

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Pavla Bílková

**Hodnocení imunitních parametrů jako odpověď na léčbu aktivní buněčnou
imunoterapií DCVAC/PCa u pacientů s karcinomem prostaty v I./II. fázi
klinického testování**

Evaluation of key parameters of the immune system in response to the treatment by active
cellular immunotherapy DCVAC/PCa in patients with prostate cancer in I./II. phase of clinical
trial

Diplomová práce

Vedoucí práce: PharmDr. Jitka Palich Fučíková, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 2014

Pavla Bílková

Poděkování

Největší poděkování patří PharmDr. Jitce Palich Fučíkové, Ph.D. bez které by tato práce nevznikla. Děkuji jí velmi za to, že se mě ujala a velmi si vážím toho, že se mnou měla trpělivost a pomáhala mi v průběhu celé tvorby mé diplomové práce. Děkuji za její čas, cenné rady a za to, že mě zasvětila do světa vědy. Za to jí patří moje velká vděčnost.

Děkuji i prof.MUDr. Radku Špíškovi, Ph.D. a prof.MUDr. Jiřině Bartůňkové, DrSc. za odborné konzultace, přínosné rady a připomínky.

Dále bych chtěla poděkovat všem z výzkumného oddělení laboratoře za to, že mi po celou dobu mé práce vytvářeli příjemné přátelské prostředí a vždy mi byli ochotni pomoci.

Velké dík patří i mé rodině a všem mým přátelům za podporu, důvěru a dodávání síly v průběhu celého mého studia. Jen díky jejich pomoci a důvěře jsem zvládla všechna dosavadní náročná období mého studia.

ABSTRAKT

Karcinom prostaty se řadí mezi nejčastější nádorové onemocnění u mužů ve vyspělých zemích. Jeho léčba ve fázi relapsu a v pokročilejším stádiu onemocnění má jen velmi omezené možnosti. Z tohoto důvodu se imunoterapie zdá být novou možnou alternativou v léčbě nádorových onemocnění. Imunitní systém je schopen dle teorie o imunitním dohledu rozpoznávat nádorové buňky a eliminovat je pomocí mnoha mechanismů v raných stádiích onemocnění. Imunoterapie je léčebná metoda, která využívá přirozené imunitní mechanismy k aktivaci protinádorové imunity.

Preklinické i klinické studie protinádorové imunoterapie karcinomu prostaty několika testovaných přípravků, o kterých se zmiňují v úvodu své práce, vykazují velice slibné výsledky. Důkazem toho je první FDA schválený přípravek tohoto typu na trhu s označením Sipuleucel-T a řada probíhajících klinických studií fáze II a III.

V laboratoři, kde jsem vypracovala svoji diplomovou práci, se dlouhodobě zabývají vývojem imunoterapeutického přípravku na bázi dendritických buněk určeného pro terapii karcinomu prostaty s označením DCVAC/PCa.

Cílem mé diplomové práce bylo sledovat imunitní parametry v průběhu imunoterapie DCVAC/PCa u dvou skupin pacientů v různém stádiu onemocnění s karcinomem prostaty. V obou skupinách pacientů jsme zaznamenali přítomnost antigen specifických T lymfocytů proti nádorovým antigenům PSA, MAGE-A1 a MAGE-3. Pouze procento antigen specifických T lymfocytů proti nádorovému antigenu PSA se v průběhu terapie signifikantně zvyšovalo. Zároveň jsme u některých pacientů v séru zaznamenali přítomnost protilátek proti nádorovým antigenům PSA a MAGE-A3, což v obou skupinách koreluje s lepší prognózou pacientů. Sledování imunitních parametrů u pacientů léčených v rámci I./II. fáze klinické studie vakcínou DCVAC/PCa nám přineslo velice cenná data o antigen specifické buněčné i humorální odpovědi. Studie však byla provedena na malé kohortě pacientů bez kontrolní skupiny. Z tohoto důvodu je třeba data považovat za předběžná a je nutné je ověřit v rámci probíhající II. a III. fáze klinické studie.

Klíčová slova: Imunoterapie, karcinom prostaty, T lymfocyty, dendritické buňky, imunitní parametry, nádorové antigeny

ABSTRACT

Prostate cancer is one of the most common types of cancer in men, in developed countries. The treatment options for the advanced and relapsed stage of this disease are very limited. Immunotherapy seems to be a potential new alternative in the treatment of cancer. According to the theory of immune surveillance, the immune system recognizes and eliminates tumor cells by various of mechanisms in the early stages of the disease. Immunotherapy is a treatment method using both innate and adaptive immune mechanisms to activate anti-tumor immunity.

Several clinical and preclinical studies of tumour immunotherapy illustrate several promising immunological principles to treat cancer. This is especially relevant in the case of prostate cancer, as recent approval of sipuleucel-T by the US Food and Drug Administration marks the first antigen-specific immunotherapy approved for cancer treatment.

Scientific team at department of Immunology, 2nd Medical school, hospital Motol and biotechnology company SOTIO is developing a next generation Active Cellular Immunotherapy based on activated dendritic cells, focusing on the treatment of prostate cancer.

The aim of my thesis was to evaluate the presence of antigen specific immune response induced by immunotherapy by DCVAC/PCa in I/II. phase of clinical trial in two groups of prostate cancer patients. In both groups of patients, we noted higher percentage of antigen specific T-cells against tumor antigens PSA, MAGE-A1 and MAGE-A3 compare to healthy donor group. Only percentage of antigen- specific T-cells against tumor antigen PSA was significantly increased during the treatment in tested patients group. We have also recorded the presence of antibodies against tumor antigens PSA and MAGE-A3 in serum samples of several patients, which in both groups correlates with a better prognosis. Monitoring of immunological parameters in patients treated by DCVAC/PCa shows very promising data on antigen-specific cellular and humoral response. However, the study was performed in a small cohort of patients without control group. For this reason, it is necessary to verify the data in the ongoing II and III phases of the clinical trials.

Keywords: Immunotherapy, prostate cancer, T lymphocytes, dendritic cells, immune parameters, tumor antigens

OBSAH

SEZNAM NEJČASTĚJI UŽÍVANÝCH ZKRATEK	8
1 TEORETICKÁ ČÁST	10
1.1 KARCINOM PROSTATY.....	10
1.1.1 <i>Stádia karcinomu prostaty</i>	11
1.1.2 <i>Diagnostika karcinomu prostaty</i>	12
1.1.3 <i>Léčba karcinomu prostaty</i>	13
1.2 IMUNOTERAPIE	16
1.2.1 <i>Role imunitního systému v boji proti nádorovým buňkám</i>	16
1.2.2 <i>Karcinom prostaty jako ideální model pro imunoterapii</i>	17
1.2.3 <i>Klinicky testované přístupy v imunoterapii karcinomu prostaty</i>	17
1.2.3.1 Sipuleucel-T (Provenge)	18
1.2.3.2 GVAX-PCa.....	21
1.2.3.3 Imunoterapie založená na dendritických buňkách.....	24
1.2.3.4 ProstVac VF	29
1.2.3.5 DNA vakcíny	32
1.2.3.6 Pasivní imunoterapie – protilátky	34
1.3 MONITOROVÁNÍ ÚČINNOSTI LÉČBY.....	36
1.3.1 <i>Klinické parametry</i>	36
1.3.1.1 <i>Očekávaná doba přežití</i>	36
1.3.1.2 <i>PSA zdvojovací čas (PSA-DT)</i>	37
1.3.2 <i>Imunologické parametry</i>	38
1.3.2.1 <i>In vivo</i> hodnocení antigenně specifické imunity	38
1.3.2.2 <i>In vitro</i> fenotypické hodnocení antigen specifické buněčné imunitní odpovědi.....	39
1.3.2.3 <i>In vitro</i> funkční analýza antigenně specifické imunitní reakce.....	40
2 PRAKTICKÁ ČÁST	44
2.1 CÍLE PRÁCE.....	44
2.2 MATERIÁL.....	46
2.2.1 <i>Vzorky</i>	46
2.2.2 <i>Připravované roztoky</i>	46
2.2.3 <i>Dodávané roztoky</i>	46
2.2.4 <i>Komerční sady</i>	47
2.2.5 <i>Použité přístroje a pomůcky</i>	48
2.2.6 <i>Software</i>	48
2.3 METODY.....	49
2.3.1 <i>Separace PBMC z periferní krve sledovaných pacientů pomocí gradientové centrifugace a jejich zamražení</i>	49
2.3.2 <i>Detekce antigenně specifických T lymfocytů</i>	50
2.3.2.1 <i>Detekce pomocí průtokové cytometrie</i>	51
2.3.3 <i>Detekce antigen specifických T lymfocytů pomocí metody ELISPOT</i>	53
2.3.4 <i>Detekce protilátek metodou ELISA</i>	55
2.3.5 <i>Stanovení cytokinů pomocí technologie Luminex</i>	56
2.4 VÝSLEDKY	58
2.4.1 <i>Detekce antigen specifických T lymfocytů v periferní krvi</i>	58
2.4.1.1 <i>Skupina pacientů s biochemickým relapsem</i>	58
2.4.1.2 <i>Skupina pacientů s kastročně rezistentním karcinomem prostaty</i>	63

2.4.1.3	Porovnání dvou metod detekce antigen specifických T lymfocytů v periferní krvi	67
2.4.2	<i>Sledování humorální odpovědi – detekce protilátek proti nádorovým antigenům</i>	69
2.4.2.1	Skupina pacientů s biochemickým relapsem	69
2.4.2.2	Skupina pacientů s kastročně rezistentním karcinomem prostaty.....	71
2.4.3	<i>Produkce cytokinů</i>	73
3	DISKUZE	75
4	ZÁVĚR	80
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	82

SEZNAM NEJČASTĚJI UŽÍVANÝCH ZKRATEK

APC	antigen prezentující buňky
BR	biochemický relaps
CRPC	hormon refrakterní metastatický karcinom prostaty (castrate resistant prostate cancer)
CTL	cytotoxické T lymfocyty
CTLA-4	cytotoxický T lymfocytární antigen 4
DC	dendritické buňky
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (antibody dependent cellular cytotoxicity)
DTH	reakce přecitlivělosti pozdního typu
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ELISPOT	Enzyme-Linked ImmunoSorbent sPOT
EMA	evropská léková agentura
FDA	americká léková agentura (food and drug association)
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a monocytů
HLA	lidský leukocytární antigen (human leukocyte antigen)
IFN	interferon
IgG	imunoglobulin G
IL	interleukin
LNCap	název pro lidskou nádorovou prostatickou linii
MAGE-A1	s melanomem asociovaný antigen 1 (melanome associated antigen 1)
MAGE-A3	s melanomem asociovaný antigen 3 (melanome associated antigen 3)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility system)
NK	přirozený zabíječ (natural killer)
PAP	kyselá prostatická fosfatáza
PBMC	periferní mononukleární buňky (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	fosfátový pufr (phospho-saline buffer)

PCR	polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction)
PD-1	programmed cell death protein 1
PolyI:C	polyinosinová-polycytidylová kyselina
PSA	prostatický specifický antigen (prostate-specific antigen)
PSA-DT	PSA zdvojovací čas (PSA doubling time)
PSMA	prostatický specifický membránový antigen
RNA	ribonukleová kyselina
TCR	T buněčné receptory (T cell receptor)
TGF- β	transformující růstový faktor beta
TLR	receptor skupiny Toll (Toll-like receptor)
Tregs	T regulační lymfocyty

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Karcinom prostaty

Karcinom prostaty patří k nejčastějším nádorovým onemocněním u mužů. Ve vyspělých zemích a ve Spojených státech amerických v roce 2013 tvořil 28% všech nově diagnostikovaných nádorů. Společně s karcinomem tlustého střeva a plic patří karcinom prostaty k nejčastější příčině úmrtí na nádorové onemocnění u mužů (Siegel, Naishadham, and Jemal 2013).

Karcinom prostaty nejčastěji postihuje pacienty ve věku od 45 let s největší incidencí po 70. roce života. Jako u většiny nádorových onemocnění je třeba včasná diagnóza pro lepší prognózu onemocnění, které však často probíhá bezpříznakově a pacient jim nevěnuje pozornost. Příčina vzniku karcinomu prostaty zůstává nejasná. Velkou roli hrají rizikové faktory jako je obezita, kouření, věk a rodinná anamnéza (Walsh 2000).

Jedná se o velmi heterogenní onemocnění s různorodým biologickým chováním. Ve většině případů pacienti s včasnou diagnózou přežívají i desítky let bez klinických projevů. Existují však i případy agresivních podob onemocnění, kdy i navzdory léčbě pacienti nemají dobrou prognózu. U pacientů se špatnou prognózou (10-20% pacientů s karcinomem prostaty) se do 5 let rozvine hormon refrakterní karcinom prostaty, pro který už není efektivní léčba. U většiny pacientů (více než 80%) s hormon refrakterním karcinomem prostaty jde již o metastatické onemocnění (kostní a uzlinové metastázy) (Geary and Salem 2013).

Pro určení správné prognózy a zvolení vhodné léčby je důležité znát pokročilost onemocnění. Ke zjištění stádia onemocnění a klasifikace rozsahu nádorového šíření se nejběžněji používá systém TNM (z anglického jazyka se jedná o zkratku pro označení: nádor, uzlina a metastáza). Sleduje se velikost nádoru a rozsah metastáz v regionálních lymfatických uzlinách i vzdálené metastázy. Zásadní roli pro klasifikaci nádoru hraje jeho lokalizace (v prostatě či mimo prostatu). T1 a T2 odpovídají lokalizaci nádoru v oblasti prostaty a T3 a T4 lokalizaci mimo prostatickou tkáň (Heidenreich et al. 2014).

1.1.1 Stádia karcinomu prostaty

Karcinom prostaty, podobně jako většina nádorových onemocnění, prochází různými klinickými stádii (Scher and Heller 2000). Časná stádia onemocnění bývají ve vyspělých zemích často včas identifikována díky vyšší hladině prostatického specifického antigenu (PSA) v séru pacienta při pravidelných zdravotních prohlídkách.

Pokud je karcinom prostaty omezen pouze na oblast prostaty, může být léčen lokální léčbou, kterou v současné době představuje zejména radioterapie či radikální prostatektomie. U velkého procenta pacientů, udává se až 80%, je lokální léčba natolik úspěšná, že se nerozvíjí metastazující onemocnění ani v období následujících 15 let (Pound et al. 1999).

Jestliže se u pacientů po lokální léčbě zachytí opět se zvyšující hladina PSA v séru, označujeme tento stav jako recidivu onemocnění a klinický stav pacientů se označuje jako biochemický relaps (BR) (Freedland and Moul 2007). Právě v tomto stádiu onemocnění podle teorie imunitního dohledu, nejsou v těle zastoupeny v tak hojném počtu nádorové buňky a zároveň nejsou dostatečně vytvořeny imunosupresivní mechanismy (jako je expanze T regulačních lymfocytů, supresivních buněk myeloidního původu a produkce TGF- β) a je proto vhodné zahájit protinádorovou imunoterapii (Drake, Jaffee, and Pardoll 2006). Tito pacienti z imunologického hlediska představují optimální skupinu pro imunoterapeutickou léčbu také z toho důvodu, že imunitní systém je stále velmi funkční a nezatížený probíhající chemoterapií. Faktickým problémem plánování klinických studií u pacientů v této fázi onemocnění je navržení designu studie. Jako nejčastěji hodnocený parametr úspěšnosti léčby se používá kritérium přežití či progresu onemocnění, ty jsou plně uznávané z hlediska lékových regulačních autorit jako je americká léková agentura (FDA) a evropská léková agentura (EMA). U této skupiny pacientů by však klinické studie trvaly neúměrně dlouhou dobu, více než 10 let, jelikož jde o pacienty s dlouhým přežitím. Jako vhodná alternativa se jeví sledování rychlosti vzestupu hladiny PSA (tzv. PSA-DT), tento parametr má však svoje limity a není jednoznačně přijímán jako parametr určující dobrou prognózu pacientů. Zejména z praktických a finančních důvodů je obtížné realizovat klinické studie pro časnou fázi karcinomu prostaty, a proto o účinnosti imunoterapie v této fázi onemocnění víme stále velice málo.

Rozvoj karcinomu prostaty je závislý na přítomnosti androgenů v těle pacienta. Z tohoto důvodu je základem léčby metastatického onemocnění tzv. androgen

deprivační terapie (ADT), které lze dosáhnout farmakologicky či nehormonální alternativou, kterou představuje chirurgická kastrace. U naprosté většiny pacientů léčených ADT nastane progresse onemocnění, kdy nádorové buňky přestanou reagovat na hormonální léčbu. Toto pokročilé stádium onemocnění se nazývá jako hormon refrakterní metastatický karcinom prostaty (CRPC z anglického castrate resistant prostate cancer). V této fázi onemocnění je testována většina imunoterapeutických přípravků zejména díky možnosti sledovat celkové přežití. Průměrná doba přežití těchto pacientů je kolem 16 měsíců, což umožňuje včasné dokončení studií (Tannock et al. 2004). U této skupiny pacientů má však imunoterapie, dle teoretických předpokladů, menší šanci na úspěch díky rozsahu onemocnění, indukci imunosupresivních mechanismů a velkému množství přítomných nádorových buněk (Drake, Jaffee, and Pardoll 2006).

1.1.2 Diagnostika karcinomu prostaty

Mezi diagnostické metody karcinomu prostaty patří fyzikální a laboratorní vyšetření, zobrazovací metody (např. transrektální ultrazvuk nebo magnetická rezonance) a histologické vyšetření (Heidenreich et al. 2011).

Karcinom prostaty je nejčastěji odhalen při laboratorním vyšetření na základě stanovení hladiny PSA ve vzorku krve. PSA je glykoprotein, který je přítomný na epiteliálních buňkách, které lemují prostatu. Tvoří se pouze v prostatických žlázkách a jedná se o orgánově specifický parametr. Patologické stavy prostaty (zánět, infekce či nádorové onemocnění) vedou k úniku PSA do celkového krevního oběhu, kde mohou být detekovány pomocí krevního testu (Drake 2010). Při fyzikálním vyšetření se vyšetřuje prostata per rectum – zhodnocení prostaty pohmatem přes konečník. V případě přítomnosti většího nádoru je prostata tvrdá a uzlovitá. Na základě předchozích vyšetření se pomocí biopsie vedené transrektálním ultrazvukem odebírá několik vzorků tkáně prostaty na histologické vyšetření, které umožní histologické mapování celé prostaty. Mikroskopické vyhodnocení odebraných vzorků je klíčové pro určení diagnózy karcinomu, určení stupně jeho agresivity a případné zahájení léčby. Popisuje se mimo jiné i tzv. Gleasonovo skóre, které vyjadřuje stupeň diferenciaci karcinomu a patří mezi významný prognostický ukazatel. Podle stupně diferenciaci se hodnotí stupeň 1-5. Gleasonovo skóre je potom součtem dvou nejvíce zastoupených

stupňů a nabývá hodnot 2-10 (čím vyšší číslo, tím je nádor agresivnější) (Heidenreich et al. 2011).

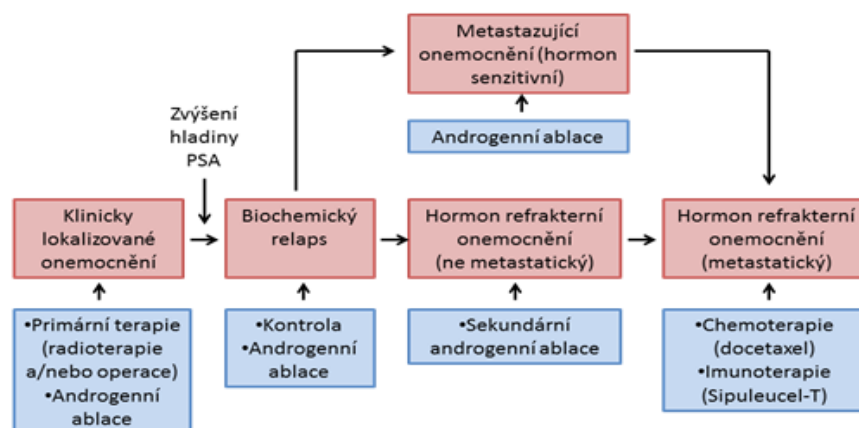
1.1.3 Léčba karcinomu prostaty

Léčba karcinomu prostaty závisí na stádiu onemocnění (obr. 1). Při včasné diagnóze karcinomu prostaty, který je omezený pouze na prostatu, se často volí lokální léčba, mezi kterou se řadí prostatektomie nebo radioterapie. Cílem radikální prostatektomie je chirurgické odstranění celé prostaty a semenných váčků. Po tomto zákroku by měla hladina PSA v krvi klesnout na neměřitelné hodnoty. Bylo prokázáno, že radikální prostatektomie prodlužuje přežití u pacientů s lokalizovaným karcinomem prostaty oproti pouhému pasivnímu sledování. Další možností léčby u lokalizovaného karcinomu prostaty je radioterapie. Radioterapie je vnější ozařování, které využívá k léčbě nádorů ionizující záření. Moderní vysoce konformní techniky umožňují navyšovat dávku a při tom být šetrnější k okolním orgánům, a tak eliminovat případné nežádoucí účinky této léčby. Další léčebnou modalitou je brachyterapie neboli vnitřní ozařování, kdy je radioaktivní zdroj záření zaveden přímo do prostaty (Walsh, DeWeese, and Eisenberger 2007).

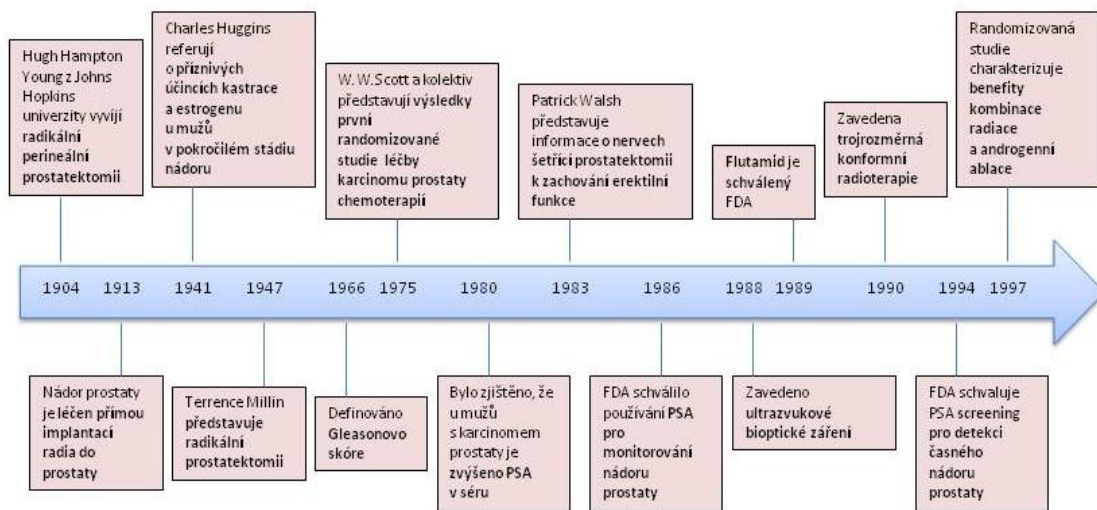
U pacientů, kteří progredují po lokální léčbě nebo je onemocnění diagnostikováno až ve stádiu metastáz, se nasazuje hormonální léčba, která má za cíl navodit útlum androgenů a následně zpomalit nebo dokonce zastavit růst nádorových buněk. Hormonální manipulace je zaměřená na snížení produkce testosteronu nebo zablokování jeho receptorů (androgenní deprivace či blokáda) pomocí bilaterální orchiektomie nebo potlačením hypofyzo-gonadální osy agonisty GnRH (goserelin či leuprorelin) či blokadou androgenových receptorů. Medián do progresse onemocnění při androgenní blokadě je 18-24 měsíců u metastatického karcinomu. Hormonální terapie bývá často kombinována s radioterapií u lokálně pokročilých typů (stádium T3,T4) (Heidenreich et al. 2014). Většina pacientů léčených hormonální léčbou po určité době přechází do stádia, ve kterém nádorové buňky nereagují na terapii a dojde tak k progresi onemocnění. Pro pacienty s hormon refrakterním karcinomem prostaty (CRPC) je pak jedinou možností léčba pomocí chemoterapie. Chemoterapie není v případě karcinomu prostaty hlavní léčebnou metodou a volí se jen tehdy, jestliže předchozí léčebné postupy nebyly úspěšné. Chemoterapie prodlužuje délku života (např. nejčastěji užívaný lék

docetaxel z průměrných 15 na 18 měsíců) a ve většině případů má celou řadu nežádoucích vedlejších účinků (Tannock et al. 2004). Přínosem chemoterapie je však zmírnění bolesti vyplývajících zejména z kostních metastáz, proto se obvykle indikuje zejména u pacientů se symptomy bolesti.

Aktivní imunoterapie představuje v posledních letech méně toxickou metodu v léčbě karcinomu prostaty, která se zkouší zejména jako doplněk ke stávajícím léčebným metodám. Pomocí imunoterapie se aktivuje imunitní systém pacientů k vytváření protinádorové imunitní reakce (Drake 2010). První přípravek tohoto typu byl schválen americkou lékovou agenturou v roce 2010 a zaregistrován pod názvem Sipuleucel-T (obr. 2) (Kantoff, Higano, et al. 2010).



Obrázek 1. Schéma léčby karcinomu prostaty v jednotlivých stádiích onemocnění. Převzato a upraveno z (Drake 2010)



Obrázek 2. Časová osa vývoje léčby karcinomu prostaty. Převzato a upraveno z (Denmeade and Isaacs 2002)

1.2 Imunoterapie

Léčebné postupy podporující nebo využívající obranné mechanismy imunity k působení proti nádoru nazýváme imunoterapií. Imunoterapie se dělí na pasivní a aktivní. Oba přístupy využívají k boji proti nádorovým buňkám specifickou i nespecifickou imunitní odpověď. Pasivní imunoterapie je založena na podávání příjemci velkého množství buněk imunitního systému, protilátek nebo jiných faktorů, které jsou předem připravené. Naopak u aktivní imunoterapie je do léčby aktivně zapojený imunitní systém příjemce. Vakcína musí po aplikaci překonat celou řadu překážek, zejména imunosupresivní působení nádoru nebo vliv předchozí léčby na imunitní systém pacienta. Cílem imunoterapie u pacientů s pokročilým nádorovým onemocněním nemusí být kompletní odstranění nádorových buněk, ale spíše obnova dynamické rovnováhy mezi nádorovými buňkami a imunitní odpovědí (Drake, Jaffee, and Pardoll 2006; Dunn, Koebel, and Schreiber 2006).

1.2.1 Role imunitního systému v boji proti nádorovým buňkám

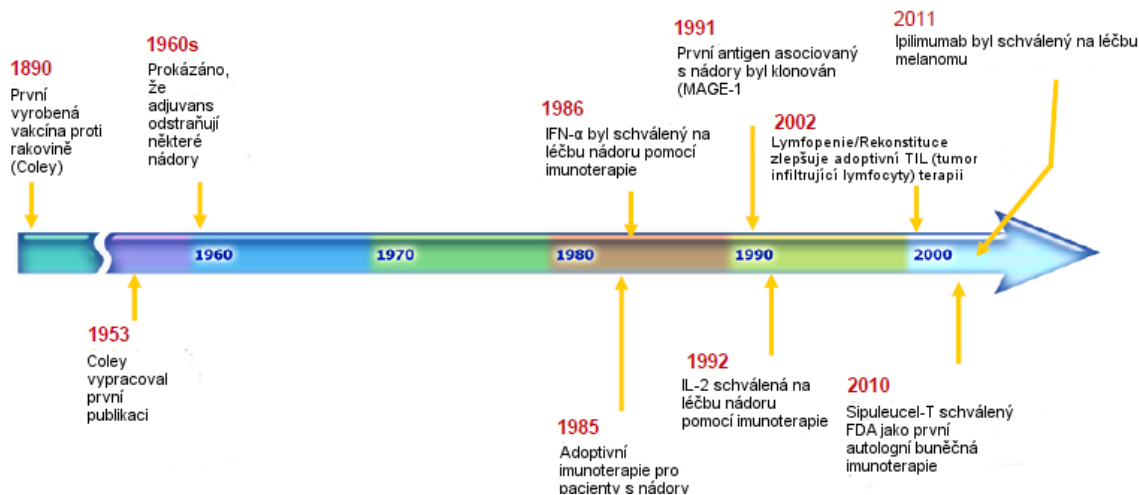
Podle hypotézy Dunna et al. (Dunn, Old, and Schreiber 2004), lze v evoluci nádorového onemocnění rozlišit tři stádia boje imunitního systému proti nádorovým buňkám: odstranění transformované buňky (elimination), nastavení dynamické rovnováhy mezi transformovanou buňkou a imunitním systémem (equilibrium) a únik transformované buňky před kontrolou imunitního systému (escape). V naprosté většině případů dochází k včasnému rozpoznání nádorové buňky imunitním systémem ve fázi eliminace. Nádorové buňky vlivem genetické nestability prochází mnoha mutacemi, čímž dochází ke změně fenotypu. Následně nemohou být rozpoznávány imunitním systémem, a proto unikají kontrole imunitního systému. Nastává tak další stádium nádorové evoluce, stádium dynamické rovnováhy. Stádium dynamické rovnováhy je nejdelší a může mít různé důsledky: 1. kompletní zničení nádorových buněk imunitním systémem, 2. dlouhodobá dynamická rovnováha aktivní imunitní odpovědi s populací nádorových buněk a 3. únik nádorových buněk kontrole imunitního systému a následný rozvoj klinického onemocnění (Dunn, Old, and Schreiber 2004).

1.2.2 Karcinom prostaty jako ideální model pro imunoterapii

Základní podmínkou pro interakci imunitního systému s nádorovými buňkami je existence nádorově specifických povrchových antigenů, které umožňují identifikaci nádorových buněk. Karcinom prostaty exprimuje významné nádorově asociované antigeny (PSA-prostatický specifický antigen, PSMA-prostatický specifický membránový antigen, PAP-kyselá prostatická fosfatáza), které lze v malé míře nalézt i na zdravých buňkách prostatické tkáně. Nejčastěji využívaným antigenem v imunoterapeutických protokolech je prostatický specifický antigen (PSA). Většina pacientů před zahájením imunoterapie podstoupí radikální prostatektomii, a proto je PSA exprimován pouze populací nádorových buněk. Případná exprese PSA na zdravé epiteliální prostatické tkáni proto není překážkou pro léčbu imunoterapií (Kiessling et al. 2008; Williams et al. 2007).

1.2.3 Klinicky testované přístupy v imunoterapii karcinomu prostaty

Imunoterapie karcinomu prostaty prochází v posledních letech velice slibným obdobím (obr. 3). Důkazem toho je první FDA schválený přípravek tohoto typu s označením Sipuleucel-T a řada probíhajících klinických studií fáze II a III. Početné strategie využívané k indukci protinádorové imunitní reakce jsou testovány na různých úrovních klinického testování.



Obrázek 3. Historicky klíčové události v léčbě nádorů pomocí imunoterapie. Převzato a upraveno z <http://www.dendreon.com/>

Imunoterapie založená na buňkách

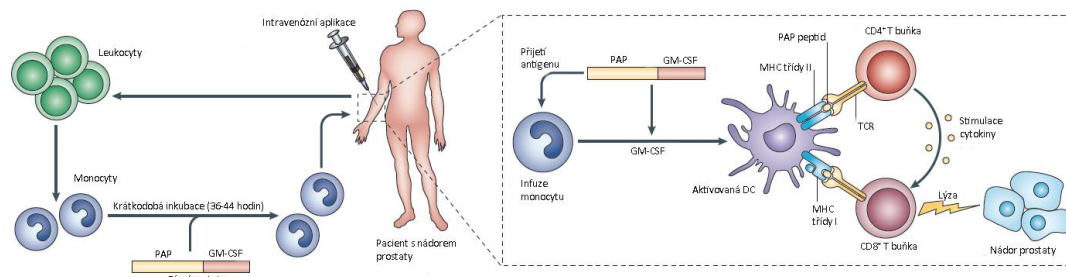
1.2.3.1 Sipuleucel-T (Provenge)

Imunoterapeutický přípravek s názvem Provenge je založen na použití vlastních antigen prezentujících buněk pacienta, které jsou *ex vivo* ošetřené pomocí rekombinantního fúzního proteinu PA2024 (obr. 4). Sipuleucel-T byl v roce 2010 jako první imunoterapeutický přípravek schválen americkým úřadem pro kontrolu léčiv pro klinické použití k léčbě karcinomu prostaty (Cheever and Higano 2011).

Příprava produktu je založena na provedení leukaferézy, z které se pomocí gradientové centrifugace izolují monocyty. Monocyty jsou posléze *ex vivo* inkubovány se specifickým imunogenem PA2024. Protein PA2024 je tvořen fúzí lidského PAP antigenu (prostatic acid phosphatase) s granulocyty monocyty kolonie stimulujícím faktorem (GM-CSF). PAP byl zvolen jako cílový antigen na základě preklinických studií na krysím modelu (Drake 2010).

Imunoterapeutický přípravek je vyráběn individuálně pro každého pacienta (Higano et al. 2009) a je určen k léčbě pacientů s asymptomatickým či minimálně symptomatickým CRPC. Podává se ve třech intravenózních infuzích v dvoutýdenních intervalech. Po aplikaci *ex vivo* ošetřených autologních monocytů do těla pacienta se očekává jejich aktivace na zralé antigen prezentující buňky (APC), jejichž hlavním

úkolem je aktivace PAP specifických CD4 a CD8 T lymfocytů. Tyto aktivované T lymfocyty se dostávají krví do nádorového ložiska, kde zahájí protinádorovou odpověď (Small et al. 2000).



Obrázek 4. Imunoterapie Sipuleucelem-T: V prvním kroku výroby jsou pacientovy monocyty obohaceny pomocí gradientové centrifugace a inkubovány s fúzním proteinem PAP-GM-CSF. GM-CSF má za úkol maturovat přítomné APC buňky, které následně prezentují PAP antigeny na MHC molekulách populaci naivních CD4 a CD8 T lymfocytů. Převzato a upraveno z (Drake 2010)

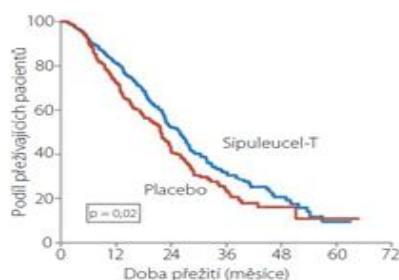
Klinické testování přípravku

Klinické studie fáze I a I/II prokázaly, že podávání Sipuleucelu-T u pacientů s CRPC je obecně dobře tolerováno a vede k indukci PAP-specifických T lymfocytů. U některých léčených pacientů zároveň docházelo ke snížení hladiny PSA v periferní krvi o více než 50% (Small et al. 2000; Burch et al. 2000).

Na základě úspěšně dokončených studií fáze I a I/II byly zahájeny dvě klinické studie fáze III na neobvykle malé skupině pacientů. V letech 2000-2003 bylo celkem 127 a 98 pacientů zařazeno do protokolů D9901 a D9902A. Vstupním kritériem byl metastatický CRPC. Po randomizaci pacienti podstoupili leukaferézu na začátku nultého, druhého a čtvrtého týdne, následovanou infuzí Sipuleucelu-T nebo placebo. Primárním cílem těchto studií bylo sledování doby do progresu nádoru podle kritérií RECIST. Tohoto cíle nebylo ve studii dosaženo, avšak souhrnné výsledky naznačují v prodlouženou dobu přežití pacientů léčených Sipuleucelem-T oproti skupině placebo (23,2 vs. 18,9 měsícům) (Higano et al. 2009).

Zásadní studií, která uvedla přípravek na farmaceutický trh, byla rozsáhlá multicentrická studie fáze III s názvem IMPACT (Immunotherapy for Prostate Adenocarcinoma Treatment). V rámci studie IMPACT bylo v letech 2003-2007 léčeno

512 pacientů s metastatickým CRPC oproti 147 pacientům ve skupině placebo (Kantoff, Higano, et al. 2010; Higano et al. 2009). Primárním cílem provedené studie bylo celkové přežití. Během střední doby sledování 34,1 měsíců zemřelo 61,6% vakcinovaných pacientů a 70,8% ve skupině s placebem. Pacienti, kteří dostávali přípravek Sipuleucel-T měli o 22% nižší riziko úmrtí, bez ohledu na celkové nebo nádorově specifické přežití. Střední doba přežití byla ve sledované skupině delší o 4,1 měsíce - 25,8 vs 21,7 měsíců (obr. 5) (Sonpavde et al. 2012).



Obrázek 5. Graf znázorňující celkové přežití u pacientů s CRPC léčených přípravkem Sipuleucel-T oproti placebo skupině v rozsáhlé klinické studii IMPACT. Převzato a upraveno z (Gulley and Singh 2014)

Slibné výsledky studie IMPACT jsou v rozporu s nedávno publikovanou prací, která uvádí, že výsledky pozorované mezi skupinou léčených pacientů a placebo skupinou mohou být artefaktem plynoucím z věkového rozdílu sledovaných subjektů v obou skupinách. Ze studie vyplývá, že pacienti mladší 65 let z léčby téměř neprofitují (celkové přežití 29,0 vs. 28,2 měsíce). Dalším kontroverzním tématem je fakt, že u pacientů sice dochází k prodloužení přežití, avšak u žádného z nich nenastala objektivní odpověď sledovatelná pomocí radiografických či biochemických metod. Neméně kontroverzní je i cena terapie, v současnosti se v USA pohybuje kolem 93 000 USD za tři cykly imunoterapie (Huber et al. 2012).

V současné chvíli je přípravek Sipuleucel-T zkoušen v dalších klinických studiích fáze II. V klinické studii (NCT00715104) je Sipuleucel-T testován ve skupině pacientů s lokalizovaným karcinomem prostaty před radikální prostatektomií. U těchto pacientů se imunochemicky hodnotí vzorky nádorové tkáně prostaty na přítomnost T lymfocytů. Průběžné výsledky prokázaly zvýšené procento CD4 ne však CD8 T lymfocytů na rozhraní mezi benigní a maligní tkání u vzorku tkáně po radikální prostatektomii.

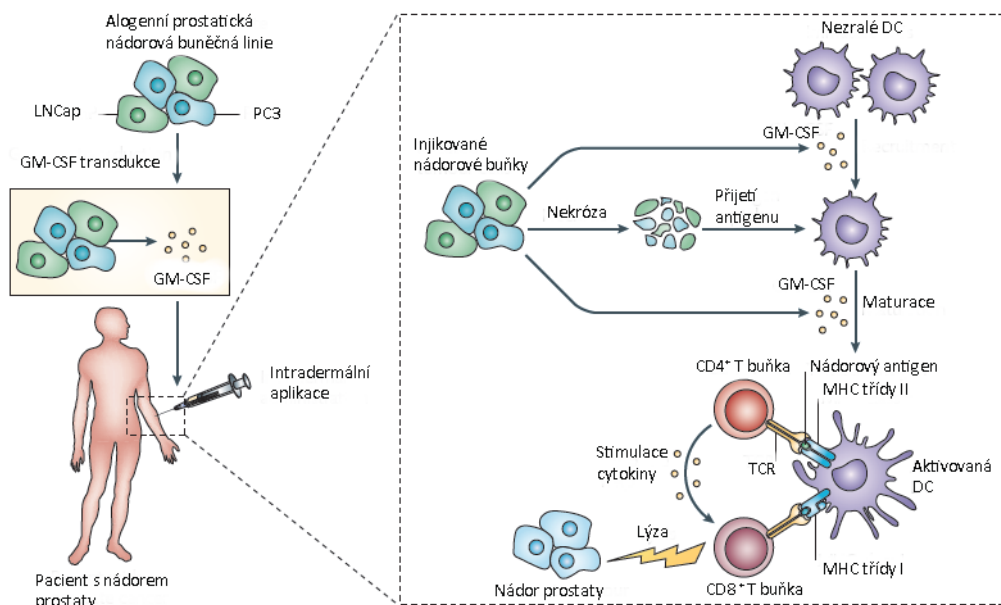
Tyto výsledky naznačují, že by léčba Sipuleucelem-T mohla zvyšovat přítomnost lymfocytů v místě nádoru prostaty (tab. 1) (Geary and Salem 2013).

Dokončené klinické studie	Aktivní a probíhající klinické studie
<p>Fáze III: IMPACT studie: 512 CRPC pacientů, delší doba přežití oproti placebo o 4,1 měsíce</p> <p>Fáze III: 127 CRPC pacientů, delší doba přežití 25,9 versus 21,4 měsíce</p>	<p>Fáze II: NCT00715078</p> <p>Fáze II: NCT00715104</p> <p>Fáze II: NCT00901342</p> <p>Fáze IIIB: NCT00779402</p> <p>Fáze II: NCT01306890</p> <p>Fáze II: NCT01487863</p> <p>Fáze II: NCT01431391</p>

Tabulka 1. Seznam dokončených a probíhajících klinických studií přípravku Sipuleucel-T. Převzato a upraveno z (Geary and Salem 2013)

1.2.3.2 GVAX-PCa

GVAX-PCa představuje polyvalentní imunoterapeutický přípravek k léčbě karcinomu prostaty. GVAX-PCa je směsí dvou alogenních buněčných linií PC3 a LNCap, které jsou geneticky modifikované pomocí adenovirového vektoru k produkci GM-CSF (obr. 6) (Le, Pardoll, and Jaffee 2010). Buňky jsou následně ozářené, aby se zabránilo jejich dalšímu dělení. Po intradermální aplikaci vakcíny, GM-CSF atrahuje do místa aplikace APC pacienta, které následně po migraci do lymfatických uzlin aktivují antigen specifické T lymfocyty (Shi et al. 2006). První klinické studie GVAX-PCa byly založeny na aplikaci autologních nádorových buněk jednotlivých pacientů, což je naprosto jedinečné a náročné schéma výroby imunoterapeutického přípravku. Později byly autologní nádorové buňky, zejména kvůli náročné logistice výroby ve III. fázi klinické studie, nahrazeny nádorovými liniemi LNCap a PC3. Prostatické nádorové linie LNCap a PC3 exprimují řadu nádorových antigenů, jež jsou exprimovány také primárními nádorovými buňkami léčených pacientů. Nádorové linie jsou zároveň transdukovány genem, který kóduje GM-CSF (Drake 2010).



Obrázek 6. Schéma výroby přípravku GVAX-PCa. Alogenní buněčné nádorové linie jsou navrženy tak, aby uvolňovaly GM-CSF, který přitahuje pacientovi APC do místa aplikace. Aplikované buňky nádorových linií projdou procesem buněčné nekrózy a vzniklý buněčný debris je pohlcen populací dendritických buněk, což vede k jejich aktivaci a zahájení imunitní odpovědi. U prostatického přípravku GVAX-PCa jsou použité alogenní buňky nádorových linií LNCap a PC3, tudíž se přípravek spoléhá na zkříženou prezentaci k vytvoření CD8 T lymfocytární protinádorové imunitní odpovědi. Převzato a upraveno z (Drake 2010)

Klinické testování přípravku

I./II. fáze klinické studie, která hodnotila bezpečnost přípravku GVAX-PCa, byla prováděna na pacientech s metastazujícím CRPC bez aplikace chemoterapie. V rámci studie byla vakcína GVAX-PCa aplikována intradermálně ve 12 stimulačních dávkách s odstupem 2 týdnů po dobu 6 měsíců. Pacienti byli rozděleni do tří skupin. První skupina byla léčena pouze radioterapií, druhá skupina kombinací radioterapie s menším počtem modifikovaných nádorových buněk (1×10^8) a vyšším počtem modifikovaných nádorových buněk ve třetí skupině (3×10^8). Zaznamenaný medián přežití první skupiny byl 26,2 měsíce. U skupin, kde byla kombinována radioterapie s imunoterapií, šlo o 24 a 34,9 měsíců. Vakcinační protokol byl dobře tolerován a nebyly zaznamenány žádné autoimunitní projevy toxicity. V navazující klinické studii fáze I/II bylo zahrnuto 80 pacientů s metastazujícím CRPC a bylo prokázáno, že GVAX-PCa je bezpečný

a posilující vysoké dávky (3×10^8) jsou neúčinnější pro prodloužení přežití pacienta (Higano et al. 2008; Geary and Salem 2013).

Z teoretických předpokladů je známo, že v rámci úspěšného imunoterapeutického protokolu je třeba účinně tlumit imunosupresivní působení regulačních T lymfocytů. Jedním způsobem, jak toho dosáhnout, je pomocí protilátek ipilimumabu a nivolumabu namířených proti imunologickým regulátorům jako jsou molekuly CTLA-4 (cytotoxický T lymfocytární antigen 4) a PD-1 (programmed cell death protein 1). Účinnost kombinace GVAX-PCa a ipilimumabu byla zjišťována v rámci další klinické studie fáze I. Tato studie byla prováděna na 28 pacientech s metastazujícím hormon refrakterním karcinomem prostaty bez předchozího podávání chemoterapie. Pacienti dostávali intradermálně GVAX-PCa spolu s ipilimumabem v kombinaci, která byla bezpečná a dobře tolerovaná. Jedním ze sekundárních cílů studie bylo sledovat přežití pacientů. Pacienti léčení GVAX-PCa s ipilimumabem měli střední dobu přežití 29,2 měsíců. Časně studie fáze I a II prokázaly bezpečnost a účinnost GVAX-PCa. V těchto studiích však nebyl GVAX-PCa nikdy aplikován společně s chemoterapií a zároveň ani výsledky studie nebyly porovnány s efektem chemoterapie (van den Eertwegh et al. 2012).

Přes tento významný fakt firma BioSante zahájila v letech 2004 a 2005 na základě úspěchů v I. a II. fázi klinického testování dvě nákladné klinické studie fáze III, ve kterých bylo podávání GVAX-PCa kombinováno s chemoterapií (docetaxel). Do protokolu VITAL-1 vstoupilo 626 pacientů s asymptomatickým metastatickým CRPC. Vakcína byla testována proti skupině pacientů léčených chemoterapií docetaxelem s prednisonem. Po 66 týdnech průběhu studie byla provedena průběžná analýza, která neprokázala efekt vakcíny na celkové přežití oproti docetaxelu (20,7 vs 21,7 měsíců). Druhá studie s názvem VITAL-2 byla založena na předpokladu, že kombinace GVAX-PCa s chemoterapií by mohla prodloužit přežívání pacientů s pokročilým CRPC. Průběžné výsledky studie VITAL-2 však prokázaly vyšší počet úmrtí u pacientů léčených kombinací GVAX-PCa a chemoterapií a studie byla z bezpečnostních důvodů zastavena. Tyto závažné události vedly také k předčasné analýze studie VITAL-1, která ukázala, že probíhající studie pravděpodobně nezvyšuje u sledovaných pacientů dobu přežití a studie byla také předčasně ukončena (Geary and Salem 2013; Drake 2009).

	Dokončené klinické studie
GVAX-PCa	Fáze I/II: bezpečná a prodloužený medián přežití
GVAX-PCa + docetaxel	Fáze III: VITAL-2: ukončena z bezpečnostních důvodů
GVAX-Pca + ipilimumab	Fáze I: bezpečná (až 3mg/kg ipilimumabu)

Tabulka 2. *Dokončené klinické studie přípravku GVAX-PCa. Převzato a upraveno z (Geary and Salem 2013)*

1.2.3.3 Imunoterapie založená na dendritických buňkách

Dendritické buňky (DC) byly objeveny v roce 1970 nositelem Nobelovy ceny Ralphem Steinmanem a jsou považovány za nejúčinnější antigen prezentující buňky. Jejich funkcí je aktivovat naivní nediferencované T lymfocyty, a tím vytvořit primární specifickou imunitní odpověď proti antigenům. Možnost přípravy dendritických buněk *in vitro* umožnila využít tyto buňky k imunoterapii nádorových onemocnění (Banchereau et al. 2000; Butterfield 2013).

Typy DC vakcín podle zdroje nádorových antigenů

K zajištění správného imunoterapeutického efektu je důležité vybrat optimální nádorový antigen. Možností je použít přímo peptidy z nádorových antigenů, exosomy, izolovat RNA z nádorových buněk nebo plazmidy kódující nádorové antigeny. Lze také použít lysát z nádorové buňky nebo celé vhodným způsobem usmrcené nádorové buňky (Drake 2010).

Dendritické buňky pulzované peptidy

Dendritické buňky je možné pulzovat peptidy, které pocházejí ze známých nádorových antigenů a jsou schopné se vázat na specifické MHC molekuly I. třídy. Nevýhoda tohoto postupu spočívá v tom, že zvolený nádorový peptid lze použít pouze u pacientů se specifickou molekulou HLA. Další nevýhodou je, že i při malé změně v expresi nádorového antigenu může nastat únik nádorových buněk imunitnímu dohledu (Špišek et al. 2010). Tento postup byl použit např. v klinické studii fáze I/II, v které

byly nezralé dendritické buňky pulzovány HLA-A2 specifickými peptidy z PSMA (Murphy et al. 1999).

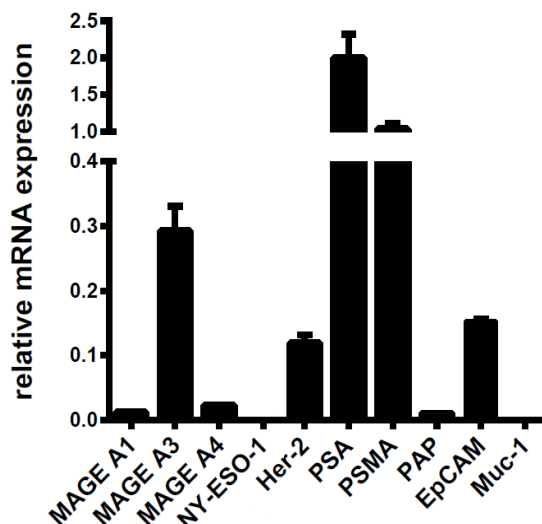
Dendritické buňky pulzované proteiny

V dalším případě se používá pro pulzaci dendritických buněk celý protein. Ten musí být dendritickou buňkou pohlcen, rozštěpen na jednotlivé fragmenty a následně prezentován na povrchu dendritických buněk v kontextu MHC molekul I. a II. třídy (Špíšek et al. 2010). Tento příklad pulzace buněk se využívá i ve výše zmíněném přípravku s označením Provenge firmy Dendreon.

Dendritické buňky pulzované nádorovými buňkami

Dalším zdrojem nádorových antigenů mohou být celé nádorové buňky. Zdrojem nádorových buněk mohou být komerčně dostupné nádorové linie nebo primární nádorové buňky pacienta. Výhodou tohoto způsobu je, že nemusí být přesně specifikovány nádorové antigeny a připravená vakcína může obsahovat i nádorové antigeny, které jsou přímo specifické pro nádor pacienta. V tomto případě jsou apoptotické nebo nekrotické buňky pohlceny nezralými dendritickými buňkami a nádorové antigeny jsou následně prezentovány v kontextu molekul MHC I. i MHC II. třídy (Špíšek et al. 2010).

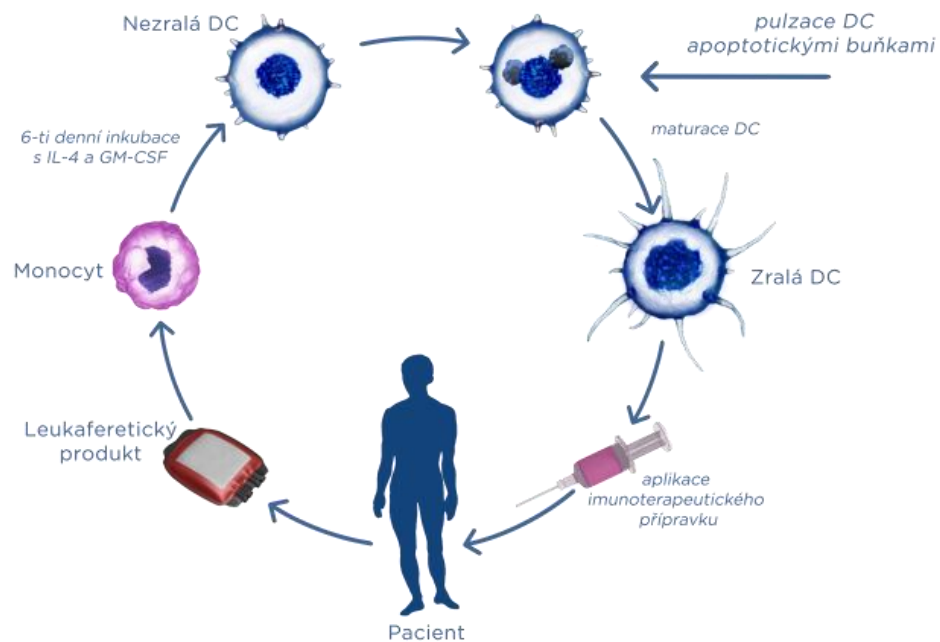
V laboratoři firmy Sotio a.s. se jako zdroj nádorových antigenů používají apoptotické nádorové buňky linie LNCap. Apoptotické nádorové buňky poskytují celé spektrum nádorových antigenů, proti kterým je následně vytvořena protinádorová odpověď. Tato nádorová linie byla vybrána na základě exprese nádorových antigenů metodou kvantitativní Real-time PCR (obr. 7). Mezi nejvíce zastoupené nádorové antigeny exprimované na nádorové linii LNCap patří PSA, PSMA a MAGE-A3. Mezi méně zastoupené, ale klíčové a specifické nádorové antigeny patří PAP a MAGE-A1.



Obrázek 7. Graf relativní exprese mRNA vybraných nádorových antigenů u nádorové linie LNCap.

Protokol vakcinace DCVAC/PCa

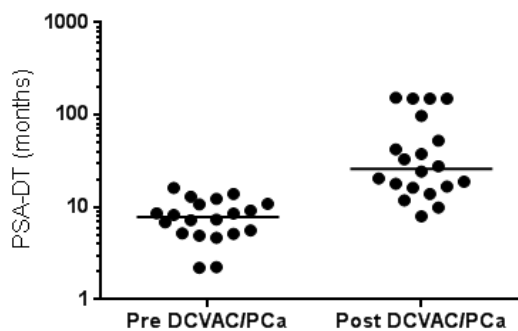
V laboratořích firmy Sotio a.s. je testován léčivý přípravek DCVAC/PCa (obr. 8). Přípravek je založený na podávání velkého množství autologních dendritických buněk, které se připravují z pacientových monocytů izolovaných z leukaferetického produktu. Z monocytů je za přítomnosti cytokinů IL-4 a GM-CSF připraveno velké množství nezralých dendritických buněk, které jsou následně pulzovány apoptotickými nádorovými buňkami (z buněčné linie LNCap) ošetřenými vysokým hydrostatickým tlakem, který vyvolává tzv. imunogenní buněčnou smrt. Usmrcené nádorové buňky z buněčných linií poskytují dendritickým buňkám široké spektrum nádorových antigenů. Dále jsou dendritické buňky aktivovány maturačním činidlem polyI:C (polyinosinová-polycytidylová kyselina), ligand TLR-3 receptoru. Takto připravené zralé dendritické buňky jsou subkutánně aplikovány pacientovi v několika dávkách (min 10 dávek). Po aplikaci léčivého přípravku DCVAC/PCa předpokládáme migraci DC do lymfatických uzlin, kde by mělo docházet k prezentaci nádorových antigenů naivním T lymfocytům. Poté dojde k aktivaci antigen specifických T a B lymfocytů a zahájení protinádorové imunitní reakce (Sotio [online]).



Obrázek 8. Schéma protinádorové imunoterapie pomocí přípravku DCVAC/PCa založeného na bázi dendritických buněk.

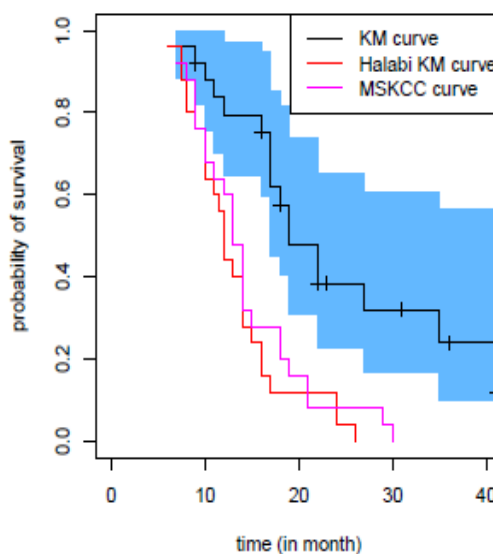
Klinické studie plánované firmou SOTIO

V letech 2010-2013 probíhaly ve FN Motol 2 klinické studie fáze I/II ve kterých byly hodnoceny dvě skupiny pacientů s karcinomem prostaty, pacienti ve stádiu biochemického relapsu a pacienti s hormonálně refrakterním metastatickým karcinomem. Cílem těchto studií bylo prokázat bezpečnost přípravku a schopnost aktivovat protinádorovou imunitní odpověď. Z předběžných výsledků této studie vyplývá, že u pacientů s biochemickým relapsem dochází v průběhu imunoterapie k signifikantnímu prodloužení PSA-DT v porovnání s obdobím před imunoterapií (obr. 9).



Obrázek 9. Graf znázorňující prodloužení PSA-DT u pacientů s biochemickým relapsem léčených přípravkem DCVAC/PCa v porovnání s obdobím před imunoterapií.

U druhé skupiny pacientů s hormonálně refrakterním karcinomem prostaty výsledky studie ukazují prodloužení mediánu přežití oproti Halabi nomogramu (obr. 10).



Obrázek10. Kaplan-Meierova křivka znázorňující prodloužení přežití u pacientů s hormon refrakterním karcinomem prostaty léčených přípravkem DCVAC/PCa v porovnání s Halabi nomogramem.

V laboratořích firmy SOTIO a.s. probíhá v současné chvíli pět klinických studií fáze II pro stovky pacientů v různých stádiích karcinomu prostaty. Čtyři klinické studie fáze II (SPOO1-SPOO4) probíhají od jara 2012 a pátá klinická studie (SPO10) byla zahájena v prosinci 2013.

V těchto studiích jsou zahrnuti pacienti s lokalizovaným karcinomem prostaty po primární radikální prostatektomii (SPOO3) nebo po primární radioterapii (SPOO4). Další skupinou jsou pacienti s diagnostikovaným metastatickým karcinomem prostaty s hormonální léčbou (SPOO2) a pacienti s kastročně-rezistentním karcinomem prostaty (SPOO1). Do klinické studie (SPO10) jsou zahrnuti pacienti s lokalizovaným karcinomem prostaty po primární radikální prostatektomii, u kterých po prvním cyklu léčby přípravkem DCVAC/PCa nedošlo k progresi onemocnění a jsou léčeni druhým cyklem aktivní buněčné imunoterapie.

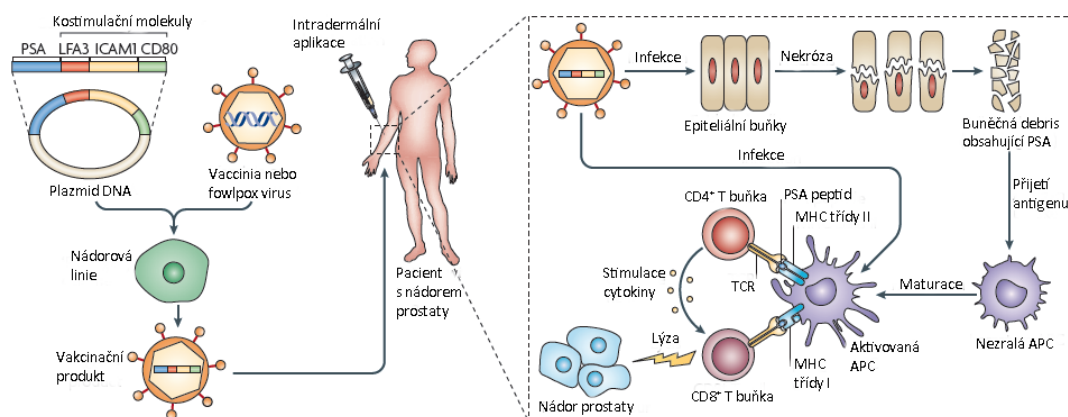
V roce 2014 byla zahájena rozsáhlá globální multicentrická studie fáze III – VIABLE a až výsledky této klinické studie fáze III, do které bude zapojena více než tisícovka pacientů v Evropě i USA mohou přinést statisticky významné výsledky, které určí, zda je imunoterapeutický přípravek účinný a mohl by se tak zařadit do komplexní léčby nádorových onemocnění prostaty (Sotio [online]),(Bartůňková 2013).

Virové vakcíny

1.2.3.4 ProstVac VF

Výhodou virových vektorů používaných pro imunoterapii je jejich snadná příprava, schopnost přenášet velké množství genetického materiálu a řada předchozích klinických zkušeností. Nejznámějším příkladem testovaného vektoru jsou poxviry – virus vaccinie, celosvětově v minulosti používaný jako vakcína proti pravým neštovicím (Arlen, Kaufman, and DiPaola 2005).

ProstVac VF nebo také PSA-TRICOM firmy BavarianNordic je protinádorová imunoterapie karcinomu prostaty založená na modifikovaném viru vaccinie, který byl navržen tak, aby kódoval lidský PSA antigen a kostimulační proteiny CD54 neboli intercelulární adhezivní molekulu1 (ICAM-1), CD58 (LFA3) a CD80, které bývají označovány jako TRICOM - odsud také označení vakcíny PSA-TRICOM (obr. 11) (Hodge et al. 1999; Kaufman et al. 2004). Aby nedocházelo k neutralizaci podaného viru protilátkami dříve, než dojde k expresi nádorového antigenu, používá se strategie semiheterologní vakcinace. Ta je založena na tom, že se po prvotní dávce vakciniového vektoru podává ještě vektor založený na fowlpox viru, který kóduje stejné kostimulační molekuly a nádorové antigeny (Madan et al. 2009).



Obrázek 11. Schéma výroby přípravku ProstVac. Vakcína ProstVac je složena z plasmidové DNA kódující cílový antigen TAA (konkrétně PSA) a tři kostimulačních molekul (LFA3, B7-1 a ICAM1). Plasmidová kazeta je v nosičové buněčné linii vložena do poxviru za vzniku konečného produktu. Virové vektory jsou aplikovány subkutánně, kde infikují pacientovy epitelální buňky, které prodělají buněčnou smrt. Následně je buněčný debris obsahující také cílový antigen PSA pohlcen populací APC a poté prezentován CD4 a CD8 naivním T lymfocytům. Převzato a upraveno z (Drake 2010)

Klinické testování přípravku

Bezpečnost přípravku ProstVac VF byla ověřena v několika nezávislých klinických studiích fáze I (Gulley et al. 2002; Arlen et al. 2007; DiPaola et al. 2006).

Randomizovaná klinická studie fáze II zjistila, že 82 pacientů s minimálně symptomatickým CRPC léčených ProstVac VF vykazovalo prodlouženou dobu přežití (25,1 měsíců) ve srovnání se 40 pacienty, kteří dostávali kontrolní prázdný vektor (16,6 měsíců, $p = 0,006$) (Kantoff, Schuetz, et al. 2010).

V podobné, ne však randomizované klinické studii fáze II, bylo opět prokázáno prodloužení doby přežití pacientů v porovnání s Halabi nomogramem (26,6 měsíců versus 17,4 měsíců) (Gulley et al. 2010). Za zmínku stojí, že prodloužení doby přežití ve studii s vakcínou ProstVac VF bylo patrné zejména u pacientů s méně pokročilou nebo méně agresivní formou onemocnění. Dále se ukázalo, že pacienti s vysokým procentem antigen specifických T lymfocytů proti PSA mají signifikantně vyšší míru přežití (Gulley, Madan, and Schlom 2011).

V další klinické studii fáze I provedené u 30 pacientů s metastazujícím hormon refrakterním karcinomem prostaty byl ProstVac VF kombinovaný s přípravkem ipilimumab (Madan et al. 2012). V průběhu léčby se objevila u některých

pacientů řada nežádoucích účinků (nejčastěji vyrážky, dále kolitida nebo průjem a podobně). Tyto vedlejší účinky byly podobné jako v předchozí klinické studii fáze I, kdy se testovalo podávání samotného ipilimumabu u pacientů s melanomem (Sanderson et al. 2005; Phan et al. 2003). To naznačuje, že aplikace ProstVac VF nezhoršuje vlastní negativní vedlejší účinky aplikovaného ipilimumabu. Medián přežití byl pro všech 30 pacientů, kteří dostávali ProstVac VF navíc s ipilimumabem 34,4 měsíce. Pro větší objasnění pozitivního synergistického účinku těchto dvou přípravků bude třeba provést další randomizované klinické studie.

Řada nově publikovaných vědeckých studií poukazuje na možnost kombinace imunoterapie s chemoterapií (Andersen et al. 2010). Právě další randomizovaná klinická studie fáze II u CRPC pacientů byla provedena s ProstVac VF v kombinaci s chemoterapií docetaxelem. Tato studie potvrzuje, že i u pacientů léčených chemoterapií může podávání imunoterapie zlepšit specifickou protinádorovou imunitní odpověď (Arlen et al. 2006).

Přesto, že je cytokin GM-CSF obvykle podáván společně s vakcínou ProstVac VF není dosud plně znám vlastní efekt cytokinu na přežití pacientů s karcinomem prostaty. Proto se v probíhající globální, randomizované klinické studii fáze III bude sledovat význam současného podávání GM-CSF s ProstVac VF (NCT01322490) (Geary and Salem 2013).

	<i>Dokončené klinické studie</i>	<i>Aktivní a probíhající klinické studie</i>
ProstVac VF	Fáze II: Zvýšená doba přežití oproti kontrolní skupině o 8,5 měsíce Fáze II: Zvýšená doba přežití v porovnání s Halabi nomogramem	Fáze III: NCT01322490 Fáze II: NCT00450463
ProstVac VF + ipilimumab (nivolumab)	Fáze I: Bezpečné a tolerované	
ProstVac VF + docetaxel	Fáze II: Bezpečné. Docetaxel nepotlačuje T lymfocytární specifickou odpověď po vakcinaci	

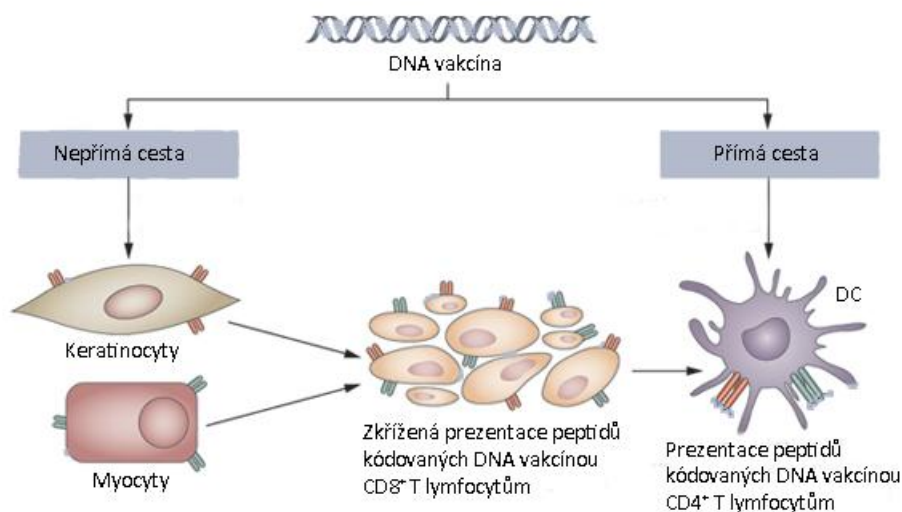
Tabulka 3. *Dokončené a probíhající klinické studie přípravku ProstVac VF a přípravku ProstVac VF kombinovaného s ipilimumabem a docetaxelem. Převzato a upraveno z (Geary and Salem 2013)*

1.2.3.5 DNA vakcíny

DNA-PAP a DNA-PSA

Výhodou DNA vakcín je jejich bezpečnost a snadná výroba, kterou lze zaměřit na jakýkoliv vybraný antigen (obr. 12) (Rice, Ottensmeier, and Stevenson 2008). Naopak nevýhodou DNA vakcín je jejich malá imunogenicita. Proto jsou DNA vakcíny kombinovány s různými prozánětlivými molekulami jako např. agonisty Toll like receptorů nebo GM-CSF jako nespecifickým adjuvans (Tsen et al. 2007).

Několik DNA vakcín již pokročilo do klinického testování fáze I a II, v nichž obsahovaly zejména genetický konstrukt kódující prostatický specifický cílový protein (Ahmad et al. 2012).



Obrázek 12. Antigen kódovaný DNA vakcínou může být předložen pomocí APC T buňkám dvěma různými způsoby – nepřímou a přímou cestou. Nepřímá cesta zahrnuje expresi antigenu na povrchu myocytů a keratinocytů po podání vakcíny podkožně nebo do svalů a následnou prezentaci antigenu pomocí APC populaci CD8 cytotoxickým T lymfocytům pomocí zkřížené prezentace. V rámci přímé cesty je antigen kódovaný DNA vakcínou přepisován přímo v dendritických buňkách, které ho prezentují na MHC molekulách II. třídy CD4 pomocným T lymfocytům. Převzato a upraveno z (Di Lorenzo, Buonerba, and Kantoff 2011)

Klinické testování přípravku

V klinické studii fáze I/II bylo vakcinováno plasmidem kódujícím lidský PAP antigen (pTVG-HP/PAP) 22 pacientů s karcinomem prostaty s biochemickou recidivou bez známek metastáz (McNeel et al. 2009). Pacienti byli očkováni opakovaně plasmidem pTVG-HP/PAP a 200 ug GM-CSF v intervalu 14 dní. Během léčby nebyly zaznamenány žádné významné nežádoucí účinky a u 7 pacientů z 22 došlo ke zdvojení PSA-DT. U 10 pacientů z 22 byly detekovány antigen specifické T lymfocyty proti PAP antigenu. U léčených pacientů však nebyla zaznamenána žádná humorální odpověď. Pozdější analýza dat prokázala korelaci mezi vyšším počtem aplikovaných dávek vakcíny a vyšší pravděpodobností indukce PAP-specifické T lymfocytární odpovědi (Becker et al. 2010).

Další klinická studie fáze I hodnotila aplikaci DNA vakcíny s plasmidem kódujícím PSA. V rámci studie byla hodnocena zejména bezpečnost, proveditelnost a imunogenicita přípravku. Plasmid kódující PSA (pVAX / PSA) byl podáván intradermálně (5 × ve 4 týdenních intervalech) devíti pacientům s CRPC (Pavlenko et al. 2004). Kromě plazmidu PVAX/PSA bylo pacientům aplikováno subkutánně do místa vpichu GM-CSF (40 ug / den, po dobu 3 dnů, počínaje 2 dny před očkovaním) a IL-2 (75 ug / den, po dobu 7 dnů a počínaje prvním dnem po očkovaní). PVAX / PSA byl schopen indukovat PSA specifickou humorální a buněčnou imunitní odpověď (Roos et al. 2005).

	<i>Dokončené klinické studie</i>	<i>Aktivní a probíhající klinické studie</i>
DNA-PAP	Fáze I/II: Bezpečné. 7/22 pacientů mělo zdvojnásobení PSA-DT	Fáze II: NCT01341652 Fáze II: NCT00849121
DNA-PSA	Fáze I: Bezpečné. 2/3 pacientů mělo významně zvýšenou hladinu PSA specifických IFN- γ produkujících T buněk	

Tabulka 4. *Dokončené a právě probíhající klinické studie vakcín založených na DNA.*
Převzato a upraveno z (Geary and Salem 2013)

1.2.3.6 Pasivní imunoterapie – protilátky

Všechny dosud uvedené imunoterapeutické přístupy jsou příkladem aktivní imunizace pacientů s karcinomem prostaty. Příkladem pasivní imunoterapie je aplikace monoklonálních protilátek, zasahující antigeny nádorových buněk nebo nádorového mikroprostředí (např. endoteliální markery) včetně buněk imunitních. Imunoterapie pomocí monoklonálních protilátek představuje běžnou praxi v klinické onkologii.

Ipilimumab

Monoklonální protilátka ipilimumab firmy Bristol-Myers je přípravkem schváleným FDA pro léčbu pokročilého melanomu. Látka se váže na molekulu CTLA-4 na povrchu T-lymfocytů, který svou aktivaci inhibuje jejich aktivitu. Pomocí blokace tohoto antigenu protilátkou ipilimumab dochází k udržení stabilní imunitní odpovědi T-lymfocytů proti nádorovým buňkám.

V klinické studii fáze II bylo 45 pacientů s metastatickým CRPC rozděleno do tří skupin. První skupina pacientů obdržela pouze studovanou látku, druhá skupina bez předchozí chemoterapie byla léčena protilátkou a paliativní chemoterapií a poslední skupinu tvořili pacienti progredující po docetaxelu. Primárním cílem bylo hodnocení účinnosti a bezpečnosti přípravku. U více než 30% pacientů byly zaznamenány nežádoucí autoimunitní reakce, jako je kolitida, hepatitida a exantémy, které byly tlumeny imunosupresivy (Weber 2009). Antigen specifická odpověď proti PSA byla detekována u 22% pacientů. Dvě randomizované studie fáze III zkoumaly vliv ipilimumabu oproti placebo skupině a pacientům po léčbě docetaxelem a vliv ipilimumabu vs. placebo u asymptomatických nebo minimálně symptomatických pacientů bez předchozí chemoterapie (May et al. 2011). Obě klinické studie skončily s negativním výsledkem.

J591

V léčbě karcinomu prostaty jsou zatím všechny studie v časných stádiích a soustředí se především na PSMA, který je ve vysoké míře exprimován na nádorových buňkách karcinomu prostaty. Nejvíce klinických testování bylo provedeno na humanizované PSMA-specifické monoklonální protilátce s názvem J591 (Akhtar et al. 2012). V první fázi klinické studie se testovalo samotné využití monoklonální

protilátky (Morris et al. 2005). Výsledky studie ukazují, že protilátka vyvolává na dávce závislý ADCC účinek, ale aplikace neaktivuje dostatečný protinádorový efekt u pacientů. Z těchto důvodů se současný vývoj s úmyslem zvýšit účinnost preparátu zaměřil na kombinace s jinými látkami. Klinická studie hodnotící ¹⁷⁷Lu-značenou J591 (¹⁷⁷Lu-J591) prokázala dostatečnou biologickou účinnost. Na základě těchto výsledků byly zahájeny další klinické studie fáze I/II (Bander et al. 2005). V klinických studiích je v současné době ¹⁷⁷Lu-J591 podáván v monoterapii (NCT00195039), v kombinaci s docetaxelem (NCT00916123) a v kombinaci s ketokonazolem (NCT00859781). Nekonjugovaný J591 je v současné době ještě testován v kombinaci s nízkou dávkou interleukinu - 2 (NCT00040586) (Schweizer and Drake 2014).

1.3 Monitorování účinnosti léčby

1.3.1 Klinické parametry

Postupné zavádění nových postupů pro léčbu nádorových onemocnění si vyžádalo potřebu jednotných a objektivních kritérií pro hodnocení účinnosti léčby, tato kritéria musejí být jasně definována a schválena Světovou zdravotnickou organizací (WHO). Pro hodnocení účinnosti léčby solidních nádorů se používají kritéria s názvem RECIST (Wolchok et al. 2009). U pacientů s karcinomem prostaty v pozdějším stádiu onemocnění je typickým cílovým ukazatelem doba do progresu nádoru (TTP – time to tumor progression), s progresí stanovenou dle kritérií RECIST (Eisenhauer et al. 2009). Dalším vhodným ukazatelem úspěšnosti léčby je sledování celkové doby přežití pacientů oproti placebo skupině. Pokud taková skupina ve studii chybí, využívá se porovnání oproti prediktivnímu nomogramu. Jako predikce odhadu očekávaného přežití u pacientů bývá nejčastěji používán tzv. Halabiho nomogram, který používá historická data k odhadu doby přežití u pacientů s metastatickým kastročně rezistentním karcinomem prostaty (Halabi et al. 2003). Parametrem u pacientů, kteří se nacházejí v časném stádiu onemocnění, je hodnota PSA zdvojnásobovacího času (PSA-DT z anglického PSA-doubling time), která do určité míry koreluje s progresí onemocnění (Paller et al. 2014).

1.3.1.1 Očekávaná doba přežití

První rozsáhlé randomizované klinické studie fáze II a III na bázi imunoterapeutických přípravků u Sipuleucelu-T (první randomizovaná klinická studie fáze III) (Small et al. 2006) a ProstVacu (studie fáze II) (Kaufman et al. 2004) byly navrženy s TTP jako typickým ukazatelem účinnosti léčby. Avšak ani v jedné uvedené studii nebyl zaznamenán statisticky signifikantní rozdíl v době do progresu nádoru mezi aktivní imunoterapií a placebo skupinou pacientů. Pozorován byl však jasný a signifikantní rozdíl v celkové době přežití mezi pacienty s imunoterapií a placebem.

Na základě těchto a dalších výsledků se předpokládá, že vznik protinádorové imunitní reakce zpomaluje progresi a může vést i ke stabilizaci onemocnění, které se projevuje prodloužením přežití, ale nezpůsobuje zmenšení či vymizení nádorové tkáně.

Na základě těchto zjištění byla vytvořena upravená RECIST a WHO kritéria, která lépe a přesněji hodnotí potenciální klinické výhody imunoterapie (Wolchok et al. 2009). Použití parametru celkového přežití jako jediného pro určení účinnosti klinického hodnocení imunoterapie je omezeno na pacienty CRPC, u kterých je možné v reálném čase 5 let získat informace o sledovaném parametru. Tento fakt je v rozporu s teoretickým předpokladem, že největší šanci na úspěch má imunoterapie u pacientů v časných stádiích onemocnění (Gulley et al. 2010), u kterých by sledování kritéria délky přežití trvalo více než 10 let a představovalo neúměrně drahé a logisticky náročné klinické studie. Z tohoto důvodu je třeba pro tuto skupinu pacientů hledat jiný hodnotící parametr léčby jako je PSA zdvojovací čas.

1.3.1.2 PSA zdvojovací čas (PSA-DT)

Množství prostatického specifického antigenu (PSA) v periferní krvi se řadí mezi jeden z klíčových prognostických faktorů karcinomu prostaty. Jedním z parametrů odvozených od PSA je PSA zdvojovací čas. PSA-DT je čas, během kterého dojde ke zdvojnásobení koncentrace PSA v séru a uvádí se v časových jednotkách (dny, týdny, měsíce nebo roky). Je to jeden z hlavních parametrů, který se používá pro určení prognózy pacientů s diagnostikovaným karcinomem prostaty po radikální prostatektomii a v průběhu hormonální léčby. Dále je čas zdvojení prognostickým ukazatelem pro pacienty ve stádiu hormon refrakterního karcinomu prostaty. Výhodou PSA-DT je nezávislost na základní hladině PSA, proto může být použitý k porovnání jednotlivých pacientů. Hodnota PSA-DT odráží biologické chování nádoru a byla zařazena mezi parametry k aktivnímu sledování. U pacientů s biochemickým relapsem může krátký PSA-DT (méně než tři měsíce) značit vyšší riziko vzniku metastáz a zvýšenou mortalitu oproti pacientům, kteří mají dlouhý PSA-DT (nad 12 měsíců). Z těchto důvodů se tento parametr jeví jako vhodný pro použití v klinických studiích, které hodnotí efekt terapie u pacientů v biochemické recidivě (Paller et al. 2014). V tomto případě jiné parametry, jako například celkové přežití nemohou být k hodnocení klinických studií použity pro dlouhý časový interval a z toho vyplývající ekonomickou náročnost (Špišek et al. 2010).

1.3.2 Imunologické parametry

Mnohé přístupy imunoterapie nádorového onemocnění se v současné době testují v klinických studiích. Pro vyhodnocení účinnosti těchto studií je důležité specifikovat, zda má léčba efekt na rozvoj onemocnění a přispívá ke zlepšení přežití. Klinický dopad vakcíny je možné charakterizovat na základě spektra imunologických vyšetření, které mohou ukázat a zjistit, zda nastala požadovaná protinádorově specifická imunitní reakce. V dnešní době stále převládá názor, že nejdůležitější je hodnocení cytotoxické odpovědi CD8 T lymfocytů (CTL), které přímo rozpoznávají nádorové antigeny v komplexu s MHC molekulami. Neméně důležité je sledovat pomocné T lymfocyty CD4, typu Th1, které jsou pro vznik vlastní CTL nezbytné. Z tohoto důvodu byla optimalizována řada testů, které přesně detekují a kvantifikují T buňky, které zprostředkovávají antigen specifickou imunitní odpověď (T M Clay et al. 2001).

1.3.2.1 *In vivo* hodnocení antigenně specifické imunity

Reakce přecitlivělosti pozdního typu (DTH)

V testu DTH je antigen ve formě rozpustného proteinu aplikován intradermálně pacientovi. Po 48 až 72 hodinách se měří průměr zarudnutí nebo indurace. Pomocné CD4 buňky, které rozpoznají antigen vystavený na APC, zprostředkují antigenní odpověď. Pomocí produkce cytokinů, které zvýší vaskulární permeabilitu, jsou do místa aplikace antigenu přitahovány monocyty a CD4 lymfocyty. Méně často může být podobná reakce zprostředkována pomocí CD8 T lymfocytů (Puccetti et al. 1994). Proteinové antigeny jsou většinou podávány v dávce 10-50 µg v 0,1 ml. Tato nízká dávka se považuje za dostatečně malou, aby neindukovala systémovou imunitní odpověď nebo nezpůsobila nadměrnou toxicitu pro kůži, ale má dostatečnou aktivitu pro vyvolání viditelné místní reakce.

DTH test i přes celou řadu nevýhod zůstává jedním z nejčastějších imunitních testů prováděných v imunoterapeutických studiích (Simons et al. 1999; Schreiber et al. 1999; Salgaller et al. 1998). Pro svoji jednoduchost je používán jako předběžné vyšetření, které určí pacienty, pro které bude potřeba provést podrobnější vyšetření imunitní odpovědi.

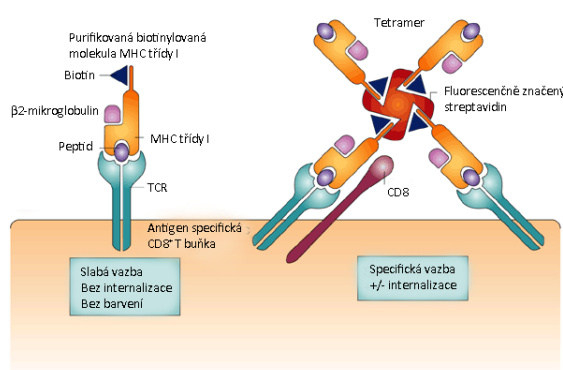
Možnost kožní biopsie z místa indurace u DTH testu může sloužit k přímé detekci antigen specifických T lymfocytů v místě podání vakcíny (Waanders et al. 1997).

1.3.2.2 *In vitro* fenotypické hodnocení antigen specifické buněčné imunitní odpovědi

Tetramery MHC molekul s peptidy

Tetramery představují relativně novou metodu k určení antigen specifických T lymfocytů na průtokovém cytometru pomocí solubilních fluorescenčně značených komplexů MHC-antigen (obr. 13). Dochází tak ke specifické a stabilní vazbě komplexů na T lymfocyty specifické pro navázaný peptid. V rámci cytometrické analýzy jsme schopni charakterizovat populaci CD8 T lymfocytů s konkrétním antigen specifickým TCR receptorem pomocí jednoduchého povrchového barvení (Altman et al. 2011).

Nejčastěji jsou touto metodou charakterizovány periferní T lymfocyty specifické proti CMV a EBV virům. Několik nejnovějších studií také ukazuje využití tetramerů v kvantifikaci antigen specifických CD8 T lymfocytů v imunoterapeutických studiích (Lee et al. 1999; Romero et al. 1998). Tetramery mohou být použity také k izolaci antigen specifických T lymfocytů z periferní krve či lymfatických uzlin pomocí separace buněk na buněčných portech (Dunbar et al. 1998). Tyto antigen specifické T lymfocyty mohou být klonovány *in vitro* pro další eseje a prokázání antigen specifického účinku. Mezi nevýhody této metody patří: a) její využití na stanovení imunitní reakce pouze proti známým antigenům a b) potřeba dále charakterizovat T lymfocyty, které jsou označeny tetramery MHC (na naivní, efektorové, paměťové nebo regulační) (Pittet et al. 1999).



Obrázek 13. Princip využití tetramerů. Tetramery mohou sloužit k detekci antigen specifických T lymfocytů na průtokovém cytometru. Převzato a upraveno z (Klenerman, Cerundolo, and Dunbar 2002)

Analýza používaných variabilních TCR

Charakter antigen specifické imunitní odpovědi může být stanoven počtem T buněk nesoucí konkrétní TCR receptor. Charakter TCR receptoru je možné stanovit pomocí PCR metody. Variabilní regiony α a β řetězců TCR receptorů mohou být detekovány i pomocí průtokové cytometrie s použitím protilátek, které rozpoznávají různé variabilní části jednotlivých rodin α - a β -řetězců na TCR (Mackensen et al. 1997). Metoda má několik omezení, mezi které patří: a) pouze malé množství T buněk exprimuje konkrétní J- α , J- β , V- α , nebo V- β regiony specifické pro určitý antigen, b) reakce na většinu antigenů je velmi rozmanitá a používá více TCR s různými variabilními regiony a c) jelikož nejsou k dispozici protilátky proti všem rodinám variabilních regionů, nemůže být analýza pomocí průtokové cytometrie kompletní (Timothy M. Clay et al. 2001).

1.3.2.3 *In vitro* funkční analýza antigeně specifické imunitní reakce

Funkce T buněk může být monitorována testy, které detekují aktivitu T buněk, jako je proliferace, produkce cytokinů nebo cytotoxicita (Timothy M. Clay et al. 2001).

Detekce produkovaných cytokinů metodou ELISPOT

Test ELISPOT byl původně navržen v roce 1983 pro detekci protilátek (secernujících buněk) a až později byl přizpůsoben pro detekci antigen specifických T buněk. Je založen na principu testu ELISA. Používá se 96-jamková mikrotitrační destička s nitrocelulózovým dnem, která je potažena protilátkou, ke které se vážou sledované cytokiny. Pro detekci antigen-specifických T buněk se používají buď neoddělené PBMC nebo izolované CD8 nebo CD4 T lymfocyty, které se inkubují v jamkách potažených protilátkou spolu s antigenem po dobu 6-48 hodin. Po rozpoznání antigenu T buňky specificky uvolní sledovaný cytokin, který je vázán na protilátku potaženou na dně jamky. Následuje promytí, které odstraní buňky z jamek a uvolněný cytokin je následně zviditelněn enzymem značenou protilátkou a jeho odpovídajícím chromogenním substrátem. Výsledkem je soubor barevných míst, z nichž každé představuje oblast, ve které byla buňka produkující sledovaný cytokin (detailněji popsáno v kapitole materiály a metody) (Timothy M. Clay et al. 2001).

Manuální počítání skvrn je pracné a podléhá lidské chybě, a to zejména v případě, že buňky v jedné jamce produkují více cytokinů nebo v případě, že skvrny jsou malé. Proto bylo zavedeno automatické vyhodnocení ELISPOT desek pomocí počítačových systémů, které vedou k objektivní analýze skvrn a poskytují užitečné parametry (Vaquerano et al. 1998).

Existují různé způsoby, jak analyzovat výsledky z ELISPOTu. Často se odečítá množství IFN- γ produkujícího nestimulovanými T buňkami od T buněk, které reagovaly v přítomnosti antigenu. Výhoda použití metody ELISPOT u protokolů detekce antigen specifických T lymfocytů spočívá v tom, že nestimulované PBMC IFN- γ nevyklučují (Keilholz et al. 2002). Uplatnění metody ELISPOT v monitorování antigen specifických T lymfocytů v rámci protinádorové imunoterapie je stále velmi běžné, i přesto, že neposkytuje jednoznačnou informaci o tom, která buněčná populace daný cytokin produkuje (Timothy M. Clay et al. 2001).

Proliferace lymfocytů

Schopnost T buněk proliferovat po stimulaci antigenem se považuje za průkaz přítomnosti antigen specifických pomocných CD4 T lymfocytů a cytotoxických CD8 T lymfocytů. Test proliferace se často používal v klinických studiích k porovnání odpovědi T buněk před a po imunizaci.

Jako zlatý standart k testování proliferační kapacity se v laboratořích využívá inkorporace 3H-thymidinu tzv. blastická transformace. Po kultivaci 3H-thymidinu se sledovanou populací T lymfocytů lze kvantifikovat proliferační aktivitu buněk po stimulaci testovanými aktivátory pomocí inkorporace 3H-thymidinu do novotvořené DNA proliferujících buněk. Detektorem beta-záření tzv. β -counterem je následně měřena radioaktivita obsažená v jednotlivých buňkách. Výhodou tohoto stanovení je vysoká citlivost, naopak nevýhodou je nutnost vybavení laboratoře pro práci s izotopy, poměrně nákladné přístrojové vybavení a nutnost vztahení výsledků ke zdravé kontrole (Kainthla et al. 2006; Timothy M. Clay et al. 2001).

Mezi novější metody detekce proliferace T lymfocytů jsou řazeny techniky měřitelné na průtokovém cytometru bez negativního vlivu radioaktivity. Mezi tyto metody patří obarvení cytoplazmy nebo membrány dělených buněk pomocí barev CFSE, Oregon Green či CellVue Claret atd. Mezi nejčastěji používané patří carbocyclofluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFDA-SE = CFSE). CFSE je lipofilní

molekula, která proniká do buňky pasivní difúzí. V buňce nastává klíčové štěpení molekuly pomocí esteráz a CFSE se stává silně fluorescenční. Vazba CFSE probíhá kovalentně k volným aminoskupinám na makromolekulách v cytoplazmě. Nenavázaná barvička se z buňky vyloučí. Komplexy CFSE zůstávají v buňce během celého vývoje a dělení, barva může být detekována ještě po 8 týdnech. Polovina CFSE se vždy dostává do dceřiných buněk při každém dělení nebo buněčné fúzi (Givan et al. 1999).

Další technikou aplikovanou na průtokovém cytometru je měření intracelulárních aktivačních markerů jako je Ki-67. Ki-67 je jaderný protein hrající významnou roli v regulaci buněčného dělení a exprimovaný během všech aktivních fází buněčného dělení, kromě klidové fáze. Velkou výhodou použití barvení Ki67 je jednoduché provedení pomocí běžného intracelulárního protokolu a možnost současného barvení dalších antigenů.

Dále lze měřit proliferační kapacitu buněk nepřímo, a to detekcí povrchových molekul, které se při proliferaci exprimují. Jde o molekuly jako je CD69, CD71, CD25 a HLA-DR znak. CD69 je časný aktivační znak, naopak CD25 (alfa podjednotka receptoru pro IL-2), CD71 (transferinový receptor) a HLADR bývají exprimovány až po 72 hodinách (Timothy M. Clay et al. 2001).

Detekce intracelulárních cytokinů

Na myších modelech bylo poprvé dokázáno, že profil produkovaných cytokinů nám umožňuje rozlišovat mezi paměťovými a efektorovými T lymfocyty s rozličnými funkcemi (Paul and Seder 1994). V lidském systému se uplatňuje podobný princip, kdy typický profil Th1 lymfocytů odpovídá produkci cytokinů IL-2, IFN- γ , TNF- α a u Th2 lymfocytů jde o produkci IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 a IL-13 cytokinů. Díky tomuto principu jsme schopni pomocí kombinace intracelulárního s povrchovým barvením na průtokovém cytometru, odlišit jednotlivé podtypy T lymfocytů v krvi, lymfatických uzlinách nebo tkáních a sledovat imunitní odpověď (Maino and Picker 1998). Většina metod spočívá v krátké, a to 4-6 hodinové stimulaci T lymfocytů s použitím antigenu nebo mitogenu a antigen prezentujících buněk nebo PBMC. V posledních 3-4 hodinách je přidáním brefeldinu A, monensinu či GolgiStop zabráněno uvolňování produkovaných cytokinů do extracelulárního prostoru. Po uplynutí doby stimulace se buňky značí protilátkou proti zvolené povrchové molekule jako například CD4, CD8

nebo CD69. Následně se buňky fixují a permeabilizují, aby mohly být obarveny protilátkou proti sledovanému cytokinu (např. IFN- γ nebo IL-2).

Na závěr je vzorek měřen na průtokovém cytometru, který umožní stanovit množství a typ buněk produkujících sledovaný cytokin (Timothy M. Clay et al. 2001). Podobně jako ELISPOT je tato metodika hojně používána při sledování antigen specifické odpovědi u pacientů léčených imunoterapií. Výsledky některých studií ukazují na korelaci určitých markerů imunitní reakce s prognózou pacientů. Ve studii fáze I/II pro maligní melanom (Maraveyas et al. 1999) byla nalezena korelace mezi produkcí cytokinu IL-2 s lepší prognózou sledovaných pacientů. Je překvapivé, že produkce cytokinů IFN- γ nebyla asociována s lepším přežíváním u stejné skupiny pacientů (Scheffold et al. 2000).

Cytotoxické testy

Princip cytotoxických testů spočívá v měření schopnosti CD8 cytotoxických T lymfocytů zabít nádorové buňky. Test zahrnuje inkubaci cílových buněk označených ^{51}Cr s populací T buněk nebo PBMC a následné měření množství ^{51}Cr uvolněného do supernatantu při lýze cílové buňky. Jako cílové buňky je možné použít autologní nádorové buňky. Jelikož je v mnoha případech obtížné získat pro provedení testování autologní nádorové buňky, mohou být použity HLA shodné alogenní nádorové linie, nebo autologní buňky s navázaným nádorovým antigenem. Jako test nespecifické lytické aktivity jsou často používány buňky citlivé k lýze NK buněk jako je nádorová linie K562. Nevýhodou cytotoxického testu je jeho nedostatečná citlivost. V některých případech je obtížné získat dostatečný počet autologních živých nádorových buněk a jsou místo nich používány náhradní cílové buňky, které ale nemusí spolehlivě odrážet situaci *in vivo*. Například nádorové buňky mohou mít sníženou expresi MHC molekul a nemusí být CTL rozpoznány. Náhradní cílové buňky také často exprimují více antigenů a může tak docházet k zabíjení snadněji než s autologními buňkami. Cytotoxické testy jsou náročné a chybí korelace s klinickou odpovědí.

Ve vývoji jsou modifikované cytotoxické testy, které se vykazují jednodušším provedením a aplikovatelností na průtokovém cytometru bez použití radioaktivního ^{51}Cr (Timothy M. Clay et al. 2001).

2 PRAKTICKÁ ČÁST

2.1 Cíle práce

Předcházející teoretická část mé diplomové práce nastiňuje problematiku imunoterapie karcinomu prostaty testované v různých fázích klinických studií. Karcinom prostaty je druhé nejčastější nádorové onemocnění u mužů a představuje ideální model pro imunoterapii. Jeho jedinečnost spočívá zejména v expresi nádorově specifických antigenů, které lze cílit imunoterapií bez většího rizika autoimunitního poškození, a v pomalé progresi onemocnění, které umožňuje dostatek času pro indukci imunitní reakce pomocí imunoterapie. V laboratoři, kde jsem vypracovala svoji diplomovou práci, na Ústavu imunologie 2. LF UK a FN Motol a v laboratořích firmy Sotio a.s., se již více než 15 let zabývají vývojem přípravku na bázi dendritických buněk s názvem DCVAC/PCa. Vakcína je založená na aplikaci velkého množství autologních dendritických buněk pulzovaných nádorovými buňkami linie karcinomu prostaty, ošetřených UV nebo vysokým hydrostatickým tlakem, jako zdrojem nádorových antigenů. Takto připravené a aktivované dendritické buňky jsou aplikovány zpět pacientovi v 3-6 týdenních intervalech po dobu přibližně jednoho roku.

V rámci I./II. fáze klinické studie, která byla uskutečněna v letech 2011-2013 v nemocnici Motol, bylo léčeno téměř 50 pacientů s karcinomem prostaty. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin podle stádia onemocnění. První skupinu představovali pacienti s biochemickým relapsem po radikální prostatektomii. Do této skupiny byli zařazeni pacienti s postupně se zvyšujícími hodnotami PSA. Právě v této skupině pacientů očekáváme na základě teorie o protinádorovém dohledu nejsilnější efekt na průběh onemocnění. Druhou skupinu tvořili pacienti s hormonálně refrakterním karcinomem prostaty. Pacienti již neodpovídají na léčbu hormonálními preparáty a jsou léčeni pomocí chemoterapie (docetaxel), ta je v tomto případě kombinována s imunoterapií vzhledem k předpokladu, že samotná imunoterapie by měla v tomto případě malou šanci na úspěch.

Výsledkem každé klinické studie je hodnocení definovaných parametrů, které se nazývají primární a sekundární cíle a jsou vždy charakterizovány před zahájením klinického testování. V případě studií fáze I je primárním cílem vždy bezpečnost.

Účinnost může být ve fázi klinického zkoušení I/II cílem sekundárním. U nádorových onemocnění se účinnost hodnotí buď dobou do progresu nádoru (TTP z anglického *time to tumour progression*), celkovým přežitím nebo eventuálně určitými laboratorními náhradními parametry. V případě karcinomu prostaty lze použít místo kontrolní skupiny (fáze I/II bývá jednoramenná) srovnání celkového přežití s předpokládaným podle tzv. Halabiové nomogramů. Tato hodnotící kritéria mohou být použita ve skupině pacientů s pokročilým karcinomem prostaty. Avšak ve skupině pacientů s biochemickým relapsem, kteří se nacházejí ve stádiu časně fáze onemocnění, je obtížné hodnotit délku přežívání zejména z logistických a finančně náročných důvodů vyplývajících z délky trvání případné klinické studie. Proto zejména u této skupiny pacientů se k hodnocení účinnosti léčby používá tzv. *surrogate marker* (náhradní ukazatel), kterým je PSA zdvojovací čas. Tento parametr do určité míry koreluje s progresí a prognózou onemocnění.

Pro účinné hodnocení účinnosti imunoterapie však stále chybí charakterizace klíčových biomarkerů používaných k monitorování odpovědi pacientů na léčbu. Výzkum vhodných biomarkerů je vědecky velice aktuální téma, kterému se věnuji ve své diplomové práci.

V diplomové práci jsem sledovala imunitní parametry u dvou skupin pacientů zařazených v I./II. fázi klinického testování. U 23 pacientů ze skupiny biochemický relaps a 23 pacientů ze skupiny hormon refrakterní jsme se zaměřili na sledování těchto imunologických parametrů:

- Detekci antigen specifických T lymfocytů proti nádorovým antigenům PSA, NY-ESO-1, MAGE-A1 a MAGE-A3 pomocí průtokové cytometrie
- Přítomnost IgG protilátek proti nádorovým antigenům PSA a MAGE-A3 pomocí metody ELISA v séru pacientů
- Sledování cytokinového profilu PBMC metodou Luminex - IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-13, IL-17, IL-2, IL-4 a IL-5

2.2 Materiál

2.2.1 Vzorky

- Zamražené PBMC (periferní mononukleární buňky) z krve pacientů s nádorem prostaty zařazených do klinického hodnocení přípravku DCVAC/PCa
- Zamražené sérum pacientů odebrané v jednotlivých časových bodech
- Supernatant odebraný při kultivaci mononukleárních buněk v kompletním médiu

2.2.2 Připravované roztoky

- T lymfocytární médium
kompletní médium RPMI 1640, 10% lidské sérum AB, 1% Glutamax, 1% Pen/strep, 1% NEAA (non-essential amino acid mix), 1% Sodium pyruvate, 0,1% β -ME
- Zamrazovací médium
70% kompletní médium RPMI 1640, 20% FBS, 10% DMSO
- Fixační pufr naředit 1:3 s diluentem (eBioscience)
- Permeabilizační pufr (eBioscience) naředit 1:9 v destilované vodě

2.2.3 Dodávané roztoky

- Dimethyl sulfoxide - DMSO (Sigma-Aldrich)
- Ficoll – Pague (GE Healthcare Bio-Sciences AB)
- Ethanol 96% P.A. (Penta)
- Trypan blue stain 0.4% (Gibco)
- PBS (fosfátový pufr) pH 7,2 (Lonza)
- PBS s 2 mmol/l EDTA (Lonza)
- Brefeldin (Biolegend)
- Anti-CD3 (Exbio)

- ViViD (Invitrogen)
- protilátka proti CD8 PD590 (Exbio)
- protilátka proti CD4 Pe-Cy7 (eBioscience)
- protilátka proti CD3 Pe-Cy5,5 (eBioscience)
- IFN γ FITC (BD biosciences)
- protilátka proti CD154 PE (Becton Dickinson)
- Krysí sérum (Sigma)
- IL-2 APC (Becton Dickinson)
- Trypan blue (Invitrogen)
- CD28/CD49D (Becton Dickinson)
- Premixy peptidů (jpt):
 - CEF - skládá se z 32 peptidů z Cytomegaloviru, Epstein-Barr viru a viru chřipky, s čistotou > 90%
 - PSA – skládá se z 63 peptidů, s čistotou > 70%
 - NY-ESO-1 – skládá se ze 43 peptidů, s čistotou > 70%
 - MAGE-A1 – skládá se ze 75 peptidů, s čistotou > 70%
 - MAGE-A3 – skládá se ze 76 peptidů, s čistotou >70%
- RPMI 1640 (Lonza)
- Penicilin (Lonza)
- Glutamin (Lonza)
- FBS (Biochrom AG)
- MAGE-A3 (lidský) rekombinantní protein (Abnova)
- PSA (lidský) rekombinantní protein (ORIGENE)
- Kozí protilátka proti lidskému IgG s navázanou křenovou peroxidázou (Abcam)

2.2.4 Komerční sady

- MILLIPLEX Map Kit (Millipore)
- kit od Diaclone (IFN- γ ELISpot Kit)
- Antibody Pair Buffer Kit (Invitrogen)

2.2.5 Použité přístroje a pomůcky

- 96 jamkové destičky (Nunclon)
- Automatické pipety (Nichipet EX II)
- Multikanálové pipety 20-200 μ l (Discovery comfort)
- Špičky (Neptune)
- Serologické pipety 2, 5, 10, 25 ml (NUNC)
- Bürkerova komůrka
- Světelný mikroskop (Nikon E TS100)
- Zkumavky (Neptune)
- Centrifuga (Megafuge 16R)
- Termostat (SteriCycle 371)
- V destičky (Nunclon)
- Laminární box (HeraSAFE KS 12-biohazard)
- Průtokový cytometr (BD LSR Fortessa)
- Vortex Mixer PV-1 (P-LAB)
- Luminex® 100™ Instrument
- Vakuový odsávač (NOSHOK)
- Třepačka mikrotitračních destiček PMS-1000 Grant-bio (P-LAB)
- Sunrise – ELISA spektrofotometr TECAN (Schoeller)

2.2.6 Software

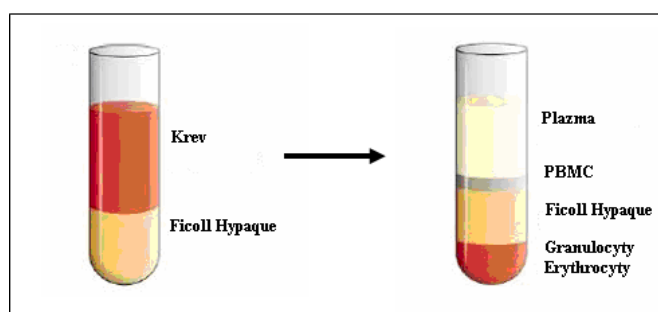
- BD FACSDiva Software (BD)
- FlowJo 8.5.2 (BD)
- GraphPad Prism 6 (Trial)
- Luminex 1.7 software
- Bioreader Software Generation 16
- Magellan 7.1

2.3 Metody

2.3.1 Separace PBMC z periferní krve sledovaných pacientů pomocí gradientové centrifugace a jejich zamražení

Periferní krev sledovaných pacientů jsme naředili v PBS v poměru 1:1 a navrstvili na 15 ml Ficoll-Hypaque v 50 ml zkumavce. Buňky jsme centrifugovali (30 min, 1800 rpm) při laboratorní teplotě. Mononukleární buňky, tj. monocyty a lymfocyty, tvoří prstenec na povrchu vrstvy Ficoll-Hypaque, protože mají nižší hustotu. Buňky s vyšší denzitou, jako jsou erytrocyty a granulocyty, se nachází pod vrstvou Ficoll-Hypaque. Trombocyty zůstávají v séru a kontaminují frakci mononukleárních buněk na povrchu ficollového gradientu. Z tohoto důvodu jsme buňky sebrané z prstence PBMC přenesli do 50 ml zkumavky a třikrát promyli PBS při postupně se snižující rychlosti centrifugace (10 min 1200 rpm, 1000 rpm, 800 rpm), abychom odstranili nežádoucí destičky. PBMC izolované z periferní krve jsme spočítali pomocí Bürkerovy komůrky a zamrazili. Buňky jsme dlouhodobě skladovali v Dewarově nádobě s tekutým dusíkem pro dlouhodobé uchování vzorků.

Veškerou práci s buňkami jsme prováděli v laminárním boxu a sterilních rukavicích, abychom zabránili kontaminaci buněk.



Obrázek 15. Schéma izolace PBMC (periferních mononukleárních buněk) z periferní krve pacientů.

2.3.2 Detekce antigenně specifických T lymfocytů

První den protokolu jsme rozmrazili jednotlivé alikvoty PBMC odebrané během terapie pacienta v několika časových bodech a spočítali jsme pomocí trypanové modři počet živých buněk v Bürkerově komůrce. Na základě výpočtu jsme buňky napipetovali do 96 jamkové U destičky po 0,5M v celkovém objemu 100 μ l T lymfocytárního média na jamku.

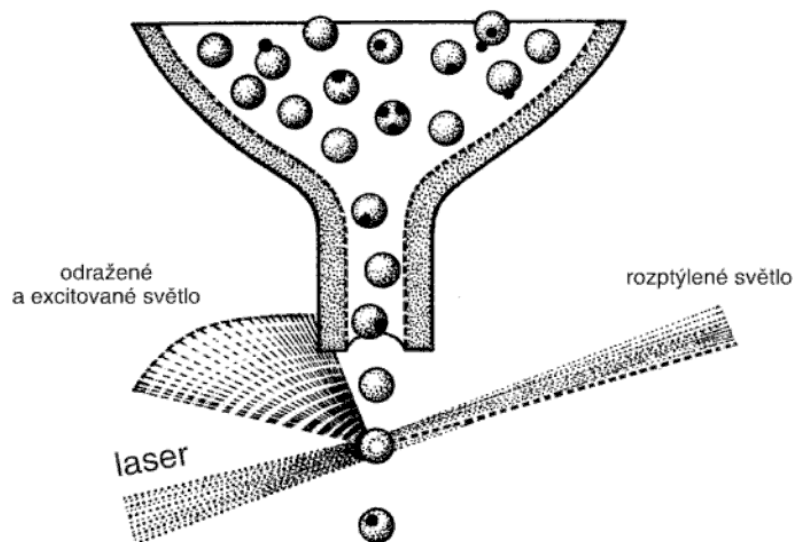
Druhý den protokolu jsme jednu jamku v destičce u dané stanovované dávky každého pacienta ponechali jako negativní kontrolu (bez stimulace) a do zbylých jamek jsme přidali pepmixy PSA, NY-ESO-1, MAGE-A1 a MAGE-A3 v koncentraci 2,5 μ g/ml. Do poslední jamky jsme přidali pepmix CEF, který nám sloužil jako pozitivní kontrola. Pepmixy stimulované PBMC jsme inkubovali po dobu 10 dnů (37°C, 5% CO₂). V průběhu desetidenní kultivace PBMC s pepmixy jsme přidávali 20U/ml IL-2 každý druhý den protokolu. Devátý den jsme buňky restimulovali stejnou směsí pepmixů, jako jsme použili v den 2 protokolu. Po 2 hodinách inkubace s pepmixy (37°C, 5% CO₂) jsme k buňkám přidali brefeldin v koncentraci 1:1000 a inkubovali jsme destičku do druhého dne (37°C, 5% CO₂).

Poslední, desátý den protokolu jsme buňky napipetovali do 96j V destičky, centrifugovali (5 minut, 1500 rpm) a dvakrát promyli PBS. Po promytí jsme buňky povrchově barvili pomocí protilátek anti-CD3 Pe-Cy5,5 1:20, anti-CD4 Pe-Cy7 1:25, anti-CD8 PE-Dy590 1:20 a ViViD 1:200 v PBS inkubovali jsme (20 min, 4°C). Buňky jsme dvakrát promyli PBS a přidali jsme 100 μ l fixačního pufru naředěného 1:3 s diluentem na jamku a inkubovali jsme ve 4°C po dobu 30 minut. Po inkubaci jsme buňky promyli pomocí naředěného permeabilizačního pufru (1:9 do destilované vody) a poté jsme buňky barvili směsí intracelulárních protilátek ředěných v permeabilizačním pufru - anti-IFN- γ FITC 1:100, anti-IL-2 APC 1:30, anti-CD154PE 1:20 a krysí sérum 1:25. Inkubovali jsme opět po dobu 30 minut ve 4°C. Po inkubaci jsme buňky promyli a na závěr resuspendovali ve 100 μ l PBS a změřili na průtokovém cytometru BD Fortessa.

2.3.2.1 Detekce pomocí průtokové cytometrie

Princip průtokové cytometrie

Průtokový cytometr je zařízení, které se používá pro analýzu buněk i jiných částic v suspenzi. Suspenze buněk je v průtokovém cytometru hnána přetlakem skrze malý otvor ve kterém vznikne proud buněčné suspenze, ve kterém jsou buňky uspořádány za sebou. Buněčnou suspenzi protíná laserový paprsek, který se po setkání s částicí odrazí a rozptýlí. V případě, že je na částice navázaná molekula fluorochromů, vyzáří se excitované (fluorescenční) světlo. Díky použití různých protilátek konjugovaných s mnoha fluorochromy lze detekovat současně přítomnost několika antigenů v každé buňce. U každé buňky detektory zaznamenávají bez závislosti na fluorochromech dva parametry – Side scatter (SSc) neboli světlo odražené a Forward scatter (FSc) odpovídající rozptylu světla do malého odraženého úhlu. Všechny tyto parametry jsou zaznamenávány do počítače ve formě matice nazvané listmode data pro pozdější analýzu. Tato data se dále analyzují pomocí speciálního softwaru. Příkladem je program FlowJo, který je používán běžně v naší laboratoři.

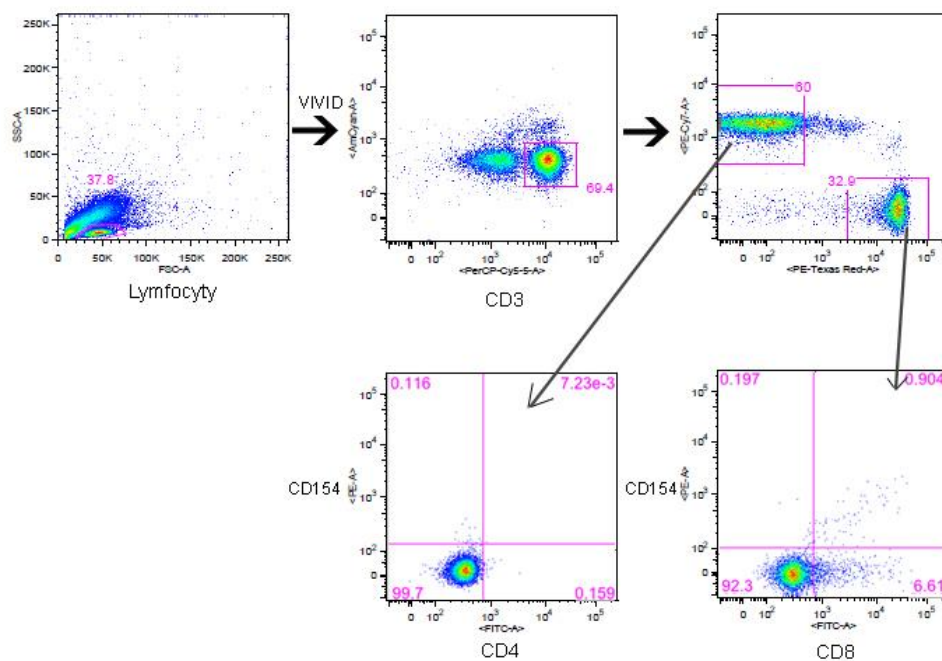


Obrázek 16. Princip průtokové cytometrie. Převzato z (Bartůňková and Paulík 2005)

Analýza dat z průtokového cytometru

Na průtokovém cytometru BD LSR Fortessa jsme změřili přibližně 100 000 buněk, které byly dále hodnoceny pomocí programu FlowJo 8.5.2 a analyzační strategie na obrázku 17.

Pomocí parametru SSC (Side scatter) – granularita a FSC (Forward scatter) – velikost buňky jsme vybrali z celkové populace buněk předpokládanou populaci T lymfocytů. Následně jsme na základě znaku CD3 a ViViD určili populaci živých T lymfocytů a z této populace jsme dále hodnotili populaci pomocných CD4 a cytotoxických CD8 T lymfocytů u kterých jsme dále sledovali intracelulární produkci IFN- γ (FITC).

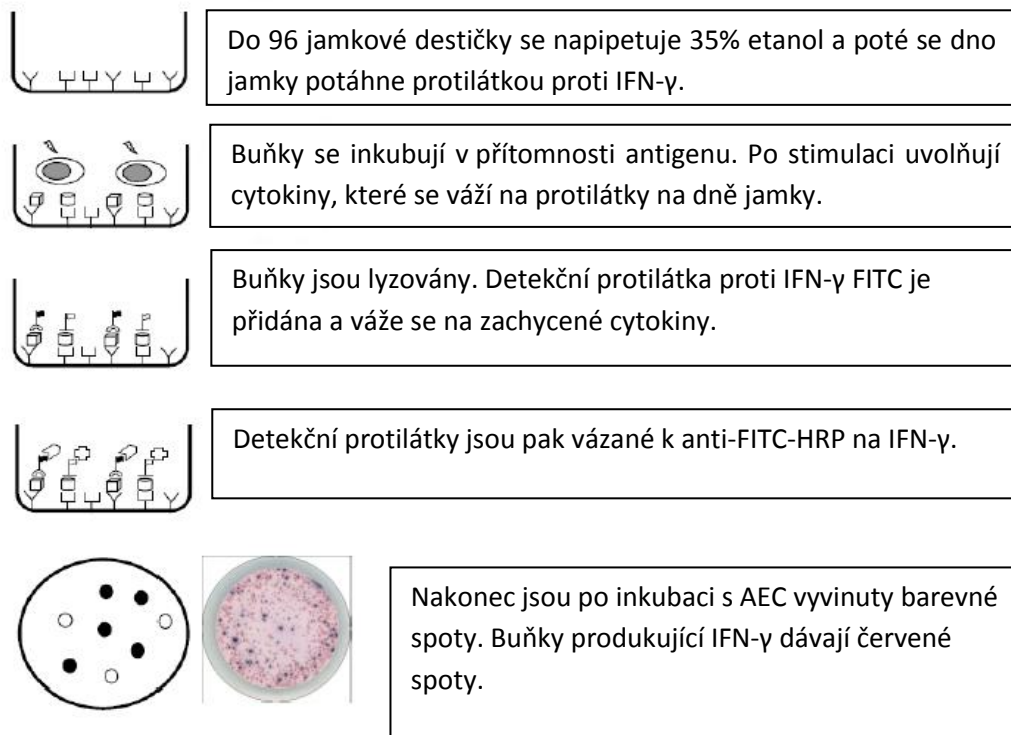


Obrázek 17. Analyzační strategie dat z průtokového cytometru.

2.3.3 Detekce antigen specifických T lymfocytů pomocí metody ELISPOT

Alternativní metodou k určení antigen specifických T lymfocytů je metoda ELISPOT. První den protokolu jsme do 96 jamkové destičky, která je součástí komerčního kitu, napipetovali 25 μ l 35% ethanolu a poté jsme inkubovali po dobu 30 sekund při laboratorní teplotě. Po inkubaci jsme destičku 3x promyli 100 μ l PBS a následně jsme přidali protilátku proti IFN- γ 1:100 v PBS. Destičku s protilátkou jsme inkubovali přes noc při teplotě 4°C. Druhý den jsme destičku 1x promyli 100 μ l PBS na jamku a následně 2 hodiny blokovali pomocí 100 μ l RPMI s 10% FBS při laboratorní teplotě. Do jamek potažených protilátkou proti IFN- γ jsme pipetovali rozmražené PBMC pacientů v množství 0,5M/jamku. Destičku jsme inkubovali po dobu 36 hodin při 37°C a 5% CO₂, důležité bylo po celou dobu inkubace s destičkou nehýbat.

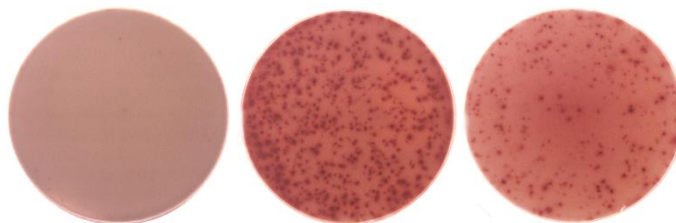
Poslední, čtvrtý den pokusu jsme do destičky napipetovali 100 μ l PBS s 0,05% roztokem Tweenu a inkubovali 10 minut při teplotě 4°C. Po inkubaci jsme destičku 3x promyli 100 μ l PBS s 0,05% roztokem Tweenu a přidali jsme biotinylovanou detekční protilátku ředěnou v PBS s 1% BSA 1:100 na jamku, a poté jsme destičku inkubovali 1,5 hodiny při laboratorní teplotě. Po inkubaci jsme destičku 3x promyli 100 μ l PBS s 0,05% roztokem Tweenu. Přidali jsme 100 μ l HRP-FITC (horseradish peroxidase-Fluorescein isothiocyanate), který jsme ředili 1:500 v PBS s 1% BSA a destičku jsme inkubovali 1 hodinu při laboratorní teplotě. Destičku jsme 3x promyli 100 μ l PBS s 0,05% roztokem Tween. Do destičky jsme napipetovali 100 μ l chromogenního substrátu AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) a vyvolávali jsme reakci po dobu 5-20 minut při laboratorní teplotě. Substrát AEC je specificky štěpen pomocí HRP. Výsledkem této reakce je tvorba červených spotů, které odpovídají buňkám produkujícím detekovaný IFN- γ . Na závěr jsme destičku opláchli destilovanou vodou a po usušení v lednici jsme destičku měřili na ELISPOT readeru Bioreader 6000 E- α .



Obrázek 18. Zjednodušené schéma detekce antigen specifických T lymfocytů pomocí metody ELISPOT.

Princip a analýza dat pomocí metody ELISPOT

Metoda ELISPOT slouží k identifikaci a stanovení počtu buněk produkujících cytokiny. Na jejím konci nastává vizualizace sekrečního produktu jednotlivých aktivovaných nebo reagujících buněk (obr. 19). Každé místo, které vizuálně vznikne při testu, představuje jednu reaktivní buňku. Test ELISPOT nám poskytuje kvalitativní a kvantitativní analýzu.



Obrázek 19. Ukázka jamek s negativní kontrolou, pozitivní kontrolou a vzorkem.

2.3.4 Detekce protilátek metodou ELISA

K detekci protilátek pomocí metody ELISA jsme používali roztoky z kitu Antibody Pair Buffer kit od Invitrogen.

Vždy den předem jsme potáhli dno jamek 96 jamkové destičky antigenem PSA nebo MAGE-A3. Do destičky jsme pipetovali 50 μ l antigenu v uhličitanovém pufru na jamku v koncentraci 1 μ g/ml a poté jsme destičku inkubovali přes noc při 4°C.

Druhý den jsme destičku 3x promyli promývacím pufrům (Wash buffer) a přidali jsme na blokování nespecifických vazeb 200 μ l blokovacího pufru (Assay buffer) na jamku a destičku jsme inkubovali po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Po inkubaci jsme destičku 3x promyli promývacím pufrům a přidávali jsme 100 μ l séra konkrétních pacientů na jamku v duplikátech a dvou koncentracích 1:100 a 1:200. Pokud jsou v séru přítomné protilátky proti konkrétním nádorovým antigenům, mělo by dojít k vazbě na antigen na dně jamky.

Destičku se vzorky jsme inkubovali po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě a na třepačce. Destičku jsme promyli 5x promývacím pufrům a poté jsme přidali 100 μ l detekční sekundární protilátky IgG s navázaným enzymem křenuv peroxidáza ředěné 1:50000 v blokovacím pufru. Destičku jsme po přidání sekundární protilátky inkubovali po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Po inkubaci jsme destičku 7x promyli promývacím pufrům a následně jsme přidali 100 μ l substrátu TMB (3,3', 5,5'-tetramethylbenzidin) na jamku na zviditelnění reakce. Destičku jsme inkubovali po dobu 20 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci jsme reakci zastavili přidáním 100 μ l kyseliny chlorovodíkové a destičku jsme měřili na ELISA readeru při vlnové délce 450 nm.

Jako negativní kontroly jsme používali sérum zdravých dárců, od kterých jsme potom stanovovali pozitivitu nebo negativitu patientských vzorků.

2.3.5 Stanovení cytokinů pomocí technologie

Luminex

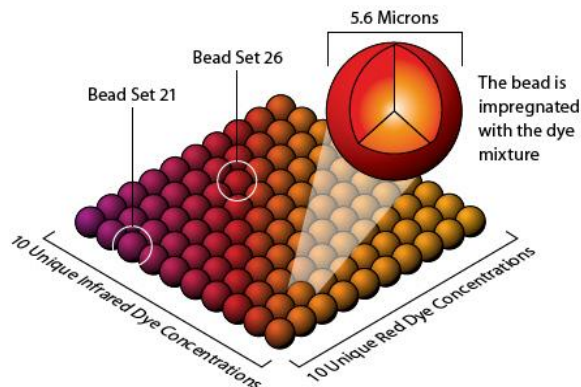
Na stanovení cytokinového profilu pomocí metody Luminex jsme používali MILLIPLEX MAP kit od MILLIPORE. Při stanovení jsme se drželi postupu, který je uveden v kitu.

Nejprve jsme do 96 jamkové destičky dodávané společně s kitem napipetovali 200 μ l PBS a nechali destičku 10 min na třepačce při laboratorní teplotě. PBS jsme odstranili pomocí vakuové odsávačky. Poté jsme do příslušných jamek destičky přidali 25 μ l standardů (ze kterých se počítá kalibrační křivka) nebo kontrol a 25 μ l kultivačního media. Do jamek určených pro vzorky jsme napipetovali 25 μ l vzorku a 25 μ l Assay Bufferu. Do všech jamek jsme poté přidali 25 μ l mixu kuliček pro jednotlivé cytokiny. Destičku jsme inkubovali po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě na třepačce. Po inkubaci jsme roztok odstranili pomocí vakuové odsávačky a destičku jsme 2x promyli promývacím pufrem. Poté jsme do každé jamky přidali 25 μ l detekční protilátky a inkubovali jsme 30 minut na třepačce při laboratorní teplotě. Poté jsme přidali 25 μ l Streptavidin-phycoerythrinu a následovala další 30 minutová inkubace při laboratorní teplotě na třepačce. Roztok jsme odstranili vakuovou odsávačkou. Na závěr jsme destičku 2x promyli promývacím pufrem a přidali jsme 150 μ l hemasolu do každé jamky a 5 minut před měřením dali destičku na třepačku. Měřili jsme destičku na přístroji Luminex® 100TM Instrument. Naměřená data byla vyhodnocena softwarem, který je součástí celého systému.

Princip metody Luminex

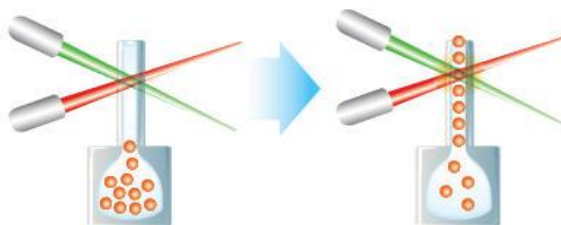
Luminex je flexibilní analyzátor založený na principu průtokové cytometrie. Technologie je zajímavá tím, že jako nosiče sond zde slouží polystyrenové mikrokuličky o průměru 5,6 μ m. Jednotlivé mikrokuličky jsou inertně značeny smícháním různých poměrů dvou fluorescenčních barev (obr. 20). To umožňuje stanovení až 100 analytů v jedné jamce s použitím velmi malého objemu vzorků. Mikrokuličky s navázaným vzorkem protékají detekčním kanálem, skrze který procházejí dva laserové paprsky (obr. 21). Zde je snímána fluorescence uvnitř

mikrokuliček (identifikace mikrokuliček) a na jejich povrchu (měření fluorescence navázaného vzorku).



Obrázek 20. Používají se polystyrenové kuličky, které jsou vnitřně obarveny červeným a infračerveným fluoroforem. Každá kulička má různé množství obou barviv a pomocí různého poměru množství jednotlivých barviv v daných kuličkách je možné stanovit až 100 testů v jednom reakčním objemu.

Převzato z <http://www.viracoribt.com/Learning-Lab/Luminex>



Obrázek 21. Luminex reader stanoví jednotlivé kuličky pomocí průtokové cytometrie.

Převzato z <http://www.viracoribt.com/Learning-Lab/Luminex>

2.4 Výsledky

2.4.1 Detekce antigen specifických T lymfocytů v periferní krvi

U dvou sledovaných skupin pacientů (biochemický relaps a hormon refrakterní pacienti), léčených přípravkem DCVAC/PCa v rámci I./II. fáze klinické studie, jsme stanovili procento antigen specifických T lymfocytů v periferní krvi. Jako vhodnou a optimalizovanou metodu jsme zvolili intracelulární barvení INF- γ produkujících CD4 a CD8 T lymfocytů pomocí průtokové cytometrie. Tato metoda byla optimalizována v rámci mé bakalářské práce (Bílková 2012).

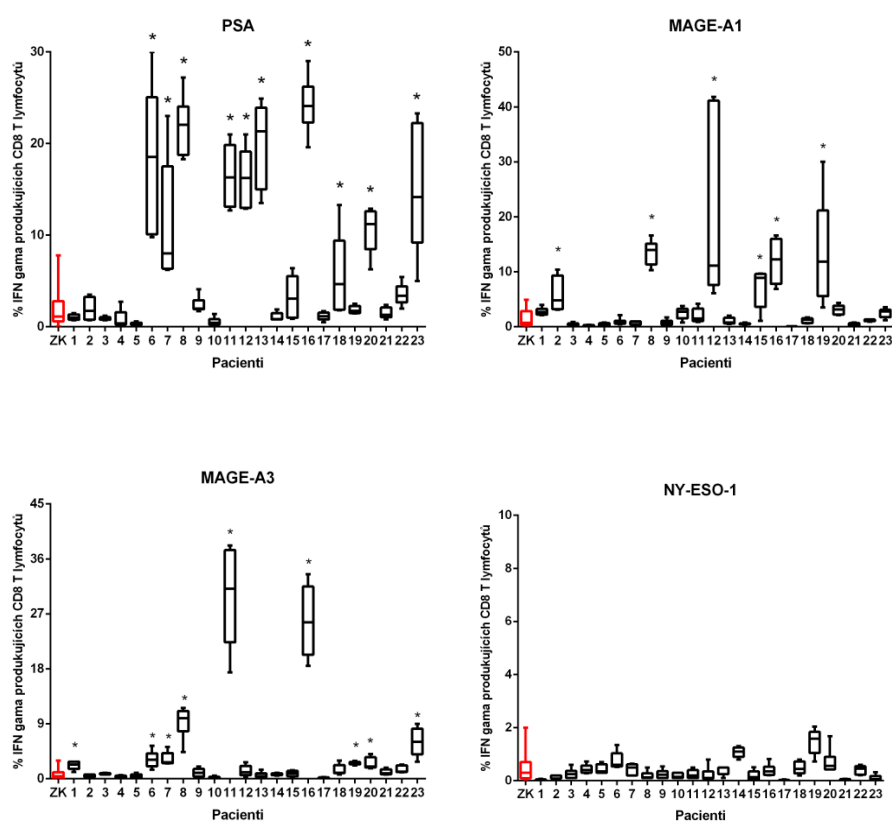
Periferní mononukleární buňky (PBMC) pacientů byly po rozmražení stimulovány směsí pepmixů, které odpovídaly konkrétním testovaným nádorovým antigenům (PSA, MAGE-A1, MAGE-A3, NY-ESO-1). Po desetidenní kultivaci byly buňky restimulovány pomocí stejného antigenního pepmixu a barveny pomocí intracelulárního protokolu na detekci IFN- γ produkujících buněk. Oproti teoretickým předpokladům vyplývajících z charakteru používaných pepmixů jsme nezaznamenali signifikantní odpověď CD4 pomocných T lymfocytů. Z tohoto důvodu jsme se v další analýze zaměřili pouze na charakterizaci cytotoxických CD8 T lymfocytů.

Hodnotili jsme procento antigen specifických T lymfocytů v průběhu celé terapie v šesti nezávislých dávkách – před aplikací vakcíny, v průběhu aplikace (přibližně v 3měsíčních intervalech) a na jejím konci u všech sledovaných pacientů.

2.4.1.1 Skupina pacientů s biochemickým relapsem

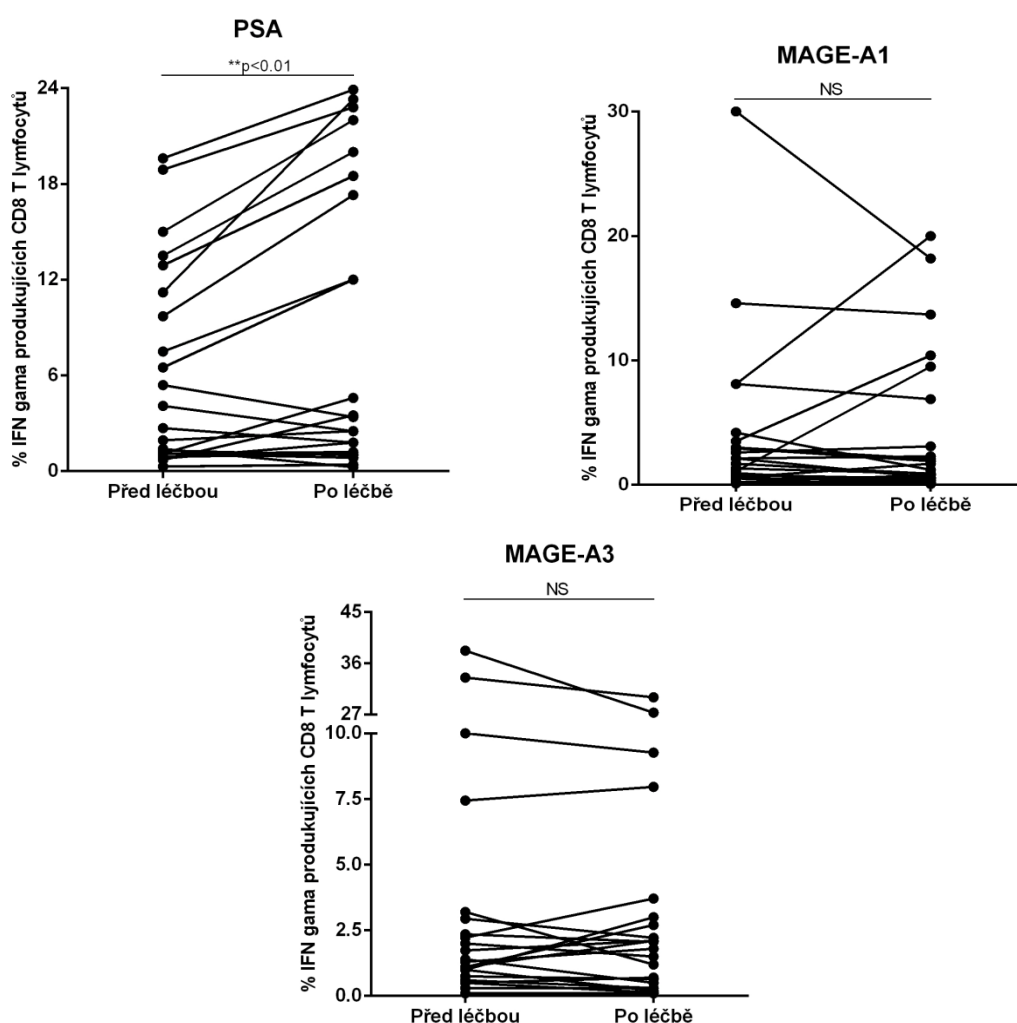
Ve skupině 23 pacientů jsme hodnotili procento antigen specifických T lymfocytů v periferní krvi proti nádorovým antigenům PSA, MAGE-A1, MAGE-A3 a NY-ESO-1. Sledovali jsme přítomnost IFN- γ produkujících CD8 cytotoxických T lymfocytů v průběhu roční terapie v rámci šesti nezávislých odběrů periferních mononukleárních buněk (PBMC).

V průběhu terapie jsme zaznamenali přítomnost antigen specifických T lymfocytů proti antigenům PSA, MAGE-A1 a MAGE-A3 v periferní krvi pacientů (obr. 22). V případě nádorového antigenu NY-ESO-1 jsme nezaznamenali signifikantně zvýšené procento antigen specifických T lymfocytů oproti skupině zdravých dárců. V případě nádorového antigenu PSA jsme zaznamenali signifikantní zvýšení procenta antigen specifických T lymfocytů oproti skupině zdravých dárců u 10 pacientů (obr. 22). U nádorového antigenu MAGE-A1 jsme zaznamenali signifikantní nárůst antigen specifických T lymfocytů oproti skupině zdravých kontrol u 6 pacientů, v případě nádorového antigenu MAGE-A3 u 9 pacientů (obr. 22).



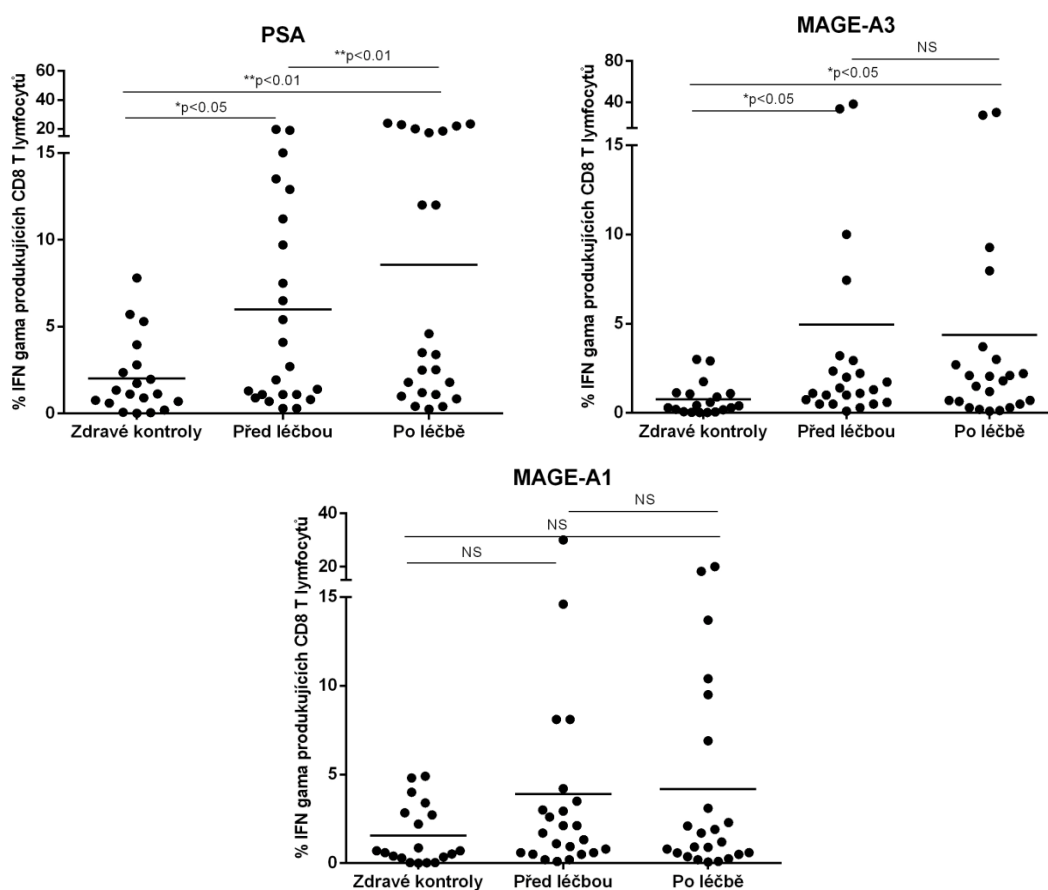
Obrázek 22. Zastoupení antigen specifických T lymfocytů proti nádorovým antigenům PSA, MAGE-A1, MAGE-A3 a NY-ESO-1 v periferní krvi u 23 pacientů ve skupině biochemický relaps v průběhu roční terapie a skupině 19 zdravých dárců.

Pomocí neparametrického párového Wilcoxonova testu jsme u 23 pacientů s biochemickým relapsem hodnotili přítomnost antigen specifických T lymfocytů proti nádorovým antigenům PSA, MAGE-A1 a MAGE-A3 před zahájením terapie a po skončení terapie (obr. 23). Pouze v případě nádorového antigenu PSA jsme zaznamenali signifikantní nárůst antigen specifických T lymfocytů v periferní krvi před zahájením terapie a po ukončení terapie (** $p < 0.01$). U zbývajících dvou nádorových antigenů MAGE-A1 a MAGE-A3 jsme nezaznamenali signifikantní nárůst antigen specifických T lymfocytů v periferní krvi během imunoterapie (obr. 23).



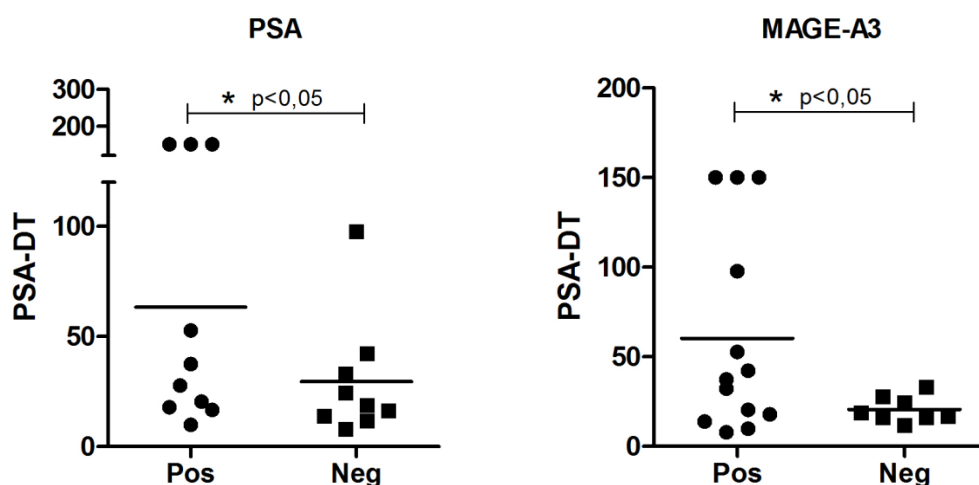
Obrázek 23. Procento antigen specifických IFN- γ produkujících CD8 T lymfocytů proti nádorovým antigenům PSA, MAGE-A1 a MAGE-A3 před zahájením a po ukončení roční terapie u 23 sledovaných pacientů ze skupiny biochemický relaps.

Procento antigen specifických T lymfocytů proti nádorovým antigenům PSA, MAGE-A1 a MAGE-A3 jsme porovnávali s procentem antigen specifických T lymfocytů v periferní krvi 19 zdravých dárců (obr. 24). Antigen specifické T lymfocyty proti nádorovému antigenu PSA $\geq 4\%$ jsme zaznamenali u 4 zdravých dárců, proti nádorovému antigenu MAGE-A1 $\geq 4\%$ u 5 zdravých dárců a proti nádorovému antigenu MAGE-A3 $\geq 4\%$ pouze u jednoho zdravého dárce. Procento antigen specifických T lymfocytů v periferní krvi sledovaných pacientů je signifikantně zvýšeno oproti procentu antigen specifických T lymfocytů v krvi zdravých dárců v případě T lymfocytů reagujících s antigenem PSA (* $p < 0.05$) a MAGE-A3 (* $p < 0.05$). V případě antigenu MAGE-A1 rozdíl není statisticky signifikantní.



Obrázek 24. Porovnání zastoupení antigen specifických CD8 IFN- γ produkujících T lymfocytů proti nádorovým antigenům PSA, MAGE-1 a MAGE-A3 ve skupině 23 sledovaných pacientů před zahájením terapie a po ukončení terapie se skupinou 19 zdravých dárců.

Zastoupení antigen specifických T lymfocytů v periferní krvi u 23 sledovaných pacientů jsme korelovali s klinickým parametrem PSA-DT. Jak bylo uvedeno v úvodu mé diplomové práce, ve skupině pacientů s biochemickým relapsem nemáme k dispozici klíčovou informaci o přežívání pacientů. Proto jako parametr hodnotící průběh jejich onemocnění používáme hodnotu PSA-DT. Skupinu 23 pacientů jsme rozdělili pomocí mediánu na pacienty s pozitivní a negativní odpovědí proti sledovaným nádorovým antigenům (obr. 25). Ve skupině 23 sledovaných pacientů jsme zaznamenali statisticky signifikantní korelaci ($*p<0,05$) mezi přítomností antigen specifických T lymfocytů proti nádorovému antigenu PSA a MAGE-3 a vyšší hodnotou PSA-DT (obr. 25).



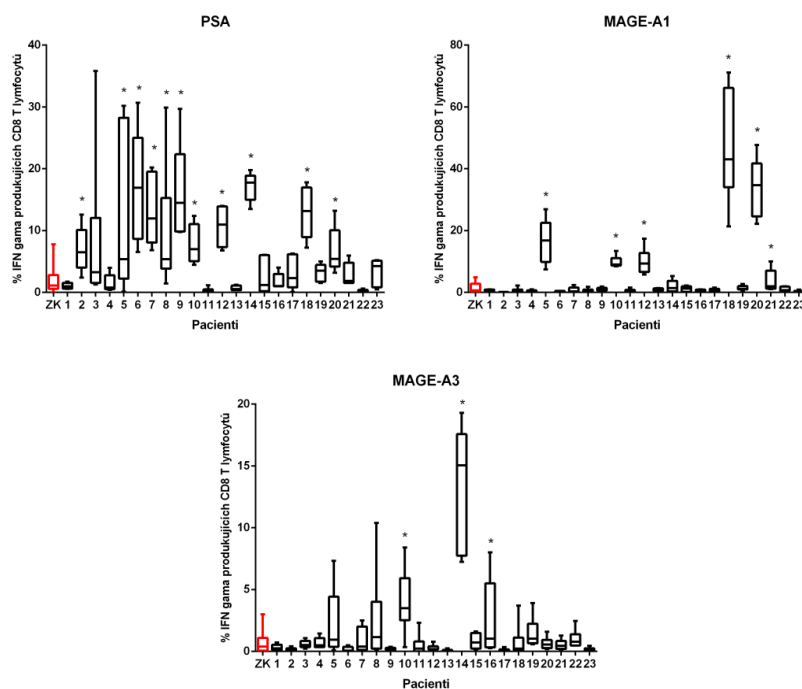
Obrázek 25. Korelace zastoupení antigen specifických T lymfocytů proti nádorovým antigenům PSA a MAGE-A3 s hodnotou PSA-DT u 23 pacientů ve skupině biochemický relaps

2.4.1.2 Skupina pacientů s kastročně rezistentním karcinomem prostaty

Ve skupině 23 pacientů jsme hodnotili procento antigen specifických T lymfocytů v periferní krvi proti nádorovým antigenům PSA, MAGE-A1 a MAGE-A3. Sledovali jsme přítomnost IFN- γ produkujících CD8 cytotoxických T lymfocytů v průběhu roční terapie v rámci šesti odběrů periferních mononukleárních buněk (PBMC) v cca 3měsíčních intervalech.

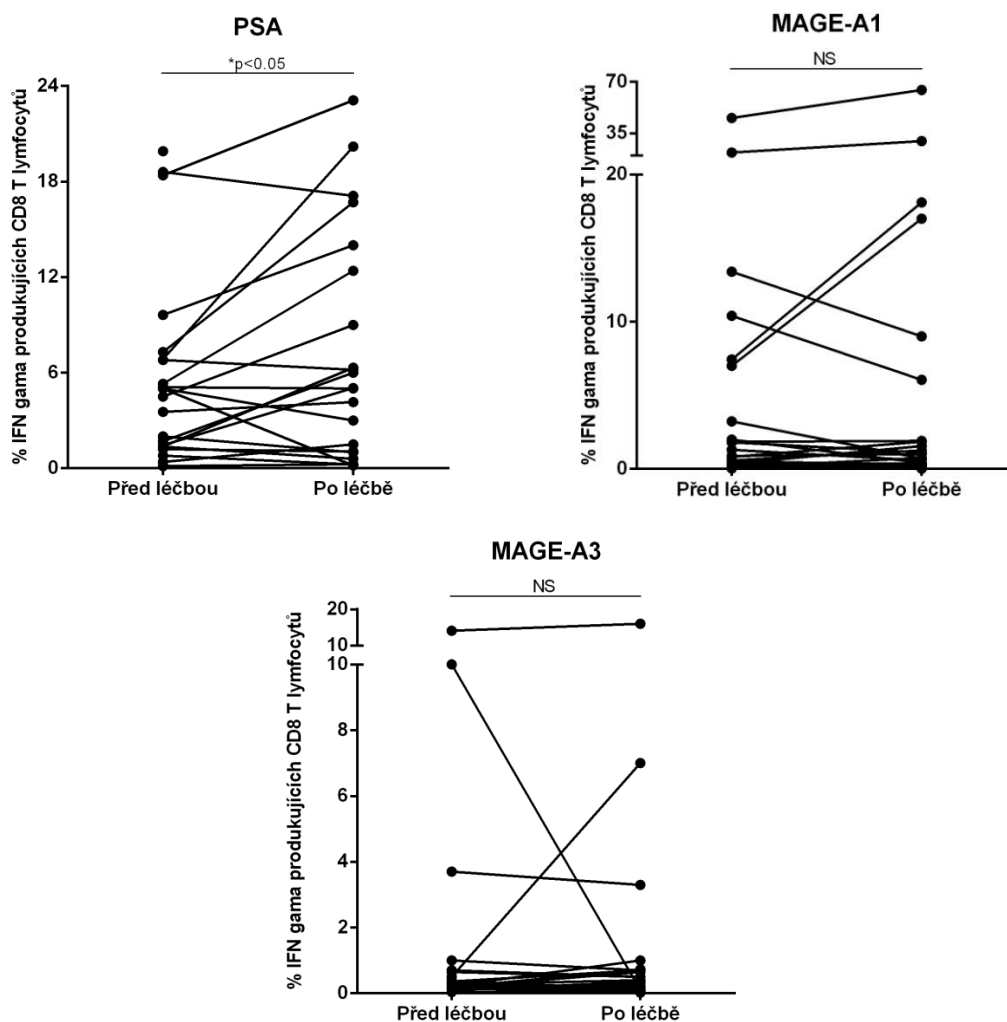
V průběhu terapie jsme zaznamenali přítomnost antigen specifických T lymfocytů proti antigenům PSA, MAGE-A1 a MAGE-A3 (obr. 26). Z důvodu nedostatku materiálu jsme u této skupiny pacientů nestanovovali antigen specifické T lymfocyty proti nádorovému antigenu NY-ESO-1.

V případě nádorového antigenu PSA jsme zaznamenali signifikantní zvýšení procenta antigen specifických T lymfocytů oproti skupině zdravých dárců u 11 pacientů (obr. 26). U nádorového antigenu MAGE-A1 jsme zaznamenali signifikantní nárůst antigen specifických T lymfocytů oproti skupině zdravých kontrol u 6 pacientů a u nádorového antigenu MAGE-A3 u 3 pacientů (obr. 26).



Obrázek 26. Zastoupení antigen specifických T lymfocytů proti nádorovým antigenům PSA, MAGE-A1 a MAGE-A3 v periferní krvi u 23 pacientů ve skupině hormon refrakterních pacientů v průběhu roční terapie a skupině 19 sledovaných zdravých dárců.

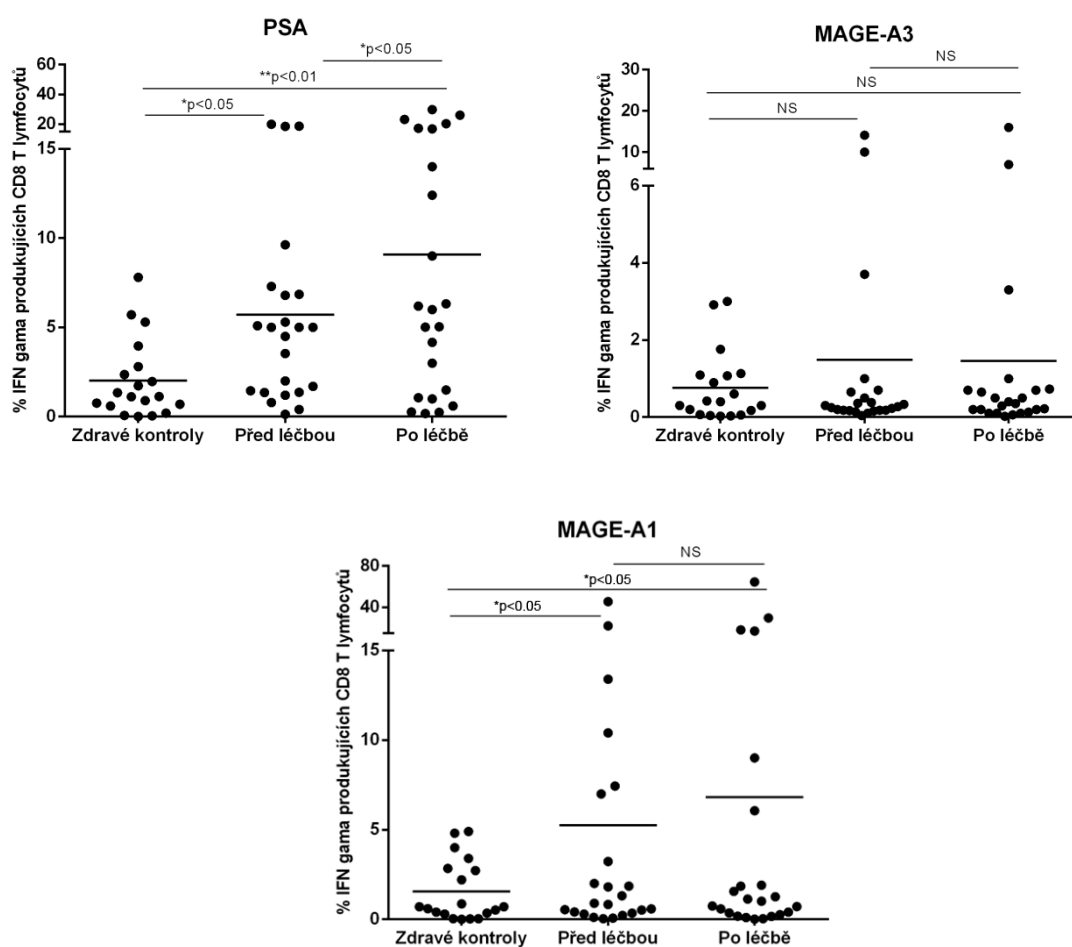
Pomocí neparametrického párového Wilcoxonova testu jsme u 23 pacientů s hormon refrakterním karcinomem prostaty hodnotili přítomnost antigen specifických T lymfocytů proti nádorovým antigenům PSA, MAGE-A1 a MAGE-A3 před zahájením terapie a po skončení terapie (obr. 27). Ve skupině pacientů s kastračně rezistentním karcinomem prostaty jsme zaznamenali podobný trend jako u předchozí skupiny pacientů. Ve skupině 23 sledovaných pacientů dochází k signifikantnímu zvýšení procenta antigen specifických T lymfocytů pouze proti nádorovému antigenu PSA (* $p < 0.05$). Procento antigen specifických T lymfocytů proti MAGE-A1 a MAGE-A3 nádorovým antigenům se signifikantně nemění.



Obrázek 27. Rozdíl procenta antigen specifických T lymfocytů před a po ukončení léčby proti nádorovým antigenům PSA, MAGE-A1 a MAGE-A3 u 23 pacientů s hormon refrakterním karcinomem prostaty.

Procento antigen specifických T lymfocytů proti nádorovým antigenům PSA, MAGE-A1 a MAGE-A3 jsme porovnávali s procentem antigen specifických T lymfocytů v periferní krvi 19 zdravých dárců (obr. 28).

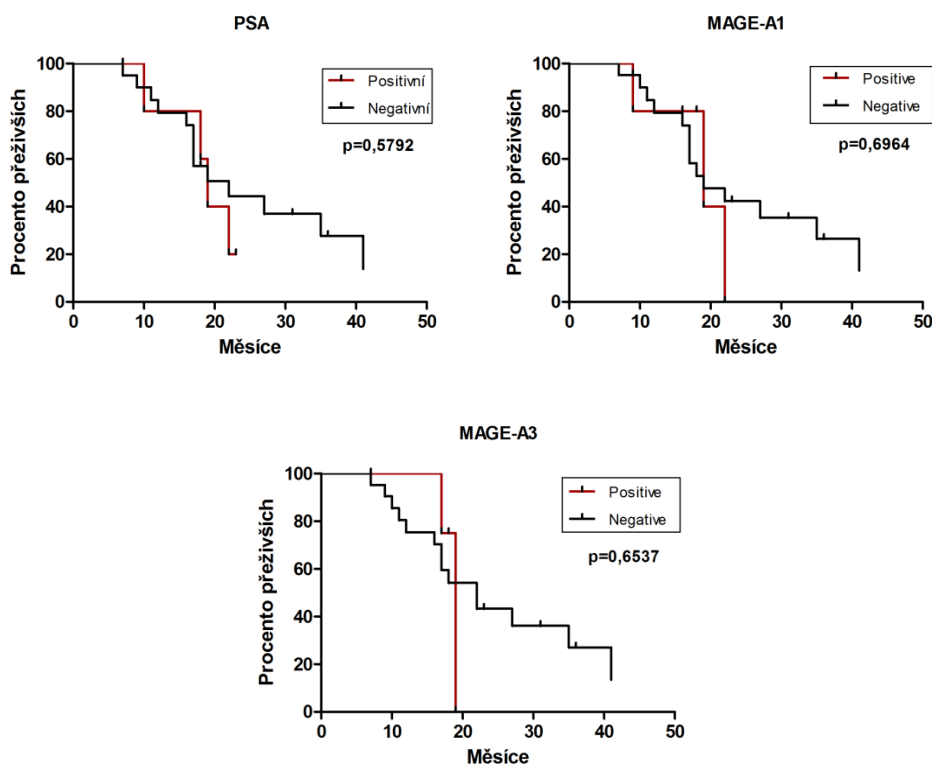
Procento antigen specifických T lymfocytů v periferní krvi sledovaných pacientů je signifikantně zvýšeno oproti procentu antigen specifických T lymfocytů v krvi zdravých dárců v případě PSA specifických T lymfocytů (* $p < 0.05$) a MAGE-A1 (* $p < 0.05$). V případě nádorového antigenu MAGE-A3 rozdíl není statisticky signifikantní.



Obrázek 28. Porovnání procenta antigen specifických T lymfocytů proti nádorovým antigenům PSA, MAGE-A1 a MAGE-A3 u 23 pacientů s hormon refrakterním karcinomem prostaty před léčbou a po ukončení terapie s 19 zdravými dárci.

Zastoupení antigen specifických T lymfocytů v periferní krvi u 23 sledovaných pacientů jsme korelovali s délkou přežívání konkrétních léčených pacientů. Jak bylo uvedeno v úvodu mé diplomové práce, ve skupině pacientů s kastročně rezistentním karcinomem prostaty je klíčovým klinickým parametrem ke sledování účinnosti léčby

délka přežívání, kterou můžeme používat ke korelaci se sledovanými imunologickými parametry. Skupinu 23 pacientů jsme pomocí mediánů statisticky rozdělili na pacienty s pozitivní a negativní odpovědí proti sledovaným nádorovým antigenům PSA, MAGE-A1 a MAGE-A3. Vynesáním hodnot délky přežití do Kaplan-Meierovy křivky pro jednotlivé nádorové antigeny jsme získali grafy (obr. 29) znázorňující korelaci jednotlivých parametrů s délkou přežívání ve skupině 23 sledovaných pacientů. U hodnocených pacientů jsme zaznamenali statisticky nesignifikantní trend znázorňující horší prognózu pacientů s vyšším procentem antigen specifických T lymfocytů proti PSA, MAGE-A1 a MAGE-A3 v periferní krvi.

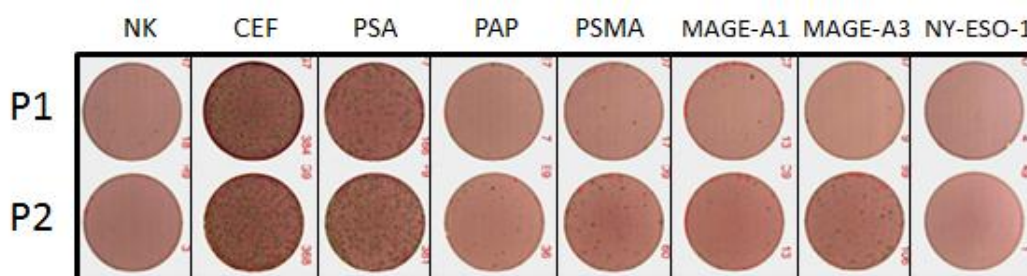


Obrázek 29. Kaplan-Meierova křivka zobrazující závislost zastoupení antigen specifických T lymfocytů proti nádorovým antigenům PSA, MAGE-A1 a MAGE-A3 s hodnotou OS (overall survival) u 23 pacientů s kastročně rezistentním karcinomem prostaty.

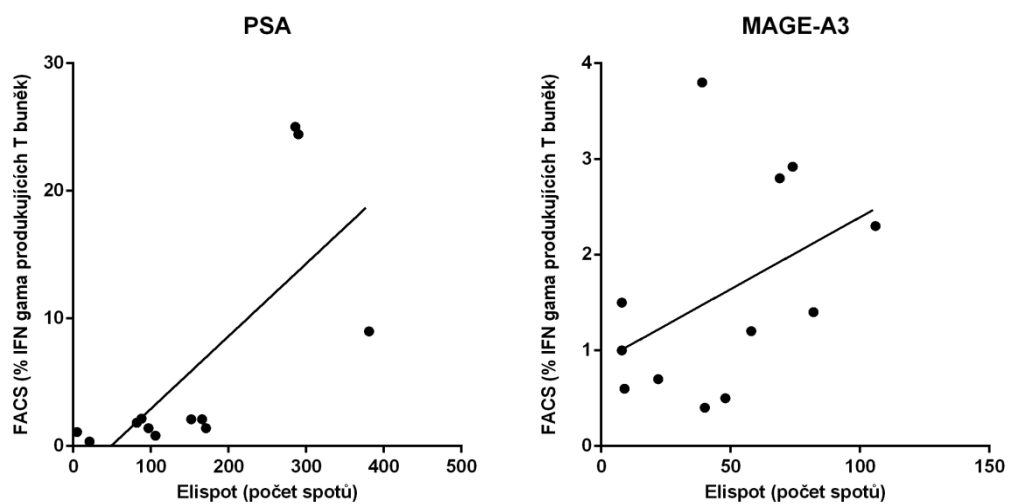
2.4.1.3 Porovnání dvou metod detekce antigen specifických T lymfocytů v periferní krvi

Získaná data jsme se rozhodli ověřit pomocí metody ELISPOT, k detekci antigen specifických T lymfocytů, používané v rámci některých klinických studií. Kontrolní měření jsme provedli na skupině 12 pacientů, u kterých jsme znali procento antigen specifických T lymfocytů proti PSA, MAGE-A1 a MAGE-A3 v periferní krvi. Tyto pacienty jsme zároveň analyzovali pomocí metody ELISPOT.

Největší odpověď ve skupině 12 sledovaných pacientů jsme zaznamenali proti nádorovým antigenům PSA, MAGE-A1 a MAGE-A3, což odpovídá výsledkům získaným pomocí průtokové cytometrie (obr. 30). Pomocí korelační matice jsme porovnávali výsledky získané pomocí dvou sledovaných metod (obr. 32). V případě nádorového antigenu PSA ($*p < 0.05$) a MAGE-A3 ($*p < 0.05$) jsme zaznamenali přímou korelaci mezi procentem antigen specifických T lymfocytů detekovaných pomocí průtokové cytometrie a počtem spotů změřených pomocí metody ELISPOT. Tyto výsledky dokazují, že námi zvolená metodika průtokové cytometrie je relevantní a vhodně optimalizovaná.



Obrázek 30. Reprezentativní obrázek zobrazující spoty na ELISPOT destičce od Diaclone měřené na přístroji Bioreader 6000 E-a.



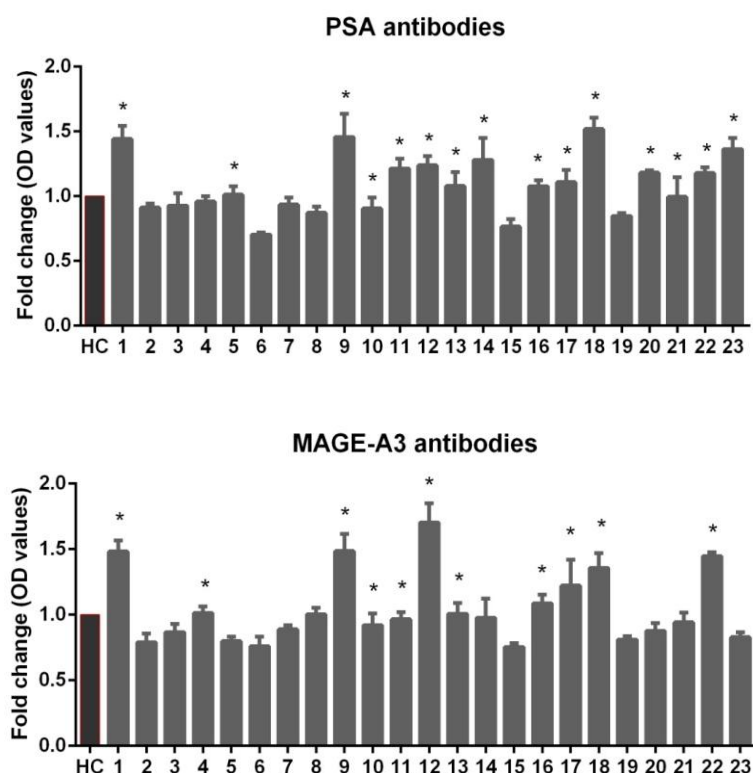
Obrázek 31. Korelační závislost mezi procentem antigen specifických T lymfocytů proti nádorovým antigenům PSA a MAGE-A3 detekovaných pomocí cytometrické analýzy a počtu spotů detekovaných metodikou ELISPOT u 12 sledovaných pacientů.

2.4.2 Sledování humorální odpovědi – detekce protilátek proti nádorovým antigenům

V další části mé diplomové práce jsme charakterizovali humorální odpověď pacientů z obou sledovaných skupin léčených v rámci I./II. fáze klinické studie DCVAC/PCa. Pomocí metody ELISA jsme sledovali přítomnost IgG protilátek proti nádorovým antigenům PSA a MAGE-A3 v séru pacientů.

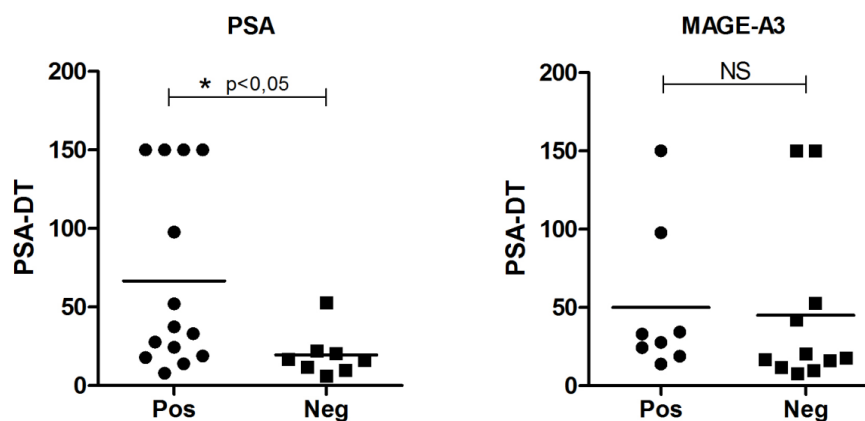
2.4.2.1 Skupina pacientů s biochemickým relapsem

Ve skupině 23 pacientů jsme hodnotili přítomnost specifických IgG protilátek proti nádorovým antigenům PSA a MAGE-A3 v séru pacientů. V průběhu terapie jsme zaznamenali přítomnost IgG protilátek proti nádorovému antigenu PSA u 15 pacientů a přítomnost IgG protilátek proti MAGE-A3 u 11 pacientů (obr. 32).



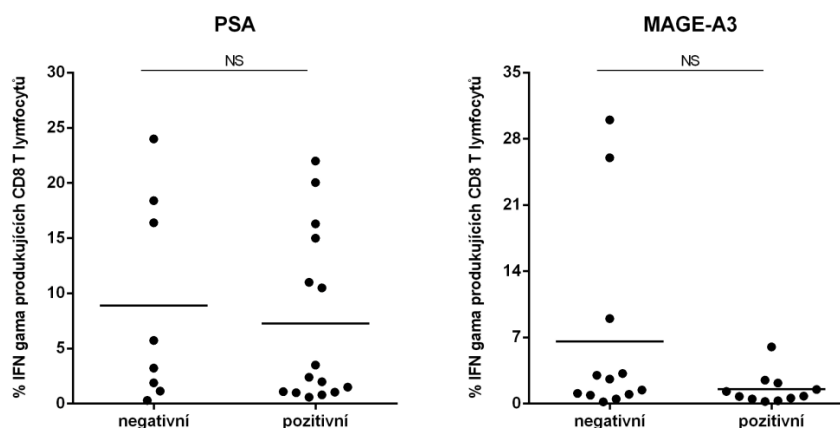
Obrázek 32. Detekce IgG protilátek proti nádorovému antigenu PSA a MAGE-A3 ve skupině 23 sledovaných pacientů.

Přítomnost protilátek proti nádorovým antigenům v séru pacientů jsme korelovali s parametrem PSA-DT (obr. 33). Ve skupině 23 pacientů jsme zaznamenali statisticky signifikantní korelaci mezi přítomností protilátek proti nádorovému antigenu PSA a vyšší hodnotou PSA-DT (* $p < 0,05$). Korelace mezi přítomností protilátek proti nádorovému antigenu MAGE-A3 a hodnotou PSA-DT není statisticky signifikantní.



Obrázek 33. Graf znázorňující korelaci protilátek IgG proti nádorovým antigenům PSA a MAGE-A3 a hodnotou PSA-DT.

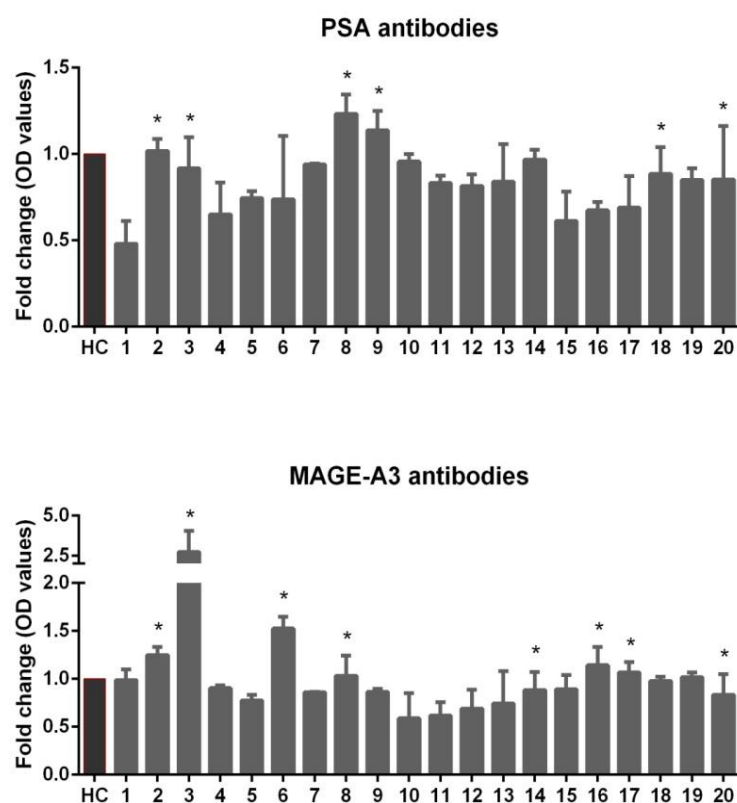
Dále jsme korelovali přítomnost protilátek proti nádorovým antigenům PSA a MAGE-A3 v séru s procentem antigen specifických CD8 T lymfocytů v periferní krvi sledovaných pacientů (obr. 34). Ani v jednom případě jsme nezaznamenali statisticky signifikantní závislost mezi procentem antigen specifických T lymfocytů a přítomností protilátek proti konkrétnímu nádorovému antigenu.



Obrázek 34. Graf znázorňující korelaci mezi přítomností IgG protilátek v séru pacientů a procentem antigen specifických T lymfocytů proti nádorovým antigenům PSA a MAGE-A3.

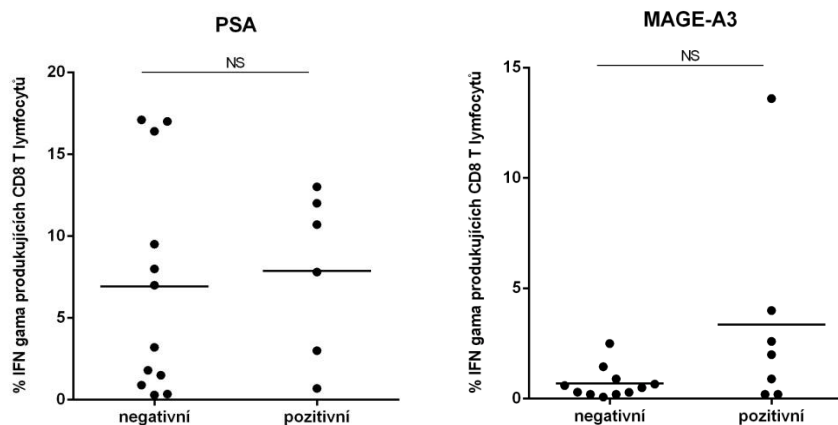
2.4.2.2 Skupina pacientů s kastročně rezistentním karcinomem prostaty

Ve skupině 20 pacientů jsme hodnotili přítomnost specifických IgG protilátek proti nádorovým antigenům PSA a MAGE-A3 v séru pacientů. V průběhu terapie jsme zaznamenali přítomnost IgG protilátek proti nádorovému antigenu PSA u 6 pacientů a přítomnost IgG protilátek proti MAGE-A3 u 8 pacientů (obr. 35).



Obrázek 35. Detekce IgG protilátek proti nádorovému antigenu PSA a MAGE-A3 ve skupině 20 sledovaných pacientů.

Dále jsme i v této skupině pacientů korelovali přítomnost pozitivních protilátek proti nádorovým antigenům PSA a MAGE-A3 v séru s procentem antigen specifických CD8 T lymfocytů v periferní krvi sledovaných pacientů (obr. 36). Opět jsme nezaznamenali statisticky signifikantní závislost mezi procentem antigen specifických T lymfocytů a přítomností protilátek proti konkrétnímu nádorovému antigenu.

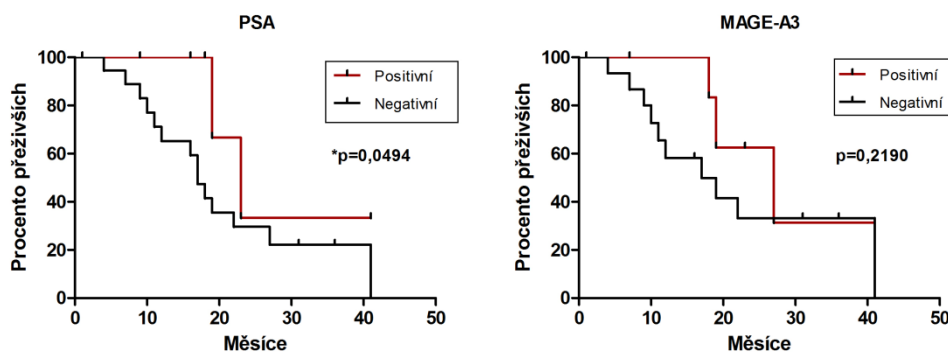


Obrázek 36. Graf znázorňující korelaci mezi přítomností IgG protilátek v séru pacientů a procentem antigen specifických T lymfocytů proti nádorovým antigenům PSA a MAGE-A3.

Dále jsme korelovali přítomnost IgG protilátek proti nádorovým antigenům PSA a MAGE-A3 s hodnotou OS (overall survival) u pacientů v této skupině (obr. 37).

Vynesením hodnot délky přežití do Kaplan-Meierovy křivky jsme získali grafy znázorňující korelaci přítomnosti IgG protilátek na délce přežívání ve skupině 20 sledovaných pacientů.

V případě IgG protilátek proti nádorovému antigenu PSA jsme zaznamenali statisticky signifikantní závislost mezi přítomností protilátek a lepší prognózou pacientů (* $p < 0.05$). V případě IgG protilátek proti nádorovému antigenu MAGE-A3 jsme zaznamenali podobný trend, v tomto případě však bez statisticky signifikantní závislosti.



Obrázek 37. Kaplan-Meierova křivka znázorňující závislost přítomnosti protilátek IgG proti nádorovým antigenům proti PSA a MAGE-A3 a hodnotou přežívání sledovaných pacientů.

2.4.3 Produkce cytokinů

U 23 pacientů ze skupiny biochemický relaps jsme sledovali pomocí metody Luminex cytokinový profil periferních mononukleárních buněk. Pomocí kitu MILLIPLEX MAP jsme hodnotili produkci 9 cytokinů IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-13, IL-17, IL-2, IL-4 a IL-5 u jednotlivých pacientů ve třech sledovaných náběrech v průběhu roční terapie – před terapií, v průběhu terapie (3. dávka) a po dokončení terapie.

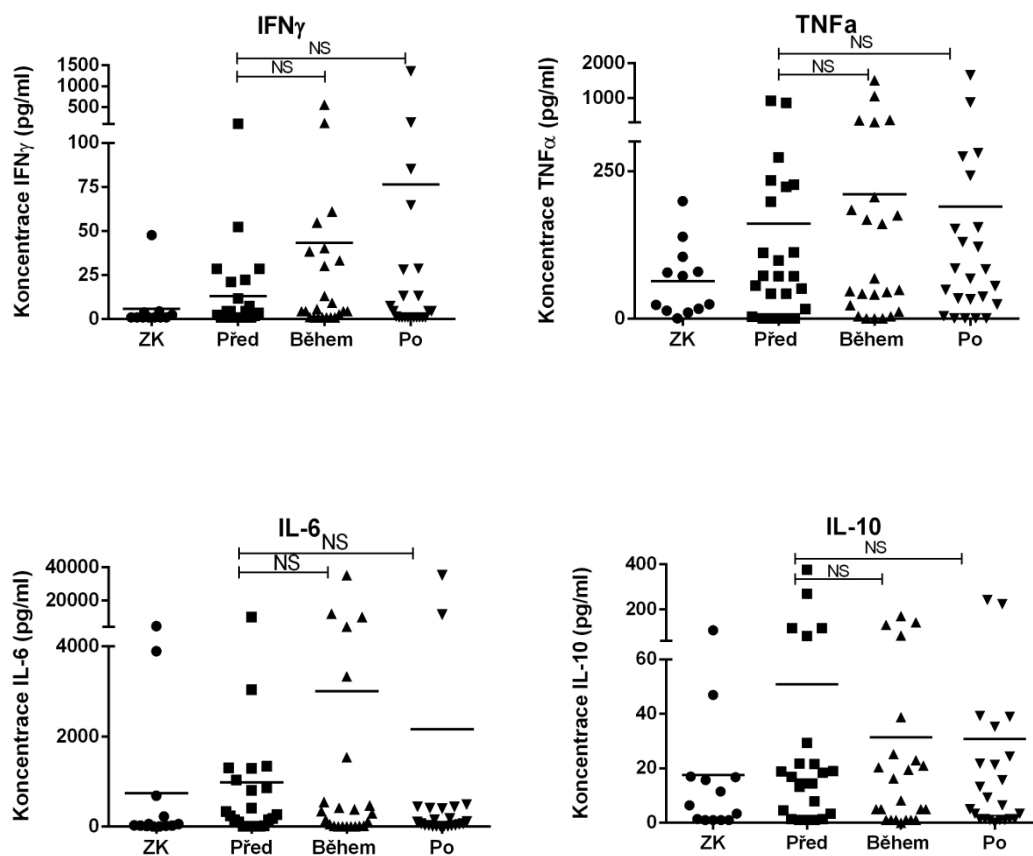
U každého pacienta jsme porovnávali hladinu konkrétního cytokinu u nestimulovaných buněk a u buněk stimulovaných pepmixem PSA. Supernatant jsme u těchto podmínek odebírali ve dvou časových intervalech po 24 a 72 hodinách. Mezi těmito čtyřmi podmínkami jsme nezaznamenali signifikantní rozdíly. Z tohoto důvodu v grafech uvádíme pouze výsledky získané stimulací PBMC pomocí PSA pepmixu a supernatantu odebíraného po 72 hodinách.

Pomocí metody Luminex jsme zaznamenali u 23 sledovaných pacientů pouze přítomnost cytokinů IFN- γ , TNF- α , IL-6 a IL-10 (obr. 38). U ostatních měřených cytokinů (IL-13, IL-17, IL-2, IL-4 a IL-5) jsme nezaznamenali signifikantně měřitelnou hodnotu.

Do skupiny Th1 sledovaných cytokinů patří IFN- γ a TNF- α , které jsou produkovány aktivovanými T lymfocyty. V případě cytokinu IFN- γ jsme zaznamenali nesignifikantní nárůst produkce v průběhu terapie. V případě cytokinu TNF- α jsme zaznamenali produkci tohoto cytokinu ve všech sledovaných časových bodech (před, v průběhu a po skočení terapie), avšak bez vlivu imunoterapie.

V případě cytokinu IL-6, který je produkován zejména Th2 lymfocyty a B lymfocyty, jsme zaznamenali v průběhu terapie nesignifikantní nárůst, zatímco v případě imunosupresivního cytokinu IL-10 jsme zaznamenali nesignifikantní pokles produkce během roční terapie.

Z důvodu nedostatku materiálu jsme u druhé skupiny pacientů s hormon refrakterním karcinomem prostaty cytokinový profil PBMC nestanovovali.



Obrázek 38. Grafy znázorňující kinetiku produkce cytokinů IFN- γ , TNF α , IL-6 a IL-10 PBMC ve skupině 23 pacientů s biochemickým relapsem v průběhu roční terapie.

3 DISKUZE

Karcinom prostaty je nejrozšířenější nádorové onemocnění u mužů a třetí nejčastější nádorové onemocnění po nádoru plic a tlustého střeva v celkové populaci. Z důvodu omezených možností léčby pokročilého stádia onemocnění je třeba hledat nové terapeutické možnosti jak pokročilých stádií, tak časných s cílem zabránit nebo zpomalit progresi onemocnění. Pomalá progresse onemocnění a existence specifických nádorových antigenů (PSA, PAP a PSMA) tvoří karcinom prostaty ideálním pro testování imunoterapeutických přípravků. Právě z těchto důvodů byla provedena u karcinomu prostaty řada klinických studií fáze II a randomizovaných studií fáze III s různými imunoterapeutickými preparáty. Vůbec první imunoterapeutický přípravek schválený americkou FDA s názvem Sipuleucel-T, se již 4 roky používá v terapii karcinomu prostaty.

Imunoterapie na bázi dendritických buněk testovaná firmou Sotio a.s. představuje unikátní technologii. K vyvolání komplexní imunitní odpovědi v těle pacienta jsou použity vlastní dendritické buňky aktivované širokým spektrem nádorových antigenů. Tímto se významně zlepšuje jejich schopnost zahájit imunitní odpověď organismu proti nádorovým buňkám. Aplikace vakcíny je prováděna opakovaně v několika dávkách v průběhu jednoho roku terapie, čímž dochází k dlouhodobé aktivaci imunitního systému. V případě pacientů s kastročně rezistentním karcinomem prostaty je imunoterapie kombinována s chemoterapií, kde na základě teoretických předpokladů očekáváme podpůrný efekt obou přístupů. Imunoterapeutický přípravek byl testován v rámci I./II. fáze klinické studie na skupině 23 pacientů s biochemickým relapsem a 23 pacientů s kastročně rezistentním karcinomem prostaty. V současné chvíli probíhají 4 studie fáze II a nově byla zahájena III. fáze randomizované multicentrické studie s názvem VIABLE, která bude probíhat v rámci EU a USA.

Pro hodnocení účinnosti imunoterapie dosud neexistuje ideální parametr. Snahou výzkumníků i farmaceutických firem je nalézt jednoduše stanovitelný laboratorní „biomarker“, který by koreloval s klinickými nebo jinými účinnými parametry. Cílem mé práce bylo hodnocení účinnosti terapie z hlediska sledování klíčových imunologických parametrů pacientů léčených vakcínou DCVAC/PCa. Cílem

imunoterapeutické vakcíny DCVAC je aktivovat populaci antigen specifických T lymfocytů, které budou schopné odhalit a ničit nádorové buňky v těle pacienta a zabránit tak progresi onemocnění. Tento proces by mohl stabilizovat a zpomalit rozvoj nádorového onemocnění, a tak přispět k lepší prognóze pacientů.

U pacientů ze skupiny biochemického relapsu a s kastročně rezistentním karcinomem prostaty, léčených vakcínou DCVAC, jsme nejprve sledovali procento antigen specifických T lymfocytů proti nádorovým antigenům PSA, MAGE-A1, MAGE-A3 a NY-ESO-1 v periferní krvi během roční terapie. V současné době je k dispozici řada testů monitorujících procento antigen specifických T lymfocytů v periferní krvi pacientů. Mezi nejběžnější techniky používané v monitorování klinických studií patří metoda ELISPOT, cytometrická analýza IFN- γ produkujících T lymfocytů a použití nádorově specifických tetramerů. Ze zmíněných technik jsme po dlouhodobé optimalizaci zvolili metodu detekce IFN- γ produkujících T lymfocytů pomocí průtokové cytometrie. Metoda je sice časově náročná, avšak podává jasnou informaci o fenotypu měřených buněk, na rozdíl od zmíněného ELISPOTU a je aplikovatelná pro všechny pacienty bez ohledu na MHC restrikcii na rozdíl od zmíněných tetramerů. Ve skupině pacientů s biochemickým relapsem jsme zaznamenali zvýšené procento antigen specifických T lymfocytů proti nádorovým antigenům PSA, MAGE-A1 a MAGE-A3 v periferní krvi oproti skupině zdravých kontrol. V případě nádorového antigenu NY-ESO-1 jsme nezaznamenali přítomnost protinádorových T lymfocytů v periferní krvi. Tato skutečnost nejspíš souvisí s nízkou expresí tohoto nádorového antigenu na povrchu nádorové linie LNCap, jak bylo popsáno v úvodu mé práce. Ve skupině 23 sledovaných pacientů jsme detekovali antigen specifické CD8 T lymfocyty proti nádorovým antigenům PSA, MAGE-A1 a MAGE-A3 v rozpětí od 3 do 25%. Navzdory teoretickým předpokladům, které vyplývají z vlastností používaných pepmixů se specifitou k MHC molekulám I. i II. třídy, jsme však nezaznamenali CD4 T lymfocytární odpověď.

Ve skupině 23 pacientů s biochemickým relapsem jsme zaznamenali signifikantní nárůst procenta antigen specifických T lymfocytů proti PSA antigenu po ukončení léčby ve srovnání s obdobím před zahájením. V případě nádorového antigenu MAGE-A1 a MAGE-A3 jsme nezaznamenali signifikantní nárůst procenta antigen specifických T lymfocytů. V druhé skupině sledovaných pacientů s kastročně rezistentním karcinomem prostaty jsme zaznamenali obdobné výsledky. V periferní krvi jsme detekovali přítomnost antigen specifických CD8 T lymfocytů pouze proti nádorovým

antigenům PSA, MAGE-A1 a MAGE-A3. Opět jsme zaznamenali signifikantní nárůst antigen specifických T lymfocytů po ukončení léčby ve srovnání s vyšetřením před zahájením léčby pouze u nádorového antigenu PSA. V případě antigenů MAGE-A1 a MAGE-A3 nebyla odpověď signifikantní.

Z publikovaných studií o monitorování imunologických parametrů v rámci klinického testování víme, že procento antigen specifických T lymfocytů může korelovat s lepší prognózou léčených pacientů. Tento trend byl zaznamenán v průběhu III. fáze klinické studie přípravku Provenge firmy Dendreon publikované v časopise *Cancer Immunology Immunotherapy* v roce 2012 a k obdobnému závěru došla i studie přípravku ProstVac firmy Bavarian Nordic z roku 2010. Sheik NA et al popisují, že Sipuleucel-T ve skupině pacientů s CRPC indukuje procento PAP antigen specifických T lymfocytů, jejichž přítomnost koreluje s lepší prognózou léčených pacientů. Podobně Gulley JL et al poukazují na statisticky významnou korelaci mezi přítomností antigen specifických T lymfocytů proti PSA v krvi pacientů a prodlouženou dobou přežití. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli korelovat zastoupení procenta antigen specifických T lymfocytů s klinickými parametry, jako jsou PSA-DT u pacientů s biochemickým relapsem a délkou přežívání u pacientů s CRPC. V případě první zmíněné skupiny pacientů jsme našli pomocí korelačního testu statisticky signifikantní závislost mezi vyšším procentem antigen specifických T lymfocytů a vyšší hodnotou PSA-DT. Tato skutečnost by odpovídala teoretickému předpokladu, že pacienti s vyšším procentem antigen specifických T lymfocytů lépe kontrolují nádorový růst, což se může odrazit v parametru PSA-zdvojovacího času. V případě druhé skupiny sledovaných pacientů s CRPC jsme korelovali přítomnost antigen specifických T lymfocytů s délkou přežívání. V tomto případě jsme nezaznamenali statisticky signifikantní výsledek, který může vyplývat z malého množství subjektů přítomných ve studii. Data o přítomnosti antigen specifických T lymfocytů v periferní krvi u obou skupin pacientů naznačují pozitivní vliv vakcinace pomocí DCVAC. Nicméně potvrzení těchto významných výsledků nám přinese teprve rozsáhlé testování na větším počtu subjektů v rámci II. a III. fáze klinické studie, které byly zahájeny v letech 2013 a 2014.

Z důvodu ověření správnosti naměřených dat jsme výsledky získané pomocí cytometrické analýzy korelovali s alternativní a běžně využívanou metodou ELISPOT. Ve skupině 12 pacientů jsme zaznamenali přímou korelaci mezi procentem antigen specifických T lymfocytů a počtem spotů detekovaných proti konkrétnímu nádorovému antigenu (PSA a MAGE-A3). Tento test nám ověřil výsledky získané pomocí průtokové

cytometrie a potvrdil správnost naší analýzy. Použití této metodiky, díky její spolehlivosti a přesnosti, plánujeme v rozsáhlé kohortě pacientů v rámci II. a III. fáze klinické studie.

Dále jsme se zaměřili na sledování protinádorově specifické humorální odpovědi v séru pacientů, pomocí detekce IgG protilátek proti nádorovým antigenům PSA a MAGE-A3. Ve skupině pacientů s biochemickým relapsem jsme zaznamenali přítomnost pozitivních IgG protilátek proti nádorovému antigenu PSA u 15 pacientů a proti nádorovému antigenu MAGE-A3 u 11 pacientů. V případě druhé skupiny pacientů s CRPC jsme detekovali přítomnost pozitivních protilátek v menší míře. IgG protilátky proti PSA byly detekovány u 6 pacientů a proti nádorovému antigenu MAGE-A3 u 8 pacientů. Opět jsme provedli statistickou analýzu korelace přítomnosti protilátek v séru s vhodným klinickým parametrem. Higano C. a kolektiv v časopise Cancer popisují pozitivní korelaci mezi přítomností protilátek proti nádorovým antigenům a lepší prognózou pacientů léčených v rámci I/II fáze klinické studie přípravkem GVAX.

V případě pacientů s biochemickým relapsem jsme zaznamenali statisticky signifikantní závislost mezi přítomností protilátek proti PSA a MAGE-A3 antigenu a vyšší hodnotou PSA-DT. U pacientů s CRPC jsme zaznamenali signifikantní závislost mezi přítomností pozitivních IgG protilátek proti PSA a delší dobou přežití. U nádorového antigenu MAGE-3 jsme zaznamenali podobnou závislost bez statistické signifikance.

Další aplikovanou metodou z technických důvodů provedenou pouze ve skupině pacientů s BR bylo sledování cytokinového profilu PBMC pomocí metody LUMINEX. Metodou jsme sledovali přítomnost 9 aktivačních i supresivních cytokinů (IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-13, IL-17, IL-2, IL-4 a IL-5) před, v průběhu terapie a po ukončení terapie. Ze skupiny měřených cytokinů jsme detekovali přítomnost 2 aktivačních Th1 cytokinů IFN- γ a TNF- α , jejichž hlavní funkcí je aktivace APC. V případě IFN- γ jsme zaznamenali nesignifikantní nárůst produkce cytokinu v průběhu terapie. Množství produkovaného cytokinu TNF α se v průběhu terapie nemění. Stejně tak množství IL-6 cytokinu produkovaného populací Th2 lymfocytů a B lymfocytů se v průběhu terapie signifikantně nemění. Množství produkovaného imunosupresivního cytokinu IL-10 se v průběhu terapie nesignifikantně snižovalo. Tento fakt může souviset se skutečností, že před aplikací imunoterapie dochází k redukci populace T-regulačních lymfocytů pomocí

metronomického cyklofosfátu podávaného v dávce 50mg po dobu jednoho týdne. Sledování cytokinového profilu ve skupině 23 pacientů nám nepodalo statisticky signifikantní informace o odpovědi pacientů na léčbu přípravkem DCVAC. Možné vysvětlení přináší sledování cytokinového profilu v celé populaci PBMC bez předchozí izolace T-lymfocytů, jež by mohlo zvýšit specifitu prováděného měření. Tento krok však nebyl z technických důvodů možný. Z důvodu malého množství dostupného materiálu a finanční náročnosti prováděného testu LUMINEX, nebudeme tento test rutinně provádět v rámci II. a III. fáze klinické studie.

Sledování imunitních parametrů, pacientů léčených v rámci I./II. fáze klinické studie přípravkem DCVAC/PCa nám přineslo velice cenná data o aktivaci antigen specifické buněčné i humorální odpovědi pomocí imunoterapie. Vzhledem k tomu, že studie byla jednoramenná, nemáme srovnání, jak se imunitní parametry mění v průběhu onemocnění v kontrolní skupině bez imunoterapie. Odpovědi na tyto otázky nám přinese analýza vzorků získávaných v průběhu klinického hodnocení fáze II a III klinické studie pacientů léčených přípravkem DCVAC/PCa, kterou plánujeme v následujících letech.

4 ZÁVĚR

Cílem mé diplomové práce bylo sledovat imunitní parametry u dvou skupin pacientů s karcinomem prostaty (pacienti s biochemickým relapsem a hormon refrakterním stádiem), zařazených v I./II. fázi klinických studií a léčených imunoterapeutickým přípravkem DCVAC/PCa. Pomocí tří metod zaměřených na sledování buněčné a humorální imunity jsme u pacientů sledovali aktivaci protinádorově specifické odpovědi.

Zaznamenali jsme přítomnost zvýšeného procenta antigen specifických CD8 T lymfocytů proti nádorovým antigenům PSA, MAGE-A1 a MAGE-A3 v periferní krvi pacientů obou sledovaných skupin oproti skupině zdravých kontrol. Pouze v případě testovaného nádorového antigenu NY-ESO-1 jsme nezaznamenali signifikantně zvýšené procento antigen specifických T lymfocytů oproti skupině zdravých kontrol. V obou skupinách sledovaných pacientů jsme zaznamenali signifikantně se zvyšující procento antigen specifických CD8 T lymfocytů proti nádorovému antigenu PSA před léčbou a po ukončení léčby. Přítomnost vyššího procenta antigen specifických CD8 T lymfocytů proti antigenu PSA a MAGE-A3 pozitivně korelovala s vyšší hodnotou PSA-DT pacientů ze skupiny biochemický relaps. U pacientů s hormon refrakterním karcinomem prostaty jsme nezaznamenali statisticky signifikantní korelaci mezi délkou přežití a procentem antigen specifických T lymfocytů v periferní krvi.

Zároveň jsme v séru některých pacientů zaznamenali přítomnost protilátek IgG proti antigenu PSA a MAGE-A3. Ve skupině pacientů s biochemickým relapsem jsme zaznamenali statisticky signifikantní závislost mezi přítomností protilátek proti antigenu PSA a vyšší hodnotou PSA-DT, tuto korelaci jsme nezaznamenali v případě nádorového antigenu MAGE-A3. U hormon refrakterních pacientů přítomnost pozitivních protilátek proti nádorovému antigenu PSA v séru signifikantně korelovala s lepší prognózou pacientů (u nádorového antigenu MAGE-A3 byl tento trend nesignifikantní).

U pacientů s biochemickým relapsem jsme sledovali přítomnost některých cytokinů produkovaných PBMC v průběhu terapie a zaznamenali jsme nesignifikantní nárůst cytokinu IFN- γ a nesignifikantní pokles imunosupresivního cytokinu IL-10. Množství cytokinu IL-6 a TNF- α se v průběhu terapie signifikantně neměnilo.

Sledování imunitních parametrů u pacientů léčených přípravkem DCVAC/PCa v rámci I./II. fáze klinické studie nám přineslo velice cenná data o antigen specifické buněčné i humorální odpovědi. Pouze klinické testování těchto parametrů na větší kohortě pacientů oproti skupině placebo však přinese potvrzení těchto výsledků a statisticky cenná data, která by mohla vést k registraci tohoto přípravku. Na základě těchto dat plánujeme rozsáhlé testování zmíněných parametrů v rámci II. a III. fáze klinické studie pacientů léčených přípravkem DCVAC/PCa v následujících letech. Tato diplomová práce přispěla mj. k výběru spektra metod, relevantních pro sledování protinádorové imunitní reakce u pacientů s karcinomem prostaty.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ahmad, Sarfraz, Paul Sweeney, Gerald C Sullivan, and Mark Tangney
2012 DNA Vaccination for Prostate Cancer, from Preclinical to Clinical Trials - Where We Stand? *Genetic Vaccines and Therapy* 10(1): 9.
- Akhtar, Naveed H, Orrin Pail, Ankeeta Saran, Lauren Tyrell, and Scott T Tagawa
2012 Prostate-Specific Membrane Antigen-Based Therapeutics. *Advances in Urology* 2012: 973820.
- Altman, John D, Paul A H Moss, Philip J R Goulder, et al.
2011 Phenotypic Analysis of Antigen-Specific T Lymphocytes. *Science*. 1996. 274: 94-96. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 187(1): 7-9.
- Andersen, Mads Hald, Niels Junker, Eva Ellebaek, Inge Marie Svane, and Per Thor Straten
2010 Therapeutic Cancer Vaccines in Combination with Conventional Therapy. *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2010: 237623.
- Arlen, Philip M, James L Gulley, Catherine Parker, et al.
2006 A Randomized Phase II Study of Concurrent Docetaxel plus Vaccine versus Vaccine Alone in Metastatic Androgen-Independent Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 12(4): 1260-1269.
- Arlen, Philip M, Howard L Kaufman, and Robert S DiPaola
2005 Pox Viral Vaccine Approaches. *Seminars in Oncology* 32(6): 549-555.
- Arlen, Philip M, Lisa Skarupa, Mary Pazdur, et al.
2007 Clinical Safety of a Viral Vector Based Prostate Cancer Vaccine Strategy. *The Journal of Urology* 178(4 Pt 1): 1515-1520.
- Banchereau, J, F Briere, C Caux, et al.
2000 Immunobiology of Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology* 18: 767-811.
- Bander, Neil H, Matthew I Milowsky, David M Nanus, et al.
2005 Phase I Trial of ¹⁷⁷lutetium-Labeled J591, a Monoclonal Antibody to Prostate-Specific Membrane Antigen, in Patients with Androgen-Independent Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23(21): 4591-4601.
- Bartůňková, Jiřina, and Milan Paulík
2005 Vyšetřovací Metody v Imunologii. <http://www.medvik.cz/link/MED00118266>, accessed May 4, 2014.
- Bartůňková, Jiřina, Radek Špíšek, and Michal Podrazil
2013 Imunoterapie Karcinomu Prostaty. *Urologie pro Praxi* 14(1): 15-18.
- Becker, Jordan T, Brian M Olson, Laura E Johnson, et al.
2010 DNA Vaccine Encoding Prostatic Acid Phosphatase (PAP) Elicits Long-Term T-Cell

Responses in Patients with Recurrent Prostate Cancer. *Journal of Immunotherapy* (Hagerstown, Md.: 1997) 33(6): 639–647.

BÍLKOVÁ, Pavla. *Sledování imunitních parametrů v průběhu protinádorové imunoterapie*. Praha: Karlova univerzita, 2. lékařská fakulta, Ústav imunologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole, 2012. 57 s. Vedoucí bakalářské práce PharmDr. Jitka Fučíková, Ph.D.

Burch, P A, J K Breen, J C Buckner, et al.

2000 Priming Tissue-Specific Cellular Immunity in a Phase I Trial of Autologous Dendritic Cells for Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 6(6): 2175–2182.

Butterfield, Lisa H

2013 Dendritic Cells in Cancer Immunotherapy Clinical Trials: Are We Making Progress? *Frontiers in Immunology* 4: 454.

Cheever, Martin A, and Celestia S Higano

2011 PROVENGE (Sipuleucel-T) in Prostate Cancer: The First FDA-Approved Therapeutic Cancer Vaccine. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 17(11): 3520–3526.

Clay, T M, A C Hobeika, P J Mosca, H K Lyster, and M A Morse

2001 Assays for Monitoring Cellular Immune Responses to Active Immunotherapy of Cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 7(5): 1127–1135.

Clay, Timothy M., Amy C. Hobeika, Paul J. Mosca, H. Kim Lyster, and Michael A. Morse

2001 Assays for Monitoring Cellular Immune Responses to Active Immunotherapy of Cancer. *Clinical Cancer Research* 7(5): 1127–1135.

Denmeade, Samuel R., and John T. Isaacs

2002 A History of Prostate Cancer Treatment. *Nature Reviews Cancer* 2(5): 389–396.

DiPaola, R S, M Plante, H Kaufman, et al.

2006 A Phase I Trial of Pox PSA Vaccines (PROSTVAC-VF) with B7-1, ICAM-1, and LFA-3 Co-Stimulatory Molecules (TRICOM) in Patients with Prostate Cancer. *Journal of Translational Medicine* 4: 1.

Drake, Charles G

2009 Immunotherapy for Prostate Cancer: Walk, Don't Run. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27(25): 4035–4037.

2010 Prostate Cancer as a Model for Tumour Immunotherapy. *Nature Reviews. Immunology* 10(8): 580–593.

Drake, Charles G, Elizabeth Jaffee, and Drew M Pardoll

2006 Mechanisms of Immune Evasion by Tumors. *Advances in Immunology* 90: 51–81.

Dunbar, P R, G S Ogg, J Chen, et al.

1998 Direct Isolation, Phenotyping and Cloning of Low-Frequency Antigen-Specific Cytotoxic T Lymphocytes from Peripheral Blood. *Current Biology: CB* 8(7): 413–416.

- Dunn, Gavin P, Catherine M Koebel, and Robert D Schreiber
 2006 Interferons, Immunity and Cancer Immunoediting. *Nature Reviews. Immunology* 6(11): 836–848.
- Dunn, Gavin P, Lloyd J Old, and Robert D Schreiber
 2004 The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annual Review of Immunology* 22: 329–360.
- Van den Eertwegh, Alfons J M, Jurjen Versluis, H Pieter van den Berg, et al.
 2012 Combined Immunotherapy with Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Transduced Allogeneic Prostate Cancer Cells and Ipilimumab in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Phase 1 Dose-Escalation Trial. *The Lancet Oncology* 13(5): 509–517.
- Eisenhauer, E A, P Therasse, J Bogaerts, et al.
 2009 New Response Evaluation Criteria in Solid Tumours: Revised RECIST Guideline (version 1.1). *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 45(2): 228–247.
- Freedland, Stephen J, and Judd W Moul
 2007 Prostate Specific Antigen Recurrence after Definitive Therapy. *The Journal of Urology* 177(6): 1985–1991.
- Geary, Sean M, and Aliasger K Salem
 2013 Prostate Cancer Vaccines: Update on Clinical Development. *Oncoimmunology* 2(5): e24523.
- Givan, A L, J L Fisher, M Waugh, M S Ernstoff, and P K Wallace
 1999 A Flow Cytometric Method to Estimate the Precursor Frequencies of Cells Proliferating in Response to Specific Antigens. *Journal of Immunological Methods* 230(1-2): 99–112.
- Gulley, J L, R A Madan, and J Schlom
 2011 Impact of Tumour Volume on the Potential Efficacy of Therapeutic Vaccines. *Current Oncology (Toronto, Ont.)* 18(3): e150–157.
- Gulley, James, Alice P Chen, William Dahut, et al.
 2002 Phase I Study of a Vaccine Using Recombinant Vaccinia Virus Expressing PSA (rV-PSA) in Patients with Metastatic Androgen-Independent Prostate Cancer. *The Prostate* 53(2): 109–117.
- Gulley, James L, Philip M Arlen, Ravi A Madan, et al.
 2010 Immunologic and Prognostic Factors Associated with Overall Survival Employing a Poxviral-Based PSA Vaccine in Metastatic Castrate-Resistant Prostate Cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 59(5): 663–674.
- Gulley, JamesL, and Bharpreet Singh
 2014 Immunotherapy and Therapeutic Vaccines in Prostate Cancer: An Update on Current Strategies and Clinical Implications. *Asian Journal of Andrology* 16(3): 364.
- Halabi, Susan, Eric J Small, Philip W Kantoff, et al.
 2003 Prognostic Model for Predicting Survival in Men with Hormone-Refractory Metastatic Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 21(7): 1232–1237.

- Heidenreich, A, J Bellmunt, M Bolla, et al.
 2011 [EAU guidelines on prostate cancer. Part I: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease]. *Actas urologicas españolas* 35(9): 501–514.
- Heidenreich, Axel, Patrick J Bastian, Joaquim Bellmunt, Michel Bolla, Steven Joniau, Theodor van der Kwast, Malcolm Mason, Vsevolod Matveev, Thomas Wiegel, F Zattoni, et al.
 2014 EAU Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent-Update 2013. *European Urology* 65(1): 124–137.
- Heidenreich, Axel, Patrick J Bastian, Joaquim Bellmunt, Michel Bolla, Steven Joniau, Theodor van der Kwast, Malcolm Mason, Vsevolod Matveev, Thomas Wiegel, Filiberto Zattoni, et al.
 2014 EAU Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Advanced, Relapsing, and Castration-Resistant Prostate Cancer. *European Urology* 65(2): 467–479.
- Higano, Celestia S, John M Corman, David C Smith, et al.
 2008 Phase 1/2 Dose-Escalation Study of a GM-CSF-Secreting, Allogeneic, Cellular Immunotherapy for Metastatic Hormone-Refractory Prostate Cancer. *Cancer* 113(5): 975–984.
- Higano, Celestia S, Paul F Schellhammer, Eric J Small, et al.
 2009 Integrated Data from 2 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trials of Active Cellular Immunotherapy with Sipuleucel-T in Advanced Prostate Cancer. *Cancer* 115(16): 3670–3679.
- Hodge, J W, H Sabzevari, A G Yafal, et al.
 1999 A Triad of Costimulatory Molecules Synergize to Amplify T-Cell Activation. *Cancer Research* 59(22): 5800–5807.
- Huber, Marie L, Laura Haynes, Chris Parker, and Peter Iversen
 2012 Interdisciplinary Critique of Sipuleucel-T as Immunotherapy in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 104(4): 273–279.
- Kainthla, Rani Poonam, Rajpal Singh Kashyap, Sweta Prasad, et al.
 2006 Evaluation of Adenosine Deaminase Assay for Analyzing T-Lymphocyte Density in Vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal* 42(10): 287–289.
- Kantoff, Philip W, Celestia S Higano, Neal D Shore, et al.
 2010 Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *The New England Journal of Medicine* 363(5): 411–422.
- Kantoff, Philip W, Thomas J Schuetz, Brent A Blumenstein, et al.
 2010 Overall Survival Analysis of a Phase II Randomized Controlled Trial of a Poxviral-Based PSA-Targeted Immunotherapy in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 28(7): 1099–1105.
- Kaufman, Howard L, Wei Wang, Judith Manola, et al.
 2004 Phase II Randomized Study of Vaccine Treatment of Advanced Prostate Cancer (E7897): A Trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 22(11): 2122–2132.

- Keilholz, Ulrich, Jeffrey Weber, James H Finke, et al.
2002 Immunologic Monitoring of Cancer Vaccine Therapy: Results of a Workshop Sponsored by the Society for Biological Therapy. *Journal of Immunotherapy* (Hagerstown, Md.: 1997) 25(2): 97–138.
- Kiessling, Andrea, Susanne Füssel, Rebekka Wehner, et al.
2008 Advances in Specific Immunotherapy for Prostate Cancer. *European Urology* 53(4): 694–708.
- Klenerman, Paul, Vincenzo Cerundolo, and P. Rod Dunbar
2002 TRACKING T CELLS WITH TETRAMERS: NEW TALES FROM NEW TOOLS. *Nature Reviews Immunology* 2(4): 263–272.
- Le, Dung T, Drew M Pardoll, and Elizabeth M Jaffee
2010 Cellular Vaccine Approaches. *Cancer Journal* (Sudbury, Mass.) 16(4): 304–310.
- Lee, K H, E Wang, M B Nielsen, et al.
1999 Increased Vaccine-Specific T Cell Frequency after Peptide-Based Vaccination Correlates with Increased Susceptibility to in Vitro Stimulation but Does Not Lead to Tumor Regression. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 163(11): 6292–6300.
- Di Lorenzo, Giuseppe, Carlo Buonerba, and Philip W. Kantoff
2011 Immunotherapy for the Treatment of Prostate Cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology* 8(9): 551–561.
- Mackensen, A, H Veelken, M Lahn, et al.
1997 Induction of Tumor-Specific Cytotoxic T Lymphocytes by Immunization with Autologous Tumor Cells and Interleukin-2 Gene Transfected Fibroblasts. *Journal of Molecular Medicine* (Berlin, Germany) 75(4): 290–296.
- Madan, Ravi A, Philip M Arlen, Mahsa Mohebtash, James W Hodge, and James L Gulley
2009 Prostavac-VF: A Vector-Based Vaccine Targeting PSA in Prostate Cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 18(7): 1001–1011.
- Madan, Ravi A, Mahsa Mohebtash, Philip M Arlen, et al.
2012 Ipilimumab and a Poxviral Vaccine Targeting Prostate-Specific Antigen in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Phase 1 Dose-Escalation Trial. *The Lancet Oncology* 13(5): 501–508.
- Maino, V C, and L J Picker
1998 Identification of Functional Subsets by Flow Cytometry: Intracellular Detection of Cytokine Expression. *Cytometry* 34(5): 207–215.
- Maraveyas, A, B Baban, D Kennard, et al.
1999 Possible Improved Survival of Patients with Stage IV AJCC Melanoma Receiving SRL 172 Immunotherapy: Correlation with Induction of Increased Levels of Intracellular Interleukin-2 in Peripheral Blood Lymphocytes. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 10(7): 817–824.

- May, Kenneth F, Jr, James L Gulley, Charles G Drake, Glenn Dranoff, and Philip W Kantoff
2011 Prostate Cancer Immunotherapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 17(16): 5233–5238.
- McNeel, Douglas G, Edward J Dunphy, James G Davies, et al.
2009 Safety and Immunological Efficacy of a DNA Vaccine Encoding Prostatic Acid Phosphatase in Patients with Stage D0 Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27(25): 4047–4054.
- Morris, Michael J, Chaitanya R Divgi, Neeta Pandit-Taskar, et al.
2005 Pilot Trial of Unlabeled and Indium-111-Labeled Anti-Prostate-Specific Membrane Antigen Antibody J591 for Castrate Metastatic Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11(20): 7454–7461.
- Murphy, G P, B A Tjoa, S J Simmons, et al.
1999 Infusion of Dendritic Cells Pulsed with HLA-A2-Specific Prostate-Specific Membrane Antigen Peptides: A Phase II Prostate Cancer Vaccine Trial Involving Patients with Hormone-Refractory Metastatic Disease. *The Prostate* 38(1): 73–78.
- Paller, C J, D Olatoye, S Xie, et al.
2014 The Effect of the Frequency and Duration of PSA Measurement on PSA Doubling Time Calculations in Men with Biochemically Recurrent Prostate Cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 17(1): 28–33.
- Paul, W E, and R A Seder
1994 Lymphocyte Responses and Cytokines. *Cell* 76(2): 241–251.
- Pavlenko, M, A-K Roos, A Lundqvist, et al.
2004 A Phase I Trial of DNA Vaccination with a Plasmid Expressing Prostate-Specific Antigen in Patients with Hormone-Refractory Prostate Cancer. *British Journal of Cancer* 91(4): 688–694.
- Phan, Giao Q, James C Yang, Richard M Sherry, et al.
2003 Cancer Regression and Autoimmunity Induced by Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4 Blockade in Patients with Metastatic Melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(14): 8372–8377.
- Pittet, M J, D Valmori, P R Dunbar, et al.
1999 High Frequencies of Naive Melan-A/MART-1-Specific CD8(+) T Cells in a Large Proportion of Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (HLA)-A2 Individuals. *The Journal of Experimental Medicine* 190(5): 705–715.
- Pound, C R, A W Partin, M A Eisenberger, et al.
1999 Natural History of Progression after PSA Elevation Following Radical Prostatectomy. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 281(17): 1591–1597.
- Puccetti, P, R Bianchi, M C Fioretti, et al.
1994 Use of a Skin Test Assay to Determine Tumor-Specific CD8+ T Cell Reactivity. *European Journal of Immunology* 24(6): 1446–1452.

- Rice, Jason, Christian H Ottensmeier, and Freda K Stevenson
2008 DNA Vaccines: Precision Tools for Activating Effective Immunity against Cancer. *Nature Reviews. Cancer* 8(2): 108–120.
- Romero, P, P R Dunbar, D Valmori, et al.
1998 Ex Vivo Staining of Metastatic Lymph Nodes by Class I Major Histocompatibility Complex Tetramers Reveals High Numbers of Antigen-Experienced Tumor-Specific Cytolytic T Lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 188(9): 1641–1650.
- Roos, Anna-Karin, Maxim Pavlenko, Jehad Charo, Lars Egevad, and Pavel Pisa
2005 Induction of PSA-Specific CTLs and Anti-Tumor Immunity by a Genetic Prostate Cancer Vaccine. *The Prostate* 62(3): 217–223.
- Salgaller, M L, P A Lodge, J G McLean, et al.
1998 Report of Immune Monitoring of Prostate Cancer Patients Undergoing T-Cell Therapy Using Dendritic Cells Pulsed with HLA-A2-Specific Peptides from Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA). *The Prostate* 35(2): 144–151.
- Sanderson, Kristin, Ronald Scotland, Peter Lee, et al.
2005 Autoimmunity in a Phase I Trial of a Fully Human Anti-Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4 Monoclonal Antibody with Multiple Melanoma Peptides and Montanide ISA 51 for Patients with Resected Stages III and IV Melanoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23(4): 741–750.
- Scheffold, A, M Assenmacher, L Reiners-Schramm, R Lauster, and A Radbruch
2000 High-Sensitivity Immunofluorescence for Detection of the pro- and Anti-Inflammatory Cytokines Gamma Interferon and Interleukin-10 on the Surface of Cytokine-Secreting Cells. *Nature Medicine* 6(1): 107–110.
- Scher, H I, and G Heller
2000 Clinical States in Prostate Cancer: Toward a Dynamic Model of Disease Progression. *Urology* 55(3): 323–327.
- Schreiber, S, E Kämpgen, E Wagner, et al.
1999 Immunotherapy of Metastatic Malignant Melanoma by a Vaccine Consisting of Autologous Interleukin 2-Transfected Cancer Cells: Outcome of a Phase I Study. *Human Gene Therapy* 10(6): 983–993.
- Schweizer, Michael T, and Charles G Drake
2014 Immunotherapy for Prostate Cancer: Recent Developments and Future Challenges. *Cancer Metastasis Reviews*.
- Shi, Yufang, Catherine H Liu, Arthur I Roberts, et al.
2006 Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) and T-Cell Responses: What We Do and Don't Know. *Cell Research* 16(2): 126–133.
- Siegel, Rebecca, Deepa Naishadham, and Ahmedin Jemal
2013 Cancer Statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 63(1): 11–30.
- Simons, J W, B Mikhak, J F Chang, et al.
1999 Induction of Immunity to Prostate Cancer Antigens: Results of a Clinical Trial of

- Vaccination with Irradiated Autologous Prostate Tumor Cells Engineered to Secrete Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Using Ex Vivo Gene Transfer. *Cancer Research* 59(20): 5160–5168.
- Small, E J, P Fratesi, D M Reese, et al.
2000 Immunotherapy of Hormone-Refractory Prostate Cancer with Antigen-Loaded Dendritic Cells. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 18(23): 3894–3903.
- Small, Eric J, Paul F Schellhammer, Celestia S Higano, et al.
2006 Placebo-Controlled Phase III Trial of Immunologic Therapy with Sipuleucel-T (APC8015) in Patients with Metastatic, Asymptomatic Hormone Refractory Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 24(19): 3089–3094.
- Sonpavde, Guru, Giuseppe Di Lorenzo, Celestia S Higano, et al.
2012 The Role of Sipuleucel-T in Therapy for Castration-Resistant Prostate Cancer: A Critical Analysis of the Literature. *European Urology* 61(4): 639–647.
- Špíšek, Radek, Rudolf Horváth, Jana Kayserová, and Jiřina Bartůňková
2010 Možnosti Protinádorové Imunoterapie U Karcinomu Prostaty. *Lékařské Listy : Prevence - Diagnostika - Terapie - Péče - Teorie - Praxe : Příloha Zdravotnických Novin* 59(6): 9–12.
- Tannock, Ian F, Ronald de Wit, William R Berry, et al.
2004 Docetaxel plus Prednisone or Mitoxantrone plus Prednisone for Advanced Prostate Cancer. *The New England Journal of Medicine* 351(15): 1502–1512.
- Tsen, Shaw-Wei D, Augustine H Paik, Chien-Fu Hung, and T-C Wu
2007 Enhancing DNA Vaccine Potency by Modifying the Properties of Antigen-Presenting Cells. *Expert Review of Vaccines* 6(2): 227–239.
- Vaquerano, J E, M Peng, J W Chang, Y M Zhou, and S P Leong
1998 Digital Quantification of the Enzyme-Linked Immunospot (ELISPOT). *BioTechniques* 25(5): 830–834, 836.
- Waanders, G A, D Rimoldi, D Liénard, et al.
1997 Melanoma-Reactive Human Cytotoxic T Lymphocytes Derived from Skin Biopsies of Delayed-Type Hypersensitivity Reactions Induced by Injection of an Autologous Melanoma Cell Line. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 3(5): 685–696.
- Walsh, P C
2000 Cancer Surveillance Series: Interpreting Trends in Prostate Cancer--Part I: Evidence of the Effects of Screening in Recent Prostate Cancer Incidence, Mortality, and Survival Rates. *The Journal of Urology* 163(1): 364–365.
- Walsh, Patrick C, Theodore L DeWeese, and Mario A Eisenberger
2007 Clinical Practice. Localized Prostate Cancer. *The New England Journal of Medicine* 357(26): 2696–2705.

Weber, Jeffrey

2009 Ipilimumab: Controversies in Its Development, Utility and Autoimmune Adverse Events. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 58(5): 823–830.

Williams, Simon A, Pratap Singh, John T Isaacs, and Samuel R Denmeade

2007 Does PSA Play a Role as a Promoting Agent during the Initiation And/or Progression of Prostate Cancer? *The Prostate* 67(3): 312–329.

Wolchok, Jedd D, Axel Hoos, Steven O'Day, et al.

2009 Guidelines for the Evaluation of Immune Therapy Activity in Solid Tumors: Immune-Related Response Criteria. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 15(23): 7412–7420.

Internetové zdroje:

Sotio [online]. 2014 [cit. 2014-05-04]. Dostupné z: <http://www.sotio.com>