28. Mellstedt H. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Curr Opin Immunol* 1990; 2: 708–14.
29. Dyer MJ, Hale G, Hayhoe FGJ, Waldmann H. Effects of CAMPATH-1 antibodies in vivo in patients with lymphoid malignancies influence of antibody isotype. *Blood* 1989; 73: 1431–6.

30. Basham TY, Race ER, Campbell MJ, Reid TR, Levy R, Merigan TC. Synergistic antitumor activity with IFN and monoclonal anti-idiotypic for murine B cell lymphoma. Mechanism of action. *J Immunol* 1988; 141: 2855–61.
31. Janson CH, Tehrani M, Mellstedt H, Wigzell H. Anti-idiotypic monoclonal antibody to a T cell chronic lymphatic leukemia. *Cancer Immunol Immunother* 1989; 28: 225–32.
32. Mellstedt H, Frodin JE, Masucci G. Clinical status of monoclonal antibodies in the treatment of colorectal carcinoma. *Oncology* 1989; 3: 25–33.
33. Baldwin RW, Byers VS. Monoclonal antibody immunoconjugates for cancer treatment. *Curr Opin Immunol* 1989; 1: 891–9.
34. Gravelle M, Ochi A. The targeting of CD4 T lymphocytes to a B cell lymphoma. A comparison of anti-CD3 anti-idiotypic antibody conjugates and antigen-anti-idiotypic antibody conjugates. *J Immunol* 1989; 142: 4079–88.
35. Ferrini S, Melioli G, Moretta L. Immunotherapy and immunity to cancer: cellular mechanisms. *Curr Opin Immunol* 1990; 2: 683–95.
36. Rosenberg SA. Cancer therapy with interleukin 2- immunologic manipulations can mediate the regression of cancer in humans. *J Clin Oncol* 1988; 6: 403–12.
37. Lotzova E, Savary CA, Freedman RS, Edwards CL, Taylor Wharton L. Recombinant IL-2 activated NK cells mediate LAK activity against ovarian cancer. *Int J Cancer* 1988; 42: 225–32.
38. Ramsdell FJ, Gray JD, Golub SH. Similarities between LAK cells derived from human tymphocytes and peripheral blood lymphocytes: expression of the NKH1 and CD3 antigen. *Cell Immunol* 1988; 114: 209–18.
39. Lotzova E. Ovarian tumor infiltrating lymphocytes: phenotype and anti-tumor activity. *Natl Immun Cell Growth Reg* 1988; 7: 226–33.
40. Belldegrun A, Muul RM, Rosenberg SA. Interleukin 2 expanded tumor infiltrating lymphocytes in human renal cell cancer – isolation, characterisation, and anti-tumor activity. *Cancer Res* 1988; 48: 3461–8.
41. Lotzova E. Analysis of effector mechanisms in cancer. *Curr Opin Immunol* 1989; 1: 904–9.

Prispelo: 4.10.1993