

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra sociální a klinické farmacie

PRECIZACE PREDIKCE LÉČEBNÉ ODPOVĚDI
PROTINÁDOROVÉ IMUNOTERAPIE

PRECISATION PREDICTION OF THERAPEUTIC
RESPONSE TO CANCER IMMUNOTHERAPY

Rigorózní práce

Vedoucí katedry: doc. PharmDr. Josef Malý, Ph.D.

Konzultant rigorózní práce: doc. PharmDr. Josef Malý, Ph.D.

Hradec Králové 2021

Mgr. Jana Novotná

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala MUDr. Janu Špačkovi, Ph.D., za odborné vedení této práce, za ochotu, konzultace a cenné rady. Spolu s ním také panu prof. MUDr. Luboši Petruželkovi, CSc., za možnost účastnit se tohoto inovativního výzkumu, jehož cílem je najít ještě lepší cesty pro léčbu onkologicky nemocných pacientů. Děkuji nejenom Onkologické klinice 1. lékařské fakulty, Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze za tuto iniciativu, ale také jejímu Ústavu patologie v čele s prof. MUDr. Pavlem Dundrem, Ph.D., který ochotně provedl odborné laboratorní posouzení zkoumaných vzorků, bez čehož by se tento projekt nemohl uskutečnit.

Dále děkuji také doc. PharmDr. Josefu Malému, Ph.D., za záštitu ze strany Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy, za věcné vedení, ochotu, pomoc a rady při tvorbě této práce.

V neposlední řadě bych zde také ráda vyjádřila poděkování své rodině a blízkým za podporu během tohoto rigorózního řízení.

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové

Dne.....

Podpis.....

Obsah

Seznam zkratk	4
Abstrakt	5
Abstract	6
1 Úvod a cíl práce	7
2 Teoretická část	7
2.1 Obecná protinádorová imunoterapie	7
2.1.1 Protinádorová imunita	8
2.1.2 Imunoterapie v léčbě nádorových onemocnění	12
2.2 Prediktory účinnosti protinádorové imunoterapie	15
2.2.1 Ligand a receptor programované buněčné smrti 1	16
2.2.2 Mutační nálož a mikrosatelitová instabilita	17
2.2.3 Tumor infiltrující lymfocyty	19
2.2.4 Mikrobiom	20
2.3 Hodnocení léčebné odpovědi protinádorové terapie	22
2.3.1 RECIST kritéria	22
2.3.2 Immune RECIST kritéria	23
2.3.3 Pseudoprogrese	24
2.3.4 Hyperprogrese	26
2.4 Bezpečnostní profil protinádorové imunoterapie	29
3 Praktická část	34
3.1 Metodika	34
3.2 Výsledky	36
3.2.1 Soubor pacientů	36
3.2.2 Analýza nádorové genetické informace	42
3.2.2.1 Biologické markery	42
3.2.2.2 Vyhodnocení vzájemných korelací	44
3.3 Diskuze	51
4 Závěr	59
5 Použitá literatura	61
6 Seznam obrázků	68

Seznam zkratk

APC	Antigen prezentující buňky
CTLA-4	Cytotoxický T lymfocytární antigen 4
ČR	Česká republika
DC	Dendritické buňky
EGFR	Receptor epidermálního růstového faktoru
IL	Interleukin
irAE	Imunitně podmíněné nežádoucí účinky
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex
MSI	Mikrosatelitová instabilita
NGS	Sekvenování nové generace
PD-L1	Ligand programované buněčné smrti 1
PD-1	Receptor programované buněčné smrti 1
TCR	T buněčný receptor
TILs	Tumor infiltrující lymfocyty
TMB	Mutační nálož

Abstrakt

Precizace predikce léčebné odpovědi protinádorové imunoterapie

Autor: Mgr. Jana Novotná

Konzultant rigorózní práce: doc. PharmDr. Josef Malý, Ph.D.

Katedra sociální a klinické farmacie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

Úvod a cíl: Protinádorová imunoterapie se v průběhu několika posledních let stala důležitou součástí léčby onkologicky nemocných pacientů.

Cílem této práce bylo zhodnotit klinické parametry léčených pacientů a nalézt biologické markery, které by mohly mít prediktivní význam pro účinnost nebo naopak neúčinnost při léčbě pembrolizumabem nebo nivolumabem.

Metodika: Výzkum byl založen na analýze dat pacientů léčených nivolumabem nebo pembrolizumabem v letech 2015–2020 na Onkologické klinice Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Pacienti byli rozděleni dle předem stanovených kritérií na respondéry a non-respondéry na základě jejich léčebné odpovědi. Posléze se zmapovaly jejich klinické parametry, včetně nežádoucích účinků na léčbu. U pacientů, jenž měli dostatek detekovatelného vzorku tkáně, byla provedena analýza prostřednictvím panelového sekvenování. Tímto byly získány nádorové genetické informace na úrovni DNA i RNA. Poté se hledala vzájemná korelace mezi nalezenými patogeními i jinými genomovými variantami a léčebnou odpovědí. Data byla popsána deskriptivní statistikou.

Výsledky: Z celkového počtu 70 pacientů tvořili většinu (60 %) muži, nejmladšímu pacientovi bylo 42 let a nejstaršímu 86 let. Nejčastější profil pacienta byl muž ve věkovém rozmezí 70–79 let s diagnózou nemalobuněčného karcinomu plic. Vedle léčeného onkologického onemocnění trpělo 74 % pacientů ještě dalšími dvěmi či více diagnózami, nejčastěji (51 %) arteriální hypertenzí. U 14 % pacientů se projevily imunitně podmíněné nežádoucí účinky v souvislosti s léčbou imunoterapií. 44 % pacientů odpovídalo definici respondéra. Detekovatelný vzorek pro panelové sekvenování mělo 17 % pacientů. Více patogenních variant bylo nalezeno u respondérů, každý měl minimálně 2 a medián činil 4. U non-respondérů byl tento medián 2,5. Bylo nalezeno 13 variant, které se objevovaly pouze u non-respondérů, konkrétně se jednalo o varianty těchto genů: APC, ARID2, BRAF, CDH2, CDK12, DPYD, ERBB4, H3F3A, KEAP1, KRAS, MTOR, NTRK3, PMS2. Výlučně u respondérů byly nalezeny 4 varianty, konkrétně genů GRM3, GHF, MLL2 a NOTCH2.

Závěr: Klinické parametry pacientů neukázaly výrazné abnormality a u obou skupin bylo nalezeno několik potenciálně prediktivních markerů pro léčbu checkpoint inhibitory, avšak pro ověření statistické významnosti je zapotřebí širšího výzkumu s větším množstvím pacientů.

Abstract

Precision prediction of therapeutic response to cancer immunotherapy

Author: Mgr. Jana Novotná

Consultant: doc. PharmDr. Josef Malý, Ph.D.

Department of Social and Clinical Pharmacy

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University

Introduction and aims: Over the last few years, anticancer immunotherapy has increasingly become an important agent in treatment of oncologic patients.

The aim of this thesis was to assess the clinical parameters and to find any biological markers that would predict efficacy of pembrolizumab and nivolumab.

Methods: The research was based on retrospective data analysis of patients treated with pembrolizumab or nivolumab during 2015–2020 at Oncology Clinic of General University Hospital in Prague. The patients were divided into responder or non-responder groups based on their treatment response. Subsequently the analysis of clinical parameters, adverse events, panel gene sequencing of tumor DNA and RNA was performed. Finally, the obtained data were tested to find any correlations between biological markers and the treatment outcomes by the descriptive statistic method.

Results: The data of 70 patients (60 % men, between 42–86 years old) were analysed. The most frequent patient profile was man in age 70–79 years with non-small cell lung cancer diagnosis. In parallel to oncologic conditions, the patients were suffering from two and more diseases (74 %) of which arterial hypertension was the most frequent (51 %). Immune-related adverse events were found in 14 % of patients. The analysis identified 44 % of patients as checkpoint therapy responders. Valid gene panel sequencing was performed in 17 % of the cases. The responders exhibited more pathogen variants of genes (minimum 2, median 4) than non-responders (median 2.5). Variants of these genes (total 13) were found exclusively in non-responders: APC, ARID2, BRAF, CDH2, CDK12, DPYD, ERBB4, H3F3A, KEAP1, KRAS, MTOR, NTRK3, PMS2. For responders, the exclusive 4 variants of mutations were found in genes GRM3, GHF, MLL2 and NOTCH2.

Conclusion: The clinical parameters of the patients did not show significant abnormalities and several potentially predictive variants for treatment with checkpoint inhibitors were found in both groups. Furthermore, larger groups of patients should be assessed to confirm the results on basis of statistical significance.

1 Úvod a cíl práce

Imunoterapie se stala během několika posledních let důležitou součástí onkologické léčby v mnoha diagnózách. Svým odlišným mechanismem účinku však vyžaduje specifický přístup ve vyhodnocování léčebné odpovědi, ve zvládnutí nežádoucích účinků a je také nutná znalost ne zcela běžných jevů jako jsou hyperprogrese či pseudoprogrese. Jakkoliv je objev imunoterapie velkým milníkem pro léčbu nádorových onemocnění, klinické studie neukazují, že by měla být plošně nasazována každému pacientovi s takovouto diagnózou. Naopak se ukazuje jako velmi zásadní umět identifikovat správného pacienta a nasadit mu ve správný čas správnou léčbu. Některé markery predikující účinnost již byly popsány a na základě dat z klinických studií je jejich přítomnost mnohdy také podmínkou pro indikaci dané léčby. Predikce efektivity či toxicity léčby imunoterapií však zatím není zcela popsána, poznána a pochopena. Další bádání tímto směrem je proto velmi žádoucí.

Cílem této práce bylo zhodnotit klinické parametry léčených pacientů a nalézt biologické markery, které by mohly mít prediktivní význam pro účinnost nebo naopak neúčinnost při léčbě pembrolizumabem nebo nivolumabem.

2 Teoretická část

2.1 Obecná protinádorová imunoterapie

Nádorová onemocnění jsou v současné době jednou z nejčastějších příčin morbidity a mortality jak u dospělých, tak dětí v České republice (ČR) i celosvětově. Přestože v ČR výskyt těchto zhoubných onemocnění dlouhodobě v celkových číslech obecně roste, lze pozorovat rozdílné trendy u konkrétních diagnóz. Stagující či klesající incidence je pozorována například u kolorektálního karcinomu či nádorů plic u mužů, naopak se zvyšuje výskyt zhoubných novotvarů prsu u žen nebo karcinomů kůže bez ohledu na pohlaví. Jelikož je věk významným rizikovým faktorem vzniku zhoubného bujení, jedním z důvodů zvyšující se incidence může být stárnutí populace, stejně tak však má vliv na tento trend, vedle

životního stylu a prostředí, také zlepšující se diagnostika spolu se screeningovými programy. Ačkoliv jsou stále nádorová onemocnění druhou nejčastější příčinou úmrtí v ČR, od roku 2003 je zaznamenáván stále výraznější pokles mortality, a to u obou pohlaví. [1,2]

Existuje několik možností přístupů k léčbě nádorových onemocnění, z nichž farmakoterapie se řadí k těm vývojově mladším a většinu v této kategorii tvoří léčiva s cytostatickým či cytotoxickým účinkem. Mechanismem účinku těchto léčiv je nespecifická inhibice proliferace rychle se dělících buněk, což však přináší také nežádoucí efekt v podobě toxického účinku na zdravé buňky lidského organismu. V případě hormonálně dependentních nádorů lze zvolit léčbu založenou na hormonální terapii, která mívá obvykle toxicitu nižší. Za posledních dvacet let se také dostala do popředí spousta léčebných modalit cílících na konkrétní mechanismy spojené s nádorovou aktivitou, které však pro svou vysokou specifikaci mají mnohdy omezené možnosti využití. Oproti tomu další léčebná možnost protinádorová imunoterapie se jeví jako potenciálně účinná u značně širšího množství nádorových subtypů. [3-6]

Pozitivní role imunitních procesů v navození dlouhodobé léčebné odpovědi proti zhoubnému bujení byla známá již v 90. letech minulého století a nádorová imunoterapie rovněž není zcela novým pojmem. Avšak až v těchto letech zažívá svůj opravdový rozkvět, jelikož přibližně od roku 2010 se tato léčebná modalita, díky výzkumu molekulárních interakcí mezi nádorovými a imunitními buňkami, začala stávat uznávanou možností systémové léčby a v současnosti má své pevné místo v komplexní onkologické péči. [4,7]

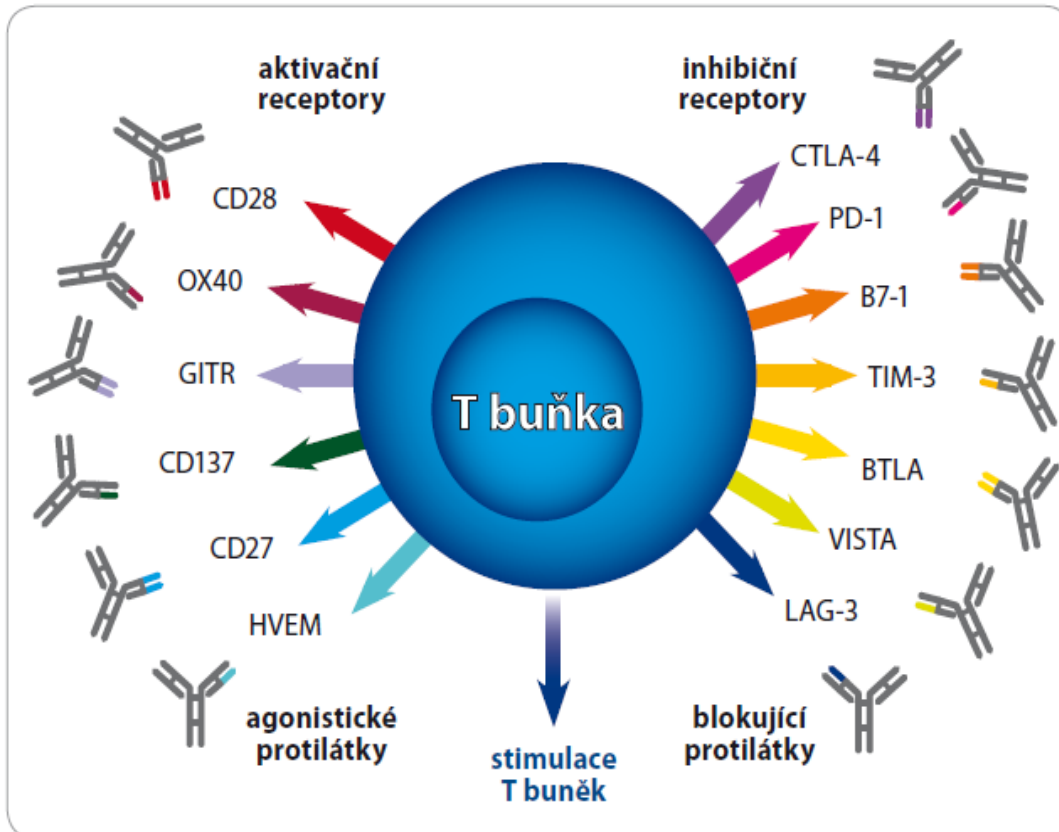
2.1.1 Protinádorová imunita

Získávání nejnovějších poznatků o molekulární nádorové biologii ukazuje, že složky imunitního systému vrozené i získané imunity dokáží neoplastické buňky nejen rozeznat, ale také je eliminovat mnohdy ještě před projevem prvních klinických příznaků onemocnění. Detekování nádorových buněk jako pro organismus cizí

buňky je stěžejní pro aktivaci imunitního systému. Děje se tak prostřednictvím nádorově specifických antigenů, které bývají exprimované na povrchu nádorové buňky. [4,8-10]

„Cancer immuno-editing“ je hypotéza popisující editaci nádoru imunitním systémem, někdy bývá nazývána také jako teorie tří „E“ (elimination, equilibrium, escape). Jak již z názvu vyplývá, imunitní reakce vůči nádoru se dělí do třech kroků, přičemž první z nich je eliminace, kdy jsou všechny premaligní i maligní buňky imunitním systémem ihned po rozpoznání zničeny. Druhá a zároveň nejdelší fáze, která může trvat i desítky let, je rovnováha neboli equilibrium. V tomto období dochází prakticky neustále k interakcím mezi transformovanými buňkami a složkami imunitního systému, které nádorovou populaci rozpozná a posléze likviduje. Nádorové buňky jsou velmi heterogenní, v průběhu času mutují a vznikají nové fenotypy, které mají za úkol imunitnímu systému uniknout. Do tohoto kroku však zpravidla ještě napadenému organismu nezpůsobují problémy, ty mohou nastat v poslední fázi zvané únik (escape). Zde již zpravidla dochází k agresivnímu růstu i tvorbě metastáz. [1,11,12]

Eliminace nádorových buněk prostřednictvím buněčné imunity je založena zejména na aktivitě CD8+ cytotoxických T lymfocytů, které se mohou nacházet ve stromatu nádorové masy u různých typů nádorů. Tento fyziologický proces nastává při současném fungování všech (ko)stimulačních a inhibičních signálů, které zajišťují adekvátní odpověď na zmutované buňky či infekci za současného udržení rovnováhy a zamezení vzniku autoimunitních reakcí. Vzájemné působení inhibičních i aktivačních molekul znázorňuje Obr. 1. Stěžejní molekulou pro základní stimulační signál je T buněčný receptor (TCR) nacházející se na povrchu T lymfocytů. Tento receptor umí rozeznávat antigenní peptidy prezentované hlavním histokompatibilním komplexem (MHC). Ten se dělí na dva základní typy. A to MHC třídy I nacházející se na povrchu veškerých jaderných buněk a MHC třídy II, který se vyskytuje pouze na povrchu antigen- prezentujících buněk (APC), a těmi jsou například dendritické buňky (DC). Umějí vyhledat,

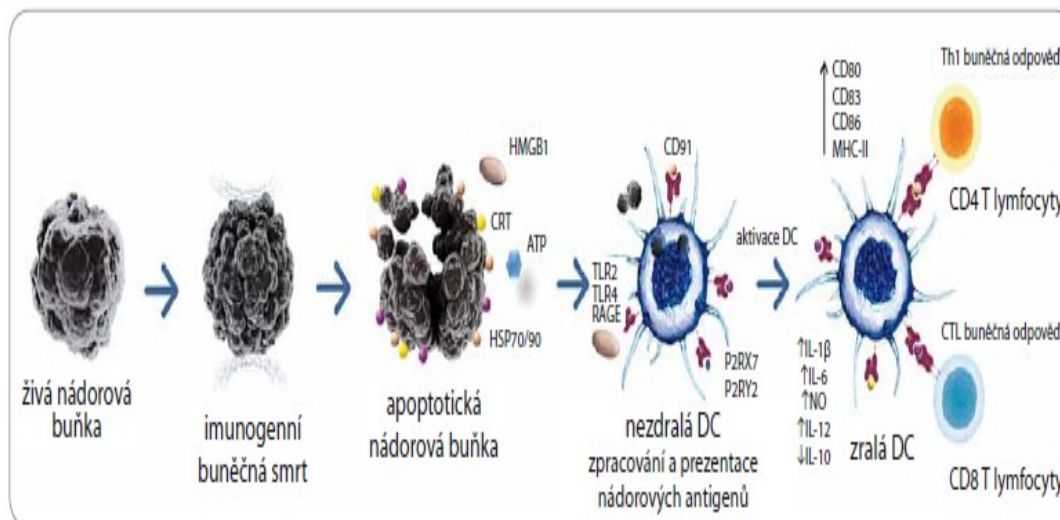


Obr. 1 Inhibice a aktivace T buněk, převzato z [8]

fagocytovat, zpracovat a na svém povrchu prostřednictvím MHC vystavit fragmenty různých antigenů, včetně těch uvolňovaných nádorovými buňkami, jak je graficky znázorněno na Obr. 2. V lymfatické uzlině následně dochází k zásadní vazbě MHC a TCR, která může vést k aktivaci T lymfocytu a jeho příslušné imunitní odpovědi proti danému prezentovanému antigenu. Aby tato reakce proběhla, musí dojít ještě k několika podpurným ko-stimulačním signálům, jako je například interakce mezi molekulami CD28 a CD80 (neboli B7.1). Na druhou stranu však existují také vazby, jenž působí naopak inhibičně a zabraňují další aktivaci T lymfocytů. Tímto způsobem organismus brání sám sebe před nekonečnou imunitní reakcí, která by mohla mít za důsledek autoimunitní onemocnění. [1,9,13-16]

Nedílnou složkou protinádorové imunity jsou také B lymfocyty, jejichž hlavním úkolem je produkce protilátek neboli imunoglobulinů a paměťových buněk. Po navázání antigenů na receptory B lymfocytů a za současného působení

pomocných molekul, jako jsou například cytokiny nebo interferon gama, dochází k množení a diferenciaci B lymfocytů na paměťové nebo plazmatické buňky. První zmiňované zůstávají po zbytek života v organismu a jsou součástí imunologické paměti, jelikož zprostředkovávají urychlenou sekundární imunitní odpověď po opětovném setkání s daným antigenem. [17,18]



Obr. 2 Protinádorová imunitní odpověď, převzato z [14]

Ve specifické protinádorové imunitní odpovědi mají své odmyslitelné místo nejenom T a B lymfocyty, ale podstatnou roli hrají také NK buňky, které rovněž nesou receptor pro MHC. Díky němu rozpoznávají a likvidují buňky s abnormálně nízkou expresí tohoto glykoproteinu, čímž mohou ničit vícero typů nádorových buněk, pro které je tento nízký výskyt MHC typický. Všechny tyto tři aktivované složky imunitního systému migrují z lymfatické uzliny krevním řečištěm do nádorové periferie a dál do samotného mikroprostředí nádoru, kde spolu s dalšími působky vykonávají cytotoxickou aktivitu. [1,14,19]

Nádorové buňky však umějí využívat různé mechanismy, které výrazně regulují imunitní odpověď. Často se jedná o inhibiční reakce, které jsou pro organismus fyziologické, slouží k udržování homeostázy a zastavení imunitní reakce v době, kdy již nadále není potřeba. V nádorovém mikroprostředí často dochází k akumulaci regulačních T lymfocytů, které mají právě inhibiční funkci. Tu vykonávají prostřednictvím exprese různých molekul, jako jsou například cytotoxický T lymfocytární antigen 4 (CTLA-4) a ligand programované buněčné

smrti 1 (PD-L1), které jsou také nazývány „checkpoint inhibitory“ a blokují či znemožňují imunitní reakce. Z tohoto důvodu jsou vyvíjeny specifické monoklonální protilátky, které inhibiční působení odblokují a imunitní buňky mohou opět cytotoxicky působit. Tento mechanismus spadá pod protinádorovou imunoterapii. [7,20,21]

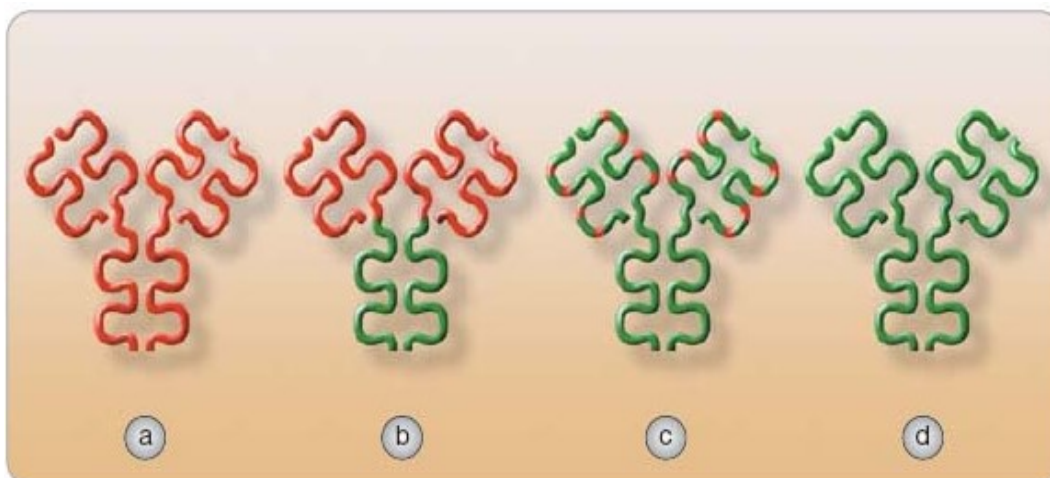
2.1.2 Imunoterapie v léčbě nádorových onemocnění

V dnešní době již existuje hned několik možností, jak v boji s nádorovými onemocněními využít imunoterapii. Její použití lze primárně rozdělit na antigenně nespecifické a specifické mechanismy. Základním mechanismem nespecifické podpory je stimulace fyziologických funkcí imunitního systému, jako je například aplikace cytokinů, či různých imunostimulačních látek nebo podpora vyvolání zánětlivé reakce pomocí BCG vakcíny. Mnohá úskalí při použití těchto léčebných postupů, jako je například riziko podpory růstu nádorů prostřednictvím navození utlumení imunity, jsou důvodem pro jejich limitované využití v praxi. [7,22,23]

Nejrozšířenější oblastí antigenně specifické imuterapie jsou monoklonální protilátky. Jejich historie sahá do minulého století, kdy byly monoklonální protilátky klonu B lymfocytů poprvé připraveny standardizovaným postupem v roce 1975 Césarem Milsteinem a Georgem J. Köhlerem. V této době byl důležitý objev poměrně přehlížen, avšak postupem času na něj bylo opět upozorněno a v roce 1984 za něj, společně s Nielsenem K. Jernem, získali Nobelovu cenu za lékařství. [22,24,25]

K získání monoklonální protilátky je zapotřebí nejprve izolovat buňky produkující specifickou protilátku a to nejčastěji ze sleziny nebo lymfatických uzlin zvířete, jenž bylo předem imunizováno příslušným antigenem. Následně jsou tyto buňky immortalizovány, aby vznikl hybridom, jenž má kromě schopnosti produkovat protilátky také vlastnost nekonečného dělení. Pro získání výhodnějších parametrů se postupně začaly prostřednictvím genetického inženýrství protilátky upravovat tak, aby byly tzv. rekombinantní, což zajišťuje jejich vyšší afinitu, specifitu, počet

vazebných míst a je zde také možnost jejich dalších modifikací. Nejčastěji jsou v dnešní době využívány protilátky produkované ovárii křeččíka čínského. Avšak tyto zvířecí látky jsou přirozeně vnímány lidským organismem jako cizorodé a spouští proti nim imunitní reakce vedoucí k zánětlivým procesům i dalším nežádoucím reakcím. Z tohoto důvodu jsou protilátky humanizovány procesem, během něhož je část nevázejícího antigen (tzv. Fc-fragment) nahrazena frakcí lidského imunoglobulinu. A právě tyto specifické rekombinantní humanizované monoklonální protilátky jsou využívány v terapii nádorových onemocnění, stejně tak jako protilátky humánní neboli plně lidské. Pro rychlé rozpoznání typu protilátky se ustanovilo jejich názvosloví, respektive koncovky v jejich názvu. Protilátky humanizované končí na -zumab a ty humánní na -mumab. Vizualizace všech jednotlivých typů protilátek je znázorněna na Obr. 3. [26-29]



Obr. 3 Typy monoklonálních protilátek užívaných v terapii: myší (a), chimérická (b), humanizovaná (c), lidská (d), převzato z [26]

Kontrolní body imunitní reakce

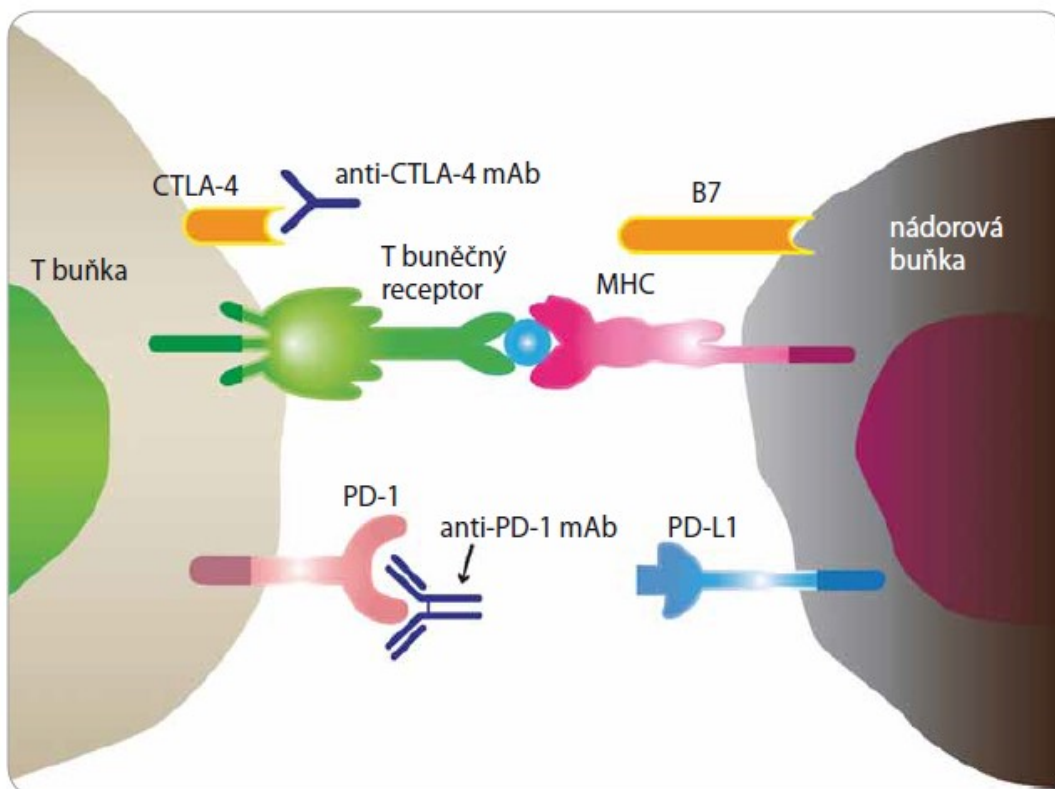
Nadále pokračující výzkum biologie nádorů a jejich biomarkerů umožňuje stále přesnější zacílení léčby. Jednou z nejvíce dynamicky se rozvíjejících oblastí jsou tzv. checkpoints neboli kontrolní body imunitní reakce, jejichž hlavními aktéry jsou působky, které svým navázáním inhibují imunitní systém a zvýšená akumulace může vést až k jeho „vypnutí“. Právě na tyto molekuly či vazebná místa cílí specificky vyvinuté monoklonální protilátky s imunomodulačním efektem, pomocí něhož danou dráhu zablokují a tím navracejí funkci imunitního systému. Terapie

pomocí checkpoint inhibitorů tedy komplexně ovlivňuje interakce nádorových a imunitních molekul, čímž radikálně mění prognózu některých typů nádorových onemocnění a u mnohých z nich jsou již také pevnou součástí doporučených postupů. [7,14,30,31]

CTLA-4 je receptor nacházející se na plazmatické membráně aktivních T lymfocytů a vázající se na ligandy molekul typu B7, konkrétně CD80 a CD86, jež jsou exprimovány na povrchu APC. Pro (de)aktivaci imunitní reakce je zásadní, na který receptor se ligandy CD80 a CD86 naváží. Zatímco vazba s CD28 je aktivační, vazba na CTLA-4 je inhibiční. Tyto dva receptory jsou si homologní antagonisté, avšak vyšší afinitu k ligandům má CTLA-4 a svou vazbou brání interakci s CD28. Dochází k negativní regulaci imunitní odpovědi, což je žádoucí v případě, kdy se organismus již vypořádá s cizorodým patogenem, avšak kontraproduktivní při boji s přetrvávajícím nádorovým onemocněním. Zde léčba naopak vyžaduje pokračující imunitní reakci, a proto byly vyvinuty protilátky specificky zaměřené proti CTLA-4, které se na tento receptor naváží, a tím jej zablokují. V důsledku toho zůstávají ligandy CD80 a CD86 volné pro CD28, jejichž vazba působí jako ko-stimulační signál pro aktivitu T lymfocytů. První a v ČR stále jedinou registrovanou molekulou tohoto typu je ipilimumab a to v indikaci pokročilého renálního karcinomu a pokročilého melanomu. [12,14,32,33]

Receptor programované buněčné smrti 1 (PD-1) a jeho ligand programované buněčné smrti 1 (PD-L1) jsou další efektivní cíl pro monoklonální protilátky. Ty způsobují blokaci inhibiční dráhy PD-1/PD-1, kde PD-1 je receptor, nacházející se zejména na povrchu aktivovaných T i B lymfocytů. PD-L1 je ligand, který se na tento receptor váže a dochází k inhibici buněk. Fyziologicky se ligand nachází na imunitních buňkách, avšak dokáže jej exprimovat také některé nádorové buňky a tím zablokovat protinádorovou imunitní odpověď. Exprese těchto molekul je v čase i místě dynamická. Pro přirozený imunitní proces platí, že jejich množství se zvyšuje s pozdějšími fázemi imunitní reakce tak, aby nakonec byla tato reakce zastavena, byla zachována homeostáza a nedocházelo k autoimunitním

poškozením, podobně jako u CTLA-4. Ve zvýšené míře umějí exprimovat PD-L1 například nádorové buňky melanomu, uroteliálního karcinomu, nemalobuněčného karcinomu plic, karcinomu ledvin, prsu, ovarií, děložního čípku, slinivky či žaludku. V protinádorovém boji je však tato exprese nežádoucí. Inhibovat tuto signální dráhu je možné jak prostřednictvím protilátek proti receptoru PD-1, tak proti jeho ligandu PD-L1. V ČR jsou na různé typy nádorových onemocnění registrovány dvě PD-1 protilátky a to nivolumab a pembrolizumab a tři PD-L1 protilátky, kterými jsou atezolizumab, durvalumab a avelumab. Jak je naznačeno na Obr. 4, navázáním těchto protilátek dochází k porušení vazby PD-1/PD-L1, T lymfocyty zůstávají aktivované a tím je zachována přirozená protinádorová imunitní odpověď. [14,33-35]



Obr. 4 Kontrolní body imunitní reakce CTLA-4 a PD-(L)1, převzato z [14]
Vysvětlivka: mAb – monoklonální protilátka

2.2 Prediktory účinnosti protinádorové imunoterapie

Protinádorová imunoterapie se stává součástí komplexní léčby ve stále více diagnózách, a přestože o této léčebné modalitě víme již mnoho, zůstávají zde i oblasti vyžadující další klinický výzkum. Ne zcela zodpovězené jsou otázky

na vhodné načasování, kombinační léčbu a zejména identifikaci správného pacienta nejvíce profitujícího z léčby imunoterapií. Vědecké bádání se proto hojně zaměřuje na hledání prediktivních biomarkerů, které by mohly pomoci personalizaci léčebných postupů pro konkrétního pacienta s konkrétním subtypem nádoru a tím mimo jiné pomoci precizovat predikci efektivity léčebné odpovědi. V současné době se výzkum výrazně posunul u některých konkrétních nádorových biomarkerů, ale stále více rezonuje také téma vlivu lidského mikrobiomu. [7,36,37]

2.2.1 Ligand a receptor programované buněčné smrti 1

PD-1 je transmembránový glykoproteinový receptor skládající se z 288 aminokyselinových zbytků a řadí se do rodiny proteinů CD28/B7, s jejichž ostatními členy vykazuje homologii 21–22 %. PD-1 exprimuje především na povrchu aktivovaných T i B lymfocytů, NK buňkách, tumor infiltrujících buňkách a DC. Naopak na neaktivovaných imunitních buňkách je exprese nízká, avšak po jejich aktivaci se výskyt rapidně zvyšuje a to již během několika málo hodin. Stimulace může být také vyvolána působením cytokinů zvané interleukiny (IL), konkrétně IL-2, IL-7, IL-15 a IL-21 nebo také zvýšenou aktivitou dráhy PI3K/AKT. Pro receptor PD-1 mají specifickou afinitu ligandy PD-L1 (neboli B7-H1 či CD274) a PD-L2 (neboli B7-DC či CD273). [34,36,38]

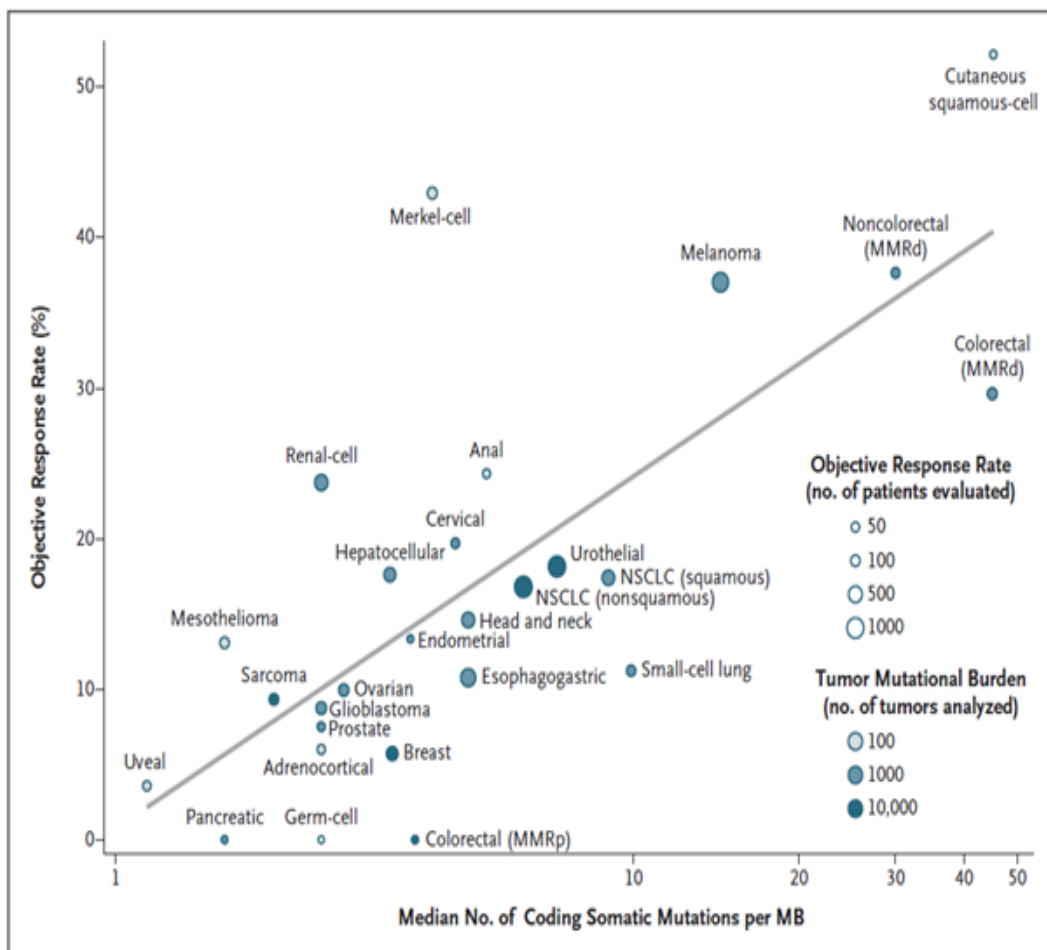
PD-L1/2 jsou transmembránové glykoproteiny patřící do imunoglobulinové rodiny B7. Oba dva ligandy mají inhibiční efekt, avšak místo jejich exprese se poměrně zásadně liší, jelikož zřejmě plní jinou funkci v imunitní odpovědi organismu. Zatímco PD-L2 exprimuje převážně na APC, jako jsou DC či makrofágy, PD-L1 se nachází na povrchu nejen těchto imunitních buněk, ale také na T a B lymfocytech a zejména také na buňkách nádorových. Ty díky tomu umějí tlumit imunitní reakci, jelikož vazbou PD-L1 na PD-1 dochází ke kaskádovitému ovlivnění hned několika chemických a signálních procesů, které mají za následek zástavu buněčného cyklu, změny metabolismu až apoptózu T lymfocytů. Vyšší exprese PD-L1 nepříznivě ovlivňuje prognózu a tento typ nádorů obvykle vykazuje také větší agresivitu.

Mapování inhibiční dráhy PD-1/PD-L1 zažilo v poledních letech svůj obrovský boom a postupně se zacílení na její blokaci testovalo na stále více diagnózách, od prvních indikací jako je maligní melanom či karcinom ledviny, přes nemalobuněčný karcinom plic či urotelialní karcinom až po triple negativní karcinom prsu, u čehož však klinické studie nekončí a posunují se k diagnózám dalším. [34,35,39]

2.2.2 Mutační nálož a mikrosatelitová instabilita

Mutační nálož (TMB) rozumíme počet somatických protein měnících mutací v nádorovém genomu na 1 milion bází DNA, jednodušeji jako množství neoantigenů na povrchu nádorové buňky. Výpočet se provádí pomocí různých typů genomového sekvenování. Aktuálně je jednou z nepoužívanějších metod cílené sekvenování na tzv. sekvenačních panelech, jež jsou dopředu definovány a mohou obsahovat desítky i stovky genů či genomových oblastí. Jelikož tato metoda cílí na konkrétní geny, umožňuje jejich důsledné mapování s vysokou mírou senzitivity. Interpretace výsledků je díky tomu snadnější s nižší mírou chybovosti. Předem daná selekce sledovaných genů může však být také nevýhodou, jelikož nedochází k zachycení jiných potenciálně významných mutací. Finanční náročnost v porovnání s ostatními metodami je spíše nižší. Těmi dalšími metodami jsou celogenomové nebo celoexomové sekvenování, které již pokrývají větší šíři mutací napříč celým genomem či z kódující oblasti genomu. S tím samozřejmě souvisí možnost detekce i zcela nových nádorových mutací, avšak také značně vysoká finanční a časová náročnost v porovnání s metodou prvně zmiňovanou. Problematickou oblastí u tohoto markeru je rozdílnost v tom, kdy mutace vzniká, zda na počátku karcinogeneze, nebo v pozdějších fázích, respektive jestli proces vede k záměně aminokyselin a posléze tedy ke vzniku neoantigenů. V posledních letech se výzkumy zaměřují na korelaci vysoké TMB s odpovědí na protinádorovou imunoterapii a v některých z nich se již u těchto pacientů ukázala vyšší míra odezvy na tuto léčbu, jak také naznačuje Obr. 5. Tento marker lze pozorovat u přibližně

5 % ze všech solidních nádorů, častěji zejména u nemalobuněčného karcinomu plic a melanomu. [36,40,41]



Obr. 5 Korelace mutační nálože a objektivní léčebné odpovědi u různých typů nádorů, převzato z [36]

Nádory s vysokou TMB obvykle disponují také tzv. mikrosatelitovou instabilitou (MSI) neboli hypermutabilními specifickými sekvencemi, které se nazývají mikrosatelity. Takto se označují krátké repetitivní genomické frekvence s přirozeně vyšším výskytem mutací, jenž jsou zapříčiněny poruchami oprav DNA po chybném párování bází. Proto vznikají mikrosatelitové frekvence zkrácené nebo naopak prodloužené. Výskyt MSI je v současnosti nejvíce popsán u kolorektálního karcinomu, ale byl již pozorován také např. u nádoru prsu či plic. Na základě rozsahu mutačních změn se dělí nádory s vysokou (MSI high), nízkou (MSI low) instabilitou nebo mikrosatelitově stabilní. Již byla vyzorována korelace mezi MSI high nádory (např. typicky nádory pravého tračníku) a přítomností silné

imunitní odpovědi, spojené s lepší prognózou, než mají ostatní typy kolorektálních karcinomů. Nejedná se však pouze o pacienty s touto diagnózou, u kterých byl při současné MSI high a léčbě protinádorovou imunoterapií pozorován významný léčebný benefit. [36,40,42]

Predikční hodnota těchto biomarkerů i jejich vzájemné korelace je stále předmětem dalších výzkumů, přičemž situace bude zřejmě znatelně rozdílná u jednotlivých diagnóz, jelikož velké diference vykazují také různé subtypy daného nádorového onemocnění. A ani pacienti s identickou histologickou diagnózou a totožnými hodnotami daných markerů, nemusí mít stejnou léčebnou odpověď na danou léčebnou modalitu. Například během klinických studií protinádorové imunoterapie u nemalobuněčného nádoru plic byla zjištěna zhruba stejná spolehlivost predikce efektivity z TMB, tak z PD-L1. Avšak během obdobných studií u stejné i jiných diagnóz se naopak tyto dva markery ukázaly jako na sobě zcela nezávislé a nekorelující. Výsledky jiné studie u totožné diagnózy ukázaly vyšší klinický benefit u pacientů s TMB high než u pacientů s expresí PD-L1. Avšak ne všichni pacienti s prokázaným TMB high na léčbu vůbec zareagovali, na druhou stranu někteří pacienti s TMB low se ukázali jako dobří respondéři na imunoterapii. Klinické výzkumy v těchto oblastech tedy stále pokračují s cílem nalézt nejlepší možnosti využití benefitu z predikce tohoto markeru. [36,40,41,43]

2.2.3 Tumor infiltruující lymfocyty

Mikroprostředí nádoru netvoří pouze nádorové buňky, ale mohou se zde vyskytovat také fibroblasty, buňky kolegenní, vaskulární, nebo do značné míry také buňky imunitního systému, převážně leukocyty. Mezi ně patří mimo jiné DC, makrofágy, neutrofily a zejména lymfocyty (NK buňky, T i B lymfocyty), které se pro tuto svou vlastnost nazývají tumor infiltruující lymfocyty (TILs). Mohou se nacházet přímo v intratumorálním mikroprostředí, na jeho okrajích či ve spádových lymfatických uzlinách a dle místa výskytu či naopak absence TILs se mohou nádory dělit na tři základní imunofenotypy. První jsou nádory se zánětlivou infiltrací (immune-inflamed), kdy se imunitní působky dostávají přímo

do mikroprostředí nádoru a tím se nacházejí v přímé blízkosti nádorových buněk. Ale zejména však cytotoxické T lymfocyty nejsou schopny na místě nádorové buňky ničit a to například z důvodu jejich inhibice prostřednictvím dráhy PD-1/PD-L1. Ze své podstaty má tedy tento fenotyp největší potenciál pro účinnost imunoterapie. Pro další imunofenotyp (immune-excluded) je typické, že tyto imunitní buňky zůstávají na periferii či ve stromatu nádoru, proto je zde léčba zaměřená na checkpoint inhibitory poměrně neúčinná. A pro poslední nádorový fenotyp je potenciál efektivity této léčebné modalitity ještě nižší, jelikož je téměř či zcela bez zánětlivé infiltrace ať už v nádorovém mikroprostředí či na jeho periferii. Potenciál predikce tohoto biomarkeru je ale limitován heterogenitou nádorového infiltrátu, kde se mohou nacházet jak látky podporující, tak inhibující nádorový růst, a nabízí se hlubší rozlišování jednotlivých buněk, než je doposud běžné. Avšak například diferenciaci různých typů lymfocytů nemusí být vždy snadná či jednotná a to jak u různých nádorových onemocnění, tak dokonce u jejich subtypů. Výsledky klinických studií zaměřující se na prediktivní význam TILs ukazují mnohdy rozporuplné výsledky, pojitkem však většinou bývá předpoklad pozitivnější prognózy u nádoru s vyšším průnikem zánětlivých buněk do jeho mikroprostředí. Konkrétně například u maligního melanomu se také v mezinárodních doporučených postupech uvádí TILs vyšetřování u bioptického vzorku jako standardní, přestože studie nehovoří jednoznačně o jeho prognostickém významu. Vědecké bádání pokračuje napříč širokou škálou diagnóz s poměrně nejednotnými výsledky a další analýzy proto jsou nevyhnutelné pro adekvátní využití potenciálu tohoto biomarkeru. [20,44,45]

2.2.4 Mikrobiom

Mikroorganismy, jako jsou bakterie, viry, kvasinky, houby či prvoci nacházející se v lidském těle se souhrnně nazývají mikrobiom. Jelikož obvykle představuje přibližně 1–3 % hmotnosti člověka a má svůj nezastupitelný vliv na fungování a zdraví organismu, můžeme si o něm v nejedné publikaci přečíst jako o dalším orgánu. Na zdravé lidské tělo, které je tvořeno zhruba 30 bilióny buněk, připadá

na 10–100 triliónů bakteriálních buněk a tvoří spolu jeden ekosystém. Bakteriální buňky jsou schopny syntetizovat či transformovat značnou část metabolitů, jako jsou hormony či vitamíny a tím samozřejmě působit na lidský organismus, jak v pozitivním, tak negativním slova smyslu. Největší část mikroorganismů, ať už fyziologicky či patologicky působících na člověka, se nachází ve střevě, kde tvoří zhruba 1–2 kg jeho hmotnosti. Skladba lidského mikrobiomu je velmi individuální a ovlivňuje vedle trávení také nervový či imunitní systém, což má za následek například právě také různou reakci imunitního systému na nádorové onemocnění. [46,47]

S příchodem protinádorové imunoterapie tato myšlenka začínala nabývat na intezitě a byla prověřována nejprve pre-klinickými studiemi na zvířatech. Výsledky některých z nich, jež prezentovala Ayelet Sivan v roce 2015, poukázaly na stimulační vliv *Bifidobacterium* na účinnost imunoterapie cílící např. na PD-L1 či CTLA-4 dráhu. Konkrétně byla u cytotoxických T lymfocytů pozorována zvýšená infiltrace tumoru a produkce interferonu gama nebo také aktivizace dendritických buněk. Další výzkum na myších zase poukázal na stimulační efekt u *B. fragilis*, jejichž antigeny se zřejmě vyznačují zkříženou reaktivitou s nádorovými neoantigeny. Pre-klinické studie ukázaly také na nižší odpověď na imunoterapii u myší, které byly předléčeny antibiotiky a jejich střevní mikrobiom byl tedy oslaben. To vše je náznakem pro korelaci mezi složením střevního mikroprostředí a stavem imunitního systému, potažmo účinností imunoterapie. Tímto by se dalo o mikrobiomu hovořit jako o jednom z dalších prediktivních biomarkerů. Hojný počet klinických studií se proto aktuálně touto otázkou zabývá. [46,48-50]

Například v roce 2018 uznávána onkoložka Laurence Zitvogel publikovala data z klinických studií s onkologickými pacienty léčených checkpoint inhibitory cílící na dráhu PD-1/PD-L1. Tato i další data shodně naznačují vliv rozdílného složení mikrobiomu na účinnost i toxicitu léčby. Obecně se ukázaly rozlišnosti ve skladbě mikroorganismů, bylo však potřeba najít klíčové určující respondéra a non-respondéra na léčbu. Za tímto účelem se ve studiích sekvenovalo DNA vzorků

stolice léčených pacientů ještě před nasazením léčby imunoterapií a vyseletovaly se výrazně zastoupené kmeny u odpovídajících i neodpovídajících jedinců. Avšak pouze některé z těchto kmenů se shodovaly napřic jednotlivými klinickými studii. Rozdíly mohou být zapříčiněny například enviromentálními nebo genetickými faktory, metodami odběru a zpracováním vzorku či následnými analýzami DNA. Tento potenciální prediktivní faktor je tedy potřeba hlouběji studovat a to včetně přesné diagnostiky působení probiotik, prebiotik či synbiotik. Ty jsou registrovány maximálně jako doplňky stravy nikoliv však jako léčivé přípravky se schválenou indikací k jakékoliv léčbě, či premedikaci u protinádorové léčby. [46,48,49]

2.3 Hodnocení léčebné odpovědi protinádorové terapie

Se zvyšujícím se počtem léčebných modalit zkoušených v klinických studiích pro onkologická onemocnění přirozeně vyvstala potřeba o sjednocení hodnocení léčebné odpovědi na tyto různé přístupy nejen ve studiích, ale také v klinické praxi. Za historického průkopníka pro toto hodnocení se považuje systém Světové zdravotnické organizace z roku 1981. Základní myšlenkou bylo stanovování velikosti nádorové masy před léčbou i během léčby a tato měření porovnat za cílem zjištění případné regrese nádoru a tím ověření efektivity dané léčby. Postupem času vznikla potřeba tento zpřístup zrevidovat a poupravit, proto byly v roce 2000 ustanovena tzv. RECIST kritéria. [51,52]

2.3.1 RECIST kritéria

Response Evaluation Criteria In Solid Tumours, zkráceně RECIST kritéria přinesla největší změnu zejména v tom, že se začala měřit pouze nejdelší strana tumorové léze nikoliv mnohačetné měření z více stran nádoru. Další zpřesnění se týkalo také měřitelnosti lézí. Mimo jiné se za neměřitelná začala považovat ložiska menší než 10 milimetrů. O devět let později, v roce 2009, byla kritéria opět revidována a vznikla verze platná dodnes označována jako RECIST 1.1. Zde bylo například definováno také posuzování lymfatických uzlin či se specifikovalo hodnocení nových lézí. V praxi se dle těchto instrukcí nejprve vyberou léze měřitelné,

z kterých se dle přesných definic vyberou ty cílové, jejichž nejdelší rozměr se změní. Těchto lézí může být maximálně pět a v jednom orgánu dvě, přičemž se vybírají ty dobře měřitelné. Ostatní se neměří ale pouze se pozoruje jejich (ne)přítomnost. Taktéž se evidují případné léze nově vzniklé. Na základě tohoto principu může různý lékař zvolit různé léze, které se budou vyhodnocovat, avšak výzkumy dokázaly v těchto případech shodné výsledky jejich vyhodnocení. Samotná metodika posuzování lézí je neměnná, rovněž jako výstupy z ní. Pokud dojde prakticky k vymizení všech cílových lézí, hovoří se o kompletní odpovědi. Dojde-li na kontrolním měření ke snížení součtu nejdelších rozměrů minimálně o 30 % ve srovnání se vstupním vyšetřením, nazývá se tento stav parciální odpovědi. Naopak, pokud dojde ke zvětšení o 20 % a více, hovoří se o progresi onemocnění. Neodpovídá-li kontrolní nález ani jedné definici, tedy není-li ani stav natolik lepší či horší, hodnotí se jako stabilizace onemocnění. [51-53]

2.3.2 Immune RECIST kritéria

Léčba imunoterapií je v mnoha ohledech specifická a vykazuje natolik rozdílné aspekty během jejího podávání, že se postupem času ukázala RECIST kritéria jako ne zcela adekvátní pro hodnocení účinnosti této léčby. Proto vznikla immune RECIST, zkráceně iRECIST kritéria, která sice z velké míry vycházejí z RECIST 1.1, avšak zohledňují také odlišnosti a nové jevy související s léčbou imunoterapií. Mezi ně můžeme řadit například přechodné zvětšení nádorové masy či pozdější nástup účinku léčebné odpovědi. Proto se dle iRECIST kritérií první zhodnocení provádí až ve 12. týdnu po zahájení léčby a pokud je v tomto čase zjištěna progrese, označuje se ještě jako nepotvrzená a léčba nemá být ihned ukončena. Je indikováno opětovné posouzení stavu za zhruba 4–8 týdnů a pokud i zde nález splňuje definici progrese, označuje se již za progresi potvrzenou. Postup při vyhodnocování celkové léčebné odpovědi je popsán na Obr. 6, kde jsou rovněž uvedeny zavedené a běžně používané zkratky. Pokud se však jedná o léčebnou odpověď vyhodnocenou dle iRECIST kritérií, užívá se v názvosloví mírná odlišnost, a to vložení písmena „i“ před danou zkratku léčebné odpovědi. Na důležitost

hodnocení unikátnosti imunoterapie ukazuje také fakt, že je stěžejní i pro zdravotní pojišťovny při stanovování podmínek úhrady dané léčby. [51,54]

Cílové léze	Necílové léze	Nové léze	Celková odpověď
CR	CR	Ne	CR
CR	Non-CR/non-PD	Ne	PR
CR	NE	Ne	PR
PR	Non-PD/ nezhodnoceny všechny	Ne	PR
SD	Non-PD/ nezhodnoceny všechny	Ne	SD
Nezhodnoceny všechny	Non-PD	Ne	NE
PD	Jakákoli	Možné	PD
Jakákoli	PD	Možné	PD
jakákoli	Jakákoli	Ano	PD

Obr. 6 Určení celkové odpovědi dle iRECIST 1.1, převzato z [51]

Vysvětlivky: CR – kompletní odpověď, PR – částečná odpověď, SD- stabilní nemoc, PD- progresse, non-CR/non-PD- ani kompletní odpověď a ani progresse, NE- nehodnotitelné

2.3.3 Pseudoprogrese

Pozitivní léčebná odpověď na imunoterapii se může projevit několika způsoby s různou rychlostí. Tumorová masa může začít mizet téměř okamžitě nebo se nejdříve stabilizovat a posléze se pomalu zmenšovat. Avšak léze se také mohou nejprve zvětšit či se dokonce objeví i nové a až poté dochází k jejich regresi, což jsou stavy, pro které se ustálil pojem pseudoprogrese. Toto přechodné zvětšení může mít několik příčin. Prvním z nich je časová prodleva, než se dostatečně vyvine imunitní reakce na léčbu a v mezičase tedy dochází ještě ke zvětšování nádorové

masy. Avšak poté složky imunitní systému překročí pomyslnou hranici a začínají nádorové buňky likvidovat, dochází ke stagnaci a poté ke zmenšování lézí. Dalším vysvětlením je také infiltrování nádorového mikroprostředí cytotoxickými buňkami, které může být spojeno s edémem a nekrózou, což zvětšuje objem masy. Tímto lze také vysvětlit případné zjištění nové léze. Kvůli těmto procesům se totiž z těch tak malých ještě nedetekovatelných staly objemnější a mohly být nově zachyceny zobrazovacími metodami. [51,55,56]

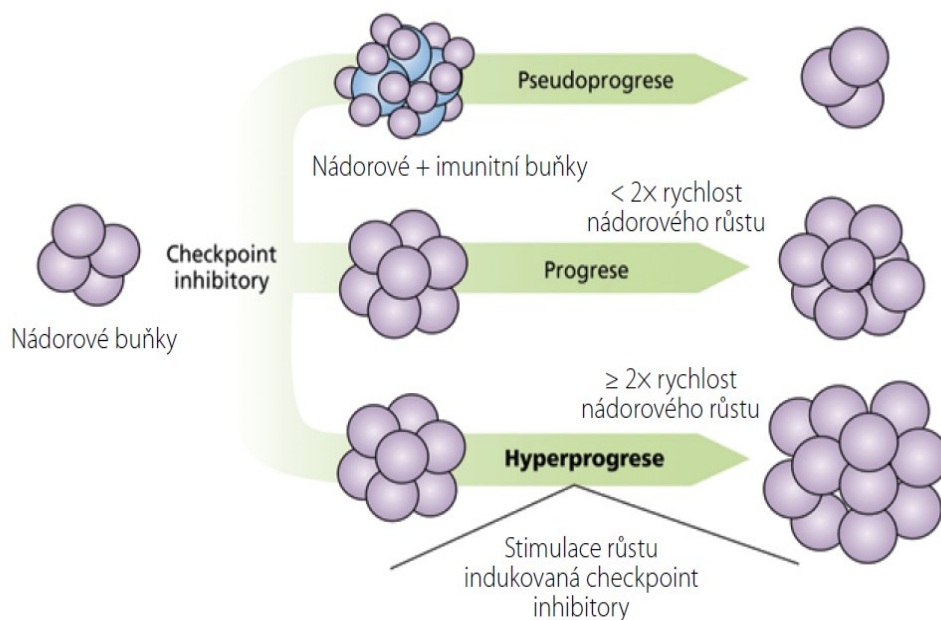
Během léčby protinádorovou imunoterapií je nesmírně důležitá znalost tohoto jevu a hodnocení léčebné odpovědi dle iRECIST kritérií. V případě neznalosti či špatného vyhodnocení by mohla být zbytečně předčasně ukončena léčebná cesta, ze které by pacient mohl výrazně profitovat. Pomocníkem při evaluaci, zda se jedná o „pravou“ či pseudo-progresi, by měl být onkologům také samotný klinický stav pacienta, na který je nutné při posuzování brát zřetel. Běžně totiž ruku v ruce s klasickou progresí zjištěnou zobrazovacími metodami jde také zhoršení klinických projevů. Těmi mohou být například zvýšená bolest, únava nebo snížení chuti k jídlu. Oproti tomu během pseudoprogrese obvykle dochází ke zlepšení těchto aspektů nemoci, pacienti popisují bolesti slabší a chuť k jídlu se jim zvyšuje. [51,55,56]

Nádorová pseudoprogrese byla poprvé popsána u mozkových metastáz během léčby temozolomidem působící na bázi alkylace DNA. Z protinádorové imunoterapie byl ipilimumab první molekulou spojovanou s tímto jevem. Jeho mechanismem účinku je anti-CTLA 4 působení. Konkrétně se jednalo o léčbu maligního melanomu, který je doposud spojen s největším výskytem pseudoprogrese a to zhruba u 10–15 % pacientů. Během dalších klinických studií se tento jev začal vyskytovat také u anti PD-(L)1 léčby. Pravděpodobnost výskytu se drží maximálně v řádech jednotek procent v závislosti na typu solidního nádoru. Výskyt byl již detekován například u nemolubuněčného karcinomu plic, hepatocelulárního karcinomu či renálního karcinomu. [51,55,56]

Pseudoprogrese není však jen výsadou farmakoterapie, objevila se také u jiných typů léčebných modalit, jako je například frakcionovaná stereotaktická radioterapie vestibulárních schwanomů či mozkových metastáz. A je velmi pravděpodobné, že nové či zpřesňující informace se budou v následujících letech ještě objevovat vlivem pokračujícího bádání v této oblasti. [51,55,56]

2.3.4 Hyperprogrese

Odpověď na léčbu imunoterapií nemusí být však vždy pozitivní nebo neutrální. Může vyvolat naopak značné zrychlení růstu a agresivitu nádoru, které jsou mnohem výraznější než přirozená progrese onemocnění při neúčinnosti nasazené léčby nebo stavu bez nasazení jakékoliv léčby. Většinou tato hranice není snadno rozpoznatelná. Ani její definice není zcela jednoznačná. Společným jádrem různých definic bývá, že se jedná o hyperprogresi, když je zvětšení nádoru více než dvojnásobné v porovnání s velikostí před léčbou, jak je uvedeno na Obr. 7. Tomuto jevu se věnovalo zatím nevelké množství klinických studií, které se však řídily definicemi navzájem rozdílnými. Také nejsou jasně konzistentní jejich výsledky v určení prediktivních faktorů pro výskyt hyperprogrese. Zřejmě také proto nepanuje mezi odborníky jasná shoda na tom, co v praxi za hyperprogresi skutečně



Obr. 7 Pseudoprogrese, Progrese, Hyperprogrese, převzato z [55]

považovat a co nikoliv. Mechanismus vzniku tohoto jevu po léčbě imunoterapií také není vědecky zcela vysvětlen, není tedy snadné předem definovat pacienta, u kterého by se tato rapidní progresse dala předpokládat. [55,56]

Za první zmiňku o hyperprogresi pozorované v klinické studii se považuje případ pacienta s nemalobuněčným plicním karcinomem zařazeného do studie s nivolumabem. V roce 2016 byly zveřejněny výsledky studie a u tohoto pacienta, který byl léčen nivolumabem v 10. linii po sedmi letech od recidivy, bylo po třech cyklech této léčby popsáno silné zhoršení nemoci. Konkrétně bylo pozorováno zvětšení velikosti primární léze, několik nových lézí na plicích, nové mozkové metastázy a také byly zhoršeny některé laboratorní výsledky. Postupně se objevovaly další obdobné případy prudkého zhoršení stavu po léčbě checkpoint inhibitory, a proto se tímto směrem začala zaobírat vědecká pozornost. Bylo provedeno několik rozborů již provedených studií. Jedna z největších retrospektivní analýz čítala 155 pacientů nasazených právě na tento typ léčby, jednalo se zejména o anti CTLA-4 a PD-(L)1 protilátky. Za hyperprogresi se považovalo selhání léčby do dvou měsíců od nasazení s růstem nádorové masy o více než 50 % a to více jak dvojnásobným tempem. Pacientů, jejichž progresse odpovídala této definici, bylo detekováno šest. Jiná studie s obdobně velkým souborem pacientů (152) s karcinomem plic definovala hyperprogresi mírně odlišně. Kromě potvrzení hyperprogrese dle RECIST kritérií, musely být zároveň splněny minimálně tři z následujících podmínek: čas od začátku léčby do jejího ukončení je menší než dva měsíce, alespoň dvě nové léze v již postižených orgánech, nové metastázy v doposud nepostižených orgánech, zvýšení součtu velikosti hlavních lézí alespoň o 50 %. Tuto definici naplnilo 39 pacientů, něco málo přes 25 %. Toto procento výskytu hyperprogrese se velmi liší v různých klinických studiích, může se jednat řádově o nízké jednotky až desítky procent. Jak se postupně přidávají další studie a dodatkové analýzy, které se tomuto fenoménu věnovaly, tím se stává více známý. Spolu s tím však také vzrůstá potřeba přesné

definice hyperprogrese a identifikace rizikových faktorů, které by mohly pomoci včas rozpoznat pacienty s tímto rizikem. [56,57]

Najít prediktivní markery je velmi žádoucí nejen pro pacienty s potenciálem velkého benefitu z léčby imunoterapií, ale také pro ty s rizikem prudkého zhoršení stavu po jejich nasazení. Pokoušelo se o to již několik vědců, avšak žádné klinické studie nedošly k jasným nebo navzájem stejným výsledkům. Doposud nebyly žádné spolehlivé markery nalezeny, avšak některé ze zkoumaných by se zřejmě daly díky získaným analýzám vyloučit. Nebyla například pozorována žádná statisticky významná korelace mezi hyperprogresí a TMB, nízkou či vysokou expresí PD-L1, počtem předchozích linií léčby či souvislost s předlечením glukokortikoidy. Žádný význam zřejmě také nemá histologie solidního nádoru, nezvyklé razantní progrese byly pozorovány u velkého množství z nich, ať už se jednalo například o plicní, ovariální, kolorektální, uroteliální karcinom či lymfom a další. Naopak jako potenciální prediktivní faktory se ukazují věk, opakované regionální ozařování nebo genomická specifika, ku příkladu aberace receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR) a amplifikace proteinu zvaného „Mouse double minute 2 homolog“ (MDM2). Stéphane Champiat publikoval v roce 2017 práci, kde uváděl vyšší výskyt hyperprogrese u pacientů starších 65 let (výskyt u 19 %) oproti těm mladším (výskyt u 5 %) a s podobnými závěry přišly také tři další nezávislé klinické studie. Vysvětlením by mohlo být odlišné chování buněk imunitního systému, konkrétně nižší exprese proteinů stimulujících T lymfocyty, nebo naopak vyšší koncentrace zánětlivých cytokinů, avšak přesný důvod není zcela znám. [57-59] Esma Saâda-Bouزيد popsal v roce 2017 klinickou studii, kde 37 % pacientů s regionální recidivou vykazovalo hyperprogresi a u pacientů bez této recidivy to bylo pouze 9 %. Výsledky také poukázaly na souvislost s předchozím ozářením, jelikož se hyperprogrese projevila u téměř všech regionálně ozářených pacientů. [60] Lékař Shumei Kato v roce 2017 publikoval studii, která pomocí genomového sekvenování zmapovala u 155 onkologických pacientů genomické markery, které by mohly mít jak pozitivní, tak negativní vliv na úspěšnost při léčbě

imunoterapií. Jako ty nepříznivě ovlivňující byly detekovány amplifikace genu z MDM2 rodiny, kde hyperprogresi vykazovalo 67 % pacientů či EGFR alterace. Pacienti s touto alterací ve výsledcích několika klinických studiích shodně vykazovali velmi nízkou léčebnou odpověď na checkpoint inhibitory, naopak často dále progredovali a mnohdy je popsáno také zvláště agresivní a rychlé zhoršení. Přímo jako hyperprogresi označuje například jedna studie stav u 50 % pacientů s EGFR alterací. Možným vysvětlením může být zvýšená exprese PD-L1 u těchto pacientů. Nicméně přesné odůvodnění vzniku rapidního zhoršování stavu pacientů s těmito mutacemi není zcela znám, stejně jako u jiných potenciálních prediktivních biomarkerů. Pro lepší porozumění tohoto jevu je proto zapotřebí dalšího vědeckého zkoumání, klinické studie zahrnující větší množství pacientů a hledání nových možných prediktivních markerů, než byly analyzovány doposud. [56,57,61]

2.4 Bezpečnostní profil protinádorové imunoterapie

Účinnost léčby checkpoint inhibitory byla prokázána v mnoha klinických studiích, kde se vedle ní pozorovala také bezpečnost podávané léčby. Na základě těchto dat je známo, nakolik se bezpečnostní profil imunoterapie liší od dosud běžně užívaných protinádorových léčiv. Objevují se nové specifické nežádoucí účinky, jež mohou mít i závažný až fatální průběh. Většinu z nich lze však předejít nebo je zvládnout jen s lehčím průběhem pomocí správného pravidelného monitoringu pacienta a při dodržování doporučených postupů. [59,62,63]

Toxicita jiných léčebných postupů využívajících se na nádorová onemocnění jako je například chemoterapie či radioterapie je výrazně odlišná než ta spojená s imunoterapií, což je důsledkem výrazně jiného mechanismu účinku těchto léčebných modalit. Proces vzniku nežádoucích účinků imunoterapie je propojen s jeho vlivem na imunitní systém, jehož fyziologické procesy k udržování homeostázy jsou tímto zasaženy. Pokud v těle dochází k tomuto narušování, mohou se rozvíjet různá autoimunitní onemocnění, a právě jim jsou mnohdy tyto specifické nežádoucí účinky podobné. Proto se nazývají imunitně podmíněné

nežádoucí účinky (irAE). A stejně tak, jako se autoimunitní nemoc může projevit v jakémkoliv orgánu, výskyt irAE má tuto širokou škálu výskytu velmi obdobnou, jelikož buňky lidského imunitního systému se nacházejí prakticky v celém těle. Během této léčby se setkáváme s projevy běžnějšími jako je například reakce spojená s infuzí, únava či pyrexie, tak i s orgánově a imunitně specifickými. Jedna z nejčastěji ovlivněných soustav je endokrinní, což se projevuje poruchami štítné žlázy, méně často narušením funkcí hypofýzy a nadledvin. Další problémy postihují systém kožní, lymfatický, nervový, plicní, či zažívací, mohou se objevit i poruchy jater, krve i srdce. S mechanismem vzniku souvisí také časová prodleva, s jakou se mohou projevit. Nežádoucí reakce jsou možné téměř okamžitě během infuze, kdy se jedná zpravidla o alergickou reakci na některou podávanou látku nebo za několik hodin, které se projevují zejména kožními změnami v místě vpichu. Další reakce se však objevují až v řádu několika týdnů, či dokonce měsíců i po ukončení podávání terapie, což u této léčby není nic neobvyklého. [59,64-67]

Přestože mají vesměs všechny dosud známé checkpoint inhibitory tyto obdobné charakteristiky, jistá variabilita zde je. Výskyt irAE se může lišit v závislosti na konkrétní léčivé látce, respektive dle mechanismu jejího účinku. Jelikož protilátky namířené proti CTLA-4 ovlivňují větší množství subtypů T lymfocytů než mířící na PD-(L)-1, je zde logický vyšší výskyt nežádoucích účinků. Z podobných úvah vychází také teorie o nižší toxicitě protilátek proti PD-L1 než proti PD-1, jelikož neovlivňuje ligand PD-L2, a tím mohou být některé fyziologické procesy uchráněny. Zcela přesně porovnat jednotlivé molekuly je velmi obtížné, jelikož nebyly součástí jedné velké klinické studie. Existují bezpečnostní data z jednotlivých studií a také několik metaanalýz z nich provedených, které mohou sloužit k nepřímému srovnání. Nejen z klinických studií ale také z klinické praxe jsou známy nejčastější nežádoucí účinky u anti CTLA-4 molekul. Jedná se zejména o projevy gastrointestinální, jako je průjem či kolitida, a kožní, nejběžněji formou vyrážky a svědění. Právě kolitida bývá během této léčby jeden z nejzávažnějších irAE. U anti-PD(L)-1 protilátek to je však pneumonitida. Více než s CTLA-4 protilátkami

se také s touto terapií pojí nežádoucí účinky endokrinní, zejména hypotyreóza, jaterní obtíže, jako je hepatitida nebo artralgie. Naopak zhruba srovnatelný výskyt je hlášen u kožních a zažívacích projevů. Již v několika indikacích se také zkoušela kombinace obou typů checkpoint inhibitorů, která ukázala vyšší výskyt nežádoucích účinků při této duální léčbě než při podávání pouze jednoho léčiva. A nezdá se, aby se od kombinování upustilo, ale je snahou najít nové cesty, jako je například jejich sekvenční podávání. [59,64-66]

Výzkumná část této práce analyzuje vzorky pacientů léčených buď pembrolizumabem, nebo nivolumabem. Klinické využití léčiv s těmito účinnými látkami strmě roste, a tím se získávají také hlubší a detailnější informace. Velká část bezpečnostního profilu je u obou léčivých látek velice podobná. Před jejich nasazením by pacient neměl být léčen kortikosteroidy nebo imunosupresivy, jelikož mají potenciál ovlivňovat farmakodynamiku těchto monoklonálních protilátek. Avšak pokud pacient již je imunoterapií léčen, mohou se naopak obě tato léčiva nasadit ke zvládnutí případných irAE. Případně lze navíc u pembrolizumabu, pokud je indikován společně s chemoterapií, preventivně podat kortikosteroidy jako antiemetikum či k prevenci dalších nežádoucích účinků chemoterapie. Metabolismus checkpoint inhibitorů probíhá katabolizací a nikoliv prostřednictvím enzymu cytochromu P450, tudíž touto cestou nevzniká žádný předpoklad pro interakci s jeho induktory či inhibitory, ani s jinými léčivými látkami, avšak farmakokinetické studie provedeny nebyly. Taktéž nejsou dostupné údaje pro těhotné či kojící ženy, ale monoklonální protilátky obecně mohou prostupovat placentární bariérou i se vylučovat do mateřského mléka. Rovněž by se mělo pečlivě zvážit podání pacientům po transplantaci solidních orgánů, jelikož se v souvislosti s léčbou monoklonálních protilátek proti PD-1 objevila rejekce štěpu. Naopak nejsou omezení pro geriatrickou populaci nebo pacienty s poruchou ledvin či lehkou poruchou jaterních funkcí. Nicméně pro pacienty s těžšími formami jaterní insuficience se doporučuje podávání s opatrností

a pečlivým sledováním laboratorních hodnot bilirubinu, AST a ALT. Ačkoliv obě léčivé látky působí stejným mechanismem účinku, ne všechna bezpečnostní data jsou totožná. Pembrolizumab, který je v ČR registrován pro léčbu pacientů s diagnózou určitých subtypů melanomu, Hodgkinova lymfomu, karcinomu plic, uroteliálního karcinomu, karcinomu hlavy a krku, renálního karcinomu a kolorektálního karcinomu, lze podávat v monoterapii i kombinační léčbě s chemoterapií nebo s cílenou léčbou, konkrétně axitinibem. Mezi indikace nivolumabu v ČR patří některé typy melanomu, renálního karcinomu, uroteliálního karcinomu, karcinomu jícnu, karcinomu hlavy a krku, karcinomu plic a Hodgkinova lymfomu. Dá se indikovat samostatně nebo v kombinaci s CTLA-4 protilátkou ipilimumabem, případně také jako trojkombinace i s chemoterapií. S tímto samozřejmě také souvisí širší škála nežádoucích účinků než u monoklonálních protilátek v monoterapii. Za účelem nepřímého porovnání bezpečnosti a toxicity nivolumabu a pembrolizumabu byly provedeny metaanalýzy klinických studií, kde byly tyto léčivé látky zkoušeny pouze v monoterapii. Velmi časté nežádoucí účinky, definované výskytem u jednoho nebo více léčených pacientů z deseti, byly u obou léčiv obdobné. Nejčastěji byla shodně detekována únava, dále dle abecedy anémie, nauzea, průjem, svědění a vyrážka. U pembrolizumabu navíc například artralgie, bolest hlavy, dyspnoe, edém a z irAE hypotyreóza. Naopak u nivolumabu nadto třeba lymfopenie, neutropenie, zvýšená hladina jaterních enzymů, kreatininu či amylázy. Typickými a mnohdy nejzávažnějšími nežádoucími účinky checkpoint inhibitorů jsou již zmíněné irAE. Pokud je jejich výskyt lékařem skutečně posouzen jako související s podávanou terapií, jejich řešení záleží na stupni závažnosti. Tyto stupně jsou označovány čísly od jedné do čtyř, přičemž vyšší číslo značí také vyšší závažnost nežádoucího účinku. Doporučení pro vysazení léčby obvykle bývá od druhého stupně závažnosti, může se ale lišit v závislosti na konkrétním typu irAE. Dávky se nijak nesnižují, ale vynechají a započne léčba zpravidla kortikosteroidy. Jelikož je většina irAE reverzibilní, po zlepšení stavu pacienta na stupeň jedna se mohou kortikosteroidy postupně vysazovat, a to

zhruba po dobu jednoho měsíce. Po určité době lze imunoterapii opět nasadit, avšak v případě závažných (od stupně tři) a opakujících se irAE již musí být tato léčba vysazena trvale. [67-73]

Také na nežádoucí účinky léčby se lze dívat jako na prediktor (ne)úspěšné léčebné odpovědi, avšak k poznání této korelaci věda zatím nemá dostatek podkladů. Objevuje se pojitko, kdy u pacientů léčených anti PD-(L)1 protilátkami s vyšším měrou výskytu irAE byly pozorovány také lepší léčebné odpovědi. Nejvíce podkladů pro tento jev je zatím k dispozici z léčby plicních nádorů, kde se jako nejsilnější prediktor ukazuje endokrinopatie. Obdobné korelace byly také pozorovány u nádorů močového měchýře, ledvin, gastrointestinálních či hlavy a krku. Co se týče anti CTLA-4 protilátek, zde data zatím nejsou natolik silná, aby se dala úměra mezi toxicitou a účinností popsat. Výsledky vědeckého bádání zde nejsou příliš jednotné, a proto v tomto ohledu, stejně jako v mnohách dalších v souvislosti s imunoterapií, je potřeba dalšího důkladného pozorování. [59,74,75]

3 Praktická část

3.1 Metodika

Vypracování praktické části této práce bylo založeno na analýze dat pacientů z Onkologické kliniky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Do projektu byli zahrnuti pacienti léčení pro onkologická onemocnění imunoterapií, konkrétně léčivou látkou pembrolizumab nebo nivolumab, od roku 2015 do 2020. Tato terapie musela být pacientům indikována pro léčbu solidního tumoru a to jakéhokoliv typu, naopak hematologické malignity byly důvodem pro vyloučení z analýzy pro jejich výrazně odlišnou charakteristiku onemocnění a léčbu. Těmto základním inclusion a exclusion kritériím odpovídalo 91 pacientů, z toho 77 léčených nivolumabem a 14 pembrolizumabem. Jelikož se ale výzkumná část zaměřuje na léčebnou predikci u pacientů rychle progredujících, nebo naopak dlouhodobě profitujících z léčby, předem se na základě odborné diskuze s onkology definovaly dvě populace pacientů, které budou analyzovány. Jako respondéři se označili pacienti, jenž byli léčení imunoterapií deseti a více cykly, naopak jako non-respondéři pacienti, kterým byla léčba imunoterapií přerušena a nedostali více než tři cykly pembrolizumabu či nivolumabu, a to z důvodu progresse léčeného onemocnění. Splnění definice respondéra či non-respondéra byla dalším inclusion kritériem. Nebyli tedy zařazeni žádní pacienti léčení 4–9 cykly imunoterapie a pokud pacient ukončil léčbu imunoterapií během prvních tří cyklů jejího podávání z jiného důvodu, než je progresse onemocnění, například kvůli toxicitě, byl z analýzy také vyloučen. Toto exclusion kritérium bylo zavedeno, abychom se zaměřili na pacienty, kteří prokazatelně neměli z imunoterapie léčebný profit a nebyli zahrnuti pacienti, u kterých léčebný benefit nemohl být posouzen, jelikož byla léčba z různých jiných důvodů brzy vysazena. Všechna tato kritéria splňovalo dohromady 70 pacientů, kteří byli do výzkumu zařazeni. Zbylých 21 pacientů nebylo analyzováno.

Ze 70 zařazených pacientů bylo 12 na léčbě pembrolizumabem a 58 se léčilo nivolumabem. U všech těchto pacientů byly analyzovány jejich klinické parametry,

tedy primárně léčené onkologické onemocnění, případné duplicitní malignity či další komorbidity. Dále také konkomitantní farmakoterapie podávána současně s imunoterapií. Rovněž byla posuzována snášenlivost léčby, zejména výskyt typických irAE, jenž byly ošetřujícím lékařem dány do příčinné souvislosti s podáváním imunoterapie. Výsledky této části byly popsány deskriptivní statistikou.

Druhá část praktické analýzy se věnovala hledání korelací mezi výsledky genomového sekvenování a léčebnou odpovědí na imunoterapii. Od všech pacientů však nebyl k dispozici vzorek nádorové tkáně, případně ne v dostatečném množství, aby mohl být rozbor proveden. Detekovatelné byly vzorky od celkem 12 pacientů a zpracovávaly se pomocí sekvenátoru v Ústavu patologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Analýza nádorové genetické informace byla prováděna na úrovni DNA a RNA, a to pomocí masivního paralelního sekvenování, známého též jako sekvenování nové generace (NGS), což je metoda, která umožňuje v jednu chvíli analyzovat genetickou informaci u většího množství genů. Výstupem NGS na úrovni DNA je informace o jednonukleotidových záměnách, krátké inserce či delece i variabilitě v počtu kopií genů. Dále je možné na základě identifikovaných variant vypočítat TMB, která definuje množství mutací na jednu megabázi nádorového genomu. Pro NGS analýzu DNA byl použit pan-cancer panel o velikosti 271 genů a pro analýzu RNA panel o 14 genech se souvislostí s karcinomem plic. Mutační analýza DNA detekovala genomové varianty, které byly prokazatelně patogenní, u jiných jejich patogenita není experimentálně dokázána, avšak z funkčního hlediska je takto můžeme pravděpodobně hodnotit. Z toho důvodu budeme tyto obě podskupiny řadit do kategorie zvané patogenní varianty. Dále byly detekovány varianty s nejasným významem, což znamená varianty pravděpodobně benigní i maligní. Tyto byly zařazeny do druhé kategorie a společně označeny jako ostatní varianty. [41,76]

Následným krokem bylo porovnání rozdílů v četnosti a typu nalezených genomových variant mezi respondéry a non-respondéry. Výchozím bodem byly výsledky NGS přenesené do programu Microsoft Excel, kde byly prostřednictvím nástrojů deskriptivní statistiky a grafů vyhodnocovány. Nalezené varianty byly následně podrobeny analýze, zda se nalézaly častěji u respondérů či non-respondérů, kde se tímto způsobem hledala vzájemná korelace.

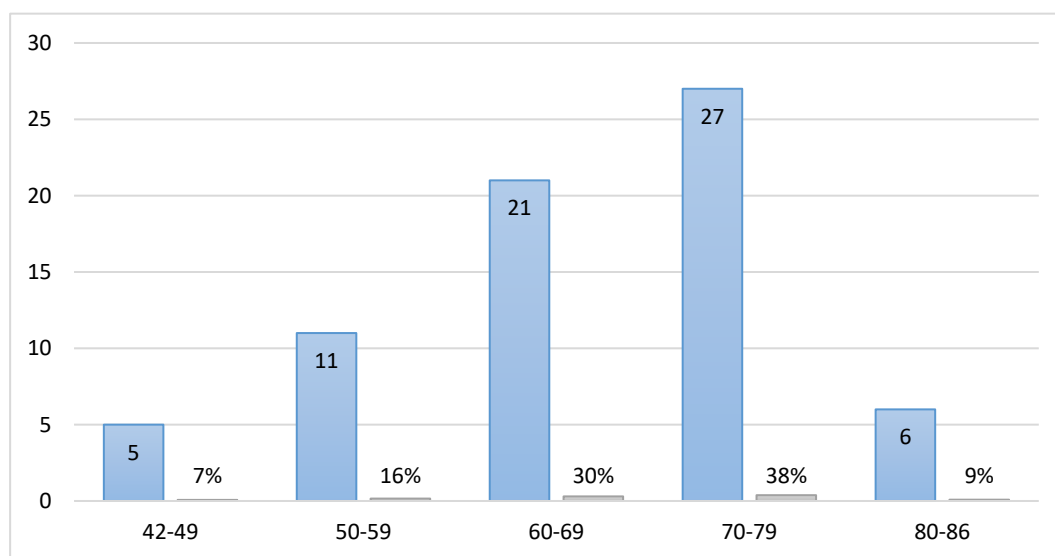
Pro účely této práce se v rámci zachování anonymizace dat a zjednodušení bude shodně každý subjekt hodnocení nazývat pacient či (non-)respondér bez ohledu na pohlaví.

3.2 Výsledky

3.2.1 Soubor pacientů

Všechny podmínky pro zařazení do primární analýzy, jež jsou uvedeny v metodice této práce splňovalo celkem 70 pacientů. Denominátor pro všechna grafická znázornění v této kapitole je tedy 70 (100 %), pokud není uvedeno jinak.

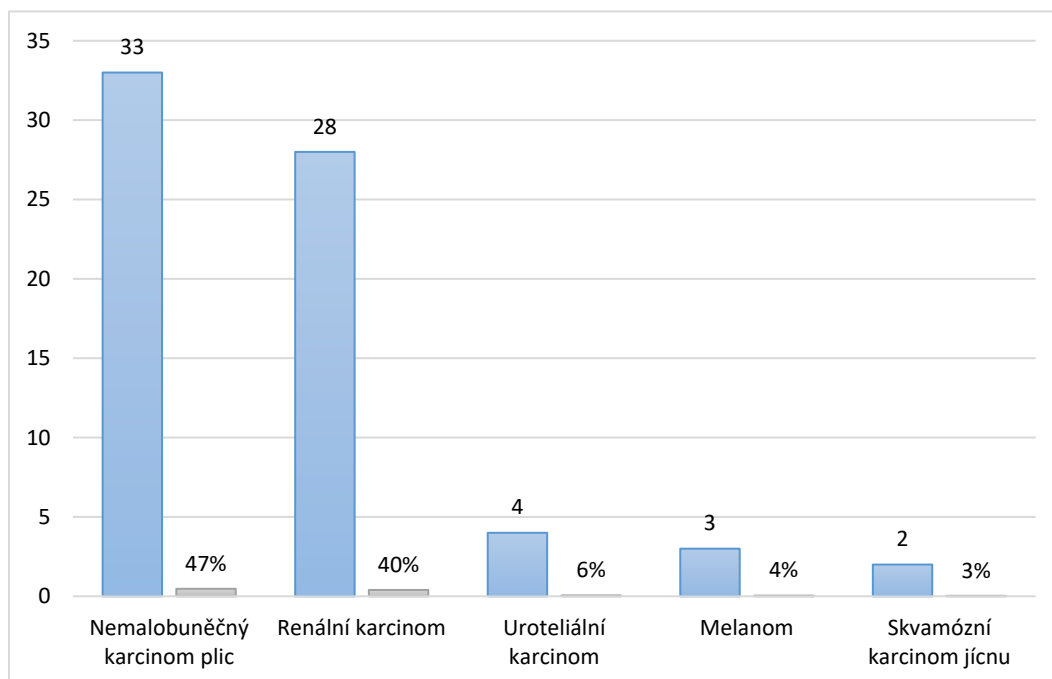
V souboru se nacházelo více mužů, kterých bylo 42 (60 %). Medián věku činil 68 let, přičemž nejstaršímu pacientovi bylo 86 let a tomu nejmladšímu 42 let. Na Obr. 8 jsou pacienti rozděleni do pěti věkových kategorií a jak je znázorněno, největší skupinu tvořili pacienti v rozmezí věku 70–79 let.



Obr. 8 Věkové rozmezí

Diagnózy

Jedním ze zařazovacích kritérií bylo primární onkologické onemocnění léčené imunoterapií. Jednalo se o 5 různých diagnóz, přičemž většina (47 %) pacientů užívalo imunoterapii pro léčbu nemalobuněčného karcinomu plic. Druhým nejpočetnějším (40 %) nádorovým onemocněním byl renální karcinom. Pouze v řádu pár jednotek se poté vyskytoval uroteliální karcinom, melanom a skvamózní karcinom jícnu, jak znázorňuje Obr. 9.

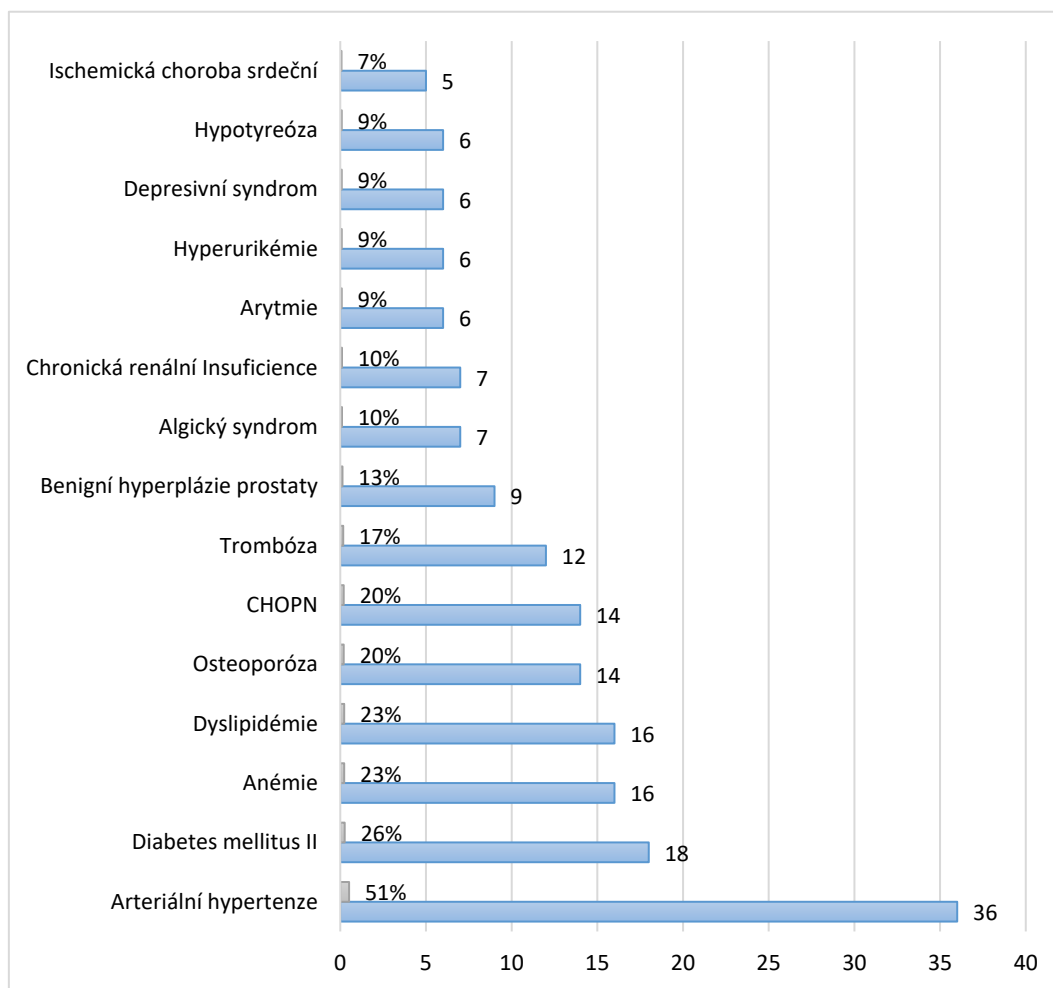


Obr. 9 Onkologické onemocnění léčené imunoterapií

U některých pacientů se však vyskytovala duplicita nádorových onemocnění, trpěli ještě jiným onkologickým onemocněním než tím, pro které byli léčeni imunoterapií. Tato duplicita se vyskytovala u 11 (16 %) pacientů. Druhou onkologickou diagnózou byl nejčastěji karcinom prostaty, jenž se vyskytoval u 3 (4 %) pacientů. Shodně 2 (3 %) pacientům byl diagnostikován karcinom pankreatu a karcinom štítné žlázy. Dále se ojediněle vyskytl také karcinom tonzily, karcinom prsu, lymfom varlete a endometriální karcinom.

V osobní anamnéze pacientů bylo u 52 (74 %) identifikováno 3 a více diagnóz. Nejčastějším souběžným onemocněním byla arteriální hypertenze, kterou trpělo

36 (51 %) pacientů. Dále byl nalezen diabetes mellitus druhého typu u 18 (26 %) pacientů, anémie a dyslipidémie shodně u 16 (23 %) pacientů. Všechna onemocnění, která byla diagnostikována více než 5 pacientům, jsou shrnuta na Obr. 10. Z laboratorních odchylek se pacienti nejčastěji potýkali s hyponatrémií či hypokalémií, ale ne u více než 5 pacientů. Poměrně často se objevovaly také různé poruchy trávení, jednalo se například o dyspepsii, syndrom dráždivého tračníku či gastroezofagiální reflux. V řádech nízkých jednotek se také objevovaly jiné gastrointestinální onemocnění jako například vředy duodena, žaludeční polypy nebo divertikulosa tračníku. Vedle arytmií, která byla diagnostikována u 6 (9 %) pacientů, se vyskytovaly také další srdeční obtíže, jednalo se například o chronické srdeční selhání, fibrilaci síní či chronickou perikarditidu. U 7 (10 %) pacientů



Obr. 10 Onemocnění souběžná s onkologickou diagnózou

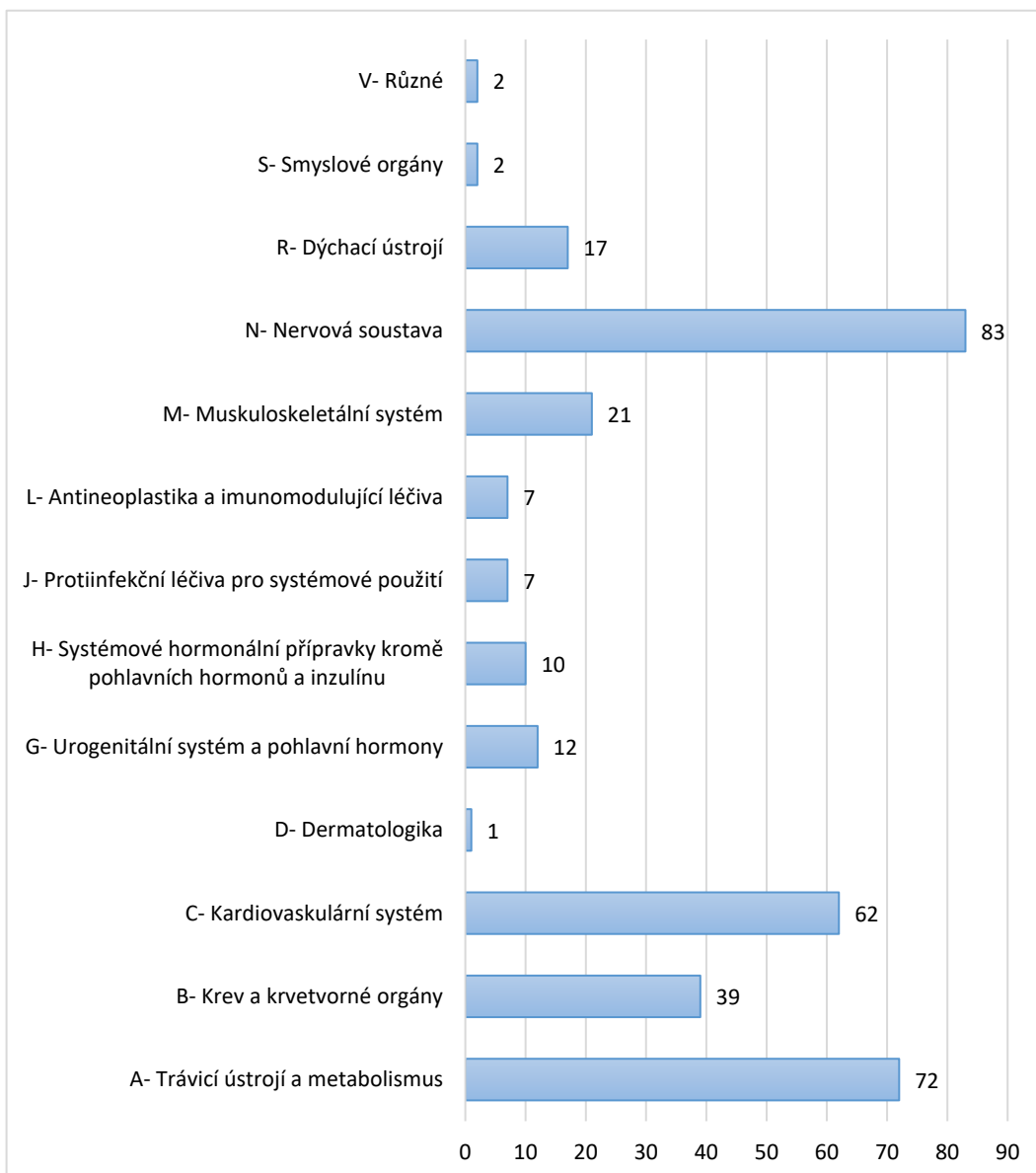
N= 171 (100 %)

Vysvětlivka: CHOPN - chronická obstrukční plicní nemoc

pacientů byla zjištěna chronická renální insuficience. Méně než 5 pacientů trpělo také jiným ledvinovým onemocněním. Šlo například o nefropatii či nefrolitiázu, v obdobném množství byly diagnostikovány také jaterní obtíže, jako hepatitida nebo steatóza jater, či také pankreatitida. Nejčastějším typem trombózy byla hluboká žilní trombóza, kterou mělo 7 (10 %) pacientů. Nejčastější psychiatrickou poruchou byl depresivní syndrom, avšak vždy méně než 5 pacientů trpělo některým z neurodegenerativních onemocnění, jako je například Alzheimerova choroba. Dále byly zaznamenány oční onemocnění (například tupozrakost, makulární degenerace, glaukom).

Užívaná farmakoterapie mimo imunoterapii

Vedle imunoterapie užívali pacienti další léčiva, žádná souběžná farmakoterapie nebyla zaznamenána pouze u 4 % pacientů. Pacienti nejvíce užívali léčiva, která cílí na nervový systém, poté ovlivňující trávicí ústrojí a metabolismus a následně ta zaměřená na kardiovaskulární systém. Počet léčiv souběžně užívaných s imunoterapií, rozdělených do ATC skupin je shrnut na Obr. 11. Nejčastěji zastoupenou léčivou látkou byl furosemid, léčivé přípravky s jeho obsahem užívalo 24 % pacientů. Mezi další hojně užívaná léčiva ovlivňující kardiovaskulární systém patřily betablokátory, léčilo se jimi 22 % pacientů, přičemž nejčastější zástupce byl bisoprolol. K ovlivnění trávicího ústrojí byly nejčastěji, ve 21 %, indikovány léčivé přípravky s obsahem omeprazolu. 24 % pacientů užívalo různé náhrady minerálních prvků, nejčastěji vápník a draslík, obdobný počet pacientů se léčil antidiabetiky.

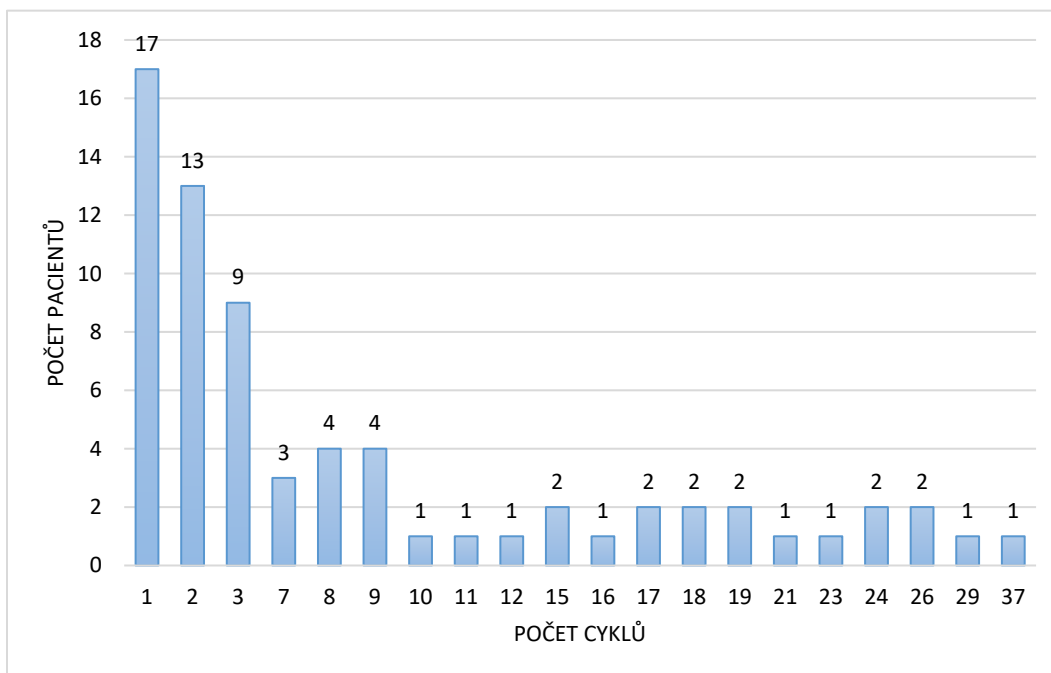


Obr. 11 Užívaná farmakoterapie (mimo imunoterapii) dle ATC skupin
N= 335 (100 %)

Terapie pembrolizumabem nebo nivolumabem

Pacienti byli léčeni dvěma různými léčivy typu checkpoint inhibitorů, a to pembrolizumabem nebo nivolumabem, přičemž obě jsou protilátkami proti receptoru PD-1. Do výsledné analýzy bylo zařazeno více pacientů léčených nivolumabem, konkrétně 58 pacientů (82 %). Mezi nimi bylo 27 respondérů, tedy pacientů léčených 7 a více cyklů léčby a 31 non-respondérů, jenž absolvovali 3 a méně cyklů. Pembrolizumabem bylo léčeno 12 (18 %) pacientů, přičemž

definici respondéra splňovali 4 pacienti a non-respondéra 8 pacientů. Podíl respondérů byl vyšší ve skupině pacientů léčených nivolumabem, kde tvořil 47 % a ve skupině s pembrolizumabem bylo respondérů 33 %. Na Obr. 12 je zaznamenán kompletní počet léčebných cyklů imunoterapie, přičemž mediánem jsou 3 cykly.



Obr. 12 Počet cyklů imunoterapie

Z podstaty cíle této práce a definice non-respondéra, byla těmto pacientům vysazena imunoterapie z důvodu progresu léčeného onkologického onemocnění. V některých případech a to však nebyla jediná příčina. Někdy byly přidruženým důvodem pro přerušeni léčby závažné nežádoucí účinky a jejich léčba. V našem souboru pacientů došlo k ukončení léčby z těchto důvodů u 10 (14 %) pacientů a vzhledem k progredujícímu onemocnění již nebyla ani opět nasazena. Ve 3 (4 %) případech přispěla k vysazení imunoterapie kontraindikace v podobě fraktury a nutné operace. Také v těchto případech nebyla léčba opět nasazena, jelikož samotné onemocnění progredovalo. Avšak 5 (7 %) pacientů stále pokračovalo v léčbě imunoterapií i v době ukončení sběru dat, tedy k poslednímu dni roku 2020. Celkově u 19 (27 %) pacientů se objevily nežádoucí účinky, které byly ošetřujícím lékařem dány do souvislosti s imunoterapií, přičemž ve 13 (19 %) případech se jednalo o irAE. Hypotyreóza a pneumonitida se shodně vyskytly u 2

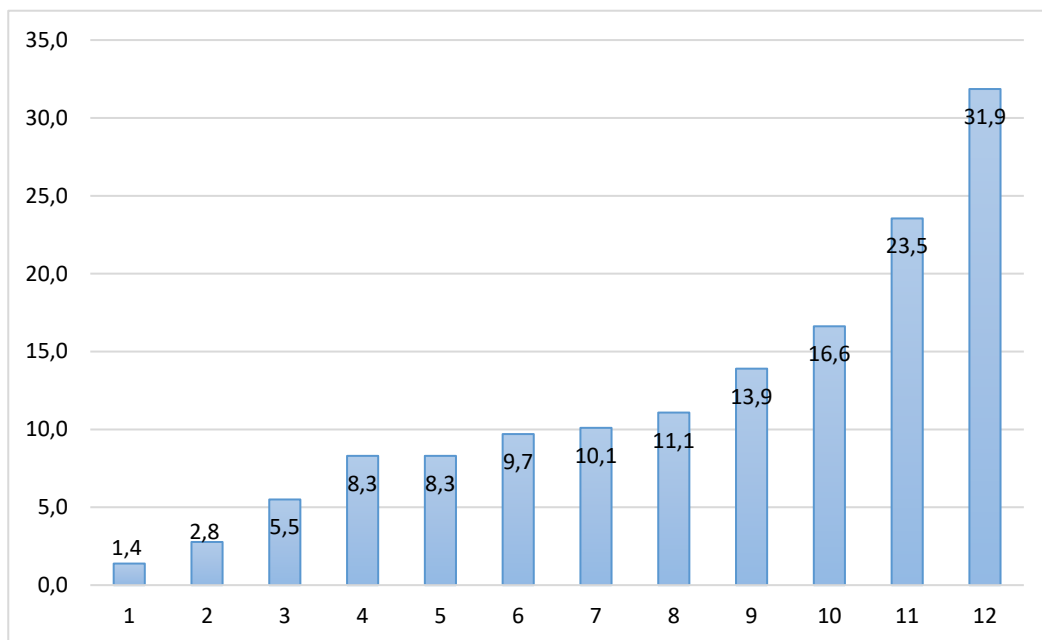
pacientů, všechny ostatní nežádoucí účinky se objevily vždy pouze u jednoho pacienta. Jednalo se anémii, dermatitidu, diabetes mellitus typu I, encefalomyelitidu, hepatitidu, myastenia gravis, myokarditidu, blíže nespécifikovanou neurotoxicitu, parestézii, parézu, reakci spojenou s infuzí, trombocytopenii, tyreoiditu, únavu a zvracení.

3.2.2 Analýza nádorové genetické informace

Podstata této části práce se zakládá na analýze nádorové genetické informace a posléze hledání korelací mezi výsledky této analýzy a léčebnou odpovědí na imunoterapii. Od všech 70 pacientů však nebyl k dispozici vzorek nádorové tkáně, případně ne v dostatečném množství, aby mohl být rozbor proveden. Detekovatelné byly vzorky od celkem 12 pacientů různého pohlaví, věku, onkologické diagnózy i nasazeného léčiva. V této kapitole bude u všech grafických znázornění denominátorem číslo 12 (100 %).

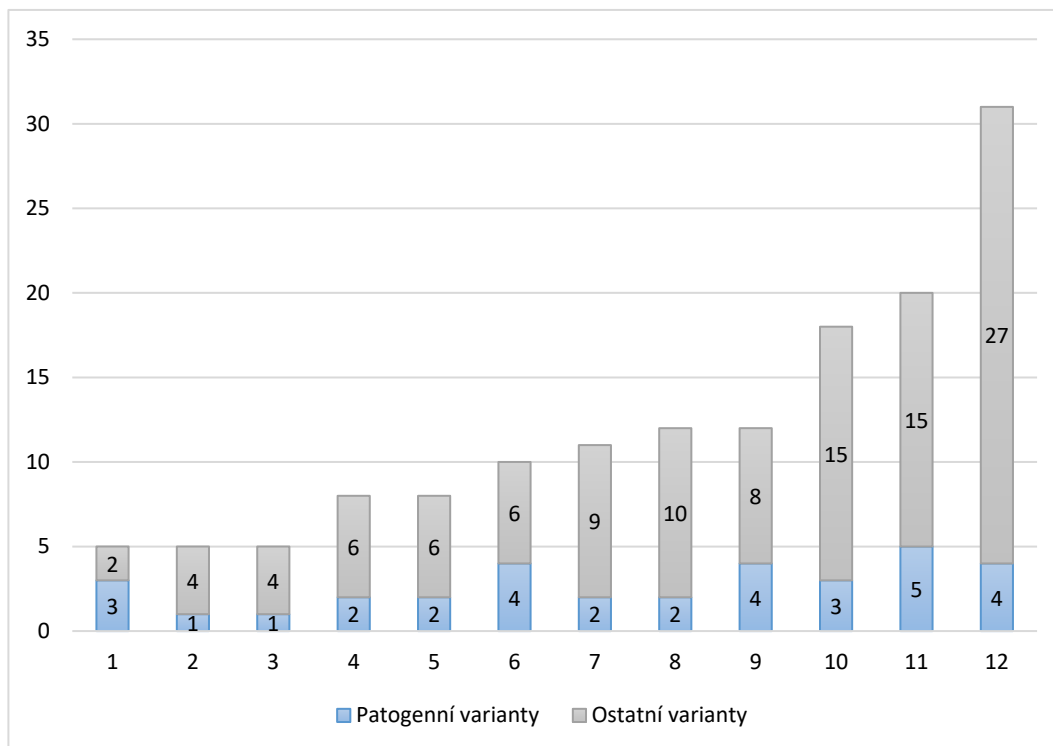
3.2.2.1 Biologické markery

Panelové sekvenování metodou NGS, které bylo použito pro účely této práce, detekuje nejen velké množství fyziologických i patologických variant genů, ale také poskytuje výpočet TMB. Jelikož neexistuje jednotné doporučení, pro účely této analýzy byly patologickou laboratoří hodnoty TMB rozděleny do tří kategorií na základě dostupných odborných článků. Hodnoty TMB mezi 0–5 jsou označeny jako „low“, 5–10 „intermediate“, 10 a více „high“. Přičemž poslední kategorii odpovídala celá polovina pacientů, zhruba třetina (33 %) bylo „intermediate“ a 17 % na úrovni „low“. Číselné hodnoty TMB zaokrouhlené na jedno desetinné místo vzestupně seřazené uvádí Obr. 13.



Obr. 13 Mutační nálož

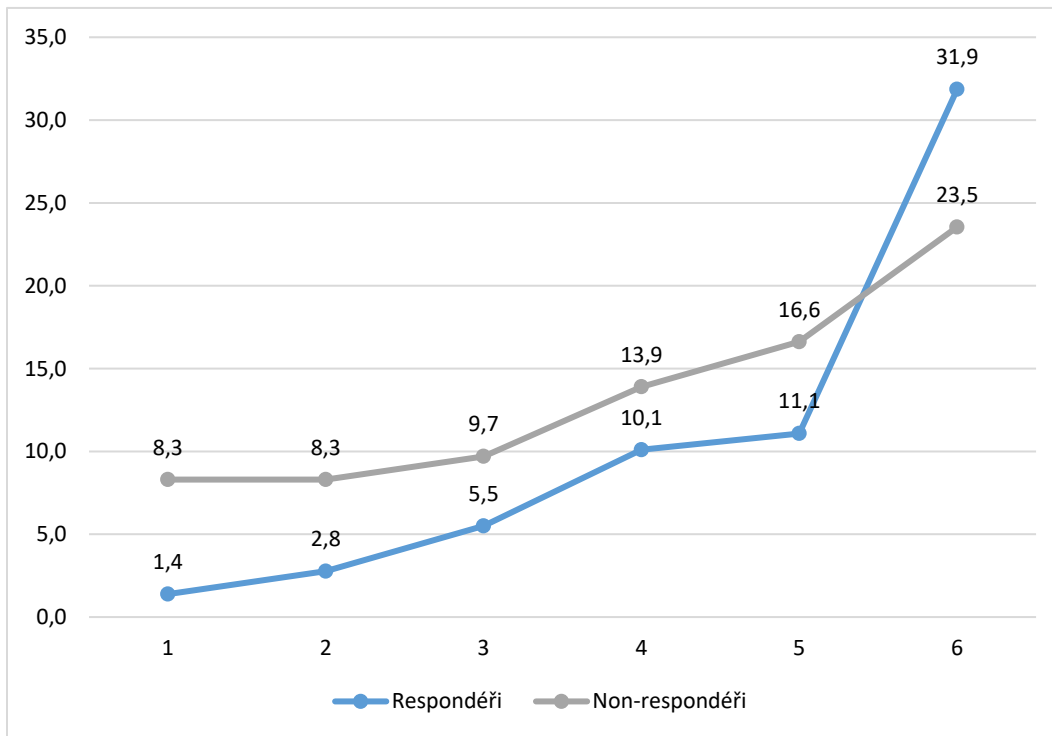
Na základě mutační analýzy DNA byla u všech pacientů byla detekována alespoň 1 patogenní varianta a jejich maximální počet u jednoho pacienta byl 5. Pokud zohledníme jak patogenní, tak ostatní varianty, pak u každého pacienta byly nalezeny alespoň 2, maximální počet byl 27 a medián byl 10,5 variant. Kompletní rozpis nalezených variant u všech pacientů je seřazen od nejnižšího počtu po nejvyšší na Obr. 14. Součástí NGS byla také analýza na bázi RNA, konkrétně se analyzovaly RNA fúze, které byly nalezeny u 1 pacienta, a varianty, detekované u 3 pacientů.



Obr. 14 Počet detekovaných variant

3.2.2.2 Vyhodnocení vzájemných korelací

Prvním hodnoceným prediktorem efektivity imunoterapie byla TMB. Její hodnota se u respondérů pohybovala mezi 1,4 a 31,9 s tím, že polovina pacientů byla v kategorii „high“, pouze jeden v „intermediate“ a dva v „low“. V této skupině pacientu byly hodnoty TMB víceméně rovnoměrně rozprostřeny a nelze významnou korelaci pozorovat. U non-respondérů bylo rovněž 50 % v kategorii „high“, druhých 50 % tvořila kategorie „intermediate“ a žádný pacient zde nebyl s výsledkem „low“. Konkrétní hodnoty TMB u všech hodnocených pacientů zobrazuje Obr. 15. Z nalezených výsledků nelze jednoznačně určit predikci na základě hodnoty TMB.

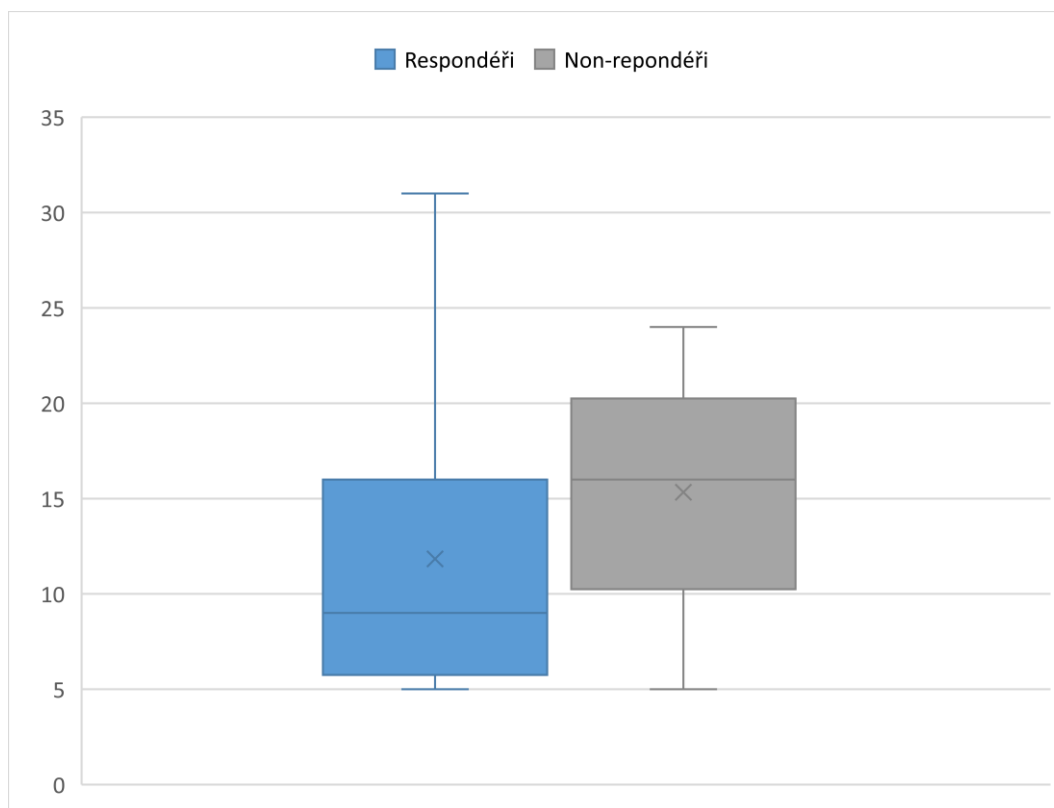


Obr. 15 Mutační nálož u podskupin pacientů

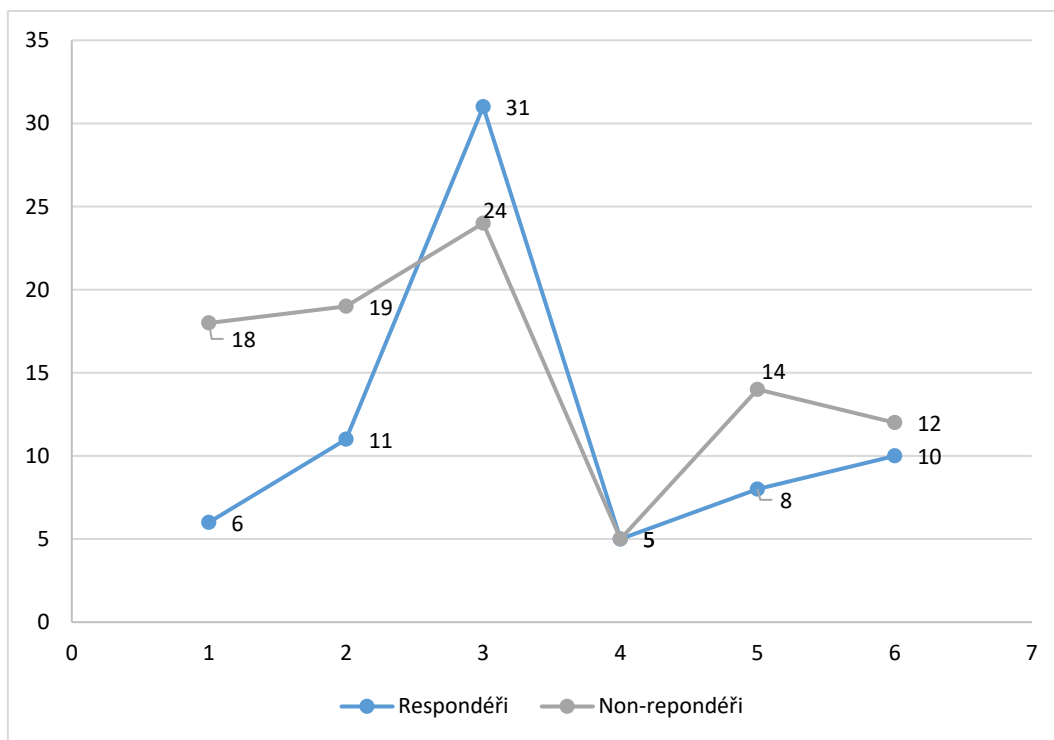
Fúze a varianty na úrovni RNA nebyly detekovány u mnoha pacientů, konkrétně pouze u 3 (25 %), avšak všichni z nich byli non-respondéři. U jednoho z těchto pacientů byly nalezeny jak dvě fúze, konkrétně genů EE1A1 a NTRK3, tak jedna varianta, a to genu KRAS. Tato varianta byla objevena i u dalšího pacienta, spolu s variantou genu FGFR2. Poslední pacient měl jednu detekovanou variantu, a to genu BRAF. Genetické markery BRAF i ty ze skupiny RAS, kde patří KRAS či NRAS, jsou součástí jedné signální dráhy. U žádného respondéra nebyl detekován žádný z markerů na bázi RNA, naopak byly detekovány vždy pouze u non-respondérů.

U každého z analyzovaných pacientů byla nalezena nějaká genomová varianta, ale nikdy nebyla pouze 1, vždy se jednalo o kombinaci patogenních a ostatních variant. Každý pacient měl vždy minimálně 1 patogenní variantu a dohromady alespoň 5 nalezených jakýchkoliv genomových variant. Rozmezí patogenních variant se pohybovalo mezi 1–5, kdežto těch ostatních bylo nalezeno 1–27. Nejméně jich bylo 5 a nejvíce 31, přičemž medián hodnot byl 11,5.

Pro hledání vzájemné korelace mezi počtem detekovaných variant a léčebnou odpovědí byly analyzovány rozdíly mezi počtem variant u respondérů a non-repondérů. Minimální hodnota byla u obou skupin stejná, v každé skupině se našel pacient, který měl pouze 5 variant. Respondér s největším počtem variant jich měl 31 a non-respondér 24. Avšak v celkovém součtu bylo nalezeno u respondérů pouze 80 variant, u non-respondérů 108, a také medián měli tito pacienti výrazně vyšší, dosáhl hodnoty 16 a u respondérů jen hodnoty 9. Celkové rozložení v obou skupinách je znázorněno na Obr. 16 a Obr. 17. V tomto porovnání tedy non-respondéři měli variant více a mohlo by se potenciálně jednat o možnou predikci pro nižší léčebnou odpověď na imunoterapii.

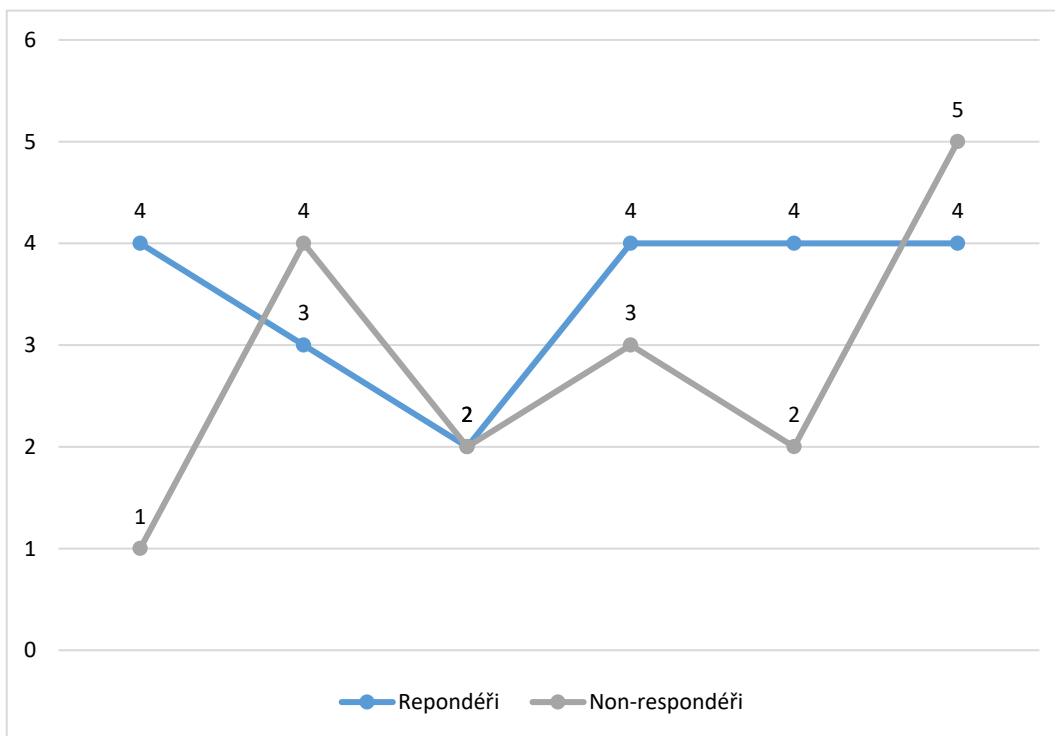


Obr. 16 Rozložení počtu variant u podskupin pacientů I



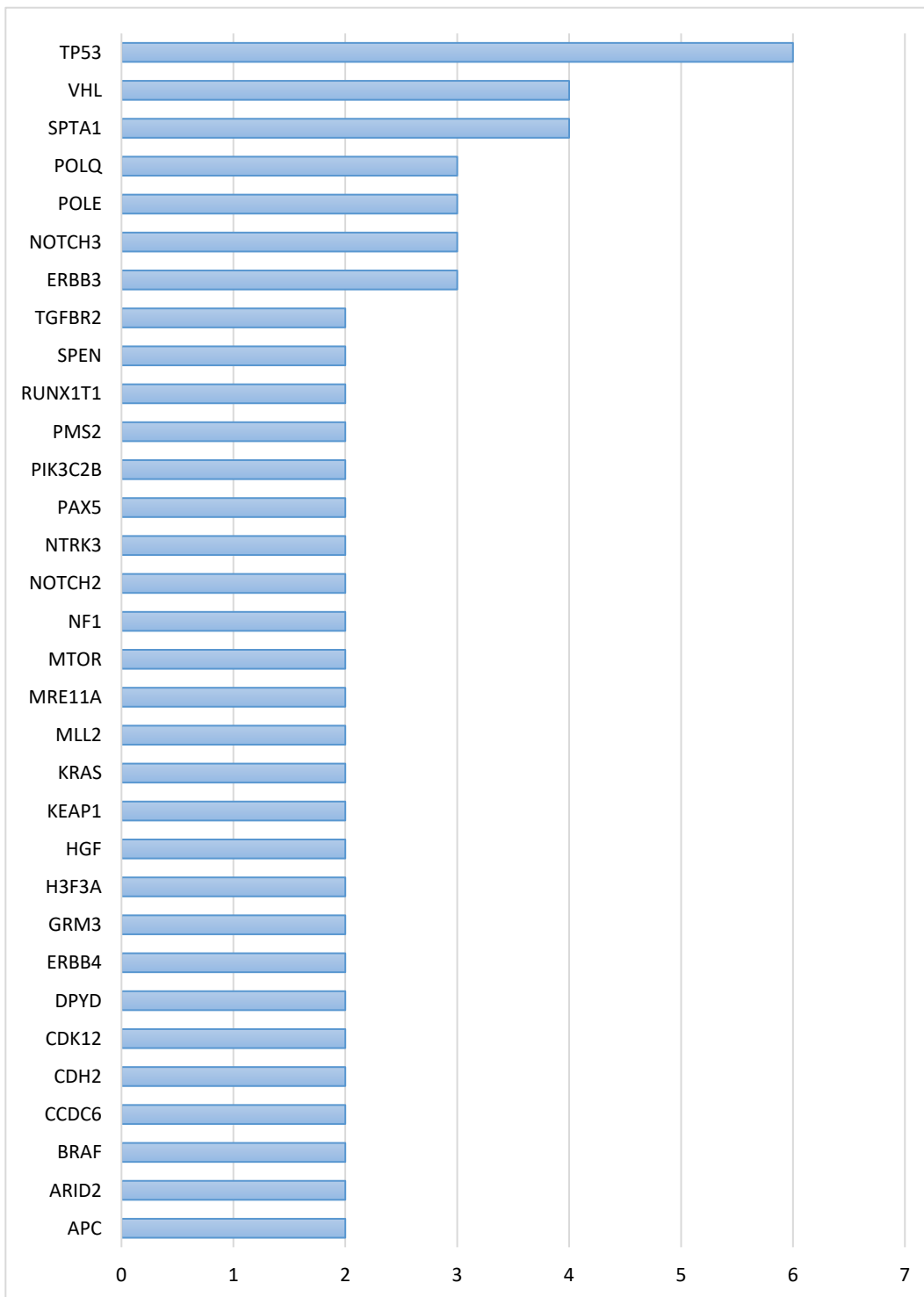
Obr. 17 Rozložení počtu variant u podskupin pacientů II

Poměrně rozdílná situace však nastává s analýzou konkrétně pouze patogenních variant, jelikož ty se více objevovaly naopak u respondérů. Každý respondér měl minimálně 2, většina (66,7 %) měla 4, což je také medián pro tuto skupinu a celkově jich bylo u těchto pacientů zaznamenáno 21. U non-respondérů se sice našlo i variant 5 u jednoho pacienta, avšak medián byl pouze 2,5 a celkové množství činilo 17, jak názorně ukazuje Obr. 18. Tato fakta by se dala považovat za potvrzení nutnosti poznávání jednotlivých variant, jelikož se nezdá být důležité jejich celkové množství jako takové, ale množství těch patogenních. A z našeho výzkumu vyplývá, že právě na tyto patogenní varianty mají potenciál účinně reagovat pacienti, jenž jsou léčeni imunoterapií.



Obr. 18 Počet patogenních variant u podskupin pacientů

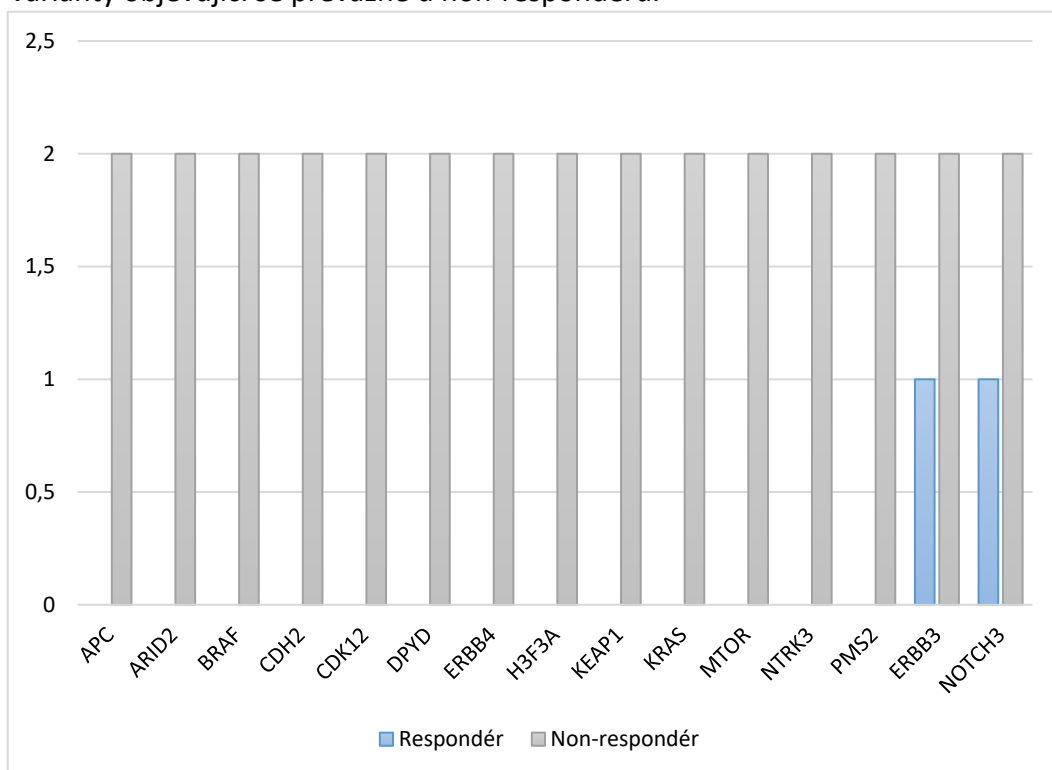
Důležitou složkou našeho výzkumu byla snaha o rozklíčování konkrétních jednotlivých variant a hledání, zda se některé z nich u daných skupin pacientů opakují. Zaměříme-li se tedy na nejčastější varianty z obou kategorií, najdeme celkově 32 variant, které se objevují u dvou a více pacientů. Ostatní se objevily vždy jen jednou, a proto pro účely této práce nebyly blíže analyzovány. Právě dvakrát se objevilo 25 variant, třikrát byly detekovány 4 varianty, čtyřikrát 2 varianty a 1 varianta se objevila dokonce šestkrát, jejich kompletní výčet uvádí Obr. 19. Téměř třetina, konkrétně 10 variant se rovnoměrně vyskytovala jak respondérů, tak u non-respondérů. Bylo však detekováno také 15 variant, jež se objevovaly zejména nebo většinou u non-respondérů a 7 variant dominujících u respondérů.



Obr. 19 Počet opakování jednotlivých variant

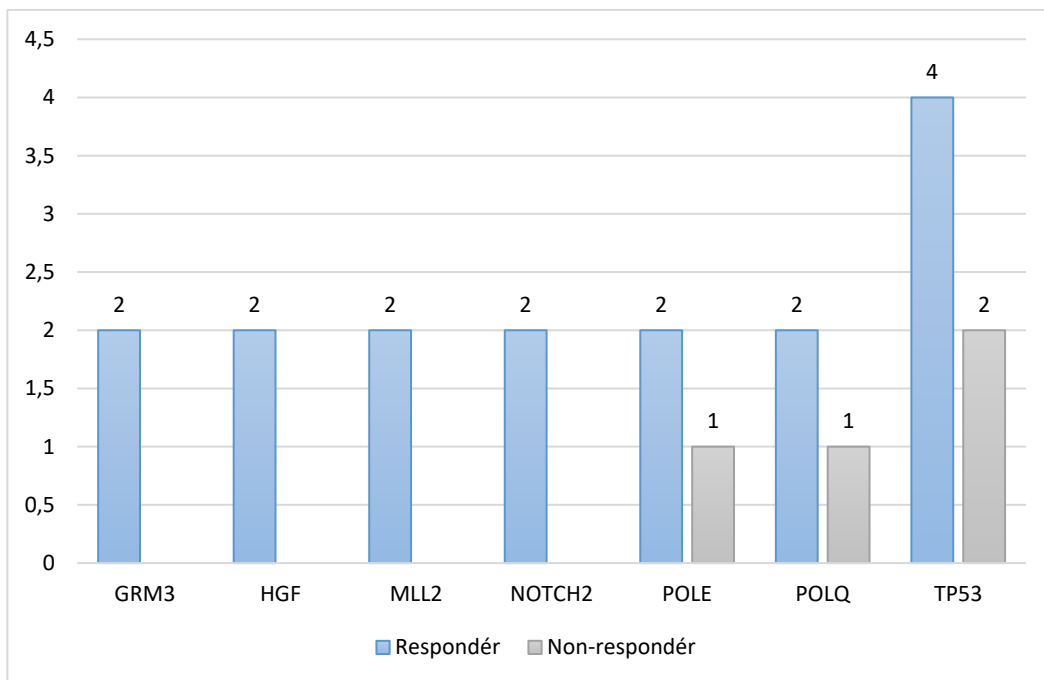
Při bližším zkoumání skupiny non-respondérů bylo zjištěno, že varianty genů ERBB3 a NOTCH3 se shodně objevily třikrát, avšak vždy 1 z těchto pacientů byl respondér a 2 non-respondéři. Jsou tedy pro tyto pacienty typičtější avšak ne

výlučně. Ostatních 13 variant bylo objeveno pouze u non-respondérů, respektive vždy u dvou různých non-respondérů. Mohly by tedy značit prediktivní charakter pro neúčinnost léčby checkpoint inhibitory. Konkrétně se jednalo o varianty následujících genů: APC, ARID2, BRAF, CDH2, CDK12, DPYD, ERBB4, H3F3A, KEAP1, KRAS, MTOR, NTRK3, PMS2, jak ukazuje Obr. 20, kde jsou zaznamenány všechny varianty objevující se převážně u non-respondérů.



Obr. 20 Počet variant převažujících u non-respondérů

Ve skupině respondérů byly detekovány 4 varianty, které se objevily pouze u nich, jednalo se konkrétně o geny GRM3, GHF, MLL2 a NOTCH2. Varianty genů POLE a POLQ se shodně vyskytly u 2 repondérů, ale také vždy u jednoho non-respondéra a varianta genu TP53 byla nalezena u celkem 4 respondérů a 2 non-respondérů, jak vše souhrně ukazuje Obr. 21.



Obr. 21 Počet variant převažujících u respondérů

3.3 Diskuze

Onkologie prošla během několika posledních let významným pokrokem a dynamika jejího vývoje nepolevuje. Jsou hledány a objevovány nové cesty, jak s nádorovými onemocněními bojovat. Zdaleka již léčba nestojí jen na často toxické chemoterapii, a přestože mnohdy stále zůstává základním kamenem terapie, je čím dál tím více kombinována, popřípadě i nahrazována novějšími léčebnými modalitami založenými na zcela jiných mechanismech účinku. Bývají zpravidla mnohem přesněji cílené na konkrétní molekuly na nádorových buňkách, ale také na molekuly modifikující nádorové mikroprostředí či na konkrétní receptory buněk imunitního systému. Ne jinak tomu také je u checkpoint inhibitorů. Ruku v ruce se specifitou jejich mechanismu účinku, jdou také odlišná indikační kritéria či bezpečnostní profil. Proto je před nasazením této léčby zapotřebí brát ohled na samotný výběr vhodného pacienta a sledovat některé konkrétní parametry. [77]

První kapitola praktické části této práce se zaměřila právě na klinický profil pacientů, jenž byli léčeni checkpoint inhibitory v daném období na daném pracovišti pro onkologické onemocnění. Výběr konkrétní diagnózy nebyl předem stanoven jako inclusion kritérium předloženého projektu, pouze se muselo jednat o solidní tumor. Bylo tak učiněno z důvodu tumor agnostického charakteru imunoterapie a pro biologický mechanismus účinku této terapeutické modality. Pacienti museli navíc splňovat definici respondéra či non-respondéra, jelikož na tento typ pacientů byl výzkum zaměřen, a proto z původních 91 pacientů jich bylo do analýz zařazeno 70. V tomto souboru se vyskytovali pacienti různého pohlaví, věku i diagnózy. Častěji byl pacientem muž, ve věkovém rozmezí 70–79 let, druhá nejčetnější věková kategorie byla 60–69 let. Nejčastější diagnózou byl nemalobuněčný karcinom plic, následovaný renálním karcinomem. Což poměrně odpovídá současným evropským i českým statistikám, které uvádějí, že více než polovina nádorových onemocnění se vyskytuje po 65. roku života. Navíc u pacientů mužů nad 70 let se nejvíce vyskytuje právě karcinom plic. Dalé také karcinom prostaty, a právě tento typ onemocnění byl v našem výzkumu nejčastější duplicitní nádorovou diagnózou. U žen nad 70 let je nejčastější diagnózou karcinom prsu s karcinomem tlustého střeva a konečníku. Přičemž v našem výzkumu se jednou karcinom prsu objevil, avšak jako duplicitní nádorové onemocnění, nikoliv jako primárně léčené onemocnění. A to z důvodu, že ani jedna ze dvou protilátek, které byly součástí našeho výzkumu, nebyla a doposud není indikovaná v léčbě žádného subtypu rakoviny prsu. Karcinom tlustého střeva a konečníku se u našich pacientů neobjevil vůbec, přestože je látka pembrolizumab indikována na jeho léčbu. K evropské registraci došlo totiž až v prosinci roku 2020, tedy v době, kdy náš sběr dat již končil. Naopak renální karcinom byl registrován jako jedna z prvních diagnóz jak u nivolumabu, tak pembrolizumabu a v našem výzkumu obsadil v četnosti druhé místo. [68,69,77,78]

Pacienti měli kromě primárního onkologického onemocnění, také v 16 % duplicitní nádorové onemocnění a celých 74 % pacientů trpělo dvěma či více jinými

diagnózami. Obecně jsou komorbidity poměrně běžné u onkologicky nemocných pacientů a s věkem se jejich výskyt ještě zvyšuje. Medián věku pacientů v našem výzkumu činil 68 let a data z mezinárodních studií ukazují čísla obdobná, tedy že více než dvě třetiny onkologicky nemocných pacientů starších 65 let mají dvě či více diagnóz. Komorbidní stavy obecně mohou podstatně ovlivnit nasazení onkologické léčby i její efektivitu. Častou praxí bývá vyloučení těchto pacientů z klinických studií. Hlavní diagnózou, pro kterou se pacienti nemohou zúčastnit studií s protinádorovou imunoterapií jsou autoimunitní onemocnění, pacienti po transplantaci užívající imunosupresiva či s jinými imunodeficitními stavy. Další významná plošná omezení pro jiné, běžnější diagnózy se příliš nevyskytují. Tedy i pacienti v tomto výzkumu měli diagnostikované další onemocnění, nejčastěji hypertenzi, diabetes mellitus druhého typu a anémii. Přičemž všechna tato tři onemocnění patří v mezinárodních statistikách mezi deset nejčastějších komorbidit u pacientů starších 65 let s karcinomem plic. Stejně či více často se objevuje ještě chronická plicní obstrukční nemoc, hyperlipidémie, chronická renální insuficience a ischemická choroba srdeční, které se ve vyšších počtech nacházely také u našich analyzovaných pacientů. Nejčastěji zastoupená konkomitantní farmakoterapie korespondovala se samotným primárním onemocněním, ale také s poměrně vysokou polymorbiditou, a tedy dalšími nemocemi, které byly pacientům diagnostikovány. Absolutně nejčastěji pacienti současně užívali léčiva ATC skupiny ovlivňující nervovou soustavu, zejména analgetika, která byla indikována u 61 % pacientů a přispívala ke zmírnění bolestí, které onkologické pacienty provázejí. Mezi častá souběžně užívaná léčiva patřila ta s léčivou látkou furosemid či bisoprolol, což koresponduje s hojným výskytem kardiovaskulárních onemocnění a přidružených komorbidit jako jsou arytmie, stav po infarktu myokardu, městnavé srdeční selhání a podobně. Ve velké míře byl rovněž užíván omeprazol, který lze přisuzovat například zvládnutí zažívacích obtíží spojených s léčbou imunoterapií. [78,79]

Všichni pacienti byli v úvodu rozděleni dle léčebné odpovědi na imunoterapii na respondéry a non-respondéry. Definici respondéra splňovalo 44 % pacientů, což bylo více než uváděly klinické studie [77], kde se většinou efektivita této terapie projevuje u zhruba 15–25 % léčených pacientů. U některých studií [77] se však toto procento dostávalo i výše. Odlišnost by mohla být způsobena tím, že do metaanalýz těchto studií byly zakomponovány nejen dvě námi analyzované protilátky proti PD-1, ale také často protilátky namířené na jiné cíle, zejména PD-L1 a CTLA-4. Dle výsledků klinických studií [68,69] je jejich efektivita poměrně srovnatelná, i když přímé srovnání je komplikované, jelikož design studií nebývá totožný. Obdobný je ale bezpečnostní profil obou léčivých látek, zejména pak výskyt specifických nežádoucích účinků, které jsou imunitně podmíněné a zvládnutí jejich závažnějších projevů je podmíněno vysazením léčby a nasazením kortikosteroidů. V našem výzkumu se tento jev také objevil, a to u 14 % pacientů. Nejčastějším typem irAE byly poruchy funkce štítné žlázy, zejména hypotyreóza, jež byly pozorovány u 4 % pacientů. Což lze chápat jako srovnatelný výsledek s klinickými studiemi [69] nivolumabu v monoterapii, kde se tento irAE objevoval často, tedy u jednoho z deseti až sta pacientů. Ve studiích [68] s pembrolizumabem byla hypotyreóza detekována dokonce velmi často, až u více než jednoho pacienta z deseti. Druhým nejčastějším irAE, detekovaným u 3 % pacientů, byla pneumonitida, která se také dle dat ze stejných studií monoterapie nivolumabem i pemrolizumabem objevovala mezi 1,4–4,6 %. V jednom případě byl však také v našem výzkumu dán do souvislosti s léčbou nežádoucí účinek, který se ve studiích nevyskytuje, konkrétně se jednalo o parestézii. [68,69,77]

Ve druhé části se výzkum ještě hlouběji zaměřil na důležitost správného výběru pacienta pro léčbu imunoterapií. Jako klíčové se totiž stále více ukazuje jít cestou personalizované medicíny, jelikož stanovení samotné diagnózy, či histologického podtypu nádoru a jeho stágingu již přestávají být dostačující. Dva pacienti se stejnými těmito parametry nemusí stejnou měrou odpovídat na stejnou léčbu. Čím dál častější klinickou praxí je individuální posouzení konkrétního pacienta nejen

onkologem, ale celým týmem dalších odborníků. Do tohoto multidisciplinárního týmu může patřit kromě onkologa například také chirurg, patolog, radiolog či dle typů nádoru další specializovaní lékaři. Tito odborníci posuzují široké spektrum parametrů, včetně výsledků exprese jednotlivých biomarkerů, které mohou napovědět vhodnost zvolení konkrétní léčebné modality, jako je například protinádorová imunoterapie. Pro tu je volba vhodného pacienta zcela zásadní, jelikož není zdaleka u každého účinná. Je naprosto klíčové umět poznat toho onkologicky nemocného pacienta, který bude z léčby profitovat. Na počátku je však nutné vědět, co hledat, tedy určit markery s prediktivním významem pro účinnost imunoterapie. Přestože na tuto otázku již existují střípky odpovědí, stále není vědecké bádání zdaleka u cíle. Zatím nejlepším markerem, ač má k dokonalé prediktivní vlastnosti ještě daleko, je exprese PD-L1 jako ukazatel pro nasazení protilátek zaměřených proti PD-L1 nebo PD-1. Avšak také zde je velký prostor pro nalezení lepších prediktivních markerů. Aktuálně je realizováno velké množství klinických studií, které se již na některé zaměřují, stejně tak se aktivně hledají nové markery prostřednictvím stále preciznějších metod genomového sekvenování. Během něj lze získat velké množství informací o změnách, variantách či mutacích různého typu, které doposud ani nebyly známy, nebo u těch již známých není prozkoumána potenciální prediktivní vlastnost. [80-82]

Z důvodu stále vysoké medicínské potřeby poznání prediktivních markerů za účelem precizace a personalizace léčby onkologických pacientů vznikl také tento výzkum. Jeho cílem bylo nalézt možné korelace mezi odpovědí na léčbu checkpoint inhibitory (pembrolizumabem a nivolumabem) a genomovými variantami. Ty byly detekovány metodou NGS, jež analyzuje genetické informace nejen z DNA, ale navíc také z RNA. Na rozdíl od DNA se nádorová RNA nejdříve přepisuje do komplementární DNA, avšak poté se už zpracovává obdobným přístupem. Výhodou analýzy RNA je možnost detekce fúzních genů a informace o genové expresi. Z důvodu souběžné detekce DNA, RNA i TMB byla zvolena metoda analýzy pomocí NGS jako nejvhodnější pro náš výzkum. U nalezených

variant se hledaly spojitosti jak s pacienty dlouhodobě profitujícími z léčby, tak s naopak rychle progredujícími. Z celého souboru 70 pacientů byl u 12 z nich k dispozici vzorek tkáně v dostatečném množství a kvalitě pro provedení NGS analýzy. U všech 12 pacientů byly k dispozici vzorky z primární tkáně nádoru, avšak u jednoho pacienta byl navíc analyzován také vzorek z nádorové metastázy. Při porovnání těchto dvou různých vzorků od jednoho pacienta bylo zjištěno, že většina mutací sice byla totožná, ale dvě se lišily. Což může potvrzovat teorii o důležitosti místa odběru vzorku. Například o PD-L1 již víme, že výskyt se mění nejen s místem, ale také časem. Což znamená, že například biopsie provedená nejen z jiného orgánu, ale také z jiné části stejného orgánu, nebo ze stejného místa v jiný čas se může poměrně výrazně lišit. U genomových variant tak významná, a zejména časová variabilita není známa, ale rozdílnost mezi nálezy z primární tkáně a metastáz jsou možné. Tyto rozdíly již byly popsány a vedou se odborné diskuze o tom, na co se při analýze, potažmo léčbě zaměřit a zda se vůbec ještě jedná o jeden shodný typ nádoru, nebo je třeba posuzovat všechny postižené oblasti zvlášť a dle toho léčebný postup případně nakombinovat. [83]

V našem výzkumu bylo detekováno výrazně více ostatních než patogenních variant, což bylo očekávatelným faktem, jelikož diagnostické metody se poměrně rychlým tempem stávají čím dál rozsáhlejší, ale ne všechny nalezené varianty jsou již vědecky popsány. Jejich význam tudíž zůstává zatím nepoznán a mohou, ale i nemusí být patogenní. Téměř třetina nalezených variant se poměrně rovnoměrně vyskytovala jak u respondérů, tak non-respondérů, proto nelze dedukovat korelaci ani s jednou skupinou. Avšak lze poukázat na možný negativní prediktivní význam fúzí či variant na bázi RNA, jelikož u žádného z respondérů nebyl tento typ markerů detekován, naopak byly nalezeny vždy pouze u non-respondérů. Tento trend však doposud nebyl klinickými studiemi potvrzen. V minulých letech již ale byly u onkologických onemocnění některé biologické markery poměrně dobře popsány. Například pro skupinu mutací RAS, kde patří například KRAS, která byla detekována u jednoho z analyzovaných pacientů,

dokonce je již vyvinuta a používána cílená léčba. Stejně tak pro mutaci BRAF, kterou měl detekovanou také jeden pacient a je součástí stejné signální dráhy jako RAS. Oba tyto typy mutací jsou spojovány s horší prognózou onemocnění a v našem výzkumu byly rovněž pozorovány pouze u non-respondérů. Dalším nalezeným markerem u této skupiny pacientů byl NTRK3, přičemž o nádorech s mutací genu typu NTRK, jejichž subtypy jsou rozlišeny číslem 1–3, již nějakou dobu víme a jsou na ně registrovány jiné léčivé přípravky, jelikož léčba imunoterapií nebyla prokázána jako efektivní. Což koresponduje s našimi výsledky, protože tato varianta byla nalezena pouze ve skupině non-respondérů. Významnost dalších rozpoznávaných markerů u obou skupin, jako jsou například EE1A1 a FGFR2, nebyla zatím výrazně prozkoumána. Výsledky získané sekvenováním nové generace mohou významně přispět k pochopení úlohy alterované genetické informace nádorové tkáně v senzitivě nádorových buněk na léčbu imunoterapií. Doposud není přesně definována primární ani sekundární rezistence vůči imunoterapii checkpoint inhibitory. Jsou však již známy jisté genetické změny. Například alterace STK11/LKB1 jako hlavní hnací síla primární rezistence vůči imunoterapii anti-PD-1 u KRAS-mutovaného plicního adenokarcinomu. Někteří pacienti s amplifikací genu MDM2 nebo aberace genu pro EGFR měly výrazné zhoršení klinického stavu a pozoruhodné zvětšení stávající velikosti nádoru (55–258 %) po imunoterapii checkpoint inhibitory. Žádný z těchto markerů však nebyl v našem výzkumu detekován jako dominující u non-respondérů. Je ale zřejmé, že alterace signálních buněčných drah daná genetickými aberacemi má potenciál modifikovat charakter nádorového mikroprostředí ve smyslu jeho imunogenicity. Jelikož disponujeme daty z klinických studií, na jejich základě TMB predikuje efektivitu imunoterapie, byly výsledky měření u našeho souboru pacientů konfliktní, protože ukazovaly spíše opačný trend, což mohlo být způsobeno velikostí pozorovaného souboru. Avšak dominantním úskalím stanovení TMB je i samotná metodika. Ve skutečnosti se zdá, že optimální cut off hodnoty pro samotnou predikci se u různých typů

solidních tumorů liší. Problematiku TMB lze shrnout konstatováním, že somatické mutace genetické informace vytvářejí alterované proteiny v podobě neoantigenů, které mohou poskytovat četné cíle antigen prezentujícím buňkám, a tím zvýšit pravděpodobnost efektivity imunoterapie. [61,76,84-89]

Limitací našeho výzkumu, zejména druhé kapitoly praktické části této práce by mohla být zejména velikost vzorku. Analýzu 12 pacientů bychom zřejmě nemohli považovat za statisticky významnou a sledované korelace mohou být zkresleny právě malými čísly, přesto však mohou již trendy ledacos naznačovat. Primárně bylo zařazeno mnohem větší množství pacientů, hlavním důvodem pro vyřazení velké části z nich bylo zejména to, že nebyl k dispozici vzorek, nebo alespoň ne v dostatečném množství či kvalitě pro provedení NGS. Také v klinické praxi se tento problém nevyskytuje ojediněle, zejména u některých diagnóz jako je například karcinom plic bývá často problém s nedostatkem tkáně použitelné pro důkladnější testování. Většího množství pacientů by mohlo být dosaženo, pokud by se zahrnuli také pacienti léčení i ostatními checkpoint inhibitory, nebo kdybychom mohli čerpat z dat od více pracovišť napříč ČR, případně i za delší časové období, jelikož s bežícím časem je imunoterapií léčeno stále více pacientů pro variabilnější diagnózy. Tento výzkum tedy lze různými způsoby rozšířit a ověřit získané předpoklady pro hledané korelace. [90,91]

4 Závěr

Imunoterapie na bázi checkpoint inhibitorů je významnou léčebnou možností u pacientů s nádorovým onemocněním. Avšak léčebný efekt se projevuje pouze u některých z nich a je stěžejní tyto pacienty umět předem určit. Plošné nasazení imunoterapie není vhodné ani z důvodu možné toxicity a není žádoucí tomuto riziku vystavovat pacienty, u kterých není předpokládán léčebný efekt. Nalézt dokonalé prediktivní biologické markery pro protinádorovou imunoterapii je náročným úkolem, kterým se preklinické i klinické studie již několik let zabývají a zatím jen s dílčími úspěchy. V některých indikacích již je standardem testování například PD-L1 pozitivitu, avšak dokonalým prediktorem není. Jistý prediktivní potenciál, který se v posledních letech hojně ověřuje, je očekáván u markerů jako jsou TMB, MSI, či TILs. Naděje se upíná také ke genetickému testování a hledání konkrétních mutačních variant v nádorových buňkách, které by mohly pomoci předpovědět účinnost checkpoint inhibitorů. Diagnostické metody k přečtení genetické informace jak na úrovni DNA, tak RNA prošly velkým rozvojem. Lze říci, že umíme najít mnohonásobně více různých variant, než jich dokážeme přesně zanalyzovat ve smyslu jejich významu či patogenity.

V našem výzkumu bylo prvním cílem zhodnocení klinických parametrů, včetně komorbidit či snášenlivosti léčby u pacientů léčených nivolumabem nebo pembrolizumabem a porovnat je z daty z klinických studií. Tyto námi pozorované aspekty se ukázaly jako obdobné s doposud publikovanými informacemi, až na jeden nežádoucí účinek – parestézii, který v literatuře spojován s imunoterapií není. V rámci dalšího cíle práce jsme se pokusili rozšířit portfolio studovaných variant genů o případně některé nové či rozšířit nebo potvrdit znalost o těch již známějších, které by mohly mít vliv na účinnost léčby imunoterapií. Byla zvolena metoda NGS, při níž byl pro analýzu DNA použit panel o velikosti 271 genů a pro analýzu RNA panel o 14 genech. Pokusili jsme se mezi detekovanými variantami a léčebnou odpovědí na checkpoint inhibitory nalézt vzájemnou korelaci. Třetina nalezených variant byla pozorována u pacientů bez ohledu

na léčebnou odpověď, ale podařilo se nám najít 15 variant, jež se objevovaly zejména nebo většinou u non-respondérů a 7 variant dominujících naopak u respondérů. RNA varianty a fúze byly nalezeny pouze u non-respondérů, což může naznačovat jejich negativní prediktivní význam. S určitostí nelze tvrdit, že se nám podařilo definovat markery predikující účinnost či naopak neúčinnost léčby imunoterapií. Pro ověření statistické významnosti těchto výsledků je zapotřebí širšího výzkumu se zařazením většího množství pacientů v obou skupinách.

Další bádání by mělo pokračovat v širokém sekvenování různých panelů genů pro nalezení co největšího množství potenciálně prediktivních biomarkerů a porovnat je s léčebnou odpovědí pacientů na protinádorovou imunoterapii. Jelikož nalézt správnou léčbu pro správného pacienta ve správný čas je hlavním předpokladem pro úspěšnou personalizovanou medicínu nádorových onemocnění.

5 Použitá literatura

1. Lakota J, Žuffa M. Protinádorová imunita. *Onkología*. 2015;10(2):111-115
2. Kolektiv autorů. Novotvary 2016 [online]. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. 2016 [cit. 14.1.2020]. Dostupné z <https://www.uzis.cz/sites/default/files/knihovna/novotvary2016.pdf>
3. Yardley D. Nab-Paclitaxel mechanisms of action and delivery. *Journal of Controlled Release*. 2013;170(3):365-372
4. Melichar B. Nádorová imunoterapie: Jsme na úsvitu nové éry? *Klinická Onkologie*. 2015;28(Suppl 4):4S4-4S5
5. Bayer V. An Overview of Monoclonal Antibodies [online]. *Seminars in Oncology Nursing*. 2019;35(5) [cit. 14.1.2020]. Dostupné z <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749208119301093>
6. Seebacher NA, Stacy AE. Clinical development of targeted and immune based anti-cancer therapies [online]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2019; 38(156) [cit. 14.1.2020]. Dostupné z <https://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-019-1094-2>
7. Bartůňková J, Podrazil M, Špíšek R. Imunoterapie v léčbě nádorových onemocnění. *Remedia*. 2015;1:34-38
8. Fučíková J, Bartůňková J, Špíšek R. Význam imunogenní buněčné smrti v protinádorové imunitě. *Klinická Onkologie*. 2015;28(Suppl 4):4S48-4S55
9. Novotný J, Vítek P, Kleibl Z. *Onkologie v klinické praxi*, 2. vydání. Praha: Mladá fronta. 2016. 589s.
10. Abbott M, Ustoyev Y. Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy [online]. *Seminars in Oncology Nursing*. 2019; 35(5) [cit. 14.1.2020] Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.08.002>
11. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases- elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology*. 2014 April;26:16-25
12. Shaaban M, Othman H. Immune Checkpoint Regulators: A New Era Toward Promising Cancer Therapy. *Current Cancer Drug Targets*. 2020;20(6):429-460
13. Klener P, Klener P jr. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. Praha: Grada. 2010. 232s.
14. Kolektiv autorů. *Klinická onkologie. Imunoterapie v onkologii*. Praha: ČLS JEP. 2015;28(Suppl 4). 122S.
15. Vernerová Z. *T-lymfocyty a nádorová imunita*. Olomouc. 2016. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta.
16. Keir ME, Latchman YE. Programmed death-1 (PD-1):PD-ligand 1 interactions inhibit TCR-mediated positive selection of thymocytes. *Journal of Immunology*. 2005;75(11):7372-7379
17. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;125(Suppl.2):33-40

18. Cyster JG, Allen CDC. B cell responses – Cell interaction dynamics and decisions. *Cell*. 2019;177(3):524-540
19. Cerwenka A, Lanier LL. Natural killers join the fight against cancer. *Science* 2018;359(6383):1460-1461
20. Mellman DCI. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*. 2017;541(7637):321-330
21. Nair VS, Elkord E. Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy: a focus on T-regulatory cells. *Immunology and Cell Biology*. 2018;96(1):21-33
22. Monjazeb AM, Hsiao H-H, Sckisel GD, Murphy WJ. The role of antigen-specific and non-specific immunotherapy in the treatment of cancer. *Journal of Immunotoxicology*. 2012;9(3):248-258
23. Pettenati C, Ingersoll MA. Mechanisms of BCG immunotherapy and its outlook for bladder cancer. *Nature Reviews Urology*. 2018;15(10):615-625
24. Leavy O. The birth of monoclonal antibodies. *Nature Immunology*. Milestone 9. 2016;17:S13
25. Hanack K, Messerschmidt K, Listek M. Protein Targeting Compounds, chapter Antibodies and Selection of Monoclonal Antibodies. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2016;917:11-22
26. Vrána A, Fellnerová A, Vránová J. *Imunologie a imunomodulační terapie. Od fyziologie k medicíně – integrace vědy, výzkumu odborného vzdělávání a praxe*. 2011. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. Univerzita Palackého v Olomouci. Cyklus seminářů.
27. Kurosawa N, Yoshioka M. Rapid production of antigen-specific monoclonal antibodies from a variety of animals [online]. *BMC Biology*. 2012;10(80) [cit. 12.8.2020]. Dostupné z <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-80>
28. Mayrhofer P, Kunert R. Nomenclature of humanized mAbs: Early concepts, current challenges and future perspectives. *Humab Antibodies*. 2019;27(1):37–51
29. Lu R-M, Hwang Y-C. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Journal of Biomedical Science* [online]. 2020;27(1) [cit. 12.8.2020]. Dostupné z <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z>
30. Obermannová R. Check point inhibitory v léčbě nádorů horního gastrointestinálního traktu. *Klinická onkologie*. 2017;30(Suppl 3):3S50-53S54
31. Kolektiv autorů. *Modrá kniha České onkologické společnosti*. 26. vydání. Brno: Masarykův onkologický ústav. 2020. 295s.
32. Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood*. 2018;131(1):58–67
33. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *American Journal of Clinical Oncology*. 2016;39(1):98-106

34. Zatloukalová P. Úloha PD-1/PD-L1 signalizace v protinádorové imunitní odpovědi. *Klinická Onkologie*. 2016;29(Suppl 4):4S72-74S77
35. Teng F, Meng X, Kong L, Yu J. Progress and challenges of predictive biomarkers of anti PD-1/PD-L1 immunotherapy: A systematic review. *Cancer Letters*. 2018;414:166-173
36. Tray N, Weber JS, Adams S. Predictive Biomarkers for Checkpoint Immunotherapy: Current Status and Challenges for Clinical Application. *Cancer Immunology Research* 2018;6 (10):1122-1128
37. Kurzrock R, Subbiah V. Precision immunotherapy: Giving the right drug to the right patient at the right time. *HemOnc Today* [online]. 2018 December 10. [cit. 12.8.2020]. Dostupné z <https://www.healio.com/news/hematology-oncology/20181205/precision-immunotherapy-giving-the-right-drug-to-the-right-patient-at-the-right-time>
38. Majerová M. Faktory ovlivňující účinnost protinádorové terapie blokuující signalizační dráhu PD-1/PD-L1 a prediktivní biomarkery této léčby. Praha. 2019. Bakalářská práce. Univerzita Karlova. Přírodovědecká fakulta
39. Miao YR. Neutralizing PD-L1 and PD-L2 Enhances the Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors in Ovarian Cancer. *bioRxiv* [online]. 2020 January 20. [cit. 12.8.2020]. Dostupné z <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.01.19.911941v1>
40. Srbová E. Kdo bude profitovat z imunoterapie? *Terapie* [online]. 2018;6:9-10 [cit. 13.8.2020]. Dostupné z https://issuu.com/ambitmedia/docs/terapie_6_2018
41. Moorcraft SY. Understanding next generation sequencing in oncology: a guide for oncologists. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2015;96(3):563-474
42. Boublíková L. Mikrosatelitová nestabilita (MSI) a mutace genů RAS u kolorektálního karcinomu. *Precizní medicína* [online]. 2019. [cit. 13.8.2020]. Dostupné z <https://www.prolekare.cz/tema/precizni-medicina/detail/mikrosatelitova-destabilita-msi-a-mutace-genu-ras-u-kolorektalniho-karcinomu-107273>
43. Chan TA. Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic. *Annals of Oncology ESMO*. 2019;30(1):44-56
44. Dundr P, Němejcová K. Hodnocení zánětlivé celulizace (tumor infiltrujících lymfocytů) u solidních nádorů. *Klinická Onkologie*. 2017;30(Suppl 3):3S10-13S21
45. Novák P. Tumor infiltrující lymfocyty jako prognostický faktor prognózy kolorektálního karcinomu po radikální chirurgické léčbě. Plzeň. 2014. Disertační práce. Univerzita Karlova. Lékařská fakulta
46. Fessler J, Matson Y, Gajewski TF. Exploring the emerging role of the microbiome in cancer immunotherapy. *Journal for ImmunoTherapy of*

- Cancer [online]. 2019;7(108) [cit. 20.10.2020]. Dostupné z <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0574-4>
47. Ursell LK. Defining the Human Microbiome. *Nutrition Reviews*. 2012;70(Suppl 1):S38–S44
 48. Srbová E. Výzkum naznačuje, že mikrobiom může hrát klíčovou roli při personalizaci imunoterapie. *Terapie* [online]. Kongresy domácí ed; 2020;1-2:14 [cit. 23.10.2020]. Dostupné z https://issuu.com/ambitmedia/docs/terapie_1-2_2020
 49. Zitvogel L, Ma Y, Raoult D. The microbiome in cancer immunotherapy: Diagnostic tools and therapeutic strategies. *Science*. 2018;1366-1370
 50. Sivan A, Corrales L., Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science*. 2015;350(6264):1084-1089
 51. Houdek Š, Buchler T, Kindlová E. Souhrnné srovnání kritérií RECIST 1.1 a iRECIST pro hodnocení odpovědi na onkologickou léčbu solidních tumorů. *Klinická Onkologie*. 2017;30(Suppl 3):3S32-33S39
 52. Schwartz LH, Litiere S, Vries E. RECIST 1.1. - Update and Clarification: From the RECIST Committee. *European Journal of Cancer*. 2016;62:132-137
 53. Litiere S, Collette S, Vries E. RECIST - learning from the past to build future. *Clinical Oncology*. 2017;14:187-192
 54. Somarouthu B, Lee SI, Urban T. Immune-related tumour response assessment criteria: a comprehensive review. *British Institute of Radiology* [online]. 2018;91(1084) [cit. 27.10.2020]. Dostupné z <https://doi.org/10.1259/bjr.20170457>
 55. Petruželka L. Jak, kdy a proč hodnotit léčebnou odpověď na léčbu imunoterapií „check point inhibitory“ při léčbě pokročilých nemalobuněčných plicních karcinomů (NSCLC). *Onkologie*. 2019;13(6):276-281
 56. Wang Q, Gao J, Wu X. Pseudoprogression and hyperprogression after checkpoint blockade. *International Immunopharmacology*. 2018;58:125-135
 57. Frelaut M, Tourneau CL, Borcoman E. Hyperprogression under Immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019;20(11) [cit. 10.2.2021]. Dostupné z <https://doi.org/10.3390/ijms20112674>
 58. S. Champiat, L. Derclé. Hyperprogressive Disease Is a New Pattern of Progression in Cancer Patients Treated by Anti-PD-1/PD-L1. *Clinical Cancer Research*. 2017;23(8):1920-1928.
 59. Kopecký J, Kubeček O. Jak zvládnout nežádoucí účinky imunoterapie. *Onkologie*. 2020;14 Suppl.C):6-12
 60. Saâda-Bouzid E, Defaucheux C. Hyperprogression during anti-PD-1/PD-L1 therapy in patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Annals of Oncology*. 2017;28(7):1605-1611.

61. Kato S. Hyperprogressors after Immunotherapy: Analysis of Genomic Alterations Associated with Accelerated Growth Rate. *Clinical Cancer Research* 2017;23(15):4242-4250
62. Maher VE, Fernandes LL. Analysis of the Association Between Adverse Events and Outcome in Patients Receiving a Programmed Death Protein 1 or Programmed Death Ligand 1 Antibody. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(30):2730-2737
63. Wang DY, Johnson DB, Davis EJ. Toxicities Associated With PD-1/PD-L1 Blockade. *Cancer Journal*. 2018;24(1):36-40
64. Abdel-Wahab N, Alshawa A, Suarez-Almaroz ME. Immunotherapy. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2. vydání. Švýcarsko: Springer [online]. 2017,2018;995:182s [cit. 10.2.2021]. Dostupné z <https://doi.org/10.1007/978-3-030-02505-2>
65. Liu Y-H, Zang X-Y, Wang J-C. Diagnosis and Management of Immune Related Adverse Events (irAEs) in Cancer Immunotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [online]. 2019;120 [cit. 11.2.2021]. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109437>
66. Farmer JR. Testing Immune-Related Adverse Events in Cancer Immunotherapy. *Clinics in Laboratory Medicine*. 2019;39(4):669-683
67. Spain L, Diem S, Larkin J. Management of toxicities of immune checkpoint inhibitors. *Cancer Treatment Reviews*. 2016;44:51-60
68. Souhrn údajů o přípravku KEYTRUDA. [online] [cit. 11.2.2021]. Dostupné z https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/keytruda-epar-product-information_cs.pdf
69. Souhrn údajů o přípravku OPDIVO. [online] [cit. 11.2.2021]. Dostupné z https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/opdivo-epar-product-information_cs.pdf
70. Xu C, Chen Y-P. Comparative safety of immune checkpoint inhibitors in cancer: systematic review and network meta-analysis. *British Medical Journal* [online]. 2018;363:4226. [cit. 11.2.2021]. Dostupné z <https://doi.org/10.1136/bmj.k4226>
71. Y.Wang D, Salem J-E, Cohen JV. Fatal Toxic Effects Associated With Immune Checkpoint Inhibitors. *JAMA oncology*. 2018;4(12):1721–1728
72. Kwok G, Yau TCC, Chie JW. Pembrolizumab (Keytruda). *Human vaccines and immunotherapeutics*. 2016;12(11):2777–2789
73. Palmieri DJ, Carlino MS. Immune Checkpoint Inhibitor Toxicity. *Current Oncology Reports* [online]. 2018;20(9):72. [cit. 11.2.2021]. Dostupné z <https://doi.org/10.1007/s11912-018-0718-6>
74. Presotto EM, Rastrelli G. Endocrine toxicity in cancer patients treated with nivolumab or pembrolizumab: results of a large multicentre study. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2020;43(3)337–345
75. Sato K, Akamatsu H. Correlation between immune-related adverse events and efficacy in non- small cell lung cancer treated with nivolumab. *Lung Cancer*. 2018;115:71-74

76. Federici G, Soddu S. Variants of uncertain significance in the era of high-throughput genome sequencing: a lesson from breast and ovary cancers. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* [online]. 2020;39(46). [cit. 18.2.2021]. Dostupné z <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01554-6>
77. Ventola C.L. Cancer Immunotherapy, Part 3: Challenges and Future Trends. *Pharmacy and Therapeutics*. 2019;42(8):514-521
78. Petruželka, L. Onkologická péče u nemocných vyšší věkové skupiny. [online] *Linkos. Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně*. [cit. 24.3.2021]. Dostupné z <https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/lecba/vekova-specifika/onkologicka-pece-u-nemocnych-vyssi-vekove-skupiny/>
79. Williams R.G, Mackenzie A. Comorbidity in Older Adults with Cancer. *Journal of Geriatric Oncology*. 2016;7(4):249-57.
80. Selby P. The Value and Future Developments of Multidisciplinary Team Cancer Care. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*; 2019:332-340
81. Shadid K. Immunotherapy and targeted therapy-the new roadmap in cancer treatment. *Annals of Translation Medicine* [online]. 2019;7(20):595. [cit. 11.2.2021]. Dostupné z <https://doi.org/10.21037/atm.2019.05.58>
82. Krzyszczuk P. The growing role of precision and personalized medicine for cancer treatment. *Technology (Singapore World Sci)*. 2018;6(3-4):79–100
83. Suda K, Mitsudomi T. Inter-tumor heterogeneity of PD-L1 status: is it important in clinical decision making? *Journal of Thoracic Disease*. 2020;12(5):1770–1775
84. Fumet J-D. Tumour mutational burden as a biomarker for immunotherapy: Current data and emerging concepts. *European Journal of Cancer*. 2020;131:40-50
85. Ma X, Zhang Y. Predictive value of tumor mutation burden (TMB) with targeted next-generation sequencing in immunotherapy for non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Cancer*. 2021;12(2):584–594
86. Samstein RM. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nature Genetics*. 2019;51(2):202-206
87. Skoulidis F. STK11/LKB1 Mutations and PD-1 Inhibitor Resistance in KRAS-Mutant Lung Adenocarcinoma. *Cancer Discovery*. 2018;8(7):822-835
88. Yokota T. Are KRAS/BRAF Mutations Potent Prognostic and/or Predictive Biomarkers in Colorectal Cancers? *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2012;12(2):163-171
89. Touat M. Targeting FGFR Signaling in Cancer. *Clinical Cancer Research* 2015;21:2684-2694
90. Kolektiv autorů. PragueONCO - O převratných novinkách v onkologii. *Medical Tribune* 2020;16(02):B4

91. Ferrara R. Comparison of Fast-Progression, Hyperprogressive Disease, and Early Deaths in Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer Treated With PD-1/PD-L1 Inhibitors or Chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology. Precision Oncology*. 2020;4:829-840

6 Seznam obrázků

Obr. 1 Inhibice a aktivace T buněk.....	10
Obr. 2 Protinádorová imunitní odpověď.....	11
Obr. 3 Typy monoklonálních protilátek užívaných v terapii.....	13
Obr. 4 Kontrolní body imunitní reakce CTLA-4 a PD-(L)1.....	15
Obr. 5 Korelace mutační nálože a objektivní léčebné odpovědi u různých typů nádorů.....	18
Obr. 6 Určení celkové odpovědi dle iRECIST 1.1.....	24
Obr. 7 Pseudoprogrese, Progrese, Hyperprogrese.....	26
Obr. 8 Věkové rozmezí.....	36
Obr. 9 Onkologické onemocnění léčené imunoterapií.....	37
Obr. 10 Onemocnění souběžná s onkologickou diagnózou.....	38
Obr. 11 Užívaná farmakoterapie (mimo imunoterapii) dle ATC skupin.....	40
Obr. 12 Počet cyklů imunoterapie.....	41
Obr. 13 Mutační nálož.....	43
Obr. 14 Počet detekovaných variant.....	44
Obr. 15 Mutační nálož u podskupin pacientů.....	45
Obr. 16 Rozložení počtu variant u podskupin pacientů I.....	46
Obr. 17 Rozložení počtu variant u podskupin pacientů II.....	47
Obr. 18 Počet patogenních variant u podskupin pacientů.....	48
Obr. 19 Počet opakování jednotlivých variant.....	49
Obr. 20 Počet variant převažujících u non-respondérů.....	50
Obr. 21 Počet variant převažujících u respondérů.....	51