

# Aktuality z Národního ústavu pro výzkum rakoviny

## Precision immuno-oncology approach for four malignant tumors in siblings with constitutional mismatch repair deficiency syndrome

Palova H, Das A, Pokorna P et al.

*NPJ Precis Oncol* 2024; 8(1): 110. doi: 10.1038/s41698-024-00597-8.



Vzácný syndrom konstitučního deficitu v mismatch repair opravném systému (constitutional mismatch repair deficiency syndrome – CMMRD) je charakterizován zvýšeným výskytem nádorů u postiženého jedince. Je způsoben bíalelickými zárodečnými mutacemi v jednom ze čtyř genů pro mismatch repair (MMR): *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* nebo *PMS2*. Přesná diagnóza doprovázená adekvátním molekulárně genetickým vyšetřením hraje zásadní roli ve sledování a léčbě nádorových onemocnění postiženého jedince a má význam i pro ostatní členy rodiny. V článku autoři popisují diagnostický proces a klinický management dvou bratrů s CMMRD, kteří jsou nositeli složené heterozygotní varianty v genu *PMS2*. Bratři pocházejí od pokrevně nepříbuzných rodičů, bez rodinné anamnézy nádorových onemocnění. U obou bratrů se CMMRD manifestoval různými fenotypovými projevy a nádorovým spektrem. Prvnímu z bratrů byl ve 14 letech diagnostikován adenokarcinom tlustého střeva, přičemž po hemikolektomii a standardní chemoterapii FOLFOX dosáhl kompletní remise. Následně se u něj o 4 roky později vyvinul difuzní high-grade gliom pediatrického typu (pediatric-type diffuse high-grade glioma – PDHGG). Sekvenování zárodečného exomu potvrdilo CMMRD způsobenou dvěma odlišnými patogenními variantami *PMS2*, z nichž každá byla zděděna od asymptomatických rodičů. Oba nádory byly hypermutované s mutačním podpisem (mutational signature) deficitu MMR, ztrátou exprese proteinu *PMS2* a vysokou mírou mikrosatelitové nestability (microsatellite instability – MSI). PDHGG vykazoval extrémně vysokou mutační nálož (tumor mutational burden – TMB), a sice 338 mut/Mb. Z toho důvodu byl u pacienta použit kombinovaný imunoterapeutický režim. Pacient byl zařazen do klinické studie s protinádorovou vakcínou založenou na dendritických buňkách (5 dávek) a dále léčen inhibitorem kontrolního bodu imunitní odpovědi nivolumabem. Po léčbě nivolumabem dítě dosáhlo kompletní remise. Léčba byla podávána 24 měsíců. Bohužel 5 měsíců po ukončení podávání nivolumabu byla potvrzena diseminovaná recidiva PDHGG s hypermutací a vysokou MSI. Po 43 měsících od stanovení diagnózy PDHGG došlo k úmrtí. U bratra prvního pacienta byla potvrzena stejná složená heterozygotní varianta v genu *PMS2* a diagnostikován CMMRD a nastaven příslušný režim sledování. Následně byla zjištěna asymptomatická abdominální lymfadenopatie. Biopsie potvrdila high-grade zralý B-buněčný lymfom s aberací *11q*, ale bez přestavby *MYC/8q24*. Pacient podstoupil dva cykly intenzivní chemoterapie spolu s rituximabem. Byla zjištěna vysoká mutační nálož a mutační podpis deficitu MMR, ztráta exprese proteinu *PMS2* a vysoká míra MSI. Chemoterapie byla ukončena a pacient byl po multidisciplinárním konsenzu léčen nivolumabem. Při trvalé remisi trvající > 24 měsíců bylo rozhodnuto o ukončení podávání nivolumabu. Po 9 měsících byl diagnostikován PDHGG s odpovídajícími mutačními znaky a vysokou mírou MSI. Po odstranění nádoru a ozáření byla opětovně zahájena léčba inhibitory kontrolních bodů imunitní odpovědi ipilimumabem a nivolumabem, která musela být pro toxicitu ukončena. Pacient je v současné době 13 měsíců po ukončení imunoterapie, > 23 měsíců od diagnózy PDHGG a 5 let od diagnózy lymfomu sledován pomocí zobrazovacích metod bez známek nádorového onemocnění. Léčba zahrnující inhibitory kontrolních bodů imunitního systému významně přispěla k prodloužení přežití obou pacientů postižených letálními gliomy. Hypermutovanost nádoru rovněž umožnila v léčbě B-buněčného lymfomu použití imunoterapie pomocí nivolumabu, čímž se omezila expozice intenzivní chemoterapii u tohoto mladého pacienta.

## Small protein blockers of human IL-6 receptor alpha inhibit proliferation and migration of cancer cells

Groza Y, Lacina L, Kuchař M et al.

*Cell Commun Signal* 2024; 22(1): 261. doi: 10.1186/s12964-024-01630-w.



Interleukin-6 (IL-6) je multifunkční cytokin, který řídí imunitní odpověď a jehož role byla popsána při vzniku autoimunitních onemocnění. Signalizace prostřednictvím komplexu receptoru IL-6 (IL-6R) je rozhodující pro progresi nádorů, a proto IL-6R představuje důležitý terapeutický cíl. K výběru proteinů cílených na IL-6R alfa (IL-6R $\alpha$ ) byla v publikované práci použita vysoce komplexní kombinatorická knihovna proteinů odvozených od domény streptokokového proteinu G vázající lidský albumin vytvořených *in vitro* ribozomálním komplexem. Rozsáhlý screening bakteriálních lyzátních klonů byl proveden pomocí metody ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) a jejich blokační potenciál pro IL-6R $\alpha$  byl ověřen kompetitivní metodou ELISA. Vazba proteinů na buňky byla sledována pomocí průtokové cytometrie a konfokální mikroskopie na transfektovaných buňkách HEK293T a inhibice signální funkce byla zkoumána prostřednictvím HEK-Blue IL-6 reportérových buněk. Vazebná

kinetika proteinů k živým buňkám byla měřena pomocí LigandTraceru, proliferace a toxicita buněk byly analyzovány pomocí iCELLigence a Incucyte, migrace buněk byla sledována testem hojení škrábnutí (scratch wound healing assay) a predikce vazebných pozic proteinů byla provedena dokováním pomocí molekulárního modelování. Autoři prezentují soubor proteinových variant NEF ligandů vybraných z kombinatorické knihovny odvozené od albumin vázicích domén s průkazem jejich vazebné specifity k lidskému IL-6R $\alpha$  a antagonistického účinku v HEK-Blue IL-6 reportérových buňkách. Tři nejslibnější varianty – NEF108, NEF163 a NEF172 – inhibovaly proliferaci buněk maligního melanomu (G361 a A2058) a buněk karcinomu slinivky břišní (PaTu a MiaPaCa) a potlačovaly migraci buněk maligního melanomu (A2058), karcinomu slinivky břišní (PaTu) a glioblastomu (GAMG) *in vitro*. Vazebné proteiny NEF také rozpoznávaly expresi IL-6R $\alpha$  primárních lidských B buněk. Proteiny NEF tak představují slibnou třídu netoxických protinádorových látek s migrastatickým potenciálem.

### Stromal cells engineered to express T cell factors induce robust CLL cell proliferation *in vitro* and in PDX co-transplantations allowing the identification of RAF inhibitors as anti-proliferative drugs

Hoferkova E, Seda V, Kadakova S et al.

*Leukemia* 2024; [online]. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41375-024-02284-w>.



Stromální buňky, upravené tak, aby produkovaly cytokiny z T lymfocytů, stimulují proliferaci buněk chronické lymfocytární leukemie (CLL) při kokultivaci *in vitro* a v PDX myších, přičemž tento model umožňuje odhalit anti-proliferativní aktivitu inhibitorů RAF kináz na buňky CLL. Množení a přežívání buněk CLL závisí na interakcích v mikroprostředí, především v lymfatických uzlinách. Míra zrodu CLL buněk je zde 0,5–3 % denně a nově vzniklé CLL buňky jsou odtud vyplavovány do periferní krve. Předpokládá se, že prostředí v lymfatických uzlinách podporuje proliferaci CLL prostřednictvím faktorů, jako jsou CD40, toll-like receptory (TLR) a aktivace B-buněčného receptoru (B-cell receptor – BCR). Samostatná aktivace BCR signalizace pomocí antigenu *in vitro* však k vyvolání proliferace CLL buněk nestačí, což naznačuje, že k proliferaci CLL jsou zapotřebí ještě další faktory mikroprostředí, pravděpodobně produkované CD4+ T lymfocyty. Prakticky nulová (< 5 %) proliferace primárních CLL buněk *in vitro* je překážkou pro studium tohoto procesu, zásadního pro pochopení progresu a agresivity onemocnění. Již dříve bylo vyvinuto několik *in vitro* modelů mikroprostředí CLL užitečných pro studium biologie CLL a pro screening sloučenin potenciálně vhodných pro terapii. Většina těchto modelů zahrnuje lidské nebo myší stromální buňky podobné fibroblastům, které zvyšují přežívání CLL buněk nebo simulují adhezí zprostředkovanou lékovou rezistenci, ale nevyvolávají proliferaci CLL. K vyvolání proliferace se v modelech se stromálními buňkami exprimujícími CD40L obvykle ještě zvláště přidávají rekombinantní faktory, jako jsou interleukiny, které jsou však velice drahé, a i za takových podmínek je míra proliferace CLL v těchto modelech relativně nízká a variabilní. V publikované studii autoři vytvořili model mikroprostředí CLL založený na napodobení interakcí CLL buněk s T lymfocyty, a to při kokultivaci *in vitro* a v imunodeficientních myších (patient derived xenografts – PDX). Bylo připraveno šest různých podpůrných buněčných linií odvozených z buněčné linie stromálních buněk HS-5. Tyto linie stabilně exprimují lidský CD40L, IL-4, IL-21 a jejich kombinace. Při kultivaci CLL buněk s HS-5 exprimujícími CD40L a IL-4 proliferovalo po 7 dnech asi 7 % buněk CLL, avšak s HS-5 exprimujícími CD40L, IL-4 a navíc IL-21 to bylo už 44 % buněk, což je pro CLL *in vitro* nebývale vysoká míra proliferace. Buňky CLL v těchto modelech vykazovaly změny genové exprese podobné těm, které lze zjistit v buňkách CLL vystavených skutečnému mikroprostředí v lidském těle. Experimenty na buňkách CLL v tomto modelu také poprvé ukázaly, že proliferaci CLL zcela blokují inhibitory RAF kináz. Vyvinutý model lze pro účely velkého screeningu léčiv zmenšit do objemu 5  $\mu$ l nebo jej lze naopak využít pro vytvoření myšího modelu CLL-PDX. Společná transplantace buněk CLL a HS5-CD40L-IL4, příp. HS5-CD40L-IL4-IL21 na kolagenovém scaffoldu do imunodeficientních myší vedla k přihojení v 47 % (82 %) případů, přičemž v ~20 % myší byly přihojené buňky klonálně příbuzné CLL, což naznačuje, že upravené HS5 by v PDX modelech potenciálně mohly nahradit autologní T lymfocyty.

## Informace z České onkologické společnosti

Zápis ze schůze výboru České onkologické společnosti konané 18. 6. 2024 ve FN Motol v Praze naleznete na [www.linkos.cz](http://www.linkos.cz).