

O léčbě založené na antiadhezních molekulách a o příčinné souvislosti mezi EB virem a roztroušenou sklerózou

Také druhý z pozvaných zahraničních hostů, neurolog a neuroimunolog prof. Lawrence Steinman ze Stanfordovy univerzity, USA, přednesl v programu letošních Jedličkových neuroimunologických a likvorologických dnů dvě přednášky vycházející z jeho výzkumu antiintegrinů či antigen-specifických terapií – mj. i vývoje vakcín zaměřených na navození tolerance imunitního systému.

Prof. Steinman se do Prahy připojil on-line – a hned v prvních minutách si získal auditorium svou osobní vzpomínkou na česko-americkou love story z časů existence železné opony. Jako chlapec totiž vyrůstal v Culver City v Los Angeles v sousedství rodiny někdejší československé atletky Olgy Fikotové a jejího amerického manžela Harolda Connollyho. Ti dva se do sebe zamilovali na olympijských hrách v Melbourne v roce 1956, odkud si oba přivezli zlaté medaile – Olga v hodu diskem, Harold v hodu kladivem. Za povolení jejich svatby se u prezidenta Zápotockého museli složitě přimlouvat manželé Zátopkovi, samotný sňatek v Praze v roce 1957 se stal událostí, které na Staroměstském náměstí přihlížely desetitíse lidí. Olga však již nikdy nesměla reprezentovat Československo a nesplnil se jí ani sen dostudovat ve své vlasti medicínu. Na dalších čtyřech olympiádách reprezentovala USA, v Mnichově byla prvním neamerickým sportovcem, který nesl při zahajovacím ceremoniálu americkou vlajku. Prof. Steinman si ji pamatuje jako dlouholetou členku rady školy, do které chodil, a jeho mladší bratr se kamarádil s jejím synem Markem Connollym. Olga Fikotová zemřela v roce 2024 v Kalifornii ve věku 91 let...

PŘEDNÁŠKA 1: Ohlédnutí za antiadhezní léčbou RS (jak to začalo, co se pokazilo, jak se snížilo riziko a co bude dál)

I samotná první přednáška prof. Steinmana byla do jisté míry historizující, jak je patrné i z jejího názvu, který jsme si vypůjčili do mezititulku výše. V roce 1992 vyšla v časopisu Nature práce [1], na které se přednášející podílel coby konzultant. Autoři využili známé a osvědčené Stamperovy-Woodruffovy metody, při které se na zmrazené řezy tkáně mozku zvířat s experimentální autoimunitní encefalomyelitidou (EAE) *in vitro* nanosou

živé imunitní buňky a sleduje se, zda a v jakých místech se k tkáni přichytí. Bylo pozorováno, že lymfocyty přilnuly k endotelu mozkových cév v místě postiženém zánětem. Poté autoři v kompetitivním vazebném testu studovali soubor monoklonálních protilátek namířených proti různým povrchovým proteinům lymfocytů s cílem zjistit, které z nich dokážou blokovat interakci T buněk s vaskulárními buněčnými adhezními molekulami (vascular cell adhesion molecule; VCAM), jež fungují jako „přistávací kotva“. Za normálních okolností se na vnitřní výstelce cév téměř nevyskytují, endotelové buňky je masivně vystaví na svém povrchu až v reakci na zánět.

Tuto schopnost nakonec prokázala protilátka, která se váže na $\alpha 4$ -podjednotku integrinu $\alpha 4 \beta 1$ – na rozdíl od dalších testovaných protilátek cílených na selektiny, integrin $\beta 2$ či integrin $\alpha 5$, které měly jen malý účinek nebo neměly žádný. Při testování *in vivo* protilátky proti integrinu $\alpha 4$ účinně zabránily hromadění leukocytů v centrálním nervovém systému a rozvoji EAE.

Tak byl objeven základ budoucího léku pro RS natalizumabu. Jak uvedl prof. Steinman, za tímto úspěchem stály spolupráce týmu s komplementárními odbornými znalostmi, kvalitní zvířecí model (který dal později vzniknout také modulátorům sfingosin-1-fosfátových receptorů), jasně formulovaná vědecká otázka, na niž bylo možné dát přímou odpověď, a využití již existující a osvědčené Stamperovy-Woodruffovy metody. „Kdybych mohl něco poradit mladým vědcům, pak toto: pokud existuje nějaká metoda, která je dostupná a mohla by fungovat, zkuste ji jako první, dříve než se pustíte do hledání nějaké zcela nové technologie,“ dodal prof. Steinman.

Jako na horské dráze: schválení, krize a rehabilitace

„Výzkum a vývoj natalizumabu i jeho registrace běžely jako na warpový pohon,“ použil

prof. Steinman přirovnání k technologii pro dosahování nadsvětelných rychlostí ze sci-fi filmů. Od publikace objevu v roce 1992 se lék rychle dostal do klinických studií fáze 1 (v roce 1997) a fáze 2 (v roce 2002). Na základě mimořádně přesvědčivých ročních interim výsledků [2], které ukázaly 76% snížení míry relapsů a nepřítomnost nových lézí enhancujících gadolinium u 96 % pacientů, získal natalizumab v listopadu 2004 ve zrychleném řízení schválení amerického Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration; FDA).

Jen o pouhé tři měsíce později, v únoru 2005, však přišla poměrně katastrofální rána. Dva pacienti s RS a jeden pacient s Crohnovou chorobou léčení natalizumabem zemřeli na progresivní multifokální leukoencefalopatii (PML). „Zaskočilo mne, že k tomu došlo tak brzy, ale očekával jsem, že se něco podobného dříve či později stane. Již v létě předchozího roku jsem v časopise Science sdílel své určité obavy. Samozřejmě jsem nepředpověděl, že se objeví zrovna PML, ale upozorňoval jsem, že ve studii fáze 2 byly patrné některé bezpečnostní signály týkající se infekcí, například zvýšený výskyt faryngitidy,“ uvedl prof. Steinman. Pro časopis Times, který jej kontaktoval poté, co k úmrtím došlo, tehdy uvedl, že FDA neměl lék schválit na základě pouhých ročních dat. Riziko vážných infekcí bylo naštěstí logické, vzhledem k tomu, že natalizumab funguje na principu zásahu do imunitního systému.

„PML se u pacientů projevila poté, kdy překročili hranici prvního roku léčby. My dnes už víme, že během prvních dvanácti měsíců léčby natalizumabem je výskyt PML velmi vzácný, protože nějakou dobu trvá, než se objeví první příznaky,“ dodal prof. Steinman.

Výrobce natalizumabu, společnost Biogen, poté přípravek dobrovolně stáhl z trhu a zaznamenal prudký propad hodnoty svých akcií. Jeho výzkumníci začali pátrat po

příčině toho, co se stalo. Analyzovali vzorky od 17 pacientů, u nichž se rozvinula PML, a zjistili, že všech 17 bylo pozitivních na protilátky proti John Cunningham viru (JC viru). Šlo o velmi významné zjištění, protože séropozitivita v běžné populaci dosahuje jen přibližně 53 %.

Na základě tohoto poznatku vyvinula společnost vysoce prediktivní screeningový test na protilátky proti JC viru, který umožnil robustní minimalizaci rizika a návrat natalizumabu na trh v červnu 2006. „*Pacienti s negativním výsledkem testu mohou přípravku užívat s vysokou mírou důvěry v jeho bezpečnost. Tento příběh dobře ukazuje, jak biomarker vzácného, avšak fatálního nežádoucího účinku může v konečném důsledku rehabilitovat lék a zvýšit šance na jeho udržení v klinické praxi,*“ konstatoval prof. Steinman.

Možné budoucí směry léčby cílené na integriny

V závěru svého prvního sdělení se prof. Steinman zaměřil na potenciál antiintegrinové léčby i mimo oblast RS. Připomněl, že přestože vykazovala slibné výsledky u zvířecích modelů diabetu 1. typu, nebyl výzkum v této indikaci dále rozvíjen. Protilátka proti integrinu $\alpha 4 \beta 7$ je však schválena k léčbě idiopatických střevních zánětů.

Prof. Steinman dále hovořil o výzkumu svého týmu zaměřeném na jiný integrin, $\alpha 5$, který je vysoce exprimován na mikroglia a makrofázích v oblastech motorických neuronů u pacientů s amyotrofickou laterální sklerózou (ALS). Preklinické studie ve třech různých myších modelech ALS ukázaly, že experimentální protilátka proti integrinu $\alpha 5$ zlepšuje motorické funkce, prodlužuje přežití a snižuje zánět v CNS.

Zmínil se i o publikaci v Nature Neuroscience [3], v níž se spolupracovníky identifikovali tři CNS-specifické populace myeloidních buněk přítomné v modelech RS, Huntingtonovy a Alzheimerovy choroby. Zjistili přitom, že monocyty migrují do mozku specificky pouze při zánětlivých onemocněních, nikoliv při neurodegenerativních stavech, přičemž tyto buňky vykazují rozdílnou produkci cytokinů. Zásadním výstupem výzkumu bylo určení receptoru pro integrin $\alpha 5$ na myeloidních buňkách jako slibného terapeutického cíle pro zvládání neurozánětu.

Klíčovou výzvou však podle prof. Steinmana zůstává skutečnost, že monoklonální protilátky špatně procházejí hematoencefalickou bariérou. K překonání tohoto pro-

blému jeho tým nyní navrhuje léčbu nové generace založenou na T buňkách s chimerickým antigenním receptorem (CAR-T), vybavených fragmentem protilátky proti integrinu $\alpha 5$.

PŘEDNÁŠKA 2: Příčinná souvislost mezi EB virem a RS (mechanismy a terapeutické horizonty)

Také svou druhou přednášku v programu letošních Jedličkových neuroimunologických a likvorologických dnů uvedl prof. Steinman exkurzem do historie. V 50. letech minulého století si Denis Burkitt, irský chirurg působící v Ugandě, všiml specifického a agresivního rakovinného bujení u tamních dětí – onemocnění, které dnes známe jako Burkittův lymfom. Zjistil, že výskyt tohoto nádoru kopíruje geografické oblasti s vysokým výskytem malárie a specifickým klimatem. Pojal proto podezření, že by za vznikem nádorů mohl stát nějaký infekční činitel, pravděpodobně virus přenášený hmyzem.

Zaslal vzorky tkáně do Londýna britskému patologovi a virologovi Siru Anthony Epsteino, kterému se spolu s jeho postgraduální studentkou Yvonne Barrovou podařilo kultivovat nádorové buňky a v roce 1964 pod elektronovým mikroskopem v nich skutečně odhalit virové částice. Na počest svých objevitelů byl virus pojmenován jako virus Epstein-Barr (EBV).

Jak připomněl prof. Steinman, patří do širší čeledi lidských herpesvirů, která zahrnuje celkem osm zástupců: virus herpes simplex typu 1, virus herpes simplex typu 2, virus varicella-zoster, virus Epstein-Barr, cytomegalovirus, lidský herpesvirus 6 (zahrnuje varianty A a B), lidský herpesvirus 7 a herpesvirus asociovaný s Kaposiho sarkomem.

Molekulární mimikry a tzv. epitope spreading

Jak uvedl prof. Steinman, ve vztahu ke kauzalitě mezi EBV a RS vyšly v lednu roku 2020 v odstupu několika dní dvě důležité práce. Nejprve tým Alberta Ascheria z Harvard School of Public Health publikoval rozsáhlou epidemiologickou analýzu 10 milionů mladých dospělých v aktivní službě v americké armádě; u 955 z nich se rozvinula RS. Autoři uvedli, že infekce EBV byla spojena s 32násobně zvýšeným rizikem RS, zatímco jiné viry (zejména cytomegalovirus [CMV]) toto riziko nevykazovaly [4].

To by však, jak zdůraznil prof. Steinman, k objasnění příčinné souvislosti nestačilo.

EBV je velmi rozšířený virus, infikováno je 95, možná až 99 % světové populace, přesto se RS rozvine jen u malé části osob. Infekce EBV je tedy jen prvním, možná rozhodujícím krokem, ale v rozvoji patofyziologie musejí hrát roli i další důležité faktory.

Druhá ze zmíněných prací publikovaných v r. 2020, tentokrát autorským týmem kolem prof. Steinmana [5], identifikovala jako možný spojovací mechanismus molekulární mimikry. Autoři uvedli, že součástí jaderného antigenu EBV 1 (Epstein-Barr Nuclear Antigen-1 [EBNA-1]), který je klíčovým transkripčním faktorem EBV, existuje specifický úsek, tzv. mimikry hotspot, dlouhý pouhých 47 aminokyselin. Tento malý úsek v sobě kombinuje sekvence, které jsou téměř identické se třemi důležitými molekulami v lidském mozku a nervovém systému. Jedná se o GlialCAM (protein v bílé hmotě mozku zajišťující stabilitu gliových buněk), iontový kanál anoktamin-2 (ANO2) a alfa-krytalin B (CRYAB). U posledně jmenované molekuly, malého proteinu tepelného šoku, se prof. Steinman zastavil podrobněji. CRYAB tlumí zánět, stabilizuje poškozené či agregující proteiny a v experimentálních modelech zmírňuje autoimunitní demyelinizaci i ischemické poškození nervové tkáně. Jeho podání vedlo u zvířat ke zmírnění průběhu EAE a k funkčnímu zlepšení po CMP či ischemii zrakového nervu [6].

Protilátky a B-lymfocyty zaměřené proti virovému antigenu EBNA1 mohou tedy zkříženě reagovat s vlastními proteiny CNS, zejména s adhezní molekulou gliových buněk GlialCAM. Imunitní odpověď původně namířená proti EBV pak u části osob přechází v autoimunitní reakci proti myelinu a gliovým strukturám.

Prof. Steinman v této souvislosti připomněl studii publikovanou v časopise Cell [7] poukazující na to, že RS je důsledkem selhání imunitní kontroly nad autoreaktivními B buňkami, které vznikají po infekci EBV. Cytotoxické natural killer buňky exprimující NKG2C nebo NKG2D a určité EBV-specifické T-lymfocyty dokážou infikované nebo autoreaktivní B-buňky napadající GlialCAM eliminovat. Pokud je ale tato bezpečnostní kontrola oslabena např. signalizací na inhibiční imunitní ose HLA-E/NKG2A, virovými variantami nebo nevhodně zaměřenou T-buněčnou odpovědí, zvyšuje se riziko rozvoje RS až 260násobně.

Prof. Steinman dále uvedl, že na rozdíl od EBV není infekce CMV spojena se zvýšením rizika RS; některé analýzy naopak na-

značují nižší riziko nebo příznivější průběh RS u CMV-séro pozitivních osob. Citoval studii [8], v níž CMV-séro pozitivní pacienti s RS s výraznější expanzí NKG2C⁺ NK buněk dosahovali hodnoty Expanded Disability Status Scale (EDSS) 3,0 později než pacienti bez této expanze nebo CMV-negativní pacienti. Výsledek podporuje hypotézu, že „adaptivní“ NK buňky indukované CMV mohou tlumit autoreaktivní imunitu.

Recentní studie z roku 2025 [9] porovnála 650 pacientů s RS a 661 zdravých kontrol. Potvrdila zvýšené odpovědi proti EBNA1, GlialCAM a dalším proteinům CNS, zejména CRYAB a ANO2. Reaktivita proti více epitopům byla spojena s vyšším rizikem RS, což svědčí nejen pro mechanismus molekulární mimikry, ale také pro tzv. epitope spreading – postupné rozšiřování autoimunitní odpovědi.

„Nejsilnější genetický rizikový faktor RS, alela HLA-DRB1*15:01, zesiluje souvislost mezi protilátkami proti EBNA1, GlialCAM a dalšími zkráceně reagujícími antigeny a rizikem RS. Pravděpodobně umožňuje účinnější prezentaci některých virových či autoreaktivních peptidů CD4⁺ T-lymfocytům,“ dodal prof. Steinman.

Role EBV jako reprogramátoru imunitního systému

„EBV evidentně není pouze pasivním spouštěčem RS prostřednictvím molekulární mimikry, ale aktivním reprogramátorem imunitního systému,“ uvedl dále prof. Steinman. Tropismus EBV směřuje primárně k B buňkám; pomocí nové technologie simultánní detekce značením nebo též prostorového multiplexování (co-detection by indexing, CODEX) byl v recentní publikaci v Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA z roku 2025 [10] při analýze vzorků mozkové tkáně post mortem popsán zvýšený výskyt markerů EBV, zejména EBNA1 a LMP1, v lécích RS. Analýza obrazových dat potvrdila přítomnost EBV-pozitivního zbarvení v neuronech a gliových buňkách, což naznačuje přímou roli EBV při postižení neuronů a gliových buněk u RS. Byly pozorovány i změněné interakce imunitních buněk, vč. snížené interakce s makrofágy a paměťovými T buňkami, a zvýšené interakce s gliovými buňkami. V oblastech mozku postižených RS byly rovněž zaznamenány poruchy integrity hematoencefalické bariéry. Tyto výsledky zdůrazňují podíl EBV na imunitní modulaci, dysfunkci

gliových buněk a poškození neuronů u RS, zejména u progresivních fenotypů.

Prof. Steinman společně se S. Zamvilem publikoval začátkem letošního roku v časopise Cell [11] zásadní přehledovou práci shrnující, řečeno jeho slovy, „tři elegantní studie“ a detailně popisující posun od teorie pouhé molekulární mimikry k novému konceptu virového reprogramování buněk, díky němuž se otevírají i cesty pro nové cílené terapie. Jako slibná se jeví být myšlenka cílit na reprogramované CXCR3-pozitivní B buňky, specifickou podskupinu paměťových B buněk, které byly EBV funkčně a transkripčně přeměněny na vysoce prozánětlivé buňky. Receptor CXCR3 funguje jako chemokinový naváděcí systém, který jim umožňuje překonávat hematoencefalickou bariéru a migrovat přímo do CNS. Tam jsou pak T-lymfocytům předkládány fragmenty vlastního myelinu, což spouští autoimunitní destrukci.

Budoucí terapeutické strategie cílené na EBV

Závěrem prof. Steinman nabídl pohled za horizont stávající terapie RS. Aktuálně se studují antivirotika potlačující lytickou aktivitu EBV, vč. stávajícího, relativně levného tenofoviru. Ten je aktuálně zkoušen v probíhající norské studii jako potenciálně užitečný preventivní přípravek krátce po prodělané mononukleóze nebo časně v průběhu RS při přítomnosti dalších rizikových faktorů. „Antivirové strategie vypadají slibně, mohou však vyžadovat dlouhodobé, možná doživotní podávání, podobně jako je tomu u HIV a virové hepatitidy C, aby byla suprese udržena,“ uvedl prof. Steinman.

Pracuje se i na profylaktických a terapeutických vakcínách proti EBV a na antigen-specifické imunoterapii navržené k neutralizaci autoreaktivní B-buněčné odpovědi.

Existuje i program vývoje mediátorové RNA vakcíny cílící na více genomových komponent EBV.

Prof. Steinman připomněl také potenciál tolerogenních vakcín. Dřívější pokusy navodit toleranci vůči myelinovému bazickému proteinu (MBP) ve studii u 267 pacientů s RS nedosáhly primárního zobrazovacího cíle, ale v předem specifikované podskupině dosáhly signifikance v 50% redukci aktivity onemocnění na MR.

Nad rámec antivirotik a vakcín probíhá i vývoj antigen-specifické imunoterapie na

bázi T-lymfocytů nesoucích chimérický autoantigenní receptor, jehož extracelulární část tvoří příslušný autoantigen (CAAR-T). Na rozdíl od běžné anti-CD19 terapie by tak nebyly odstraněny všechny B-buňky, ale pouze specifické autoreaktivní klonny.

Literatura

1. Yednock T, Cannon C, Fritz L et al. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against $\alpha 4 \beta 1$ integrin. Nature 1992; 356: 63–66. doi: 10.1038/356063a0.
2. Miller DH, Khan OA, Sheremata WA et al. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. N Engl J Med 2003; 348(1): 15–23. doi: 10.1056/NEJMoa020696. PMID: 12510038.
3. Ajami B, Samusik N, Wieghofer P et al. Single-cell mass cytometry reveals distinct populations of brain myeloid cells in mouse neuroinflammation and neurodegeneration models. Nat Neurosci 2018; 21(4): 541–551. doi: 10.1038/s41593-018-0100-x.
4. Bjornevik K, Cortese M, Healy BC et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. Science 2022; 375(6578): 296–301. doi: 10.1126/science.abj8222.
5. Lanz TV, Brewer RC, Ho PP et al. Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM. Nature 2022; 603: 321–327. doi: 10.1038/s41586-022-04432-7.
6. Ousman SS, Tomooka BH, van Noort JM et al. Protective and therapeutic role for alphaB-crystallin in autoimmune demyelination. Nature 2007; 448(7152): 474–479. doi: 10.1038/nature05935.
7. Vietzen H, Berger SM, Kühner LM et al. Ineffective control of Epstein-Barr-virus-induced autoimmunity increases the risk for multiple sclerosis. Cell 2023; 186(26): 5705–5718.e13. doi: 10.1016/j.cell.2023.11.015.
8. Moreira A, Alari-Pahissa E, Munteis E et al. Adaptive features of natural killer cells in multiple sclerosis. Front Immunol 2019; 10: 2403. doi: 10.3389/fimmu.2019.02403.
9. Sattarnezhad N, Kockum I, Thomas OG et al. Antibody reactivity against EBNA1 and GlialCAM differentiates multiple sclerosis patients from healthy controls. Proc Natl Acad Sci USA 2025; 122(11): e2424986122. doi: 10.1073/pnas.2424986122.
10. Orr N, Steinman L. Epstein-Barr virus and the immune microenvironment in multiple sclerosis: Insights from high-dimensional brain tissue imaging. Proc Natl Acad Sci USA 2025; 122(11): e2425670122. doi: 10.1073/pnas.2425670122.
11. Steinman L, Zamvil SS. Discoveries beyond molecular mimicry describe how EBV drives multiple sclerosis. Cell 2026; 189(2): 345–347. doi: 10.1016/j.cell.2025.12.047.

Jan Kulhavý
redakce kongresového zpravodajství
Care Comm s.r.o.

Po odborné stránce schválila:
prof. MUDr. Dana Horáková, Ph.D.
Neurologická klinika a Centrum klinických
neurově
1. LF UK a VFN Praha