

Univerzita Karlova v Praze
2. lékařská fakulta

Studijní program: Postgraduální doktorské studium v biomedicině

Studijní obor: Biologie a patologie buňky



MUDr. Michal Podrazil

Subpopulace imunokompetentních buněk a jejich význam

u imunopatologických stavů

Podtitul: Subpopulace imunokompetentních buněk v protinádorové imunitě a

využití dendritických buněk pro imunoterapii nádorů

Immunocompetent cells and their importance in immunopathological conditions

Subtitle: Immunocompetent cells in antitumor immunity and principles

of dendritic cell-based immunotherapy

Dizertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Jiřina Bartůňková, DrSc., MBA

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 24. září 2015

MUDr. Michal Podrazil

Identifikační záznam:

PODRAZIL, Michal. *Subpopulace imunokompetentních buněk a jejich význam u imunopatologických stavů. [Immunocompetent cells and their importance in immunopathological conditions]*. Praha, 2015. 114 stran, 3 přílohy. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Ústav imunologie UK 2.LF a FN Motol 2015. Školitel: Bartůňková, Jiřina.

Poděkování

V první řadě bych rád poděkoval Prof. MUDr. Jiřině Bartůňkové, DrSc. za její cenné připomínky, velkou trpělivost a odborné vedení v průběhu celého postgraduálního studia. Velké díky rovněž patří celé mé rodině, zejména manželce Luce, která se mnou celé studium prožívala, vždy mě ve všem podporovala a vytvářela mi příjemné rodinné zázemí. Samozřejmě také děkuji všem ostatním, kteří se na celém projektu podíleli.

Seznam zkratek:

ACI-MAP	aktivní buněčná imunoterapie-širokospektrá antigenní prezentace
ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách
AE	adverse event
AMP	adenosinmonofosfát
APC	antigen prezentující buňka
ATP	adenosintrifosfát
BCR	receptor B lymfocytů
CCL, CXCL	typy chemokinů
CCR	typ chemokinových receptorů
CD	diferenční antigen (cluster of differentiation)
CFA	cyklofosfamid
CRPC	kastračně rezistentní karcinom prostaty (castrate resistant prostate cancer)
CT	počítačová tomografie
CTL	cytotoxické T lymfocyty
DC	dendritická buňka
DCVAC	dendritic cell vaccine
DCVAC/PCa	dendritic cell vaccine against prostate cancer
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FGF	fibroblast growth factor
FoxP3	forkhead box P3, intracelulární protein
GM-CSF	granulocyty a monocyty kolonie stimulující faktor
GMP	správná výrobní praxe (good manufacturing practices)
HLA	lidský leukocytární antigen (human leukocyte antigen)
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN α	interferon α
IFN γ	interferon γ
IL	interleukin
LFA-3	lymphocyte function-associated antigen
LNCaP	buněčná linie karcinomu prostaty
MAGE-A1,3	melanome associated antigen 1,3
mDC	myeloidní dendritické buňky
MDSC	myeloid derived suppressor cells
MHC	major histocompatibility complex
MIC-1	macrophage inhibitory cytokine 1
MMP	matrix metaloproteináza
MRD	minimální reziduální nemoc
NET	neutrophil extracapsular trap
NK	natural killer
OS	celkové přežití
PAP	kyselá prostatická fosfatáza
PD-1	programmed cell death protein 1
pDC	plasmocytoidní dendritické buňky
PDE2	fosfodiesteráza 2
PDGF	platelet derived growth factor
PFS	přežití bez známek progresu onemocnění
PGE	prostaglandin E
poly I:C	polyinosinic:polycytidylic acid
PRR	pattern recognition receptor
PSA	prostatický specifický antigen
PSADT	PSA doubling time
PSMA	prostatický specifický membránový antigen
RAG	gen aktivující rekombinaci

RNA	ribonukleová kyselina
RP	radikální prostatektomie
SAE	serious adverse event
SPECT	single photon emission computed tomography
SRT	salvage radiotherapy
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TAM	tumor asociované makrofágy
TAN	tumor asociované neutrofily
TCR	receptor T lymfocytů
TGF	transforming growth factor
Th	pomocný T lymfocyt
TIL	tumor infiltrující lymfocyty
TNF	tumor necrosis faktor
Treg	regulační T lymfocyt
ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor

Obsah

Seznam zkratk:	4
1. Abstrakt	8
2. Úvod do problematiky	10
2.1 Role imunitního systému v obraně proti nádorům	10
2.2 Editace nádoru imunitním systémem- tzv. „Cancer immune editing“	11
2.3 Strategie úniku nádorových buněk kontrole imunitního systému	13
3. Úloha jednotlivých druhů imunokompetentních buněk v protinádorové imunitě	14
3.1 Nespecifické složky imunity	15
3.1.1 Neutrofilly	15
3.1.2 Makrofágy	16
3.1.3 Myeloidní supresorové buňky- MDSC	17
3.1.4 NK buňky	17
3.1.5 NK-T buňky	18
3.2 Specifické složky imunity	18
3.2.1 T lymfocyty	18
3.2.2 Th17 lymfocyty	19
3.2.3 Regulační T lymfocyty- Treg	20
3.3 Dendritické buňky	21
3.3.1 Obecná charakteristika DC	21
3.3.2 Subpopulace DC	22
4. Imunoterapie karcinomu prostaty	23
4.1 Karcinom prostaty	23
4.2 Přehled imunoterapeutických přípravků klinicky testovaných u karcinomu prostaty	24
4.2.1 Sipuleucel-T	24
4.2.2 PROSTVAC	26
4.2.3 Imunoterapie pomocí dendritických buněk	27
5. Cíle práce	30
5.1 Analýza imunokompetentních buněk v imunoterapeutickém přípravku DCVAC/PCa	30
5.2 Vyhodnocení schopnosti migrace dendritických buněk obsažených v DCVAC/PCa in vivo	30
5.3 Vyhodnocení bezpečnosti a schopnosti indukce imunitní reakce u pilotní „first-in-men“ aplikace imunoterapie DCVAC/PCa in vivo u pacienta s kastročně-rezistentním metastatickým karcinomem prostaty	31
5.4 Vyhodnocení bezpečnostních parametrů, schopnosti indukce imunitní protinádorové odpovědi a délky celkového přežití u pacientů s generalizovaným karcinomem prostaty léčených pomocí aktivní buněčné imunoterapie preparátem DCVAC/PCa v kombinaci s chemoterapií ve fázi I/II klinického hodnocení	31
5.5 Vyhodnocení bezpečnostních parametrů, schopnosti indukce imunitní protinádorové odpovědi a kinetiky PSA u pacientů s lokalizovaným karcinomem prostaty léčených pomocí aktivní buněčné imunoterapie preparátem DCVAC/PCa ve fázi I/II klinického hodnocení	31
6. Materiál a metodika	31
7. Výsledky a diskuze	31
7.1 Analýza imunokompetentních buněk v imunoterapeutickém přípravku DCVAC/PCa	32
7.2 Vyhodnocení schopnosti migrace dendritických buněk obsažených v DCVAC/PCa in vivo	36
7.3 Koncept kombinované chemoterapie a imunoterapie pomocí dendritických buněk u karcinomu prostaty	40
7.4 Fáze I/II klinického hodnocení imunoterapie DCVAC/PCa v kombinaci s chemoterapií u pacientů s metastatickým kastročně-rezistentním karcinomem prostaty	41

7.5 Fáze I/II klinického hodnocení imunoterapie pomocí DCVAC/PCa u pacientů s biochemickou recidivou karcinomu prostaty	44
8. Závěr.....	46
9. Seznam citované literatury	47
10. Seznam vlastních publikací.....	53
11. Přílohy	56

1. Abstrakt

Pokroky v současné imunologii vedou k lepšímu porozumění interakcí mezi imunitním systémem a nádory, což vzbuzuje zájem o využití imunitního systému v léčbě nádorových onemocnění. V úvodní části práce jsou shrnuty teoretické poznatky o mechanismech protinádorové imunitní odpovědi a jednotlivých složkách imunitního systému podílejících se na tomto procesu. Ústřední úlohu v této interakci reprezentují dendritické buňky. Právě jejich využitím v klinické medicíně se dlouhodobě zabývá naše pracoviště. V této práci se věnuji několika dílčím cílům. První z nich je analýza zastoupení jednotlivých subpopulací imunokompetentních buněk v imunoterapeutickém léčivém přípravku na bázi dendritických buněk proti karcinomu prostaty- DCVAC/PCa vyvinutého na Ústavu imunologie, dále praktickým aspektům přípravy této formy aktivní buněčné imunoterapie a její optimalizaci za podmínek správné výrobní praxe. Výsledky této části byly součástí farmaceutické dokumentace, která vedla ke schválení výrobního postupu i zahájení klinických studií u pacientů s karcinomem prostaty regulačními autoritami. Dalším krokem bylo následné praktické testování imunoterapie DCVAC/PCa nejprve v pilotní „first-in-men“ aplikaci u pacienta s pokročilým metastatickým karcinomem prostaty a následně klinické hodnocení tohoto preparátu v rámci 2 studií fáze I/II již u většího souboru 52 pacientů se stejnou onkologickou diagnózou. Cílem bylo vyhodnocení bezpečnostních parametrů DCVAC/PCa, jeho schopnosti indukce imunitní protinádorové odpovědi a hodnocení klinické odpovědi u pacientů. Příznivý bezpečnostní profil léčivého přípravku spolu se schopností indukce imunitní odpovědi na nádorové struktury a potvrzeným klinickým efektem pro pacienty vedl k pokračování v testování této formy imunoterapie v dalších fázích klinického hodnocení u celé řady nádorových chorob.

Klíčová slova:

imunitní systém, imunitní dohled nad nádory, imunoterapie, dendritické buňky, karcinom prostaty

Abstract

Current advances in immunology lead to a better understanding of interactions between the immune system and cancer, which raises interest in using the immune system in cancer treatment. The introductory part summarises theoretical knowledge of mechanisms of anti-tumour immune responses and the individual components of the immune system participating in this process. Dendritic cells play a central role in this interaction and we have been working on the use of these cells in clinical medicine over a long time. In this work I concentrate on several objectives. First is the analysis of the representation of the various subpopulations of immunocompetent cells in the immunotherapeutic medical product based on dendritic cells against prostate cancer, the dendritic cell vaccine against prostate cancer, DCVAC/PCa, developed at our Department of Immunology. Following is the evaluation of practical aspects of the preparation of this form of active cellular immunotherapy and its optimisation under conditions of good manufacturing practice. The results of this work formed part of the pharmaceutical documentation to regulatory authorities that led to the approval of the manufacturing process of DCVAC/PCa and the initiation of clinical trials in patients with prostate cancer. Next step was the subsequent practical testing of immunotherapy of DCVAC/PCa, initially in a pilot "first-in-men" application in patients with advanced metastatic prostate cancer followed by a clinical evaluation of this product in Phase I/II trials with a larger set of 52 patients with the same oncological diagnosis. The aim was to evaluate safety parameters of DCVAC/PCa, and its ability to induce an anti-tumour immune response and a clinical response in patients. Favourable safety profile of DCVAC/PCa together with its ability of inducing an immune response to prostate cancer structures and a validated clinical effect led to further testing of this form of immunotherapy in a variety of cancers.

Key words:

immune system, immune surveillance of tumours, immunotherapy, dendritic cells, prostate cancer

2. Úvod do problematiky

2.1 Role imunitního systému v obraně proti nádorům

Hlavní funkcí imunitního systému je obrana proti infekcím. Infekční nemoci byly v historii lidstva až do objevu účinných antimikrobiálních léků nejčastější příčinou smrti. Ještě na počátku 20. století se průměrná délka života pohybovala mezi třiceti pěti a čtyřiceti lety. Z evolučního hlediska bylo proto důležité, aby nás imunitní systém chránil minimálně do okamžiku dosažení reprodukční zralosti. S prodlužující se délkou života jsou před organismus stavěny i další nástrahy, zejména pak boj s nádorovými onemocněními a autoimunitními chorobami. Postupně také přibývalo množství důkazů o tom, že imunitní systém nás chrání i před vznikem nádorových onemocnění, které dominují postreprodukčnímu věku, a že antiinfekční a protinádorová obrana je založená na podobném principu fungování. Nádorové buňky exprimují na svém povrchu antigenní struktury, které se na jiných buněčných typech nevyskytují vůbec, nebo pouze ve velmi malé míře. Těchto tzv. nádorově specifických, resp. asociovaných antigenů je již popsáno velké množství. Problémem však je, že nádorové buňky disponují celou řadou schopností, jak uniknout kontrolním mechanismům imunitního systému, které významnou měrou znevýhodňují organismus při eliminaci nádorových buněk (Rosenberg and Dudley 2004). Ke značnému pokroku v oblasti imunoterapie došlo především díky porozumění molekulárním interakcím nádorových buněk s imunitním systémem. Uplatnění imunoterapie jakožto léčebné strategie vychází z předpokladu, že imunitní systém má schopnost rozeznat a eliminovat nádorové buňky zejména v raném stadiu karcinogeneze, ještě před klinickou manifestací onemocnění. Řada experimentálních dat však ukázala, že u pokročilých stadií nemoci jsou imunitní mechanismy často neúčinné nebo utlumené a v některých případech dokonce růst nádoru podporují. Tato ambivalence imunitního systému se zdá být zcela zásadní ve správném načasování imunoterapie.

Cesta k pochopení protinádorových imunitních mechanismů byla složitá. Z historického hlediska na příčinnou souvislost mezi zánětem a nádory poprvé poukázal německý lékař R. Virchow. Na základě nálezu „leukoretikulárního infiltrátu“ v neoplastické tkáni předpokládal, že původ rakoviny je v místech chronického zánětu (Balkwill and Mantovani 2001).

Představa, že imunitní systém může reagovat na nádorovou tkáň, byla poprvé vyslovena v roce 1898 americkým chirurgem W. Coleyem, který zaznamenal vzácné regrese solidních nádorů u pacientů v průběhu bakteriálních infekcí erysipelem (Coley 1910). Jasnější představu o účasti imunitního systému na obraně proti nádorům však přinesla až série transplantačních experimentů na inbredních myších. Na studiích ze čtyřicátých a padesátých let minulého století se poprvé podařilo demonstrovat, že inbrední myši mohou být

imunizovány proti nádorům indukovaným karcinogeny a že transplantovaný nádor u nich navozuje specifickou imunitní odpověď. Na základě těchto objevů byla v roce 1957 sirem M. Burnetem a **L. Thomase formulována hypotéza o protinádorovém imunitním dohledu.** Ta předpokládala existenci strážných buněk pocházejících z thymu, které aktivně monitorují přítomnost transformovaných nádorových buněk (Burnet 1970). Teorie imunitního dohledu by se měla projevit u imunodeficientních jedinců, kde se očekávala zvýšená frekvence nádorů, nicméně zásadní evidence stále chyběla. Rozhodující důkaz o roli imunitního systému v obraně proti nádorům poskytly až studie na myších, které nemají T- a B-lymfocyty v důsledku mutací genů pro RAG1 a RAG2 rekombinázy, enzymů nutných pro tvorbu antigenně specifických receptorů. V porovnání s imunokompetentními kontrolami byly RAG-/- myši náchylnější ke vzniku chemicky indukovaných, ale i spontánně rostoucích nádorů (Shankaran, Ikeda et al. 2001). Série analogických studií na myších knock-out modelech pomohla objasnit roli dalších buněčných složek imunitního systému v prevenci nádorového onemocnění. Za zmínku stojí knock-outy NKT buněk nebo interferonu γ (IFN- γ) (Smyth, Thia et al. 2000, Street, Cretney et al. 2001).

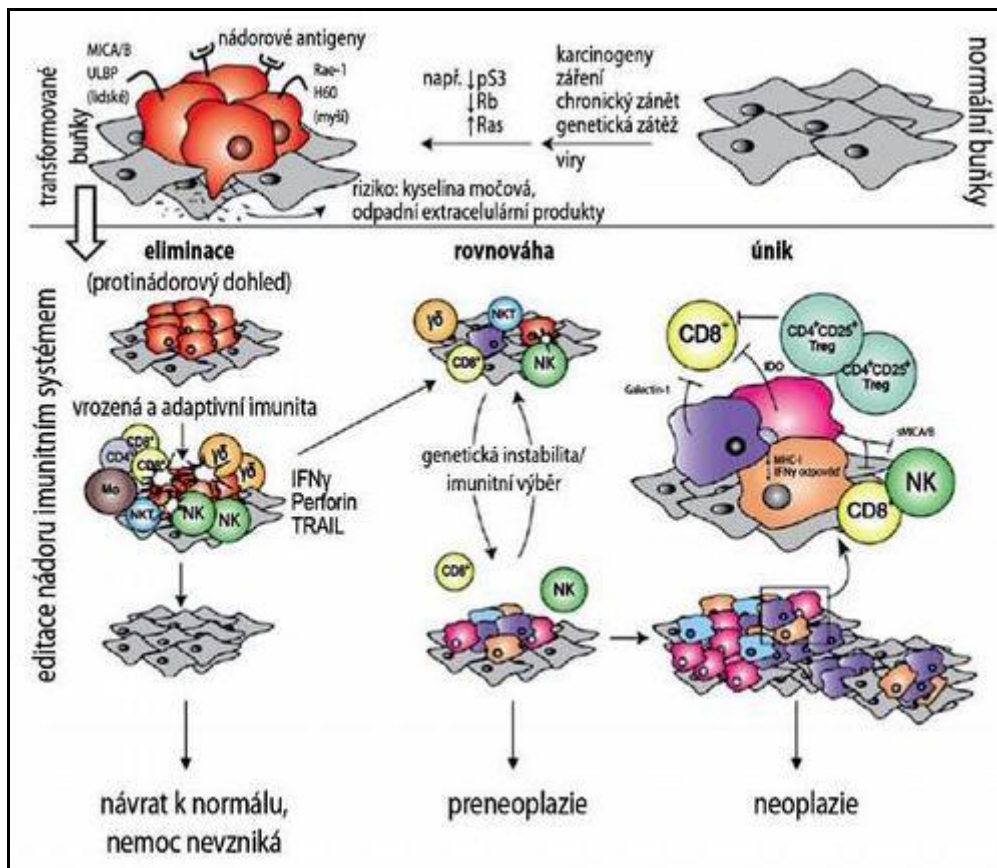
2.2 Editace nádoru imunitním systémem- tzv. „Cancer immune editing“

Původní hypotéza Thomase a Burneta byla později komplexněji rozvinuta G. P. Dunnem a kol. v rámci teorie „Cancer immune editing“ (tj. editace nádoru imunitním systémem), formulované na základě analýzy poznatků získaných při pokusech na RAG deficientních myších (Dunn, Old et al. 2004). Byly odhaleny významné rozdíly v imunogenicitě nádorů v závislosti na hostiteli, ve kterém rostly. Pokud byl tumor izolovaný z RAG2 -/- myši bez funkčního imunitního systému transplantovaný do myši stejného kmene, rostl se stejnou kinetikou. Stejně tak přenos nádoru rostoucího v imunokompetentní myši do kontrolní myši téhož kmene také vedl k rychlé implantaci a rozvoji všech tumorů. Zajímavé a nečekané bylo ovšem zjištění, že téměř 50% tumorů rostoucích v RAG2 -/- imunokomprimovaných myši bylo odvrženo po přenosu do imunokompetentního hostitele. Nádory, které rostly v nepřítomnosti funkčního imunitního systému, byly tedy více imunogenní než tumory vytvořené v imunokompetentních hostitelích. Výše uvedené výsledky naznačují, že imunitní systém se podílí jak na eliminaci nádorových buněk, tak i na postupném tvarování imunogenního fenotypu tumorů, který vede k selekci variant transformovaných buněk schopných uniknout efektorovým mechanismům imunitního systému. Dunn navrhuje rozlišovat tři odlišné úrovně procesu boje imunitního systému proti nádorovým buňkám, a to - eliminaci transformované buňky (elimination), ustanovení rovnováhy mezi transformovanou buňkou a organizmem (equilibrium) a únik transformované buňky před kontrolou imunitního

systému (escape) (**Obr.1**). Stádium **eliminace** se překrývá s imunologickým dohledem a vede k aktivaci a indukci efektorových mechanismů imunitního systému, které jsou schopny eradikace nádorově transformovaných buněk. Celý proces zde může skončit nebo přejít do dalších fází. Stádium **equilibria** představuje dynamický rovnovážný proces, kdy imunitní systém kontroluje růst nádoru, nicméně se vlastním selekčním tlakem podílí na postupné tvorbě variant nádorových buněk se zvyšující se kapacitou přežít útoky efektorových mechanismů. Stádium **úniku** představuje již terminální proces editace, kde jsou imunitním systémem modelované nádorové buňky pod detekční a eliminační hladinou a začínají nekontrolovaně expandovat, což vede ke klinické manifestaci. Fáze ustanovení rovnováhy je nejdelší z těchto tří procesů a klinicky se shoduje s preneoplastickým onemocněním, které nejčastěji zůstává nediodagnostikované. Výsledkem stádia rovnováhy mohou být tři různé situace: 1) kompletní eliminace nádorových buněk, 2) dlouhodobé, možná stálé udržení dynamické rovnováhy mezi aktivní imunitní odpovědí a vymezenou populací nádorových buněk, 3) únik před kontrolou reakce a rozvoj klinického onemocnění.

Nádorové buňky ale nelze vnímat jen jako izolované protihráče imunitního systému. Vznik nádorového onemocnění je mnohastupňový proces komplexní povahy, v němž samotné nádorové buňky představují velmi heterogenní populaci zasazenou do kontextu mikroprostředí nenádorových buněk a tkání (cévy, stromální buňky, mezibuněčná hmota, infiltrující buňky imunitního systému aj.) a tvořící složitý nádorový „ekosystém“.

Cílem imunoterapeutických přístupů je zvýšení účinnosti a zacílení imunitních reakcí proti nádorové tkáni, které by mohly vést k eradikaci nebo ke kontrole nad růstem perzistujících maligně transformovaných buněk. Vzhledem k uvedeným poznatkům o komplexitě nádorového mikroprostředí je důležité správné načasování imunoterapie (Finn and Forni 2002, Finn 2003, Forni, Curcio et al. 2003, Spisek and Dhodapkar 2006). V souladu s výše uvedenými fakty je zřejmé, že v optimálním případě by měla být protinádorová imunoterapie zahájena ve fázi, kdy je v organismu přítomno malé množství nádorových buněk (Markman 2004). Již výše zmíněná ambivalence imunitního systému poukazuje na fakt, že ideální načasování imunoterapie je nejlepší v časnějších stádiích karcinogeneze, nebo např. ve stadiu minimální reziduální nemoci- MRD po odstranění větší nádorové masy jinými terapeutickými prostředky.



Obrázek 1. Teorie protinádorového dohledu, editace nádoru imunitním systémem a klinický korelát jednotlivých stádií. Převzato a upraveno dle (Dunn, Old et al. 2004).

2.3 Strategie úniku nádorových buněk kontrole imunitního systému

Nádorové buňky disponují celou řadou strategií, pomocí nichž dokáží uniknout kontrole imunitního systému. Řada z nich vykazuje jistou analogii s principy únikových mechanismů infekčních agens. Příkladem je vysoká variabilita nádorových buněk a vznik mutantních forem, které nádorový antigen ztratily. Stejně tak nízká hustota exprese nádorových antigenů či mutace antigenu přispívá k heterogenitě nádorových lézí a může vést k tomu, že jsou neoplastické buňky složkami imunitního systému přehlíženy. Dalším mechanismem, který zabraňuje rozpoznání nádorových buněk imunitním systémem, je snížená exprese MHC I molekul. Celková ztráta MHC I je způsobena především mutací $\beta 2$ mikroglobulinu (Bicknell, Rowan et al. 1994, Igney and Krammer 2002). Dalším mechanismem je sialylace povrchu nádorových buněk, která může vést k maskování některých epitopů povrchových antigenů nádoru. Produkci cytokinů potlačujících protinádorovou imunitní reakci, jako je transformující růstový faktor (TGF- β) a interleukin 10, dochází k přímé inhibici maturace dendritických buněk či inhibici efektorových T lymfocytů. Nedostatečnou produkcí kostimulačních molekul dochází k anergii T lymfocytů a změnou v signalizační apoptotické

dráze také k inhibici indukce apoptózy (Igney and Krammer 2002). Zvýšenou expresí inhibičních molekul, jako je CTLA-4 nebo PD1 na T lymfocytech dochází k zastavení aktivace T lymfocytů a jejich anergizaci, což je fyziologický mechanismus předcházející autoimunitnímu poškození. Nádorové mikroprostředí však může indukovat nadměrnou expresi těchto inhibičních molekul, čímž se zabraňuje cytotoxickému působení T lymfocytů na nádorovou buňku. Proto je blokáda těchto molekul využívána k aktivaci protinádorové imunity. Odolnost nádorových buněk vůči efektorovým mechanismům imunitního systému vede nejen k úniku nádorů z imunitního dohledu, ale může také výrazně ovlivnit účinnost imunoterapie.

3. Úloha jednotlivých druhů imunokompetentních buněk v protinádorové imunitě

Imunitní systém používá v boji proti nádorovým onemocněním své dva hlavní systémy – systém přirozené (nespecifické) imunity a systém imunity adaptivní (specifické). Složky nespecifické imunity, ať již buněčné (makrofágy, NK-buňky, granulocyty) nebo humorální (komplement, antimikrobiální peptidy, cytokiny), jsou schopny rychle patogen v organismu detekovat a eliminovat jej do určité míry bez nutnosti zapojení specifické imunity.

Nespecifická imunita ale nemá mechanismy, které by zabezpečily vznik imunologické paměti. Tu zajišťují až složky specifické imunity, T- a B-lymfocyty, díky existenci množství (až 10^{11}) různých receptorů (TCR, resp. BCR) s přesně definovanou specifitou pro nejrůznější antigeny. Pro aktivaci specifického lymfocytu musí být antigen zpracován v buňkách prezentujících antigen – nejčastěji v dendritických buňkách (DC), poté složitým systémem postupných interakcí APC s T-lymfocyty dojde ke klonální expanzi a teprve po vytvoření dostatečné populace efektorových buněk se rozvíjí specifická imunitní reakce. Tento proces většinou trvá 4–7 dní a po tuto dobu je nutné, aby obranu zajistila nespecifická imunita. Při opakovaném setkání se stejným antigenem je již situace odlišná. V organismu jsou již vytvořeny paměťové T- a B-lymfocyty a sekundární imunitní odpověď je mnohem rychlejší (Rosenberg, Yang et al. 2004). Reakce na nádorovou buňku je v principu obdobná jako na infekční agens, ale vzhledem k tomu, že se jedná o buňku vycházející z vlastních tkání, je situace komplikovanější, protože k vlastním tkáním je ustanovena imunologická tolerance. Proto se zdá, že pro udržení kontroly nad nádorovým růstem je potřeba podporovat a udržovat aktivitu protinádorových lymfocytů opakovanými „boosty“.

3.1 Nespecifické složky imunity

3.1.1 Neutrofilly

Neutrofilly tvoří nejpočetnější skupinu leukocytů v cirkulující krvi (50-70%). Tvoří se z prekurzorů v kostní dřeni pod vlivem G-CSF, jehož produkce se zvyšuje v závislosti na IL-17A, který je produkován Th17 buňkami. Tato buněčná populace se diferencuje z naivních CD4+ T buněk pod vlivem IL-23 produkovaným makrofágy a dendritickými buňkami, obzvláště v době zánětu. Neutrofilly produkují několik typů granul – azurofilní granula obsahující myeloperoxidázu, defenziny, specifická granula obsahující laktoferrin a terciální granula obsahující matrix metaloproteinázu 9 (MMP9, gelatináza B). Tyto molekuly plní svou funkci v době zánětu, kdy neutrofilly fagocytují cizorodé organismy a uvolňují do fagozomů či extracelulárně myeloperoxidázu, čímž dochází k tvorbě reaktivních kyslíkových radikálů, dále plejádu aktivních molekul – katepsiny, lysozym, defenziny, či laktoferrin, jejichž úkolem je cizí mikroorganismus eliminovat. Jako dalším, nedávno objeveným mechanismem eliminace patogenů u neutrofilů, byla prokázána schopnost vytvářet tzv. extracelulární neutrofilní sítě NETs (NETs neutrophil extracellular traps). NETs vytváří aktivované neutrofilly. Hlavní strukturální součástí NETs je DNA. Dále NETs obsahují proteiny z primárních granulí, jako jsou neutrofilní elastáza, katepsin G, myeloperoxidáza, a proteiny ze sekundárních i terciálních granulí, jako laktoferin a gelatináza. Hlavní rolí extracelulárních neutrofilových sítí je zachycení mikrobů a zabránění jejich šíření z místa původní infekce, inaktivování virulentních patogenů a zabíjení mikrobů. Neutrofilly hrají důležitou úlohu v imunitní reakci proti nádorům. Spolu s NK buňkami a makrofágy představují značnou část buněčné populace tumor infiltruujících buněk, která je závislá na stádiu nádoru. Influx neutrofilů do nádorů je pod vlivem chemokinů produkovaných nádorovými buňkami (např. CXCL6, IL-8, G-CSF, GM-CSF) (Gijsbers, Gouwy et al. 2005), samotnými neutrofilly (CXCL1,2,6, CCL3) nebo tumor infiltruujícími lymfocyty nebo makrofágy (IL-8, CCL3) (Fridlender and Albelda 2012). Zvýšené množství neutrofilů v některých nádorech se ukázal jako nepříznivý prognostický faktor přežití pacientů s metastatickým a lokalizovaným onemocněním (Donskov and von der Maase 2006, Jensen, Donskov et al. 2009). Na druhou stranu v některých nádorech je vyšší influx neutrofilů spojen s lepší prognózou (Caruso, Bellocco et al. 2002). Tuto diskrepanci můžeme vysvětlit 2 typy neutrofilů, které byly v nádorech prokázány (TAN - tumor asociované neutrofilly). N1 TAN mají antitumorózní efekt, produkují TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12, podporují influx dalších buněk imunitního systému produkcí chemokinů, prezentují antigen T lymfocytům, a tím podporují eliminaci nádorové buňky. Na druhou stranu N2 TAN mají protumorózní efekt, dozrávají v prostředí s TGF β ,

produkují MMP9, která usnadňuje proces metastazování (Opdenakker and Van Damme 2004) a současně dochází k uvolňování VEGF a FGF-2 z extracelulárního prostoru, dále produkují arginázu rozkládající arginin potřebný ke správné funkci T-lymfocytů (Piccard, Muschel et al. 2012). Neutrofilly také přispívají k extravazaci cirkulujících nádorových buněk a tím usnadňují zakládání vzdálených metastáz. Zprostředkovávají adhezi k endotelovým buňkám přes $\beta 2$ integrin v rámci interakce s ICAM1 exprimovaným na povrchu endotelových buněk. Současně však cirkulující nádorové buňky také produkují ICAM1, přes který se navážou na neutrofilly (Liang, Slattery et al. 2005). Jiným způsobem, kterým nádorové buňky využívají neutrofilly k zakládání vzdálených metastáz, jsou dříve zmíněné NET, kdy nádorové buňky jsou zachyceny v síti extracelulárně vypuštěné DNA (Cools-Lartigue, Spicer et al. 2013). Těchto poznatků lze v budoucnu využít pro zlepšení účinnosti imunoterapeutických metod.

3.1.2 Makrofágy

Makrofágy představují heterogenní populaci buněk, které se diferencují z krevních monocytů. Hrají úlohu v regulaci adaptivní imunitní odpovědi, účastní se procesů hojení ran a eliminaci infekčních agens. V prostředí akutního zánětu vyvolané např. přítomností bakterií dochází ke klasické aktivaci makrofágů (M1 makrofágy), jež se vyznačují vysokou produkcí IL-12 a IL-23 a současně nízkou produkcí IL-10, produkují reaktivní kyslíkové radikály a exprimují ve větším množství MHC-II. V důsledku těchto pochodů dochází k diferenciaci Th1 lymfocytů, které svou produkcí IFN- γ podporují makrofágy v eliminaci cizorodého agens nebo tumoru. Opačným pólem jsou alternativně aktivované makrofágy za přítomnosti IL-4 nebo IL-13 produkované při Th2 imunitní odpovědi, např. při eliminaci parazitů, makrofágy aktivované imunokomplexy s TLR ligandy nebo IL-10, TGF β či glukokortikoidy. Vyznačují se sníženou produkcí IL-12, IL-23 a zvýšenou produkcí IL-10, mají sníženou schopnost prezentovat antigen, působí protizánětlivě, podporují angiogenezi a hojení ran. V nádorech se vyskytují makrofágy (TAM – tumor asociované makrofágy), které svými fenotypy jsou blízké M2 makrofágům. Jejich koncentrace v nádorech je způsobená produkcí chemokinů nádorovými buňkami např. CCL2, či jinými cytokiny VEGF, PDGF a M-CSF. Kumulují se více v oblastech s hypoxií, dochází k vyšší expresi HIF-1 α (Talks, Turley et al. 2000), a tím k podpoře angiogeneze přes VEGF a uvolněným FGF z extracelulární matrix. Produkují různé typy MMP (např. MMP9) (Giraud, Inoue et al. 2004), které přispívají k remodelaci extracelulární matrix a usnadňují podobně jako neutrofilly invazi nádorových buněk do stromatu. TAM také svou produkcí IL-10 a TGF β společně s MDSC potlačují lokální imunitní reakci v nádorové tkáni (preferenci Th2 odpovědi, potlačení NK buněk, podpora diferenciacie regulačních T lymfocytů).

3.1.3 Myeloidní supresorové buňky- MDSC

MDSC jsou heterogenní populací nezralých myeloidních buněk a reprezentují jeden z nejvýznamnějších mechanismů úniku imunitnímu dozoru v nádorech. Dělí se na 2 základní skupiny: monocytární a granulocytární. Obě skupiny výrazně infiltrují nádorovou tkáň, kde tvoří 30-70% všech leukocytů. MDSC potlačují imunitní odpověď několika mechanismy: a) produkují reaktivní kyslíkové i dusíkové radikály, které způsobují disociaci ζ řetězce z receptorů T lymfocytů (Ezernitchi, Vaknin et al. 2006), b) přerušují signalizaci přes IL-2 receptor, c) zabraňují rozeznání komplexu peptid/MHC-I, d) produkují arginázu, e) brání migraci T lymfocytů do uzlin produkcí ADAM 17, který vede ke snížení exprese L-selektinu na T-lymfocytech, f) svou produkcí IL-10, TGF β preferují influx a lokální diferenciaci regulačních T lymfocytů (Serafini, Mgebroff et al. 2008). MDSC také přes IL-10 ovlivňují TAM směrem k M2 diferenciaci a svými působky se vzájemně potencují. MDSC přispívají k dysfunkci dendritických buněk v nádoru přes IL-10: omezují migraci dendritických buněk, jejich dozrávání, jejich produkci IL-12.

3.1.4 NK buňky

NK buňky patří mezi buňky nespecifické imunity a mají schopnost zabíjet některé nádorové a virem infikované buňky. Svůj cytopatický efekt uplatňují pomocí uvolněných perforinů a granzymů, které poškozují cílovou buňku. Dále produkují IFN- γ , který také potencuje účinnost klasicky aktivovaných M1 makrofágů v eliminaci fagocytovaných buněk. NK buňky exprimují na svém povrchu receptory, které můžeme rozdělit do 2 základních skupin: aktivační a inhibiční (Moretta, Bottino et al. 2005). Aktivita NK buněk závisí tom, který ze stimulů v danou chvíli převažuje. Základním ligandem pro inhibiční receptory (Freud, Yu et al. 2014) (např. komplex CD94/NKG2A) jsou molekuly MHC-I třídy exprimované na každé zdravé buňce v těle. U některých virových či nádorových onemocnění dochází ke snížení exprese MHC-I, jakožto jednoho z mechanismů úniku detekce cytotoxickými T lymfocyty. V těchto případech dojde ke snížení inhibice a NK buňky se stanou v danou chvíli buňkami efektorovými. Současně stresem postižené buňky exprimují na svém povrchu vyšší množství ligandů pro aktivační receptory a tím je aktivační proces NK buňky dále potencován. Nejlépe prozkoumaným aktivačním receptorem je NKG2D, jehož ligandy jsou MICA (MHC class I polypeptide-related sequence A) a MICB, jejichž exprese se zvyšuje např. na povrchu buněk, jejichž DNA byla poškozena (Vivier, Ugolini et al. 2012). Jinými aktivačními receptory, které hrají úlohu v rozeznání nádorové buňky, jsou tzv. NCR (natural cytotoxicity receptor). Mezi tyto receptory se řadí NKp30, jehož ligandem je B7-H6 exprimovaný na povrchu některých nádorových buněk (Vivier, Ugolini et al. 2012). Jiným aktivačním receptorem je také

Fc γ RIIIA, který má se váže na Fc fragmenty imunoglobulinu G na opsonizovaných buňkách a zprostředkovává tzv. ADCC (cytotoxicitu závislou na protilátkách). Tohoto mechanismu se využívá při protinádorové imunoterapii pomocí monoklonálních protilátek (Gross and Walden 2008). Infiltrace nádoru NK buňkami je ve srovnání s T-lymfocyty méně významná a jejich homing není přesně znám.

3.1.5 NK-T buňky

Jedná se o buněčnou subpopulaci stojící na pomezí NK buněk a T-lymfocytů. Tato populace buněk na svém povrchu exprimuje funkční receptor T-lymfocytů (TCR- $\alpha\beta$ řetězce) a současně receptory NK buněk např. NK 1.1. Je schopna rozpoznávat glykolipidové antigeny v kontextu s molekulou CD1d. Dle vzoru T-lymfocytů byly nalezeny dvě subpopulace: typ I podporující protinádorovou odpověď zprostředkovanou CD8⁺ T-lymfocyty a typ II se supresivními účinky (Terabe and Berzofsky 2007).

3.2 Specifické složky imunity

3.2.1 T lymfocyty

Zásadní úlohu v rozpoznávání a odstraňování buněk infikovaných intracelulárními parazity hrají CD8⁺ T-lymfocyty, označované jako cytotoxické (CTL), které jsou zároveň klíčovými hráči při protinádorové odpovědi. CTL rozeznávají komplex peptid/MHC I a jejich finální diferenciaci z naivních lymfocytů probíhá v lymfatických uzlinách při interakci s antigen prezentujícími buňkami, které prezentují antigen ve spojení s MHC I. Takto již diferencované cytotoxické T lymfocyty následně cestují krevním oběhem do nádoru, kde interagují s nádorovými buňkami, ve kterých vyvolávají apoptózu. Nádorové mikroprostředí však tomuto průběhu imunitní reakce nenahrává. Přítomnost vyššího množství TGF β produkovaného nádorovými buňkami, makrofágy a MDSC inhibuje v cytotoxických T lymfocytech produkci granzymu A i B, IFN γ , FasL i signalizaci přes TCR (Thomas and Massague 2005). TGF β také indukuje expresi FoxP3 v cytotoxických T lymfocytech, čímž se stávají regulačními ve své funkci (Chaput, Louafi et al. 2009). Antigen prezentující buňky exprimují také komplex antigen/MHC II, mají schopnost aktivace naivních pomocných T lymfocytů, které se za příslušných podmínek (produkce IL-12 dendritickými buňkami) diferencují v Th1 lymfocyty. Tyto buňky jsou poté uvolněny do oběhu a organizují se v nádorech. Produkují např. TNF a IFN- γ . Tento interferon zvyšuje expresi MHC I na nádorových buňkách, současně aktivuje makrofágy klasickou cestou. Společně s cytotoxickými T lymfocyty pak Th1 buňky přispívají k eliminaci nádorových buněk. Tento scénář lze však považovat za ideální a odpovídá fázi dříve zmíněné immunosurveillance, či

immunoediting, kdy je nádor s imunitním systémem v rovnováze a je klinicky němý. Postupem času jsou však vyselektovány nádorové buňky, které jsou schopny se imunitnímu systému ubránit. Takové buňky produkují např. TGF β , IL-10 potlačující imunitní reakci. Uvolňují také chemokiny, které přitahují leukocyty do nádoru, které však působí prorůstově a usnadňují proces invaze a zakládání metastáz (N2 neutrofilů, M2 makrofágů, MDSC). TGF β má také přímý vliv na diferenciaci Th buněk (Maeda and Shiraishi 1996), které se preferenčně diferencují směrem k Th2 buňkám a za pomoci IL-4, IL-13 i IL-10 podporují expanzi M2 makrofágů. Pod vlivem TGF β , nezralých dendritických buněk a M2 makrofágů se část infiltrujících CD4+ T lymfocytů diferencuje v regulační T lymfocyty (tzv. indukované Treg) (Beyer and Schultze 2006), které v součinnosti s přirozenými regulačními T lymfocyty (nTreg) inhibují lokální imunitní reakci v nádoru. Regulační T lymfocyty exprimují na povrchu CD39 a CD73, jež jsou ektonukleotidázy, které konvertují ATP na AMP nebo adenosin (Maeda and Shiraishi 1996). Regulační T lymfocyty produkují také PDE2, který společně s AMP a adenosinem mají silný imunosupresivní účinek na ostatní efektorové T lymfocyty.

3.2.2 Th17 lymfocyty

Nedávno identifikované Th17 lymfocyty představují zvláštní samostatnou skupinu pomocných T lymfocytů, které se účastní při ochraně organismu před extracelulárními bakteriemi a plísněmi. Th17 lymfocyty produkují skupinu cytokinů (IL-17, IL-21, IL-22) hrajících klíčovou úlohu při chemoatrakci neutrofilů a navozují tak prozánětlivou odpověď v infikovaných tkáních a účastní se při ochraně organismu před extracelulárními bakteriemi a plísněmi. Přítomnost Th17 lymfocytů je podporována působením IL-23 (hlavním zdrojem jsou antigen prezentující buňky), IL-6 a TGF- β (produkovan zejména naivními CD4+ lymfocyty). Tyto cytokiny pak působí prostřednictvím transkripčních faktorů ROR γ T a následně STAT3. Ve vztahu k T-regulačním (Foxp3+) lymfocytům jsou pravděpodobně Th17 lymfocyty udržovány v rovnováze (Ziegler and Buckner 2009). Nadměrná aktivita Th17 lymfocytů hraje důležitou úlohu v patogenezi některých autoimunitních onemocněních, jako jsou roztroušená skleróza mozkomíšní, revmatoidní artritida, Crohnova choroba, psoriáza či diabetes I. typu (Iwakura, Ishigame et al. 2011). V některých nádorech mohou mít Th17 buňky pronádorový efekt a jejich zvýšené množství koreluje s horším přežitím (Sfanos, Bruno et al. 2008). Na druhou stranu počet Th17 buněk v některých nádorech nepřímo úměrně koreluje s regulačními T lymfocyty (Kryczek, Banerjee et al. 2009) a jejich počet pozitivně koreluje s přežitím (Miyahara, Odunsi et al. 2008). V některých nádorech byly prokázány IL-17+FoxP3+ T lymfocyty, které exprimují CD25 a ROR γ t (receptor related orphan receptor- γ t

– specifický pro Th17 buňky). Tato populace buněk má supresivní účinek (Beriou, Costantino et al. 2009, Voo, Wang et al. 2009) na imunitní protinádorovou reakci.

3.2.3 Regulační T lymfocyty- Treg

Regulační T-lymfocyty (Treg) jsou schopny potlačovat aktivity jiných efektorových T lymfocytů, a proto představují jeden z důležitých mechanismů pro zachování imunologické tolerance a tlumení imunitní odpovědi. Tato regulace hraje významnou roli v prevenci autoimunitních onemocnění, na druhou stranu má vliv na vznik a vývoj chronických infekčních onemocnění nebo nádorových onemocnění, kde potlačuje protinádorovou imunitu. Regulační T-lymfocyty suprimují imunitní odpověď buď nepřímo prostřednictvím IL-10 a TGF- β či kontaktními mechanismy (např. CTLA-4 indukuje apoptózu), eventuálně přímým zabíjením prostřednictvím granzymů a perforinů (Piersma, Welters et al. 2008). Vznik, vývoj a správné fungování Treg je závislé na expresi klíčového transkripčního faktoru Foxp3, který je využíván jako specifický marker Treg. Jeho mutace vede k IPEX syndromu (imunitní dysregulace, polyendokrinopatie, enteropatie, vázané na chromozom X) (Barzaghi, Passerini et al. 2012). Dále na svém povrchu exprimují např. GITR - protein příbuzný s TNFR indukovaný glukokortikoidem (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor) či CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4, CD 152). V periferní krvi u člověka jsou regulační T-lymfocyty zastoupeny v 5-12% a vyskytují ve dvou hlavních odlišných subpopulacích. Každá tato subpopulace má jiné místo vzniku a liší se i z hlediska své funkce. Přirozeně se vyskytující Treg (nTreg) vznikají v thymu, jsou silně závislé na IL-2 a jejich hlavním úkolem je udržovat periferní toleranci. Tyto buňky přežívají v nezměněné funkční kapacitě po dlouhý čas a na svém povrchu nesou „autoreaktivní“ TCR. nTreg jsou schopny indukovat v makrofázích supresivní fenotyp (Perrone, Ruffini et al. 2008). Druhou subpopulací jsou indukované Treg (iTreg), které vznikají v periferních tkáních po většinou antigenně specifických reakcích, ať již Th1 nebo Th2 typu, a působí prostřednictvím podobných inhibičních mechanismů jako nTreg. Klíčovou úlohu zde hraje i TGF- β . Indukovat tvorbu, expanzi i biologickou aktivitu regulačních T lymfocytů jsou schopny i membránové mikrovezikuly či exosomy uvolňované přímo nádorovými buňkami (Szajnik, Czystowska et al. 2010). Regulační lymfocyty různých typů mají schopnost přeměňovat jiné T-lymfocyty na sobě podobné buňky (tzv. infekční tolerance). Pokud se tedy setká aktivní Treg s jinými T-lymfocyty na povrchu stejné dendritické buňky, vytváří cytokinové prostředí příznivé pro diferenciaci obdobného typu buněk. Regulační T lymfocyty hrají s největší pravděpodobností velmi významnou roli v supresi protinádorové imunitní odpovědi u pacientů s nádorovým onemocněním. Nádorové buňky disponují řadou dosud známých mechanismů, s jejichž

pomocí dokáží unikat imunitnímu systému hostitele. Jedním z těchto mechanismů je také specifická indukce Treg. Existují hypotézy, které říkají, že je to právě specifická indukce Treg, která přímo podporuje progresi růstu tumorů (Hermans, Chong et al. 2003, Lutsiak, Semnani et al. 2005). Bylo prokázáno, že nádorové buňky a makrofágy vyskytující se v jejich blízkosti produkují chemokiny, které přitahují Treg přímo do místa nádoru. Specifická inhibice tohoto procesu by tudíž mohla výrazně napomoci při léčbě nádorových onemocnění. U pacientů s různými typy nádorových onemocnění byla v mnoha nedávno prováděných studiích detekována zvýšená hladina Treg v periférii nebo Treg izolovaných přímo z nádorové tkáně (Vergati, Cereda et al. 2011).

3.3 Dendritické buňky

3.3.1 Obecná charakteristika DC

Dendritické buňky (DC) patří mezi nejúčinnější antigen prezentující buňky a reprezentují centrální spojkou mezi nespecifickou a specifickou imunitou. DC jako jediné mohou aktivovat naivní T lymfocyty, a tím zahájit primární specifickou imunitní odpověď. V posledních letech byla objasněna řada mechanismů, jež buňkám umožní rozeznat přítomnost mikroba nebo jiného nebezpečí včetně nádorových buněk v periferních tkáních a zajistí, že je zmíněná informace přenesena do lymfatických uzlin, kde jsou poté stimulovány specifické T-lymfocyty (Nouri-Shirazi, Banchereau et al. 2000). Dendritické buňky byly pojmenovány podle charakteristické morfologie s množstvím výběžků, dendritů (Obr. 3) (Steinman and Cohn 1974). V periferní krvi cirkulují dendritické buňky ve velmi malém množství, proto se obtížně studují. Zásadní zlom ve studiu dendritických buněk nastal v polovině 90. let, kdy byly publikovány protokoly popisující kultivaci dendritických buněk z monocytů nebo kmenových hematopoetických buněk zdravých dárců za přítomnosti různých cytokinů, především GM-CSF a IL-4. Proces, během kterého se z nezralé dendritické buňky stane profesionální APC, je nazýván maturace (zráním) dendritické buňky. Tento proces je zahájen poté, co dendritická buňka pomocí specifických receptorů rozpozná hrozící nebezpečí, nejčastěji průnik infekčního agens do organismu. Proces maturace je charakterizován vymizením schopnosti fagocytovat antigeny. Dochází k výraznému zvýšení exprese HLA molekul I. a II. třídy, CD83 a kostimulačních molekul CD80, CD86. Na povrchu dendritických buněk se objevuje molekula CCR7, která je receptorem pro chemokin MIP-3β, který se vyskytuje v lymfatických uzlinách. Zrající aktivovaná dendritická buňka migruje do lymfatických uzlin, kde účinně předkládá antigeny na svém povrchu T-lymfocytům, aktivuje

je a zahajuje imunitní reakci, která v optimálním případě vede k eliminaci patogenu nebo nádorové buňky.

3.3.2 Subpopulace DC

Mezi dendritickými buňkami lze rozlišit řadu subpopulací. Plasmocytoidní dendritické buňky (pDC) byly pojmenovány podle morfologie připomínající plazmatické buňky. Lze je identifikovat dle exprese CD123 (receptoru pro IL-3) a jejich hlavní funkcí je rozpoznání virových infekcí a obrana proti nim (prostřednictvím exprese TLR-7 a TLR-9) (Terabe and Berzofsky 2007, Szabo and Dolganiuc 2008, Jegalian, Facchetti et al. 2009). IL-3 je důležitým růstovým faktorem plasmacytoidních dendritických buněk (Shortman and Liu 2002). Myeloidní dendritické buňky (mDC), mezi které patří i Langerhansovy buňky v epidermis, jsou charakterizovány povrchovou expresí molekuly CD11c a současně absencí molekuly CD14, jež je charakteristická pro monocyty a makrofágy. Langerhansovy buňky se vyznačují expresí langerinu (CD207) a molekuly DEC-205 (CD205). Nejpočetnější populací myeloidních dendritických buněk jsou intersticiální dendritické buňky, které lze nalézt ve všech tkáních. Tyto buňky jsou nejvíce podobné dendritickým buňkám připraveným *in vitro* diferenciací z monocytů v přítomnosti GM-CSF a IL-4, a proto je o nich nejvíce informací (Romani, Gruner et al. 1994, Sallusto and Lanzavecchia 1994, Hellman and Eriksson 2007). Jednotlivé subpopulace dendritických buněk mají různou výbavu pro rozpoznání patogenů a každá je tedy specializována v obraně proti různým infekcím. Dendritické buňky rozpoznávají přítomnost „nebezpečí“ i nepřímým způsobem, detekcí prozánětlivých cytokinů (např. TNF, IL-1 β , IFN α a IFN β) produkovaných různými buňkami, které jsou aktivované přítomností daného patogenu. Tato cesta však nevede k plnohodnotné maturaci se schopností aktivovat T-lymfocyty. DC hrají i důležitou roli v indukci periferní tolerance, kdy v nepřítomnosti aktivačních signálů migruje určité množství nezralých DC do lymfatických uzlin a prezentuje antigeny pocházející z vlastních tkání. Tím se účastní i na indukci regulačních T-lymfocytů, které specificky potlačují imunitní odpověď proti vlastním tkáním. Tento proces je zodpovědný za mechanismus periferní tolerance. Přirozené nádorové mikroprostředí má na dendritické buňky imunosupresivní vliv (Bennaceur, Chapman et al. 2008).

4. Imunoterapie karcinomu prostaty

4.1 Karcinom prostaty

S trendem delšího průměrného věku přežití v populaci se zvyšuje incidence onemocnění, která byla v minulosti vzácnější. Jedná se především o nádorová onemocnění. Karcinom prostaty je jednou z nejčastějších malignit u mužů. Podle statistických údajů je nejčastějším nádorovým onemocněním mužů v rozvinutých zemích, kdy v těchto zemích v roce 2013 tvořil 28% všech nově diagnostikovaných nádorů a po karcinomu plic je druhou nejčastější příčinou úmrtí z onkologických důvodů. V USA ročně onemocní kolem 240 000 mužů a 33 000 jich na tuto diagnózu zemře, v Evropě je ročně nových případů přes 300 000 s 87 000 úmrtí. Dle údajů Národního onkologického registru z roku 2012 činil počet nově zachycených karcinomů prostaty v ČR 134,5 případů na 100 000 mužů a úmrtnost 29,9 případů na 100 000 mužů. V absolutních číslech to znamená, že v roce 2012 bylo odhaleno 6942 mužů s tímto nádorem a 1542 mužů na něj zemřelo. Asi 15 % nemocných má již v době stanovení diagnózy generalizované onemocnění (ÚZIS, 2012). Mezi léčebné možnosti karcinomu prostaty patří chirurgická léčba (prostatektomie), radioterapie, hormonální léčba a chemoterapie (Heidenreich, Bellmunt et al. 2011). Kurativně lze karcinom prostaty léčit ve fázi lokálního postižení. Přes dobré dlouhodobé výsledky radikální prostatektomie nebo primární radioterapie část pacientů recidivuje. Rizikovými faktory relapsu jsou zejména Gleasonovo skóre, stadium a hodnota PSA v době diagnózy. Významným prognostickým faktorem po biochemické recidivě je tzv. čas do zdvojení PSA (PSADT, PSA doubling time). Pacienti s krátkým PSADT (méně než 3 měsíce) mají vyšší riziko časnějšího vzniku metastáz a zvýšenou mortalitu než pacienti s dlouhým PSADT (nad 12 měsíců) (Antonarakis, Feng et al. 2012). Proto se PSADT jeví jako vhodný „surrogate marker“ u klinických studií, které hodnotí efekt různých léčiv aplikovaných v době biochemické recidivy, kdy jiné parametry, jako jsou čas do progresu nebo celkové přežití, nemohou být pro dlouhý časový interval k vyhodnocení studií použity. Pacienti s lokálně pokročilým karcinodem prostaty mají horší prognózu. Metodou volby je také operace nebo radioterapie, obvykle v kombinaci s hormonální terapií. Pacienti s metastazujícím karcinodem jsou kandidáty pro androgenní deprivaci, ať již chirurgickou nebo farmakologickou. Androgenní deprivace vede k apoptóze buněk primárního tumoru i případných metastáz. Průměrný čas přežití bez progresu u pacientů léčených androgenní deprivací se pohybuje mezi 18–24 měsíci a medián celkového přežití je 24–36 měsíců (Heidenreich, Bellmunt et al. 2011). Při hormonální léčbě totiž dochází k progresi choroby, a to v důsledku nekontrolovaného růstu hormon-independentních

buněk nádoru. Metastatický kastročně-rezistentní karcinom prostaty (mCRPC) je definován přítomností kostních nebo jiných vzdálených metastáz a kontinuálním nárůstem PSA, ke kterému dochází i přes androgenní deprivaci (Heidenreich, Bastian et al. 2014). Medián přežití u těchto pacientů je bez další léčby přibližně 15–20 měsíců. Poslední léčebnou možností, kterou lze pacientům v tomto stadiu onemocnění nabídnout kromě paliativní podpůrné terapie, je dle standardů urologické společnosti chemoterapie (Heidenreich, Bellmunt et al. 2011). Na základě velkých randomizovaných studií je doporučeným léčebným postupem podávání docetaxelu v třítydenních intervalech, u kterého byl prokázán statisticky významný vliv na celkové přežití (prodloužení mediánu přežití o 2,9 měsíce – z 16,3 na 19,2 měsíce) (Tannock, de Wit et al. 2004). Po selhání docetaxelu lze použít nově schválené léky, které prokázaly příznivý vliv na celkové přežití: léky zasahující do procesu androgenní deprivace – abirateron (Zytiga®, inhibitor enzymu CYP17A1 důležitého v procesu syntézy testosteronu v různých tkáních), enzalutamid (Xtandi®, antagonist androgenních receptorů), ev. lokální radioterapeutika – (Xofigo®, lokální radiofarmakum obsahující alfa zářič radium-223), případně chemoterapeutika II. linie – preparát kabazitaxel (Jevtana®, taxanové chemoterapeutikum).

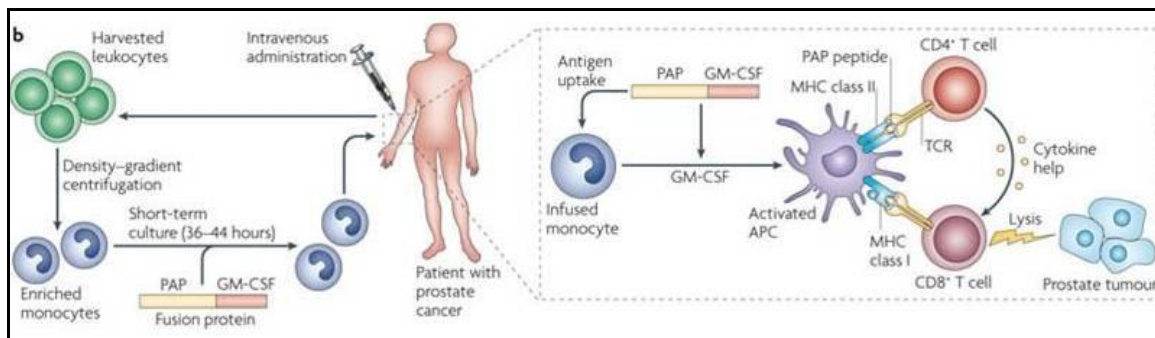
Základní podmínkou pro interakci imunitního systému s nádorovými buňkami je existence nádorově specifických povrchových antigenů, které umožňují identifikaci nádorových buněk. Karcinom prostaty exprimuje významné nádorově asociované antigeny (PSA-prostatický specifický antigen, PSMA-prostatický specifický membránový antigen, PAP-kyselá prostatická fosfatáza), které lze v malé míře nalézt i na zdravých buňkách prostatické tkáně. V další části je uveden přehled imunoterapeutických prostředků, které úspěšně postoupily do III. fáze klinického testování.

4.2 Přehled imunoterapeutických přípravků klinicky testovaných u karcinomu prostaty

4.2.1 Sipuleucel-T

Autologní imunoterapeutický přípravek Sipuleucel-T (Provenge®) je založen na použití vlastních antigen prezentujících buněk pacienta, které jsou *ex vivo* ošetřené pomocí rekombinantního fúzního proteinu PA2024 (**Obr.2**). Příprava produktu je založena na provedení leukaferézy z periferní krve, ze 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 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 a je určen k léčbě pacientů s asymptomatickým či minimálně symptomatickým CRPC (Higano, Schellhammer et al. 2009). Léčebný cyklus se skládá ze tří intravenozních infuzí podaných ve dvoutýdenních intervalech. Infuzní dávka Sipuleucel-T obsahuje autologní mononukleární buňky periferní krve aktivované fúzním proteinem PAP-GM-CSF o obsahu minimálně 50×10^6 autologních buněk CD54+. Buněčné složení a počet buněk v jedné dávce přípravku Provenge závisí na pacientově leukaferéze a kromě aktivovaných monocytů tak preparát obsahuje i další imunitní buňky periferní krve pacienta (T-lymfocyty, B-lymfocyty, NK buňky a další buňky). Po aplikaci *ex vivo* ošetřených aktivovaných autologních monocytů do těla pacienta se očekává jejich aktivace na zralé 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, Fratesi et al. 2000). Klinické studie fáze I a I/II prokázaly, že podávání Sipuleucel-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% (Burch, Breen et al. 2000, Small, Fratesi et al. 2000). V registrační studii fáze III s názvem IMPACT (Immunotherapy for Prostate Adenocarcinoma Treatment) bylo v letech 2003-2007 léčeno 512 pacientů s metastatickým CRPC oproti 147 pacientům ve skupině placebo (Kantoff, Higano et al. 2010). 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. Na základě výsledků této studie byl v dubnu 2010 Sipuleucel-T jako dosud jediný autologní imunoterapeutický přípravek schválený FDA pro použití u pacientů s asymptomatickým či minimálně symptomatickým metastatickým kastročně-rezistentním karcinomem prostaty (mCRPC). V současné chvíli je přípravek Sipuleucel-T zkoušen v řadě dalších klinických studiích. V klinické studii (NCT00715104) byl 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 (Geary and Salem 2013).



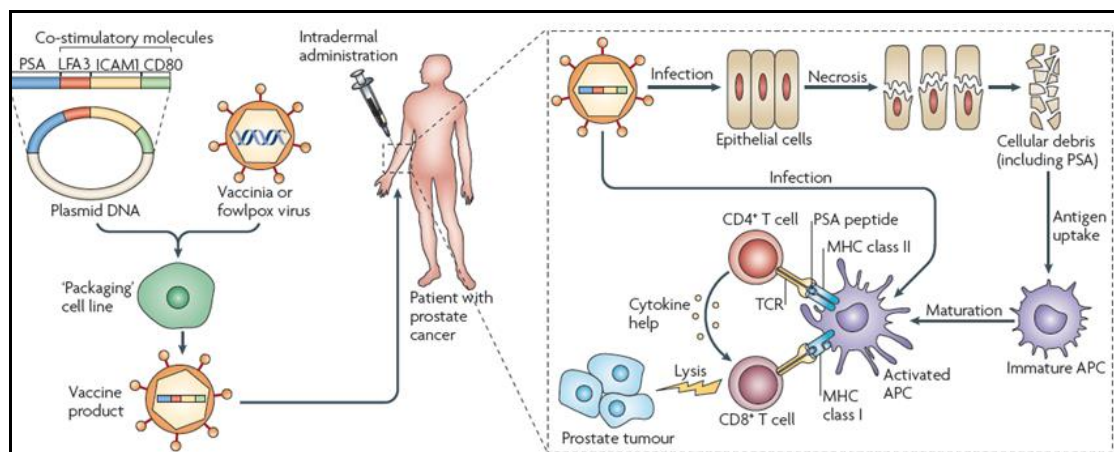
Obrázek 2. Imunoterapie Sipuleucem-T: V prvním kroku výroby jsou pacientovy monocyty obohaceny pomocí gradientové centrifugace a inkubovány s fúzním proteinem PAP-GM-CSF. GM-CSF má za úkol maturovat přítomné APC buňky, které následně prezentují PAP antigeny na MHC molekulách populaci naivních CD4 a CD8 T lymfocytů. Převzato z (Drake 2010).

4.2.2 PROSTVAC

PROSTVAC® vyvinutý firmou BavarianNordic v USA je další forma protinádorové imunoterapie u karcinomu prostaty založená na rekombinantních atenuovaných virech neštovic (vakinie) a ptačích neštovic (fowlpox) (Arlen, Gulley et al. 2006). Tyto viry slouží jako vektory, které exprimují zároveň gen pro PSA a tři kostimulační molekuly– B7.1, ICAM-1 a LFA-3 (komerční označení TRICOM™) (Hodge, Sabzevari et al. 1999).

Mechanismus účinku spočívá v tom, že buňky pacienta jsou po aplikaci infikovány tímto modifikovaným virem a stanou se dobrými antigen prezentujícími buňkami, které budou exprimovat jak kostimulační molekuly, tak zároveň nádorový antigen PSA (**Obr.3**).

Vzhledem k tomu, že proti buňkám infikovaným viry se vyvíjí cytotoxická T buněčná reakce, je zde předpoklad, že se naindukují cytotoxické T lymfocyty, které posléze budou lyzovat buňky exprimující PSA, tedy nádorové buňky karcinomu prostaty. Použití dvou antigenně odlišných vektorů pro první a následné imunizace by mělo snížit riziko, že dojde ke snížené účinnosti vakcíny v důsledku tvorby neutralizačních protilátek navozených imunizací virem vakcinie. Tomuto postupu se říká heterologní prime/boost strategie. PROSTVAC® prošel v posledních deseti letech rozsáhlými studiemi fáze I/II v různých stadiích ca prostaty i v různých kombinacích (Arlen, Gulley et al. 2006). Příznivé výsledky randomizované fáze II na 125 pacientech s minimálně symptomatickým mCRPC nedokázala rozdíly mezi přežitím bez známek progresu onemocnění (PFS), ale medián celkového přežití (OS) byl o 8,5 měsíce lepší než v kontrolní skupině (Kantoff, Schuetz et al. 2010). Na základě těchto výsledků byla v listopadu 2011 zahájena studie fáze III u 1200 pacientů s minimálně symptomatickým CRPC (NCT01322490) (Geary and Salem 2013).



Obrázek 3. Schéma výroby přípravku ProstVac: Vakcína ProstVac je složena z plasmidové DNA kódující cílový antigen TAA (konkrétně PSA) a tří 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 epiteliální 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 z (Drake 2010).

4.2.3 Imunoterapie pomocí dendritických buněk

Dendritické buňky se vyznačují jedinečnou schopností indukovat primární imunitní odpověď prostřednictvím aktivace naivních nediferencovaných T lymfocytů (Banchereau, Briere et al. 2000). Právě pochopení tohoto výjimečného postavení dendritických buněk v procesu T buněčné aktivace v kombinaci s rozvojem a optimalizací metod pro přípravu DC *in vitro* přispělo k využití DC v léčbě nádorových onemocnění (Fucikova, Rozkova et al. 2011, Vacchelli, Vitale et al. 2013).

Metodické aspekty imunoterapie dendritickými buňkami

Rozhodujícími faktory pro účinnost imunoterapie jsou zejména postup výroby vakcíny z DC a způsob a frekvence aplikace v různých fázích onemocnění. Klasickým postupem ve výrobě dendritických buněk je diferenciací periferních monocytů v přítomnosti IL-4 a GM-CSF (Romani, Gruner et al. 1994, Sallusto and Lanzavecchia 1994). Úspěšné byly i alternativní přístupy ve výrobě dendritických buněk s použitím IFN α (Santini, Lapenta et al. 2000) a IL-15 (Mohamadzadeh, Berard et al. 2001). Rovněž bylo testováno použití DC izolovaných přímo z periferní krve a pulsovaných *ex vivo* nádorovým antigenem (Timmerman, Singh et

al. 2002) nebo použití odlišných populací výchozích progenitorů (CD34+ hematopoetické progenitory) (Banchereau, Schuler-Thurner et al. 2001).

Typy DC vakcín podle zdroje nádorových antigenů

K zajištění správného imunoterapeutického efektu je dále důležité vybrat optimální nádorový antigen, kterým budou napulzovány připravené namnožené dendritické buňky.

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. Tento postup byl použit např. v klinické studii fáze I/II, ve které byly nezralé dendritické buňky pulzovány HLA-A2 specifickými peptidy z PSMA (Murphy, Tjoa 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 DC v kontextu MHC molekul I. a II. třídy. Tento příklad pulzace buněk se využívá i ve výše uvedeném přípravku s označením Provence firmy Dendreon (Kantoff, Higano et al. 2010).

Dendritické buňky pulzované nádorovými buňkami

Dalším zdrojem nádorových antigenů mohou být také celé nádorové buňky (Rozkova, Tiserova et al. 2009). 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.

Dalšími klíčovými parametry imunoterapie jsou způsob aplikace a počet DC ve vakcíně. Nejčastějšími způsoby aplikace je subkutánní a intravenózní podání. Problémem podání zmíněnou cestou je fakt, že se do lymfatických uzlin často dostává jen velmi malé procento injikovaných DC, což může vést k selhání vakcíny. Klíčovým parametrem je exprese chemokinového receptoru CCR7 na povrchu DC, díky kterému jsou buňky schopné odpovídat na chemokinové signály CCL19 a CCL21, jež jsou exprimované v sekundárních lymfatických orgánech.

Vliv maturačního stavu DC na účinnost imunoterapie

Nezralé dendritické buňky s nízkou expresí kostimulačních molekul nejsou schopné dodávat T buňkám dostatečně silné aktivační signály. Tento stav může vést k anergii T lymfocytů, delecii antigen-specifických T buněk nebo vzniku regulačních T lymfocytů (Steinman, Hawiger et al. 2003). Pokud podáváme vakcíny obsahující nezralé dendritické buňky, můžeme navodit nežádoucí toleranci vůči nádorovému antigenu. K maturaci dendritických buněk se v klinických studiích využívá zejména směsi prozánětlivých cytokinů, např. IL-1 β , TNF, IL-6, PGE-2 (Jonuleit, Kuhn et al. 1997). Nedostatkem tohoto maturačního koktejlu je indukce lymfocytů s regulačním fenotypem (Banerjee, Dhodapkar et al. 2006). Dalším maturačním signálem používaným v klinických studiích jsou ligandy TLR. Některé z nich jsou silné aktivátory produkce Th1 polarizačního faktoru IL -12 a účinně navozují crosprezentaci antigenů. Jako výhodné se ukazuje i použití více druhů TLR pro zajištění rozsáhlejší imunologické reakce (Querec, Bennouna et al. 2006). Tímto způsobem můžeme dosáhnout i synergického účinku TLR ligandů a znásobení jejich účinku. Dalším rizikem při aplikaci maturovaných DC je podávání tzv. vyčerpaných DC. Maturované DC začnou produkovat velké množství cytokinů včetně IL-12-p70, avšak po podání dalších maturačních signálů již nejsou schopny produkce dalších cytokinů. Taková buňka pak není schopná indukovat antigenně specifickou odpověď.

Současné trendy v imunoterapii dendritickými buňkami

Podstata většiny imunoterapeutických postupů v současné době spočívá v ex-vivo kultivaci monocytů, ze kterých se stanou dendritické buňky. Monocyty periferní krve pacientů vybraných pro imunoterapii se získávají v průběhu leukaferézy. Z monocytů se pak v laboratoři připraví nezralé dendritické buňky. V dalším kroku jsou DC „pulsovány“ nádorovými antigeny (buď definovanými peptidy, mRNA, apoptotickými buňkami nebo lyzáty- viz výše uvedený přehled). Po pohlcení nádorových antigenů jsou následně dendritické buňky aktivovány, maturovány a poté jako protinádorová vakcína podány zpět pacientovi. Různé výzkumné skupiny nebo biotechnologické firmy se ve výrobním postupu liší a obvykle jsou tyto postupy patentově chráněny. Imunoterapie pomocí dendritických buněk si získává stále silnější postavení mezi ostatní terapií v léčbě nádorových onemocnění a hodnocené protinádorové DC vakcíny vykazují minimální nebo žádné vedlejší účinky. Cílem imunoterapie v pokročilém nádorovém onemocnění u pacientů nemusí být úplné odstranění nádorových buněk, ale obnovení dynamické rovnováhy mezi nádorovými buňkami a imunitní odpovědí. Vzhledem k výše uvedeným poznatkům je důležité správné načasování

imunoterapie (Finn 2003, Forni, Curcio et al. 2003, Spisek and Dhodapkar 2006). V souladu s výše uvedenými fakty je zřejmé, že v optimálním případě by měla být protinádorová imunoterapie zahájena v co nejčasnějším stadiu onemocnění, nebo ve fázi, kdy je v organismu přítomno malé množství nádorových buněk (Markman 2004). V tomto stádiu však lze klinickou účinnost imunoterapie velmi obtížně hodnotit. Proto většina studií probíhá u pacientů v pokročilejších stádiích nádorových chorob. Imunoterapeutické studie ve fázích pokročilého onemocnění prokázaly určitý klinický benefit a docházelo k laboratorně detekovatelné indukci protinádorové imunitní odpovědi, a to i navzdory tomu, že imunitní systém takto léčených pacientů byl poškozen jak proběhlou chemoterapií, tak i imunosupresivními mechanismy nádorové tkáně (Vacchelli, Vitale et al. 2013). Probíhají studie, zda lze zvýšit celkem nízkou klinickou účinnost samotné imunoterapie v pokročilých stádiích kombinací s dalšími léčebnými postupy.

5. Cíle práce

Předcházející teoretická část této dizertační práce podává přehled o protinádorových imunitních mechanismech se zaměřením na hlavní buněčné populace podílející se při protinádorové odpovědi organismu. Shrnuje současný pohled na problematiku moderní imunoterapie s akcentací na imunoterapeutické protokoly realizované u karcinomu prostaty. Cílem této dizertační práce bylo vyhodnocování různých aspektů imunoterapie dendritickými buňkami u pacientů s karcinomem prostaty. Jednotlivé konkrétní úkoly byly definovány následovně:

5.1 Analýza imunokompetentních buněk v imunoterapeutickém přípravku DCVAC/PCa

V rámci preklinického testování imunoterapeutického přípravku DCVAC/PCa jsme provedli analýzu imunokompetentních buněk v kontrolních šaržích přípravků DCVAC/PCa, které se poté staly základem pro propouštěcí kritéria individuálních imunoterapeutických přípravků.

5.2 Vyhodnocení schopnosti migrace dendritických buněk obsažených v DCVAC/PCa in vivo

V rámci tohoto experimentu jsme provedli biodistribuční studii dendritických buněk označených radiofarmakem in vitro s cílem sledování jejich migrace in vivo po subkutánním podání pacientovi.

5.3 Vyhodnocení bezpečnosti a schopnosti indukce imunitní reakce u pilotní „first-in-men“ aplikace imunoterapie DCVAC/PCa in vivo u pacienta s kastročně-rezistentním metastatickým karcinomem prostaty

Cílem je shrnutí experimentálních základů chemoimunoterapie aplikované v klinické praxi na kazuistice pacienta s pokročilým metastatickým nádorem prostaty společně s analýzou bezpečnosti, imunologické a klinické účinnosti.

5.4 Vyhodnocení bezpečnostních parametrů, schopnosti indukce imunitní protinádorové odpovědi a délky celkového přežití u pacientů s generalizovaným karcinomem prostaty léčených pomocí aktivní buněčné imunoterapie preparátem DCVAC/PCa v kombinaci s chemoterapií ve fázi I/II klinického hodnocení

V období let 2010 až 2014 probíhala na Ústavu imunologie 2. LF a FN Motol v Praze klinická studie fáze I/II u 25 pacientů s metastatickým kastročně-rezistentním karcinomem prostaty. Cílem bylo vyhodnocení bezpečnosti, změn imunitních parametrů a klinické účinnosti v průběhu chemoterapie a současné imunoterapie.

5.5 Vyhodnocení bezpečnostních parametrů, schopnosti indukce imunitní protinádorové odpovědi a kinetiky PSA u pacientů s lokalizovaným karcinomem prostaty léčených pomocí aktivní buněčné imunoterapie preparátem DCVAC/PCa ve fázi I/II klinického hodnocení

V období let 2010 až 2014 probíhala na Ústavu imunologie 2. LF a FN Motol v Praze klinická studie fáze I/II u 27 pacientů s biochemickou recidivou karcinomu prostaty po primární terapii (radikální prostatektomií ev po salvage radioterapii). Cílem bylo vyhodnocení bezpečnosti, změn imunitních parametrů a kinetiky PSA v průběhu imunoterapie.

6. Materiál a metodika

Materiál a metodika jednotlivých experimentů je podrobně popsána v publikovaných člancích v časopisech s impact faktorem. Kopie článků jsou vytištěny v rámci kapitoly 11 této práce.

7. Výsledky a diskuze

Výsledky této dizertační práce byly shrnuty do třech publikací a jsou rozděleny do jednotlivých podkapitol podle tématu. K jednotlivým podkapitolám je poté přiložen původní článek publikovaný v časopisech s impact faktorem a článek odeslaný do tisku. U prvních

dvou podkapitol týkajících se analýzy zastoupení imunokompetentních buněk v léčivém přípravku DCVAC/PCa a výsledků provedené biodistribuční studie s DCVAC/PCa jsou výsledky vypsány přímo podrobně v textu, neboť se jednalo o studie, které byly součástí materiálů vyžadovaných regulačními úřady (SÚKL) pro vydání povolení k výrobě a pro zahájení fáze I klinické studie, nešlo tedy primárně o publikovatelné výsledky.

7.1 Analýza imunokompetentních buněk v imunoterapeutickém přípravku DCVAC/PCa

Abstrakt

DCVAC je buněčná suspenze, jejíž hlavní složkou jsou dendritické buňky. V produktu se vždy přirozeně v určitém procentu vyskytují i další buněčné populace. V této studii byla provedena multiparametrická cytometrická analýza konečného produktu DCVAC po rozmražení za účelem zjištění přesného zastoupení buněčných populací.

Úvod

Výchozí surovinou pro přípravu DCVAC/PCa je směsná populace leukocytů s převahou mononukleárních buněk. Z leukaferetického produktu jsou izolovány mononukleární buňky pomocí gradientové centrifugace na densitním médiu Ficoll Paque. Získaná populace je pomocí sledu promývacích kroků očištěna od krevních destiček. Finální suspenze buněk obsahuje cca 30% monocytů a 70% lymfocytů. Ze směsné populace mononukleárních buněk jsou izolovány monocyty, které selektivně adherují na plastový povrch kultivační lahvičky. Tento krok neposkytuje stoprocentní čistotu získané populace, je zvýšeno zastoupení monocytů, ale v buněčné suspenzi jsou dále přítomny buňky některých dalších populací (zejména lymfocytů). Tyto buňky se dostávají až do výsledného produktu. Dále jsou jako v každé buněčné kultuře přítomny v určitém procentu mrtvé buňky a buněčná debris.

Cíle

Provést multiparametrickou cytometrickou analýzu konečného produktu DCVAC/PCa po rozmražení za účelem zjištění přesného zastoupení buněčných populací.

Materiál a metody

Materiál: Alikvoty DCVAC/PCa (šarže KON4, KON5, KON6).

Rozmražení alikvotu DCVAC:

Alikvoty byly rozmrazeny ve vodní lázni vytemperované na 37°C. Buňky byly převedeny do zkumavky a zkumavka byla pomalu doplněna kultivačním médiem. Následovala centrifugace 260g (1200 otáček/min) 10 min při 4°C. Supernatant byl odstraněn a peletka buněk byla resuspendována v 1 ml kultivačního média.

Příprava buněk na cytometrické stanovení:

Objem 100 µl suspenze buněk bylo přeneseno do FACS analyzační zkumavky a byly přidány monoklonální protilátky značené různými fluorochromy (od každé 5 µl):

CD4 pacific blue (BD Biosciences)

CD3 FITC (Exbio)

CD19 PC7 (Immunotech)

EpCAM PE (Biolegend)

CD56 APC (Immunotech)

CD16 Alexa700 (Exbio)

CD8 PE-Alexa610 (Exbio)

CD45 PERCP (Exbio)

Dále byly zkumavky zpracovány dle SOP I-264 (průtoková cytometrie). Zkumavky byly inkubovány 20 min při 4°C ve tmě. Poté byly k suspenzi přidány 2 ml pufru PBS (Lonza) a byla provedena centrifugace 260g (1200 otáček/min) 5 min při 4°C. Supernatant byl odstraněn a peletka buněk byla resuspendována ve 300 µl pufru PBS. Souběžně byla připravena zkumavka bez přidání protilátek – neznačená kontrola.

Cytometrické stanovení

Vzorky byly měřeny na přístroji FACS Aria (BD Biosciences). Bylo uloženo minimálně 100 tisíc eventů (událostí).

Analýza dat

Data byla analyzována v software FlowJo.

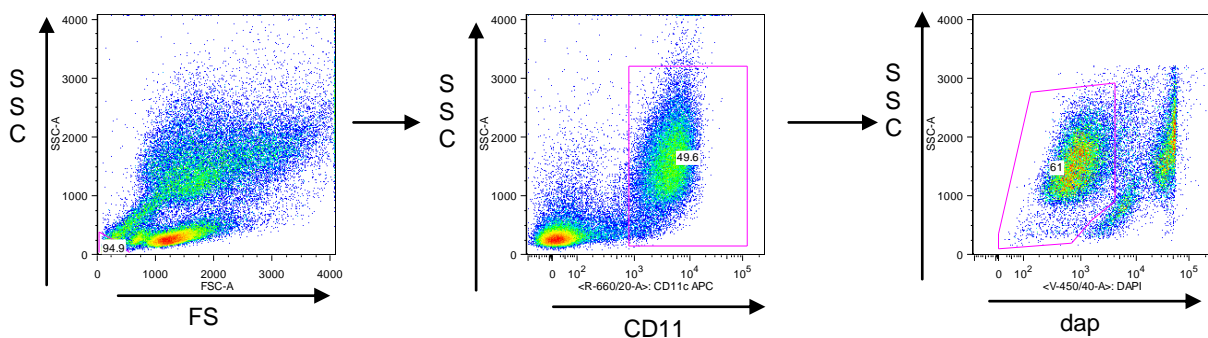
Výsledky

Byly rozmrazeny alikvoty od tří kontrolních šarží a byla provedena analýza zastoupení živých dendritických buněk (**Obr. 4**) a ostatních populací ve vzorku (**Obr. 5**). Cytometrickou analýzou rozmražených alikvotů ze tří kontrolních šarží bylo stanoveno, že DCVAC obsahuje průměrně 54,3 % dendritických buněk a 2,3 % nádorových buněk. Ostatní populace tvoří zejména lymfocyty (30,8 %) (**Tabulka 1**). V populaci lymfocytů jsou ze 68,3 % zastoupeny T

lymfocyty a z 23,2 % B lymfocyty. T lymfocyty tvoří celkově 20,7 %, B lymfocyty 7 %. Populaci T lymfocytů tvoří ze 48,9 % CD8+ lymfocyty a ze 46,4 % CD4+ lymfocyty (z celkového počtu tvoří 10,5 % respektive 9,9 %). Minoritně jsou zastoupeny NK buňky (0,4 % všech buněk). V produktu je přítomno 6,5 % mrtvých lymfocytů (**Tabulka 2**).

Obr. 4 : Zastoupení živých dendritických buněk ve vakcíně.

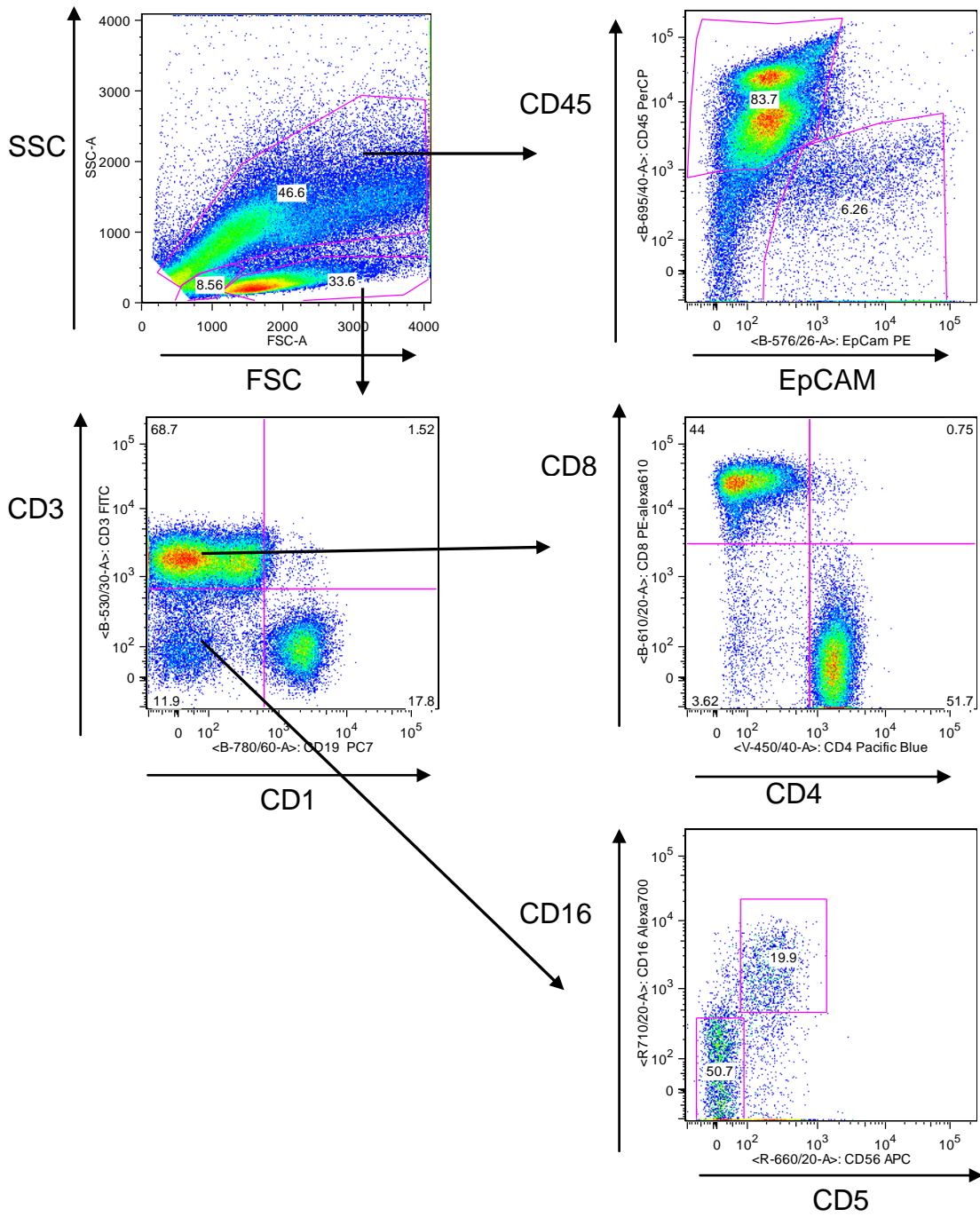
Z gatu buněk bez debris (události s velmi malým SSC a FSC) byl zobrazen znak CD11c. Pozitivní buňky (dendritické buňky) byly analyzovány na životnost (dapi negativní buňky jsou živé dendritické buňky, dapi pozitivní buňky jsou mrtvé nebo apoptotické dendritické buňky).



Obr. 5: Zastoupení ostatních populací ve vakcíně

Z gatu buněk s vysokým SSC (dendritické buňky a nádorové buňky) byla provedena analýza znaku CD45 (na leukocytech – dendritických buňkách) a EpCAM (na nádorových buňkách). (Řádek 1)

Z gatu buněk s nízkými hodnotami SSC (lymfocyty a NK buňky) byla provedena analýza znaku CD3 (T lymfocyty) a CD19 (B lymfocyty). V gatu CD3 pozitivních lymfocytů byl hodnocen znak CD4 (Th lymfocyty) a CD8 (cytotoxické T lymfocyty). Z buněk negativních na znak CD3 a CD19 bylo hodnoceno zastoupení CD56+CD16+ buněk, které odpovídají NK buňkám.



Tabulka 1: Zastoupení základních buněčných populací ve vakcíně (tři kontrolní šarže)

Označení šarže	DC	Nádorové buňky	Lymfocyty
	% celkově	% celkově	% celkově
KON4	58,2%	2,9%	26,5%
KON5	57,7%	1,2%	24,5%
KON6	47,0%	2,7%	41,3%
Průměr	54,3%	2,3%	30,8%

Tabulka 2: Detailní zastoupení lymfocytárních populací ve vakcíně (tři kontrolní šarže)

Šarže	T CD3+		B CD19+		T lymfocyty CD4+		T lymfocyty CD8+		NK b.	Mrtvé lymfo.
	% celk.	% z lymfo.	% celk.	% z lymfo.	% celk.	% z T lymfo.	% celk.	% z T lymfo.	% celk.	% celkově
KON4	17,9%	67,7%	5,3%	19,9%	8,4%	47,0%	8,4%	46,6%	0,7%	8,4%
KON5	18,2%	74,3%	4,6%	18,7%	6,6%	36,3%	10,4%	57,5%	0,5%	4,3%
KON6	26,0%	63,0%	11,1%	31,1%	14,5%	55,8%	12,8%	42,7%	0,2%	6,8%
Průměr	20,7%	68,3%	7,0%	23,2%	9,9%	46,4%	10,5%	48,9%	0,4%	6,5%

Závěr

V rámci preklinického testování jsme provedli analýzu zastoupení hlavních populací imunokompetentních buněk v imunoterapeutickém přípravku DCVAC/PCa a tato validační studie se následně stala základem pro propouštěcí kritéria individuálních imunoterapeutických přípravků.

7.2 Vyhodnocení schopnosti migrace dendritických buněk obsažených v DCVAC/PCa in vivo

Úvod

Provedli jsme biodistribuční farmakokinetickou studii dendritických buněk obsažených v preparátu DCVAC/PCa označených radiofarmakem Indium(¹¹¹In)-oxin in vitro s jejich následným sledováním migrace in vivo pomocí zobrazovacích metod.

Cíle

Vyhodnocení schopnosti migrace dendritických buněk obsažených v preparátu DCVAC/PCa v in vivo podmínkách.

Materiál a metody

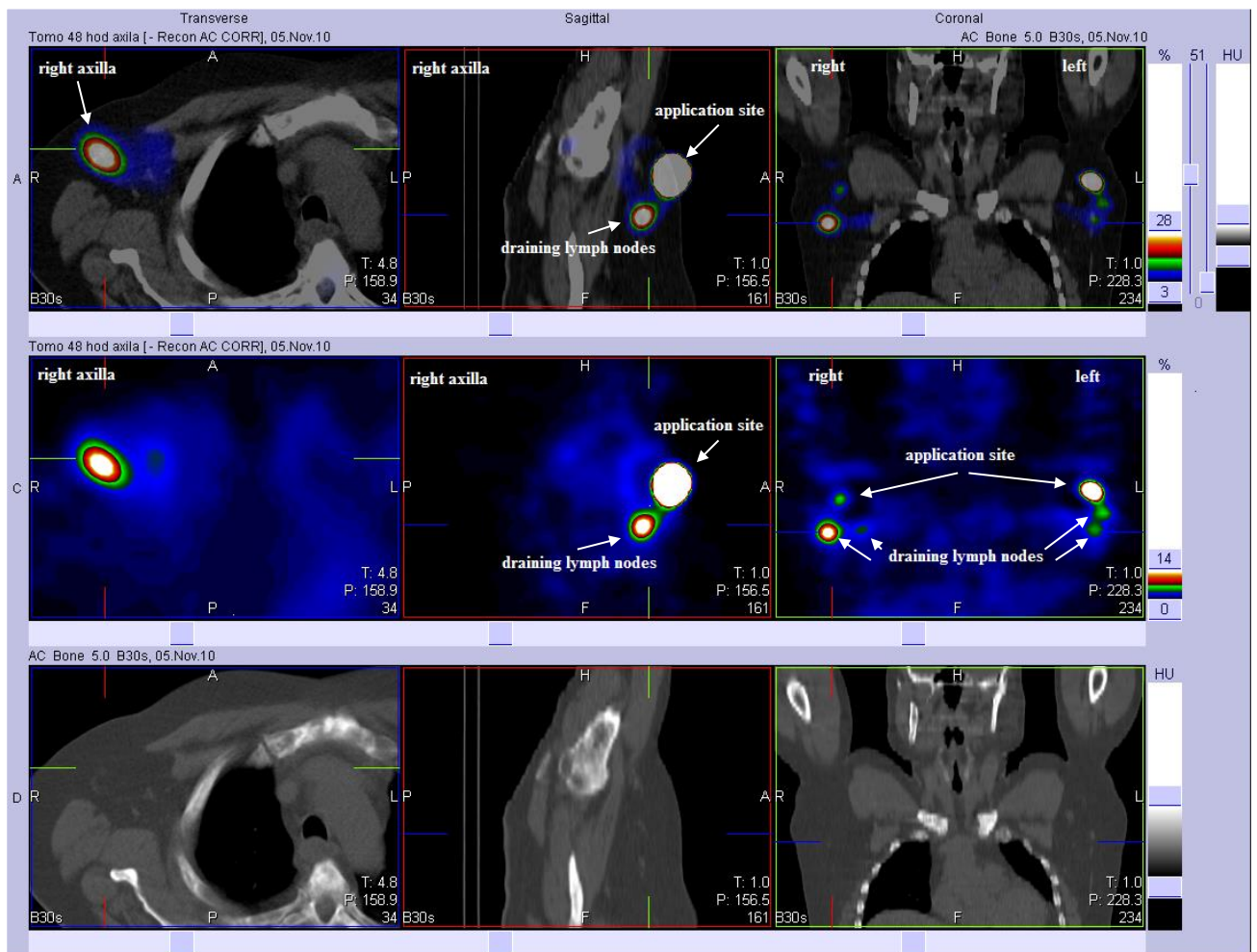
Pracovní postup:

- 1) Dendritické buňky byly ponechány k teplotě pokojové teploty a kvantitativně byly přeneseny do inkubační konické zkumavky (množství se pohybovalo v řádech 20 až 50 milionů buněk) a objemu cca 1,5 ml.
- 2) Byl připraven roztok ^{111}In -oxinu o objemu 1 ml přidáním 0,4 ml Tris pufru a byla změřena jeho aktivita v 1,4 ml celkového objemu.
- 3) Tímto roztokem byly označeny dendritické buňky a byly inkubovány asi 45 – 50 minut při pokojové teplotě (takže objem byl necelé 3 ml).
- 4) Po skončené inkubaci byly přidány 3 ml promývacího roztoku (fyziologický roztok), směs byla protřepána, změřena aktivita a dána centrifugovat na 10 minut při 3070 ot./ min.(1000g).
- 5) Byly odtáženy 3 ml supernatantu a obě části změřeny Curiementorem 3 (jak supernatant, tak značené buňky na dně zbývajícího roztoku).
- 6) Opět byly přidány 3 ml promývacího roztoku (fyziologický roztok), směs byla protřepána, změřena aktivita a dána centrifugovat na 10 minut při 3070 ot./ min.(1000g).
- 7) Toto vše bylo opakováno ještě jednou – celkem 3x bylo promýváno a točeno a to celé i jednotlivé části supernatantu i roztoku se značenými dendritickými buňkami bylo neustále proměřováno ohledně aktivity.
- 8) Konečný objem značených dendritických buněk byl cca 3 ml, ten byl upraven na požadovaný objem 4 ml, byla změřena konečná aktivita a vyrobena 4 ml injekce.
- 9) Účinnost značení v % byla vypočítána jako podíl vstupní aktivity, od které se odečetly všechny aktivity supernatantů, lomeného celkovou vstupní aktivitou a násobené 100.
- 10) V případě množství cca 50 milionů dendritických buněk byla účinnost značení více než 85%.
- 11) V druhém případě množství cca 20 milionů dendritických buněk byla účinnost značení asi 77%.

Takto připravený imunoterapeutický preparát DCVAC/PCa o celkovém objemu 4 ml (aktivita 6MBq) byl podán dvěma pacientům subkutánně bilaterálně do podpažní a tříselné krajiny do každého místa o objemu 1ml. Následná vizualizace byla provedena s použitím scintigrafie a jednofotonové emisní počítačové tomografie (single photon emission computed tomography-SPECT) ve spojení s nízkodávkovými (low dose) CT obrazy. Scintigrafické snímky z těchto oblastí byly provedeny za 1, 4, 24 a 48 hodin. Za 48 hodin bylo provedeno snímkování pomocí SPECT/lowdose CT zaměřené nad místa aplikací. Etická komise FN v Motole schválila tuto studii a pacienti podepsali informovaný souhlas. Tato biodistribuční studie byla provedena v rámci vývoje preparátu DCVAC/PCa za účelem zhodnocení schopnosti migrace dendritických buněk po podání in vivo a ve shodě s již dříve publikovanými pracemi (Ridolfi, Riccobon et al. 2004, de Vries, Lesterhuis et al. 2005, Srinivas, Aarntzen et al. 2010)

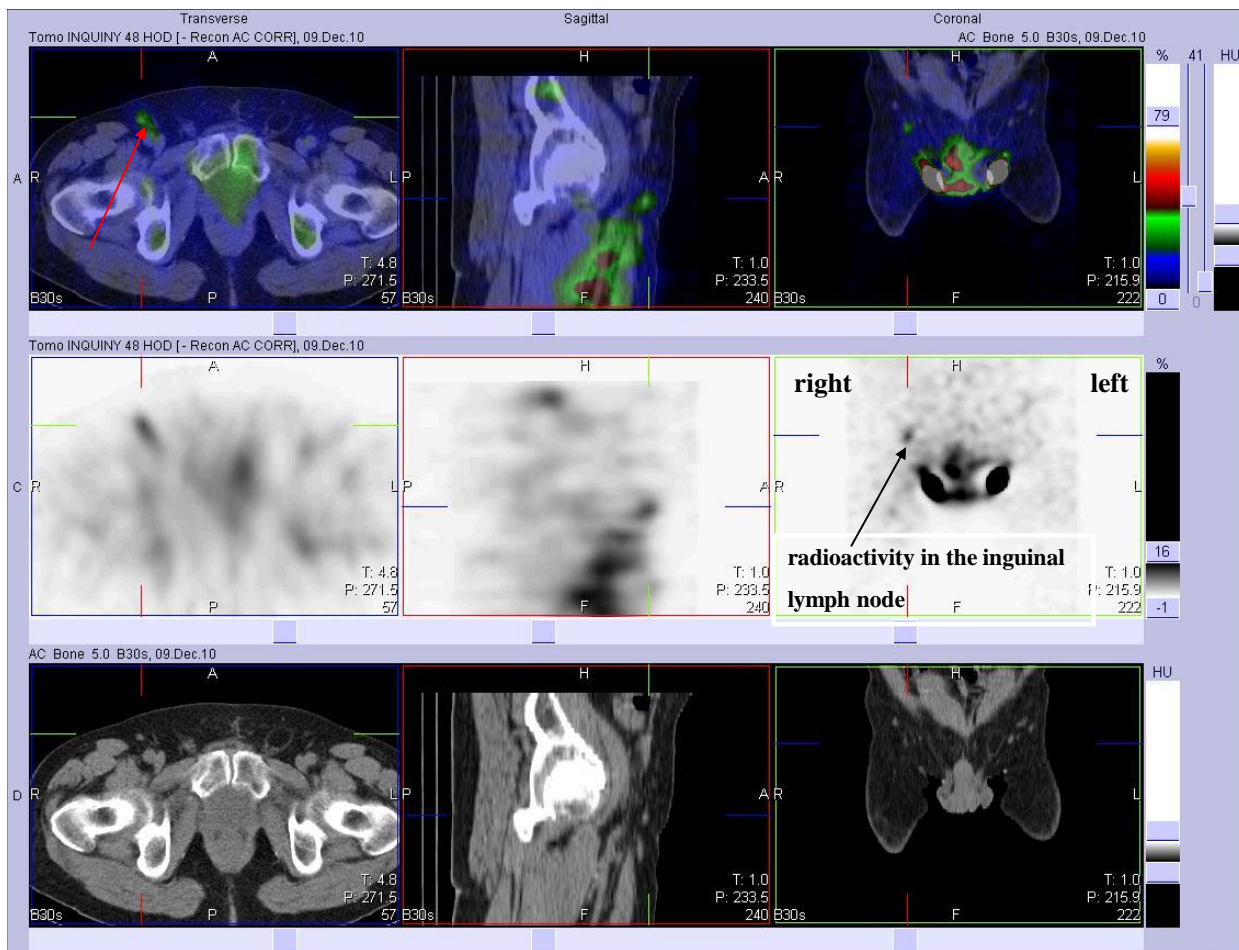
Výsledky

Farmakokinetická studie s přípravkem DCVAC/PCa obsahující DC označené radiofarmakem Indium(¹¹¹In)-oxin pomocí zobrazovacích metod pro detekci DC migrace in vivo prokázala, že po aplikaci imunoterapie dochází k migraci radiofarmakem označených DC zejména po 48 hodinách do spádových regionálních lymfatických uzlin v podpažní a tříselné oblasti, což je základní předpoklad pro následnou komunikaci těchto DC s T lymfocyty a tím zahájení specifické protinádorové imunitní odpovědi organismu u pacienta s nádorovým onemocněním (**Obr. 6,7**).



Obrázek 6

Fúzované SPECT/low-dose CT snímky prokázaly in vivo migraci označených DC do spádových lymfatických uzlin v obou axillách za 48 hodin po subkutánní aplikaci DCVAC/PCa.



Obrázek 7

Fúzované SPECT/low-dose CT snímky prokázaly migraci in vivo označených DC do spádových lymfatických uzlin v pravé tříselné krajině za 48 hodin po subkutánní aplikaci DCVAC/PCa.

7.3 Koncept kombinované chemoterapie a imunoterapie pomocí dendritických buněk u karcinomu prostaty

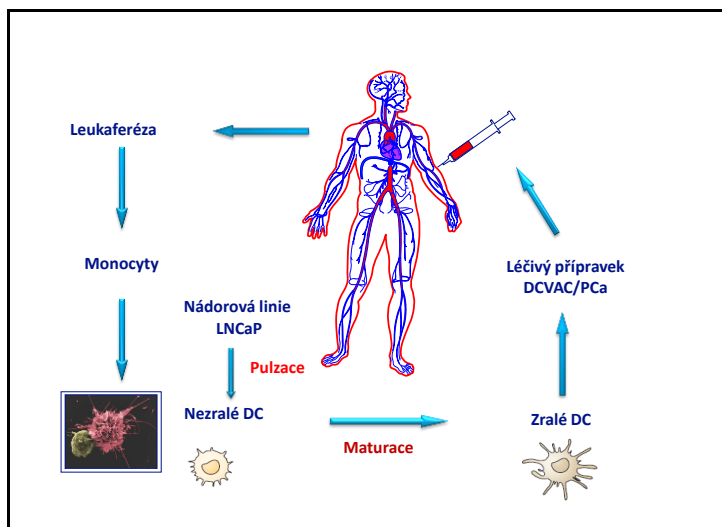
V této práci shrnujeme experimentální základy a klíčové myšlenky konceptu kombinované chemo–imunoterapie a prezentujeme ji na kazuistice pacienta s metastatickým nádorem prostaty se špatnou prognózou léčeného pomocí imunoterapie dendritickými buňkami v kombinaci s chemoterapií. V publikaci jsme se věnovali optimalizaci přípravy a výroby protinádorové vakcíny na bázi aktivovaných dendritických buněk pro pacienty s karcinomem prostaty v GMP podmínkách. Jako nejlepší medium pro kultivaci dendritických buněk z periferních mononukleárů v těchto podmínkách se ukázalo medium Cell Gro. Nezralé dendritické buňky byly nejdříve maturovány v přítomnosti poly I:C, lipopolysacharidu nebo směsí IL-1, IL-6, TNF a PGE2. Takto připravené zralé dendritické buňky byly následně pulzovány influenza matrix peptidem. Po kokultivaci a následné restimulaci s autologními T lymfocyty jsme zjistili, že maturace dendritických buněk pomocí poly I:C vede k nejvyšší proliferaci specifických T lymfocytů. Optimalizovaná forma vakcíny pak byla použita u

pacienta s karcinomem prostaty po selhání dostupných terapeutických modalit. Před zahájením imunoterapie jsme u našeho pacienta detekovali vyšší podíl regulačních T lymfocytů v krvi než u zdravých kontrol. Pomocí aplikace nízkých dávek cyklofosfamidu po dobu 7 dní jsme dokázali snížit množství regulačních T lymfocytů v krvi pacienta. V další fázi přípravy vakcíny jsme nezralé dendritické buňky pulzovali nádorovými antigeny pocházejícími z apoptotických nádorových linií LNCaP ošetřených UV zářením. Takto připravené dendritické buňky in vitro zvyšovaly 5× detekci specifických T lymfocytů po restimulaci in vitro. Frekvenci specifických T lymfocytů jsme také stanovili u našeho pacienta in vivo po několika dávkách vakcíny. Došlo ke zvýšení zastoupení specifických T lymfocytů reagujících na stimulaci dendritickými buňkami pulzovanými jak celou nádorovou linií LNCaP, tak peptidy odvozenými z PSA. V této pilotní „first-in-men“ aplikaci aktivní formy imunoterapie pomocí dendritických buněk in vivo jsme prokázali, že aktivní buněčná imunoterapie pomocí dendritických buněk indukovala specifickou protinádorovou odpověď. Kombinovaná chemo-imunoterapie vedla k významnému a zejména dlouhodobému zlepšení klinických a laboratorních hodnot pacienta a ke snížení hodnot PSA o více než 90 %. Podrobný postup přípravy a výsledky jsou uvedeny v příloženém původním článku- **PŘÍLOHA č. 1.**

7.4 Fáze I/II klinického hodnocení imunoterapie DCVAC/PCa v kombinaci s chemoterapií u pacientů s metastatickým kastračně-rezistentním karcinomem prostaty

Po úvodní pilotní studii (viz 7.3) jsme princip chemo-imunoterapie aplikovali ve fázi I/II klinické studie u pacientů s metastatickým kastračně rezistentním karcinomem prostaty. Zrekapitulujeme, že použitá imunoterapie na bázi dendritických buněk využívá technologie širokospektré antigenní prezentace (Active Cellular Immunotherapy-Multiple Antigen Platform, ACI-MAP). Při tomto postupu jsou k vyvolání komplexní imunitní odpovědi v těle pacienta použity jeho vlastní dendritické buňky aktivované širokým spektrem nádorových antigenů pocházejících z celých usmrcených buněk nádorových linií. 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 po několika dnech připraveno velké množství nezralých dendritických buněk, které jsou následně pulzovány a aktivovány k vyvolání komplexní imunitní odpovědi v těle pacienta širokým spektrem nádorových antigenů pocházejících z celých usmrcených buněk nádorových linií ošetřenými UV zářením. V případě karcinomu prostaty jde o buňky nádorové linie LNCaP, u které mezi nejvíce zastoupené nádorové antigeny patří PSA, PSMA a MAGE-A3. Mezi méně zastoupené, ale klíčové a specifické nádorové

antigeny patří PAP a MAGE-A1 (Fucikova, Moserova et al. 2014). Po pohlcení nádorových buněk jsou následně dendritické buňky aktivovány maturačním činidlem polyI:C (polyinosinová-polycytidylová kyselina), ligand TLR-3 receptoru (**Obr.8**) a léčivý přípravek DCVAC/PCa je následně aplikován zpět pacientovi.



Obrázek 8. Obecné schéma protinádorové imunoterapie pomocí léčivého přípravku DCVAC/PCa založeného na bázi dendritických buněk.

V publikaci prezentujeme výsledky otevřené jednoramenné klinické studie fáze I/II s léčivým přípravkem DCVAC/PCa u pacientů s metastatickým kastročně-rezistentním karcinomem prostaty (mCRPC) progredujícím na standardní androgenní deprivaci (EudraCT 2009-017259-24). Klinická studie a výroba hodnoceného léčivého přípravku DCVAC/PCa probíhala za podmínek správné výrobní praxe (Good Manufacturing Practice –GMP) v superčistých laboratořích s povolením národních regulačních autorit (Státní ústav pro kontrolu léčiv) a byla řádně schválena příslušnou Etickou komisí. Ve studii probíhající v časovém období od r. 2010 do března 2014 jsme měli zařazeno 25 pacientů s karcinomem prostaty léčených preparátem DCVAC/PCa v kombinaci se standardní chemoterapií docetaxelem. Po dobu 7 dní před zahájením aplikace imunoterapie pacienti dostali metronomicky podávaný cyklofosfamid(CFA) 50mg denně p.o. Imunoterapie DCVAC/PCa obsahující 1×10^7 aktivovaných dendritických buněk byla poté aplikována pacientům do podpažní a tříselné oblasti do blízkosti lymfatických uzlin v časovém intervalu 14 dní mezi prvními dvěma dávkami a následně v 6 týdenních intervalech do celkového počtu dávek vyrobených pro pacienta z leukaferézy. K imunoterapii byla konkomitantně podávána chemoterapie docetaxelem ve 3 týdenním režimu. Vyhodnotili jsme data všech 25 zařazených pacientů a v čase zahájení podávání imunoterapie DCVAC/PCa

byla základní charakteristika pacientů- medián věku 73 (rozsah 48-82) let, PSA 186 ng/mL (1-749 ng/mL), laktátdehydrogenáza (LDH) 234 IU/L (129-399 IU/L), alkalická fosfatáza (ALP) 192 IU/L (37-1843 IU/L), hemoglobin (Hgb) 11.9 g/dL (9-14.8 g/dL), C-reaktivní protein (CRP) 5.6 mg/L. 88% pacientů mělo Gleasonovo skóre ≥ 7 a žádný z pacientů neměl vstupně známky viscerálního postižení. V průběhu studie bylo podáno kumulativně více než 350 dávek imunoterapie DCVAC/PCa s mediánem 12 dávek na jednoho pacienta. Primárním cílem studie bylo vyhodnocení bezpečnostního profilu DCVAC/PCa. Zaznamenali jsme běžné nežádoucí reakce (adverse event- AE) mírného stupně závažnosti- charakteru zvýšené únavy, bolestí zad, parestézií, mírných infekcí, z oblasti gastrointestinálního traktu- průjmu, zácpy. Ani žádná ze 44 referovaných závažných nežádoucích reakcí (serious adverse event-SAE) neměla příčinnou souvislost s aplikovanou imunoterapií DCVAC/PCa, ale pozorované reakce byly ve vztahu k progresi základního onkologického onemocnění či podávané chemoterapii. U pacientů nebyl zaznamenán zvýšený výskyt autoimunitních onemocnění. Terapie preparátem DCVAC/PCa byla dobře tolerována a prokázala příznivý bezpečnostní profil. Medián přežití našeho sledovaného souboru pacientů byl 19 měsíců oproti předpokládanému mediánu přežití 11,8 měsíců dle Halabi nomogramu (Halabi, Small et al. 2003) a 13 měsícům dle MSKCC nomogramu (Smaletz, Scher et al. 2002), tj. benefit v mediánu přežití 7.2 a 6 měsíců. V průběhu podávaného cyklu imunoterapie při hodnocení PSA odpovědi mělo 39% pacientů pokles hodnot PSA o více než 50% pod vstupní hodnotu. Sekundárním cílem klinického hodnocení byla analýza imunologických odpovědí na podávanou protinádorovou imunoterapii. Zde jsme pozorovali signifikantní nárůst celkového počtu aktivovaných CD3⁺/HLA-DR⁺ lymfocytů a CD8⁺ T lymfocytů a signifikantní pokles T regulačních lymfocytů a hladin imunoglobulinů IgG a IgM v průběhu cyklu chemo-imunoterapie. Hodnotili jsme procento antigen specifických T lymfocytů v periferní krvi reagujících proti nádorovým antigenům PSA, MAGE-A1 a MAGE-A3. Sledovali jsme přítomnost IFN- γ produkujících CD8 cytotoxických T lymfocytů v průběhu terapie. V čase zahájení imunoterapie jsme zaznamenali zvýšené procento antigen specifických T lymfocytů proti antigenům PSA, MAGE-A1 a MAGE-A3 v periferní krvi pacientů oproti skupině zdravých dárců. U nádorového antigenu PSA došlo k signifikantnímu nárůstu antigen specifických T lymfocytů po cyklu chemo-imunoterapie a přetrvávaly stabilní hodnoty antigen specifických T lymfocytů proti nádorovým antigenům MAGE-A1 a MAGE-A3. V průběhu terapie jsme zaznamenali přítomnost IgG protilátek proti nádorovému antigenu PSA u 6 ze 23 pacientů (26%) a přítomnost IgG protilátek proti MAGE-A3 u 8 ze 23 pacientů (34%), ale neprokázali jsme statisticky signifikantní závislost mezi procentem antigen specifických T lymfocytů a přítomností protilátek proti konkrétnímu

nádorovému antigenu. Neidentifikovali jsme žádný ze sledovaných imunologických parametrů, který by statisticky signifikantně koreloval s lepším celkovým přežitím u pacientů.

Publikace je přílohou- **PŘÍLOHA č. 2.**

7.5 Fáze I/II klinického hodnocení imunoterapie pomocí DCVAC/PCa u pacientů s biochemickou recidivou karcinomu prostaty

V časovém období let 2010 až 2014 probíhala na Ústavu imunologie 2. LF a FN Motol v Praze otevřená jednoramenná klinická studie fáze I/II s léčivým přípravkem DCVAC/PCa u 27 pacientů s časnou biochemickou recidivou karcinomu prostaty po primární terapii (po radikální prostatektomii-RP nebo salvage radioterapii-SRT, u kterých po dosažení nadiru docházelo k postupnému narůstání hodnot PSA měřených ultrasenzitivním testem). Hodnocená studijní medikace DCVAC/PCa obsahující 1×10^7 aktivovaných autologních dendritických buněk pulzovaných prostatickou nádorovou linií LNCaP byla vyráběna a schválena příslušnými regulačními autoritami za stejných podmínek jako u předchozí popsané klinické studie. Imunoterapie DCVAC/PCa byla pacientům aplikována do podpažní a tříselné oblasti do blízkosti lymfatických uzlin v časovém intervalu 14 dní mezi prvními dvěma dávkami a následně v 4-6 týdenních intervalech do celkového počtu dávek vyrobených pro pacienta z leukaferézy. Primárním cílem bylo vyhodnocení bezpečnosti a toxicity studovaného preparátu DCVAC/PCa a sekundárním cílem bylo sledování kinetiky PSA a změn imunitních parametrů (schopnosti indukce protinádorové odpovědi) v průběhu podávané formy imunoterapie. Vyhodnotili jsme data 27 zařazených pacientů a v čase zahájení podávání imunoterapie DCVAC/PCa jsme měli následující základní charakteristiku sledovaného souboru- medián věku 63 (rozsah 49-77) let, PSA 0,153 ng/mL (0,028-0,812 ng/mL), laktátdehydrogenáza (LDH) 188,4 IU/L (141-340 IU/L), alkalická fosfatáza (ALP) 66 IU/L (41-107 IU/L), hemoglobin (Hgb) 15,5 g/dL (13,8-17,4 g/dL). V průběhu studie bylo podáno kumulativně 510 dávek imunoterapie. Mezi běžné nežádoucí reakce (adverse event- AE) mírného stupně závažnosti patřily dle četnosti: zvýšená únava, infekce s mírným průběhem, bolesti svalů a kloubů, reakce v místě vpichu imunoterapie (indurace, erytém, bolest), potíže v oblasti gastrointestinálního traktu (průjem, zácpa), urtikárie. V průběhu trvání studie žádný pacient nezemřel a u žádného pacienta se nerozvinulo detekabilní metastatické onemocnění. Terapie léčivým přípravkem DCVAC/PCa ve shodě s předchozí popsanou studií potvrdila dobrý bezpečnostní profil bez závažných nežádoucích reakcí (serious adverse event-SAE) s příčinnou souvislostí s aplikovanou imunoterapií DCVAC/PCa a ani nebyl zaznamenán zvýšený výskyt autoimunitních onemocnění. V rámci vyhodnocení klinické účinnosti podávané imunoterapie

DCVAC/PCa jsme sledovali kinetiku hodnot PSA vyjádřenou v čase jako tzv. PSA zdvojovací čas (PSADT-PSA doubling time). Parametr PSADT byl vypočítán u 25 pacientů, u kterých bylo aplikováno minimálně 5 dávek DCVAC/PCa a kteří neměli v průběhu studie jinou léčbu. Median PSADT se prodloužil z 5,67 měsíce před zahájením studie na 18,85 měsíce po dokončení 1. cyklu imunoterapie. Identifikovali jsme 17 silných respondérů (PSADT byl na imunoterapii delší než 15 měsíců), 5 respondérů (u kterých se PSADT na imunoterapii prodloužil oproti stavu před zahájením studie, ale na dobu kratší 15 měsíců) a 3 nonrespondéry (PSADT na imunoterapii se nelišil oproti stavu před zahájením studie). 12 z 25 pacientů, kteří měli stabilní hodnoty PSA v průběhu prvního cyklu imunoterapie (median PSADT 39,79 po dokončení 1. cyklu), souhlasili s dalším cyklem imunoterapie a jejich PSADT zůstal stabilní i v průběhu druhého cyklu imunoterapie (median PSADT 58,03 měsíce po dokončení 2. cyklu). 3 pacienti dokonce absolvovali třetí cyklus imunoterapie s medianem PSADT 32,13 měsíce po kompletizaci 3. cyklu. Sekundárním cílem klinického hodnocení byla analýza imunologických odpovědí na podávanou protinádorovou imunoterapii. Imunononitoring byl proveden v čase zahájení podávání imunoterapie a poté při podání 4. a 12. ev. poslední aplikované dávky DCVAC/PCa. Hodnotili jsme procento antigen specifických T lymfocytů v periferní krvi reagujících proti nádorovým antigenům PSA, MAGE-A1 a MAGE-A3. Sledovali jsme přítomnost IFN- γ produkujících CD8 cytotoxických T lymfocytů v průběhu terapie. Došlo k signifikantnímu nárůstu CD3⁺ T lymfocytů v průběhu cyklu imunoterapie, ale nedošlo k signifikantním změnám v počtu aktivovaných CD3⁺/HLA-DR⁺ lymfocytů, CD4⁺, CD8⁺ T lymfocytů, T regulačních lymfocytů ani hladin imunoglobulinů IgG a IgM. 12 ze 27 pacientů mělo před imunoterapií statisticky signifikantně zvýšené procento antigen specifických T lymfocytů proti antigenu PSA v periferní krvi pacientů oproti skupině zdravých dárců a obdobně 6 z 27 pacientů zvýšené procento antigen specifických T lymfocytů v periferní krvi reagujících proti nádorovým antigenům MAGE-A1 a MAGE-A3. Pozorovali jsme, že podávání imunoterapie DCVAC/PCa vedlo k nárůstu antigen specifických T lymfocytů proti antigenům PSA po 4. a 12. aplikované dávce DVAC/PCa a proti MAGE-A1 pouze po 4. dávce DCVAC/PCa. V průběhu terapie jsme zaznamenali přítomnost IgG protilátek proti nádorovému antigenu PSA u 9 ze 27 pacientů (33%) a přítomnost IgG protilátek proti MAGE-A3 u 9 ze 27 pacientů (33%). Neidentifikovali jsme žádný ze sledovaných imunologických parametrů, který by koreloval s prodloužením PSADT. U pacientů respondéru jsme před zahájením imunoterapie DCVAC/PCa prokázali zvýšenou hladinu genové exprese se vztahem k CD8/NK cytotoxicitě. Tento manuskript je submitován do časopisu s IF- **PŘÍLOHA č. 3.**

Další vývoj DCVAC již zajišťuje česká biotechnologická společnost SOTIO a.s., která je sponzorem pěti klinických studií fáze II a mezinárodní klinické studii fáze III v indikaci karcinomu prostaty. Studie fáze II jsou randomizované a hodnotí imunoterapii v různých stadiích karcinomu prostaty: jako monoterapii u pacientů s lokalizovaným karcinomem prostaty (T2) v biochemickém relapsu po radikální primární terapii a její prodloužení o další cyklus, dále v kombinaci s hormonální léčbou u pacientů s nově diagnostikovaným metastatickým karcinomem prostaty, potom u pacientů s lokálně pokročilým karcinomem prostaty (T3-T4) a konečně v kombinaci s radioterapií a androgen deprivací léčbou. Pacientům po selhání hormonální léčby indikovaným k chemoterapii je terapeutická vakcína podávána v kombinaci s docetaxelem. Obdobný design má i rozsáhlá globální multicentrická studie fáze III-VIABLE zahájená v květnu 2014, do které bude zapojena více než tisícovka pacientů v Evropě i USA.

8. Závěr

Příspěvkem mé dizertační práce do problematiky zabývající se oblastí protinádorové imunologie je komplexní pohled na dlouhodobý vývoj imunoterapeutického léčivého přípravku moderní terapie využívajícího aktivované dendritické buňky- DCVAC/PCa, a to od základního preklinického výzkumu až po praktické hodnocení tohoto léčivého přípravku v klinických studiích u pacientů s karcinomem prostaty. Z rozsáhlých preklinických testů jsem se podílel na analýze zastoupení hlavních populací imunokompetentních buněk zastoupených v přípravku DCVAC/PCa. Tato validační zpráva se stala součástí rozsáhlé dokumentace, která vedla ke schválení výrobního postupu i zahájení klinických studií příslušnými státními regulačními autoritami. Věnovali jsme se optimalizaci přípravy a výroby imunoterapie pomocí DCVAV/PCa pro pacienty s karcinomem prostaty v GMP podmínkách. Následovala pilotní „first-in-men“ aplikace léčivého přípravku spolu s chemoterapií u pacienta s metastatickým karcinomem prostaty, ve které jsme byli schopni detekovat in vivo specifické T lymfocyty proti nádorovým antigenům prostaty a použitý koncept kombinované chemo-imunoterapie vedl k významnému a zejména dlouhodobému zlepšení klinických a laboratorních parametrů pacienta a ke snížení hodnot PSA o více než 90 %. Biodistribuční studie s přípravkem DCVAC/PCa prokázala schopnost migrace radiofarmakem označených DC do spádových regionálních lymfatických uzlin po aplikaci in vivo, což je základním předpokladem k zahájení protinádorové imunitní odpovědi.

V následujících letech jsem byl certifikovaným investigátorem klinického hodnocení preparátu u skupiny 52 pacientů zařazených ve 2 klinických studiích fáze I/II, a to u pacientů s lokalizovaným karcinomem prostaty a metastatickým kastročně-rezistentním karcinomem. Nepozorovali jsme výskyt závažných nežádoucích reakcí ve vztahu k hodnocené imunoterapii

ani zvýšení rizika vzniku autoimunitních onemocnění a imunoterapie vykazovala příznivý bezpečnostní profil.

Ověřili jsme schopnost DCVAC/PCa indukovat specifickou imunitní protinádorovou odpověď. Výše uvedené faktory spolu s potvrzenou klinickou účinností charakterizovanou delším než očekávaným mediánem přežitím ve skupině pacientů s metastatickým karcinomem a sledování dynamiky vývoje PSA charakterizované výrazným prodloužením PSA zdvojovacího času u pacientů s lokalizovaným onemocněním vyústilo v další testování této formy imunoterapie. Imunoterapeutické přístupy obecně jsou dnes již uznávanou léčebnou modalitou u řady nádorových chorob. Probíhající klinické studie postupně přinášejí odpovědi na otázky optimálního načasování imunoterapie, vhodných terapeutických kombinací a identifikaci pacientů, kteří budou z dané terapie nejvíce profitovat. Moderní léčba s sebou zároveň přináší specifika léčebných odpovědí a také nové typy vedlejších účinků. Neméně důležitá jsou a budou farmakoekonomická hlediska. Pro konkrétní pacienty pak bude třeba vždy na základě dostupných poznatků léčbu individualizovat.

9. Seznam citované literatury

- Antonarakis, E. S., Z. Feng, B. J. Trock, E. B. Humphreys, M. A. Carducci, A. W. Partin, P. C. Walsh and M. A. Eisenberger (2012). "The natural history of metastatic progression in men with prostate-specific antigen recurrence after radical prostatectomy: long-term follow-up." *BJU Int* **109**(1): 32-39.
- Arlen, P. M., J. L. Gulley, C. Parker, L. Skarupa, M. Pazdur, D. Panicali, P. Beetham, K. Y. Tsang, D. W. Grosenbach, J. Feldman, S. M. Steinberg, E. Jones, C. Chen, J. Marte, J. Schlom and W. Dahut (2006). "A randomized phase II study of concurrent docetaxel plus vaccine versus vaccine alone in metastatic androgen-independent prostate cancer." *Clin Cancer Res* **12**(4): 1260-1269.
- Balkwill, F. and A. Mantovani (2001). "Inflammation and cancer: back to Virchow?" *Lancet* **357**(9255): 539-545.
- Banerjee, D. K., M. V. Dhodapkar, E. Matayeva, R. M. Steinman and K. M. Dhodapkar (2006). "Expansion of FOXP3high regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients." *Blood* **108**(8): 2655-2661.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran and K. Palucka (2000). "Immunobiology of dendritic cells." *Annu Rev Immunol* **18**: 767-811.
- Banchereau, J., B. Schuler-Thurner, A. K. Palucka and G. Schuler (2001). "Dendritic cells as vectors for therapy." *Cell* **106**(3): 271-274.
- Barzaghi, F., L. Passerini and R. Bacchetta (2012). "Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, x-linked syndrome: a paradigm of immunodeficiency with autoimmunity." *Front Immunol* **3**: 211.
- Bennaceur, K., J. Chapman, L. Brikci-Nigassa, K. Sanhadji, J. L. Touraine and J. Portoukalian (2008). "Dendritic cells dysfunction in tumour environment." *Cancer Lett* **272**(2): 186-196.
- Beriou, G., C. M. Costantino, C. W. Ashley, L. Yang, V. K. Kuchroo, C. Baecher-Allan and D. A. Hafler (2009). "IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function." *Blood* **113**(18): 4240-4249.
- Beyer, M. and J. L. Schultze (2006). "Regulatory T cells in cancer." *Blood* **108**(3): 804-811.

Bicknell, D. C., A. Rowan and W. F. Bodmer (1994). "Beta 2-microglobulin gene mutations: a study of established colorectal cell lines and fresh tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 4751-4755.

Burch, P. A., J. K. Breen, J. C. Buckner, D. A. Gastineau, J. A. Kaur, R. L. Laus, D. J. Padley, M. V. Peshwa, H. C. Pitot, R. L. Richardson, B. J. Smits, P. Sopapan, G. Strang, F. H. Valone and S. Vuk-Pavlovic (2000). "Priming tissue-specific cellular immunity in a phase I trial of autologous dendritic cells for prostate cancer." Clin Cancer Res **6**(6): 2175-2182.

Burnet, F. M. (1970). "The concept of immunological surveillance." Prog Exp Tumor Res **13**: 1-27.

Caruso, R. A., R. Bellocco, M. Pagano, G. Bertoli, L. Rigoli and C. Inferrera (2002). "Prognostic value of intratumoral neutrophils in advanced gastric carcinoma in a high-risk area in northern Italy." Mod Pathol **15**(8): 831-837.

Coley, W. B. (1910). "The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus)." Proc R Soc Med **3**(Surg Sect): 1-48.

Cools-Lartigue, J., J. Spicer, B. McDonald, S. Gowing, S. Chow, B. Giannias, F. Bourdeau, P. Kubes and L. Ferri (2013). "Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis." J Clin Invest.

de Vries, I. J., W. J. Lesterhuis, J. O. Barentsz, P. Verdijk, J. H. van Krieken, O. C. Boerman, W. J. Oyen, J. J. Bonenkamp, J. B. Boezeman, G. J. Adema, J. W. Bulte, T. W. Scheenen, C. J. Punt, A. Heerschap and C. G. Figdor (2005). "Magnetic resonance tracking of dendritic cells in melanoma patients for monitoring of cellular therapy." Nat Biotechnol **23**(11): 1407-1413.

Donskov, F. and H. von der Maase (2006). "Impact of immune parameters on long-term survival in metastatic renal cell carcinoma." J Clin Oncol **24**(13): 1997-2005.

Drake, C. G. (2010). "Prostate cancer as a model for tumour immunotherapy." Nat Rev Immunol **10**(8): 580-593.

Dunn, G. P., L. J. Old and R. D. Schreiber (2004). "The three Es of cancer immunoediting." Annu Rev Immunol **22**: 329-360.

Ezernitchi, A. V., I. Vaknin, L. Cohen-Daniel, O. Levy, E. Manaster, A. Halabi, E. Pikarsky, L. Shapira and M. Baniyash (2006). "TCR zeta down-regulation under chronic inflammation is mediated by myeloid suppressor cells differentially distributed between various lymphatic organs." J Immunol **177**(7): 4763-4772.

Finn, O. J. (2003). "Cancer vaccines: between the idea and the reality." Nat Rev Immunol **3**(8): 630-641.

Finn, O. J. and G. Forni (2002). "Prophylactic cancer vaccines." Curr Opin Immunol **14**(2): 172-177.

Forni, G., C. Curcio, M. Spadaro, J. Iliffe, E. Quaglino, E. Di Carlo, P. Musiani and P. L. Lollini (2003). "Immunization in tumor prevention." Int Immunopharmacol **3**(8): 1151-1158.

Freud, A. G., J. Yu and M. A. Caligiuri (2014). "Human natural killer cell development in secondary lymphoid tissues." Semin Immunol.

Fridlender, Z. G. and S. M. Albelda (2012). "Tumor-associated neutrophils: friend or foe?" Carcinogenesis **33**(5): 949-955.

Fucikova, J., I. Moserova, I. Truxova, I. Hermanova, I. Vancurova, S. Partlova, A. Fialova, L. Sojka, P. F. Cartron, M. Houska, L. Rob, J. Bartunkova and R. Spisek (2014). "High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells." Int J Cancer **135**(5): 1165-1177.

Fucikova, J., D. Rozkova, H. Ulcova, V. Budinsky, K. Sochorova, K. Pokorna, J. Bartunkova and R. Spisek (2011). "Poly I: C-activated dendritic cells that were generated in CellGro for use in cancer immunotherapy trials." J Transl Med **9**: 223.

Geary, S. M. and A. K. Salem (2013). "Prostate cancer vaccines: Update on clinical development." Oncoimmunology **2**(5): e24523.

Gijsbers, K., M. Gouwy, S. Struyf, A. Wuyts, P. Proost, G. Opdenakker, F. Penninckx, N. Ectors, K. Geboes and J. Van Damme (2005). "GCP-2/CXCL6 synergizes with other endothelial cell-derived chemokines in neutrophil mobilization and is associated with angiogenesis in gastrointestinal tumors." *Exp Cell Res* **303**(2): 331-342.

Giraudo, E., M. Inoue and D. Hanahan (2004). "An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis." *J Clin Invest* **114**(5): 623-633.

Gross, S. and P. Walden (2008). "Immunosuppressive mechanisms in human tumors: why we still cannot cure cancer." *Immunol Lett* **116**(1): 7-14.

Halabi, S., E. J. Small, P. W. Kantoff, M. W. Kattan, E. B. Kaplan, N. A. Dawson, E. G. Levine, B. A. Blumenstein and N. J. Vogelzang (2003). "Prognostic model for predicting survival in men with hormone-refractory metastatic prostate cancer." *J Clin Oncol* **21**(7): 1232-1237.

Heidenreich, A., P. J. Bastian, J. Bellmunt, M. Bolla, S. Joniau, T. van der Kwast, M. Mason, V. Matveev, T. Wiegel, F. Zattoni, N. Mottet and U. European Association of (2014). "EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer." *Eur Urol* **65**(2): 467-479.

Heidenreich, A., J. Bellmunt, M. Bolla, S. Joniau, M. Mason, V. Matveev, N. Mottet, H. P. Schmid, T. van der Kwast, T. Wiegel, F. Zattoni and U. European Association of (2011). "EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease." *Eur Urol* **59**(1): 61-71.

Hellman, P. and H. Eriksson (2007). "Early activation markers of human peripheral dendritic cells." *Hum Immunol* **68**(5): 324-333.

Hermans, I. F., T. W. Chong, M. J. Palmowski, A. L. Harris and V. Cerundolo (2003). "Synergistic effect of metronomic dosing of cyclophosphamide combined with specific antitumor immunotherapy in a murine melanoma model." *Cancer Res* **63**(23): 8408-8413.

Higano, C. S., P. F. Schellhammer, E. J. Small, P. A. Burch, J. Nemunaitis, L. Yuh, N. Provost and M. W. Frohlich (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, L. Gritz, M. G. Lorenz and J. Schlom (1999). "A triad of costimulatory molecules synergize to amplify T-cell activation." *Cancer Res* **59**(22): 5800-5807.

Chaput, N., S. Louafi, A. Bardier, F. Charlotte, J. C. Vaillant, F. Menegaux, M. Rosenzweig, F. Lemoine, D. Klatzmann and J. Taieb (2009). "Identification of CD8+CD25+Foxp3+ suppressive T cells in colorectal cancer tissue." *Gut* **58**(4): 520-529.

Igney, F. H. and P. H. Krammer (2002). "Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack." *J Leukoc Biol* **71**(6): 907-920.

Iwakura, Y., H. Ishigame, S. Saijo and S. Nakae (2011). "Functional specialization of interleukin-17 family members." *Immunity* **34**(2): 149-162.

Jegalian, A. G., F. Facchetti and E. S. Jaffe (2009). "Plasmacytoid dendritic cells: physiologic roles and pathologic states." *Adv Anat Pathol* **16**(6): 392-404.

Jensen, H. K., F. Donskov, N. Marcussen, M. Nordmark, F. Lundbeck and H. von der Maase (2009). "Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma." *J Clin Oncol* **27**(28): 4709-4717.

Jonuleit, H., U. Kuhn, G. Muller, K. Steinbrink, L. Paragnik, E. Schmitt, J. Knop and A. H. Enk (1997). "Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions." *Eur J Immunol* **27**(12): 3135-3142.

Kantoff, P. W., C. S. Higano, N. D. Shore, E. R. Berger, E. J. Small, D. F. Penson, C. H. Redfern, A. C. Ferrari, R. Dreicer, R. B. Sims, Y. Xu, M. W. Frohlich, P. F. Schellhammer and

I. S. Investigators (2010). "Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer." N Engl J Med **363**(5): 411-422.

Kantoff, P. W., T. J. Schuetz, B. A. Blumenstein, L. M. Glode, D. L. Bilhartz, M. Wyand, K. Manson, D. L. Panicali, R. Laus, J. Schlom, W. L. Dahut, P. M. Arlen, J. L. Gulley and W. R. Godfrey (2010). "Overall survival analysis of a phase II randomized controlled trial of a Poxviral-based PSA-targeted immunotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer." J Clin Oncol **28**(7): 1099-1105.

Kryczek, I., M. Banerjee, P. Cheng, L. Vatan, W. Szeliga, S. Wei, E. Huang, E. Finlayson, D. Simeone, T. H. Welling, A. Chang, G. Coukos, R. Liu and W. Zou (2009). "Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments." Blood **114**(6): 1141-1149.

Liang, S., M. J. Slattery and C. Dong (2005). "Shear stress and shear rate differentially affect the multi-step process of leukocyte-facilitated melanoma adhesion." Exp Cell Res **310**(2): 282-292.

Lutsiak, M. E., R. T. Semnani, R. De Pascalis, S. V. Kashmiri, J. Schlom and H. Sabzevari (2005). "Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide." Blood **105**(7): 2862-2868.

Maeda, H. and A. Shiraishi (1996). "TGF-beta contributes to the shift toward Th2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice." J Immunol **156**(1): 73-78.

Markman, M. (2004). "Duration of chemotherapy in low-versus high-volume metastatic cancer: should there be a difference?" Curr Oncol Rep **6**(2): 75-76.

Miyahara, Y., K. Odunsi, W. Chen, G. Peng, J. Matsuzaki and R. F. Wang (2008). "Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(40): 15505-15510.

Mohamadzadeh, M., F. Berard, G. Essert, C. Chalouni, B. Pulendran, J. Davoust, G. Bridges, A. K. Palucka and J. Banchereau (2001). "Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells." J Exp Med **194**(7): 1013-1020.

Moretta, L., C. Bottino, D. Pende, M. Vitale, M. C. Mingari and A. Moretta (2005). "Human natural killer cells: Molecular mechanisms controlling NK cell activation and tumor cell lysis." Immunol Lett **100**(1): 7-13.

Murphy, G. P., B. A. Tjoa, S. J. Simmons, J. Jarisch, V. A. Bowes, H. Ragde, M. Rogers, A. Elgamal, G. M. Kenny, O. E. Cobb, R. C. Ireton, M. J. Troychak, M. L. Salgaller and A. L. Boynton (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." Prostate **38**(1): 73-78.

Nouri-Shirazi, M., J. Banchereau, J. Fay and K. Palucka (2000). "Dendritic cell based tumor vaccines." Immunol Lett **74**(1): 5-10.

Opdenakker, G. and J. Van Damme (2004). "The countercurrent principle in invasion and metastasis of cancer cells. Recent insights on the roles of chemokines." Int J Dev Biol **48**(5-6): 519-527.

Perrone, G., P. A. Ruffini, V. Catalano, C. Spino, D. Santini, P. Mureto, C. Spoto, C. Zingaretti, V. Sisti, P. Alessandroni, P. Giordani, A. Cicetti, S. D'Emidio, S. Morini, A. Ruzzo, M. Magnani, G. Tonini, C. Rabitti and F. Graziano (2008). "Intratumoural FOXP3-positive regulatory T cells are associated with adverse prognosis in radically resected gastric cancer." Eur J Cancer **44**(13): 1875-1882.

Piccard, H., R. J. Muschel and G. Opdenakker (2012). "On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression." Crit Rev Oncol Hematol **82**(3): 296-309.

Piersma, S. J., M. J. Welters and S. H. van der Burg (2008). "Tumor-specific regulatory T cells in cancer patients." Hum Immunol **69**(4-5): 241-249.

Querec, T., S. Bennouna, S. Alkan, Y. Laouar, K. Gorden, R. Flavell, S. Akira, R. Ahmed and B. Pulendran (2006). "Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity." J Exp Med **203**(2): 413-424.

Ridolfi, R., A. Riccobon, R. Galassi, G. Giorgetti, M. Petrini, L. Fiammenghi, M. Stefanelli, L. Ridolfi, A. Moretti, G. Migliori and G. Fiorentini (2004). "Evaluation of in vivo labelled dendritic cell migration in cancer patients." J Transl Med **2**(1): 27.

Romani, N., S. Gruner, D. Brang, E. Kampgen, A. Lenz, B. Trockenbacher, G. Konwalinka, P. O. Fritsch, R. M. Steinman and G. Schuler (1994). "Proliferating dendritic cell progenitors in human blood." J Exp Med **180**(1): 83-93.

Rosenberg, S. A. and M. E. Dudley (2004). "Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **101 Suppl 2**: 14639-14645.

Rosenberg, S. A., J. C. Yang and N. P. Restifo (2004). "Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines." Nat Med **10**(9): 909-915.

Rozkova, D., H. Tiserova, J. Fucikova, J. Last'ovicka, M. Podrazil, H. Ulcova, V. Budinsky, J. Prausova, Z. Linke, I. Minarik, A. Sediva, R. Spisek and J. Bartunkova (2009). "FOCUS on FOCIS: combined chemo-immunotherapy for the treatment of hormone-refractory metastatic prostate cancer." Clin Immunol **131**(1): 1-10.

Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (1994). "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha." J Exp Med **179**(4): 1109-1118.

Santini, S. M., C. Lapenta, M. Logozzi, S. Parlato, M. Spada, T. Di Pucchio and F. Belardelli (2000). "Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice." J Exp Med **191**(10): 1777-1788.

Serafini, P., S. Mgebroff, K. Noonan and I. Borrello (2008). "Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells." Cancer Res **68**(13): 5439-5449.

Sfanos, K. S., T. C. Bruno, C. H. Maris, L. Xu, C. J. Thoburn, A. M. DeMarzo, A. K. Meeker, W. B. Isaacs and C. G. Drake (2008). "Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing." Clin Cancer Res **14**(11): 3254-3261.

Shankaran, V., H. Ikeda, A. T. Bruce, J. M. White, P. E. Swanson, L. J. Old and R. D. Schreiber (2001). "IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." Nature **410**(6832): 1107-1111.

Shortman, K. and Y. J. Liu (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." Nat Rev Immunol **2**(3): 151-161.

Smaletz, O., H. I. Scher, E. J. Small, D. A. Verbel, A. McMillan, K. Regan, W. K. Kelly and M. W. Kattan (2002). "Nomogram for overall survival of patients with progressive metastatic prostate cancer after castration." J Clin Oncol **20**(19): 3972-3982.

Small, E. J., P. Fratesi, D. M. Reese, G. Strang, R. Laus, M. V. Peshwa and F. H. Valone (2000). "Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells." J Clin Oncol **18**(23): 3894-3903.

Smyth, M. J., K. Y. Thia, S. E. Street, E. Cretney, J. A. Trapani, M. Taniguchi, T. Kawano, S. B. Pelikan, N. Y. Crowe and D. I. Godfrey (2000). "Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells." J Exp Med **191**(4): 661-668.

Spisek, R. and M. V. Dhodapkar (2006). "Immunoprevention of cancer." Hematol Oncol Clin North Am **20**(3): 735-750.

Srinivas, M., E. H. Aarntzen, J. W. Bulte, W. J. Oyen, A. Heerschap, I. J. de Vries and C. G. Figdor (2010). "Imaging of cellular therapies." Adv Drug Deliv Rev **62**(11): 1080-1093.

Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1974). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro." J Exp Med **139**(2): 380-397.

Steinman, R. M., D. Hawiger, K. Liu, L. Bonifaz, D. Bonnyay, K. Mahnke, T. Iyoda, J. Ravetch, M. Dhodapkar, K. Inaba and M. Nussenzweig (2003). "Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance." Ann N Y Acad Sci **987**: 15-25.

Street, S. E., E. Cretney and M. J. Smyth (2001). "Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis." Blood **97**(1): 192-197.

Szabo, G. and A. Dolganiuc (2008). "The role of plasmacytoid dendritic cell-derived IFN alpha in antiviral immunity." Crit Rev Immunol **28**(1): 61-94.

Szajnik, M., M. Czystowska, M. J. Szczepanski, M. Mandapathil and T. L. Whiteside (2010). "Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg)." PLoS One **5**(7): e11469.

Talks, K. L., H. Turley, K. C. Gatter, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe and A. L. Harris (2000). "The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages." Am J Pathol **157**(2): 411-421.

Tannock, I. F., R. de Wit, W. R. Berry, J. Horti, A. Pluzanska, K. N. Chi, S. Oudard, C. Theodore, N. D. James, I. Turesson, M. A. Rosenthal, M. A. Eisenberger and T. A. X. Investigators (2004). "Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer." N Engl J Med **351**(15): 1502-1512.

Terabe, M. and J. A. Berzofsky (2007). "NKT cells in immunoregulation of tumor immunity: a new immunoregulatory axis." Trends Immunol **28**(11): 491-496.

Thomas, D. A. and J. Massague (2005). "TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance." Cancer Cell **8**(5): 369-380.

Timmerman, J. M., G. Singh, G. Hermanson, P. Hobart, D. K. Czerwinski, B. Taidi, R. Rajapaksa, C. B. Caspar, A. Van Beckhoven and R. Levy (2002). "Immunogenicity of a plasmid DNA vaccine encoding chimeric idiotype in patients with B-cell lymphoma." Cancer Res **62**(20): 5845-5852.

Vacchelli, E., I. Vitale, A. Eggermont, W. H. Fridman, J. Fucikova, I. Cremer, J. Galon, E. Tartour, L. Zitvogel, G. Kroemer and L. Galluzzi (2013). "Trial watch: Dendritic cell-based interventions for cancer therapy." Oncoimmunology **2**(10): e25771.

Vergati, M., V. Cereda, R. A. Madan, J. L. Gulley, N. Y. Huen, C. J. Rogers, K. W. Hance, P. M. Arlen, J. Schlom and K. Y. Tsang (2011). "Analysis of circulating regulatory T cells in patients with metastatic prostate cancer pre- versus post-vaccination." Cancer Immunol Immunother **60**(2): 197-206.

Vivier, E., S. Ugolini, D. Blaise, C. Chabannon and L. Brossay (2012). "Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer." Nature Reviews Immunology **12**(4): 239-252.

Voo, K. S., Y. H. Wang, F. R. Santori, C. Boggiano, K. Arima, L. Bover, S. Hanabuchi, J. Khalili, E. Marinova, B. Zheng, D. R. Littman and Y. J. Liu (2009). "Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(12): 4793-4798.

Ziegler, S. F. and J. H. Buckner (2009). "FOXP3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation." Microbes Infect **11**(5): 594-598.

10. Seznam vlastních publikací

Původní články s IF související s dizertací:

- **Podrazil M**, Horváth R, Becht E, Rožková D, Bílková P, Sochorová K, Hromádková H, Kayserová J, Vávrová K, Lašťovička J, Vrabcová P, Kubáčková K, Gašová Z, Jarolím L, Babjuk M, Špíšek R, Bartůňková J, Fučíková J. Phase I/II clinical trial of dendritic-cell based immunotherapy (DCVAC/PCa) combined with chemotherapy in patients with metastatic, castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget*. 2015;6(20):18192-205. **IF 6,359**
- Rožková D, Tišerová H, Fučíková J, Lašťovička J, **Podrazil M**, Ulčová H, Budínský V, Prausová J, Linke Z, Minárik I, Šedivá A, Špíšek R, Bartůňková J. FOCUS on FOCIS: Combined chemo-immunotherapy for the treatment of hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Clin Immunol*. 2009;131(1):1-10. **IF 3,606**

Domácí publikace související s dizertací:

- Špíšek R, **Podrazil M**, Horváth R, Bartůňková J. Antitumor immunity and vaccination against tumors. *Vakcinologie*, 2010, 4(1):12-19.
- Brtnický T, **Podrazil M**, Bartůňková J., Špíšek R, Rob L, Active cellular immunotherapy of ovarian cancer using dendritic cells. *Česká gynekologie*, 2012, 77(3): 215-220.
- Bartůňková J, Špíšek R, **Podrazil M**. Imunoterapie karcinomu prostaty. *Urologie pro praxi*, 2013, 14(1): 5-18.
- Bartůňková J, Špíšek R, **Podrazil M**, Kuklík R. Imunoterapie karcinomu prostaty, *Onkologie*, 2014, 8(1):6-8.
- **Podrazil M**, Bartůňková J. Imunoterapie nádorových chorob. *Postgraduální medicína*, 2015, 17(3): 272-278.
- Bartůňková J, **Podrazil M**, Špíšek R. Imunoterapie v léčbě nádorových chorob. *Remedia*, 2015, 25(1): 34-38.

Abstrakta související s dizertací:

- Podrazil M., Hromádková H., Špíšek R., Bartůňková J., Dendritic cell vaccination in prostate cancer, *Dendritic Cells and the Initiation of Adaptive Immunity 2011*, Santa Fe, New Mexico 2011, Abstract Supplement

- Podrazil M., Hromádková H., Minárik I., Jarolím L., Babjuk M., Špíšek R., Bartůňková J., Combined chemo-immunotherapy for the treatment of hormone-refractory metastatic prostate cancer, CIMT 2011, Mainz, Germany, Abstract Supplement
- Podrazil M., Hromádková H., Minárik I., Jarolím L., Babjuk M., Špíšek R., Bartůňková J., Prostate cancer immunotherapy- clinical trials, FOCIS 2012, Vancouver, BC, Canada Abstract Supplement
- Podrazil M., Imunoterapie karcinomu prostaty – klinické studie, XXIX. Sjezd českých a slovenských alergologů a imunologů, Liberec, 2012, Přednáška
- Bartůňková J., Podrazil M., Jarolím L., Hromádková H., Kayserová J., Horváth R., Skalická A., Špíšek R., Autoprotilátky v průběhu imunoterapie dendritickými buňkami u pacientů s karcinomem prostaty, Alergie, 2012,14,Supplementum 2
- Jarolím L., Špíšek R., Podrazil M., Babjuk M., Fučíková J., Fialová A., Minárik I., Hromádková H., Bartůňková J. Klinická studie imunoterapie fáze I/II pomocí dendritických buněk u nemocných s karcinomem prostaty a biochemickou recidivou, Abstrakt, Klinická urologia 2013 (9)
- Podrazil M., Rožková D., Hromádková H., Kayserová J., Brtnický T., Rob L., Horváth R., Špíšek R., Gašová Z., Bartůňková J., Ovarian cancer immunotherapy- clinical trial FOCIS 2013 Boston, MA, USA
- Podrazil M., Imunoterapia karcinómu prostaty, 5. zimné urologické sympóziu, Vysoké Tatry, leden, 2014, Přednáška
- Podrazil M., Fučíková J., Rožková D., Jarolím L., Babjuk M., Kubáčková K., Prausová J., Katina S., Špíšek R., Bartůňková J., Kombinovaná chemoimunoterapie aktivní protinádorovou buněčnou terapií preparátem DCVAC/PCa u pacientů s karcinomem prostaty, Vědecká konference 2. LF UK Praha 2014, Poster
- Podrazil M., Rožková D., Fučíková J., Katina S., Špíšek R., Bartůňková J. Combined chemoimmunotherapy of castrate-resistant prostate cancer with dendritic-cell based vaccine DCVAC/PCa, CIMT 2014, Mainz, Germany, 2014, Abstract Supplement
- XXXI. Sjezd českých a slovenských alergologů a imunologů, Ostrava, 15.-18.10.2014. Kombinovaná chemoimunoterapie aktivní protinádorovou buněčnou terapií preparátem DCVAC/PCa u pacientů s karcinomem prostaty, Poster

- Podrazil M., Fučíková J., Vrabcová P., Horváth R., Becht E., Rožková D., Bílková P., Hromádková H., Kayserová J., Vávrová K., Laštovička., Kubáčková K., Gašová Z., Jarolím L., Babjuk M., Špíšek R., Bartůňková J., Immunological parameters in phase I/II clinical trial of dendritic-cell based immunotherapy (DCVAC/PCa) combined with chemotherapy in patients with metastatic, castration-resistant prostate cancer, CIMT 2015, Mainz, Germany, 2015, Abstract Supplement

Původní články s IF nesouvisející s dizertací:

- Suchánek O, **Podrazil M**, Fischerová B, Bočínská H, Budínský V, Stejskal D, Špíšek R, Bartůňková J, Kolář P. Intensive physical activity increases peripheral blood dendritic cells. *Cell Immunol.* 2010;266(1):40-5. **IF 2,698**
- Šedivá A, Poloučková A, **Podrazil M**, Froňková E, Kalina T. Characterization of the B-cell compartment in a patient with Schnitzler syndrome. *Scand J Rheumatol.* 2011;40(2):158-60. **IF 2,507**

Domácí publikace nesouvisející s dizertací:

- **Podrazil M**, Bartůňková J, Šedivá A. Renal involvement in immunopathological states. *Alergie*, 2007, 9(4): 312-319.
- **Podrazil M**, Bartůňková J, Šedivá A. Congenital heart block caused by maternal autoantibodies anti-SSA/Ro and anti-SSB/La. *Čes. Revmatol.*, 2008, 16(4): 163–168.
- Suchánek O, **Podrazil M**, Fischerová B, Bočínská H, Budínský V, Stejskal D, Špíšek R, Bartůňková J, Kolář P. Vliv intenzivní fyzické zátěže na zastoupení subpopulací dendritických buněk v periferní krvi u vrcholových sportovců. *Alergie*, 2009, 11(4): 242-249.
- Janda A, Čižnár P, Daňková E, Houšťková H, Kayserová H, Koláčná A, Litzman J, Mikulová Š, Pařízková E, **Podrazil M**, Rozsival P, Poloučková A, Šedivá A, Bartůňková J. Pacienti s chronickou granulomatozní nemocí v České a Slovenské republice. *Alergie*, 2010, 12(2): 112-120.

11. Přílohy

- **Publikace č. 1**
- **Publikace č. 2**
- **Publikace č. 3**



available at www.sciencedirect.com

Clinical Immunology

www.elsevier.com/locate/yclim

CIS Clinical
Immunology
Society



The FOCIS Centers of Excellence were established in 2004 to advance interdisciplinary clinical immunology. This network provides multiple opportunities for trainee and faculty education and interaction. For more information please visit www.focisnet.org

FOCIS Centers of Excellence Review

FOCUS on FOCIS: Combined chemo-immunotherapy for the treatment of hormone-refractory metastatic prostate cancer

Daniela Rožková^a, Hana Tišerová^a, Jitka Fučíková^a, Jan Lašt'ovička^a, Michal Podrazil^a, Hana Ulčová^a, Vít Budínský^a, Jana Prausová^b, Zdeněk Linke^b, Ivo Minárik^{a,c}, Anna Šedivá^a, Radek Špíšek^{a,1}, Jiřina Bartůňková^{a,*,1}

^a Institute of Immunology, Charles University, 2nd Faculty of Medicine, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic, FOCIS Center of Excellence

^b Department of Oncology and Radiotherapy, Charles University, 2nd Faculty of Medicine, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

^c Department of Urology, Charles University, 2nd Faculty of Medicine, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

Received 21 December 2008; accepted with revision 5 January 2009

Available online 8 February 2009

KEYWORDS

Dendritic cells;
Cancer immunotherapy;
Prostate cancer;
Chemo-immunotherapy;
PSA

Abstract Immunotherapy has emerged as another treatment modality in cancer. The goal of immunotherapy in advanced cancer patients does not have to be the complete eradication of tumor cells but rather the restoration of a dynamic balance between tumor cells and the immune response. Appropriate combination of tumor mass reduction (by surgery and/or chemotherapy) and neutralization of tumor-induced immunosuppression might set the right conditions for the induction of anti-tumor immune response by active immunotherapy. We review experimental basis and key concepts of combined chemo-immunotherapy and document its principles in the case report of patient with hormone refractory

* Corresponding author. Institute of Immunology, Charles University, 2nd Faculty of Medicine, V Uvalu 84, Prague 5, Czech Republic. Fax: +420224435962. E-mail address: jirina.bartunkova@lfmotol.cuni.cz (J. Bartůňková).

¹ These authors contributed equally.

metastatic prostate cancer with sinister prognosis. More than four hundred prostate cancer patients have been treated with DC-based immunotherapy and tumor-specific immune responses have been reported in two-thirds of them. In half of these patients, DC immunotherapy resulted in transient clinical responses. Tregs, among other factors, potently inhibit tumor-specific T cells. Prostate cancer patients have elevated numbers of circulating and tumor infiltrating Tregs and there is evidence that Tregs increase tumor growth in vivo. Because of the high frequency of circulating Tregs in our patients, we first administered metronomic cyclophosphamide. After obtaining IRB approval, we started regular vaccinations with dendritic cells (DCs) loaded with killed prostate cancer cells. In accordance with the principles of combined immunotherapy, we continued palliative chemotherapy with docetaxel to reduce the tumor cell burden. DC-based vaccination induced prostate cancer cell-specific immune response. Combined chemo-immunotherapy consisting of alternate courses of chemotherapy and vaccination with mature DCs pulsed with LNCap prostate cancer cell line led to the marked improvement in the clinical and laboratory presentation and to the decrease of PSA levels by more than 90%.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Case presentation

In June 2006, a prostate cancer was detected in a 65-years old Caucasian male during a routine examination. The patient presented with a previous history of arterial hypertension and complained of lower back pain. An elevated level of prostate-specific antigen (PSA), 332 ng/ml, was detected.

Subsequently, during an urology examination, an enlarged rock-hard prostate gland was found with predominance to the right side. A transrectal ultrasound prostate biopsy revealed prostatic adenocarcinoma with Gleason score 4+3=7 in the right lobe and 4+5=9 in the left lobe of the prostate. On CT scans, enlarged multiple retroperitoneal and paraaortic lymph nodes over than 2 cm in size were detected together with a prostate enlargement invading into the seminal vesicles. A bone scan confirmed generalized metastases in the whole skeleton. A diagnosis of metastatic adenocarcinoma of the prostate gland stage T3cN2M1, grade D was made and the treatment was initiated.

Initially, the patient was treated with a maximal androgen blockade (MAB), consisting of the combination of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists/goserelin 3.6 mg every 28 days and antiandrogens/bicalutamide 50 mg once daily for 12 months. He also underwent 2 months of external beam radiotherapy in dose 50.4 Gy on the small pelvic area and 20 Gy on the prostate and seminal vesicles (from July to September 2006). The therapy had a positive effect on the painful bone metastases. PSA normalization and castrate testosterone levels were achieved and patient remained in remission for several months.

In July 2007, after 1 year of hormone therapy, the treatment failed and the disease progressed as a hormone-refractory prostate cancer (HRPC). Patient received 3 cycles of palliative chemotherapy-docetaxel 75 mg/m² every 3 weeks with a low dose of corticosteroids prednisone 5 mg twice daily. The chemotherapy was discontinued because of metabolic failure with hypokalemia, hyponatremia, hypocalcemia and pancytopenia. After normalization of biochemical and hematological parameters (Na, K, Ca supplementation, blood transfusions, Neupogen), we started the first

attempt with immunotherapy by interferon gamma (Imukine®) and symptomatic treatment of bone metastases by high doses of vitamin D (300 000 IU ergocalciferol every 2 weeks with the monitoring of serum 25-OH D3 levels), calcium, bisphosphonates and once radioactive Samarium¹⁵³. After a short response—drop in PSA levels below 400 in January 2008—disease relapsed and progressed during the first 5 months of 2008, with PSA levels peaking at 1955 ng/ml and rise in serum alkaline phosphatase (ALP) to 1800 IU/L. Since April 2008, patient was treated with additional cycles of palliative docetaxel.

At this stage of the disease, based on the Institutional Review Board (IRB) approval and patient's informed consent, patient was enrolled into an experimental combined chemo-immunotherapy protocol. In addition to the chemotherapy treatment, parameters of the immune system including frequency of regulatory T cells (Tregs) were monitored and we started the administration of cancer vaccine based on dendritic cells (DCs) pulsed with prostate cancer cell line. Based on the patient clinical status, parameters of cellular immunity and laboratory signs of the disease activity, immunotherapy was initiated in August 2008. After the preliminary treatment with cyclophosphamide (50 mg daily for 1 week), the first dose of the vaccine was injected subcutaneously in the inguinal and brachial area. DC-based vaccine has been then administered every 3–4 weeks. Continuous chemo-immunotherapy stabilized the course of progressive metastatic disease (X-ray showing marked improvement of bone metastases, over 90% drop in serum PSA levels and serum ALP dropped and stabilized at nearly normal levels) and patient remains well, lives good working and social life. Fig. 5 summarizes the course of the disease and treatment administered.

Materials and methods

Prostate cancer cell line

PSA positive prostate cancer cell line LNCap was obtained from the American Type Culture Collection and grown in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS/glutamine/gentamicin under Good Manufacturing Practice (GMP) conditions.

Frequency of Tregs in the peripheral blood

FoxP3⁺ expression in T cells was assessed at various time points using the APC-anti-human FoxP3⁺ Staining Kit (e-Biosciences, San Diego, CA). Rat IgG2a-APC (BD Biosciences) was used as isotype control. Samples were also simultaneously stained with CD25 PE (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), CD3 FITC, CD4 FITC, CD4 PE, and CD8 PE (BD Biosciences). Cells were acquired on FACS Aria (Becton Dickinson) and analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

DCs generation

Immature monocyte-derived DCs were generated from HLA-A2⁺ buffy coat monocytes as described [1,2]. Monocytes were separated by negative selection according to manufacturer's instructions (EasySep Human Monocyte Enrichment Kit, StemCell Technologies, Vancouver, Canada) and were cultured for 5 days in Cell Gro culture medium (CellGenix, Freiburg, Germany) in the presence of GM-CSF at 500 IU/ml (Gentaur, Brussel, Belgium) and 15 ng/ml of IL-4 (Gentaur). On day 5, immature DCs were used for subsequent experiments.

Expansion of influenza matrix peptide (MP) specific T lymphocytes, intracellular IFN γ staining and HLA-A2-MP tetramer staining

Immature DCs were activated for 4 h with tested activation stimuli: Poly (I:C) (Cayla-InvivoGen Europe, Toulouse, France) at 25 μ g/ml, LPS at 1 μ g/ml and a mixture of proinflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF and PGE2, maturation cocktail (MC)). Activated DCs were then pulsed with HLA A2 restricted peptide from influenza MP (GILGFVFTL, kindly provided by P. Otahal) for 2 h. Pulsed DCs were then washed and added to autologous lymphocytes at T cell: DCs ratio of 10:1 for 7 days. 50 U/ml of IL-2 (PeproTech EC, London, UK) were added on day 3. On day 7, lymphocytes were restimulated with fresh peptide-loaded DCs and analyzed for IFN γ production by intracellular staining as described previously [3]. Briefly, 1 h after restimulation, Brefeldin A (BioLegend, San Diego, CA) was added to block the extracellular release of IFN γ . After additional 4 h, cells were fixed using Fixation Buffer, permeabilized with Permeabilization Buffer and stained with anti-IFN γ -PE (all chemicals e-Bioscience, San Diego, CA) and CD8 PE-A610 (EXBIO, Prague, Czech Rep.). Frequency of influenza MP-specific CD8 T cells was determined by staining with HLA-A2-MP tetramers (Beckman Coulter, Marseilles, France).

In vitro induction of tumor specific T cells

LNCap cells were detached with 0.05% trypsin (Lonza, Vierviers, Belgium), washed and killed by UV irradiation (312 nm for 10 min). Immature DCs (day 5) were fed tumor cells at a DC-tumor cell ratio of 5:1 for 4 h and engulfment of tumor cells was confirmed by confocal microscopy. Tumor cell-pulsed DCs were then matured by 25 μ g/ml of Poly I:C overnight and used for stimulation of autologous T cells. LNCap-loaded mature DCs were added to T cells at a ratio of 1:10. IL-2 (50 IU/ml) was added on day 3 of culture. On day 7, T cells were restimulated by LNCap-loaded DCs and analyzed for the production of IFN γ .

Generation of DCs under GMP conditions

Leukapheresis was performed using Cobe Spectra separator (Cobe BCT, Lakewood, CO, USA). All following operations were performed under GMP conditions in the GMP facility of University Hospital Motol using protocol for DCs generation approved by Czech Drug Agency. The leukapheretic product was diluted in PBS + 1 mM EDTA (Lonza, Vierviers, Belgium) and mononuclear cells separated by Premium Ficoll Paque (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) gradient centrifugation. Collected mononuclear cells (PBMC) were washed in PBS + 1 mM EDTA (Lonza), resuspended in Cell Gro medium and plated in triple flasks (NUNC, Roskilde, Denmark) at 1×10^6 cells per cm² of surface area. After 2 h, non-adherent cells were washed with PBS (Lonza). Adherent monocytes were cultured for 6 days in Cell Gro medium with 20 ng/ml of IL-4 (Gentaur) and 500 U/ml of GM-CSF (Gentaur), fresh cytokines were added on day 3. Immature DCs were harvested on day 6, cryopreserved in human serum albumin (Baxter, Czech Republic) with 10% DMSO (WAK-Chemie, Steinbach, German) and stored in liquid nitrogen.

Loading of immature DCs with killed prostate cancer cells

LNCap cells were detached with 0.05% trypsin (Lonza), washed and killed by UV irradiation (312 nm for 10 min). Freshly thawed, immature DCs (day 6) were fed tumor cells at a DC: tumor cell ratio of 5:1 for 4 h. Tumor cell-pulsed DCs were then matured by 25 μ g/ml of Poly I:C overnight. 1×10^7 LNCap-pulsed mature DCs were washed in PBS, resuspended in 5 ml of 0.9% NaCl (Baxter) and injected subcutaneously in the inguinal and brachial area within 30 min.

Flow cytometry

Monoclonal antibodies (mAbs) against the following molecules were used: HLA-DR Alexa 700, CD14 PE-Dyomics 595 (EXBIO, Prague, Czech Rep.), CD11c-APC (Caltag, Invitrogen, Carlsbad, CA), CD80 FITC, CD83 PE (Beckman-Coulter, Marseilles, France) CD86-PC5 (BD Bioscience, San Diego, CA). DCs were stained for 30 min at 4 °C, washed twice in PBS, acquired on FACS Aria (BD, San Diego, CA) and analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR). DCs were gated according to their FSC and SSC properties and CD11c expression to eliminate tumor cells from the gate. Dead cells were excluded from the analysis based on DAPI staining. Appropriate isotype controls were included.

Immunomonitoring, detection of prostate cancer-specific T cells during induced DC-based vaccination

Blood samples were collected pre-vaccination and then before every administration of DC-based vaccine. Isolated PBMCs were cryopreserved until the analysis of tumor cell-specific T lymphocytes. Frequency of prostate cancer specific T cells was analyzed by IFN γ ELISPOT (GmbH, Germany) [4]. Pre- and post-vaccination samples were thawed and 2×10^5 T cells seeded in 96 well ELISPOT plate with 2×10^4 LNCap-pulsed or unpulsed mature DCs or with DCs loaded with recombinant PSA. After an overnight incubation, the number of IFN γ -

producing T cells was analyzed according to the manufacturer's instructions on ELISPOT reader (AID, Germany).

Results

Patient with 1 year history of metastatic prostate carcinoma was enrolled into IRB approved, experimentally combined chemo-immunotherapy protocol after he became resistant to hormonal therapy and was progressing on palliative chemotherapy. Combined chemo-immunotherapy consisted of alternate courses of chemotherapy and vaccination with mature DCs pulsed with LNCap prostate cancer cell line. Here, we describe the development and optimization of chemo-immunotherapy treatment.

Optimal conditions for generation of GMP quality DC-based vaccine

For clinical use, DCs have to be generated using GMP approved reagents. We thus tested DC generation in several GMP-certified culture media. Monocytes differentiation in Cell Gro yielded the highest number of viable immature DCs (data not shown). To efficiently activate T cells, DCs have to be

activated. We tested three maturation signals available in GMP quality: Poly I:C, LPS (TLR-3 and TLR-4 ligands, respectively) and the mixture of proinflammatory cytokines (MC) consisting of IL-1, IL-6, TNF and prostaglandine E2. DCs activated by tested stimuli were evaluated for their capacity to activate and expand HLA-A2 influenza MP specific CD8 T cell response. DCs activated by Poly I:C induced the highest frequencies of influenza MP specific T cells producing IFN γ (Fig. 1A). Poly I:C activated DCs also induced the lowest number of FoxP3+ Tregs. On the other hand, MC activated DCs xpanded very high numbers of Tregs, higher than immature DCs (Fig. 1B). Based on these findings, we chose Cell Gro as the optimal medium, and Poly I:C as the most efficient activation stimulus for clinical-grade DC vaccine generation.

Combined chemo-immunotherapy

Reduction of Tregs before initiation of DC-based vaccination by metronomic cyclophosphamide

We first monitored the frequency of Tregs that are known to suppress anti-tumor immune response. We detected a significantly higher frequency of Tregs (>5%) in the peripheral blood of our patient compared to the population of

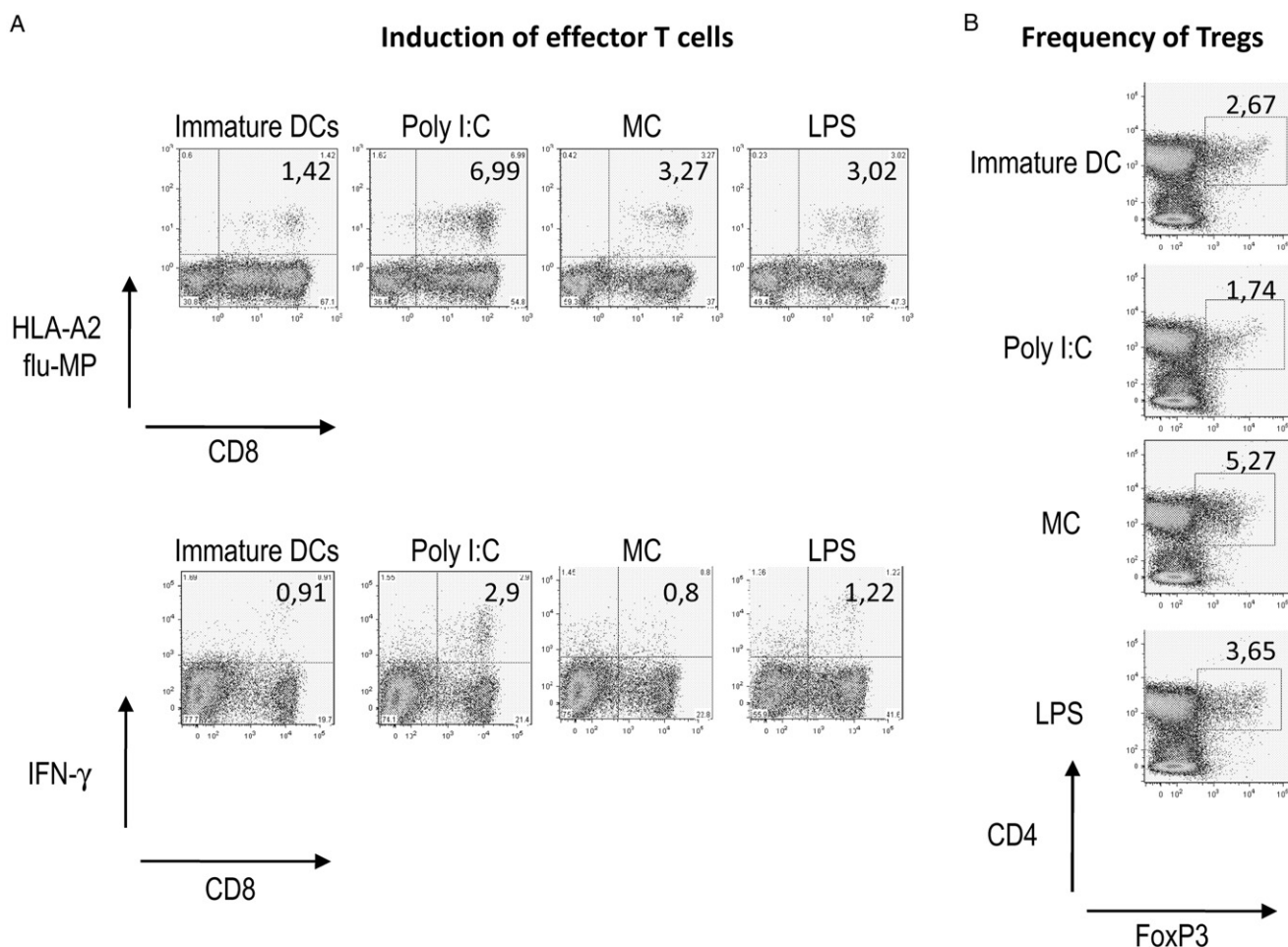


Figure 1 Poly I:C is a superior maturational agent for DCs generated in Cell Gro medium. Immature DCs were generated in the Cell Gro medium. DCs activated with Poly I:C, MC or LPS were tested (A) for their capacity to expand influenza MP specific T cells. Frequency of MP-specific CD8 T cells was determined by HLA-A2-MP tetramers (top) and their function by intracellular staining for IFN γ (bottom). (B) Frequency of expanded Tregs was determined by staining for CD4+CD25+FoxP3+. MC: Maturation cocktail (IL-1, IL-6, TNF and PGE2).

healthy controls (2–3%) (Fig. 2). In February 2008, cyclophosphamide (CPM) was thus administered at 50 mg daily for 1 week (metronomic CPM) to reduce the number of circulating Tregs before the initiation of DC-based immunotherapy. CPM treatment significantly reduced Tregs load, however we had to postpone the initiation of DCs vaccination because of delay in the approval of protocol for DC-based cancer vaccine generation by national Drug agency. Frequency and absolute numbers of Tregs went back up by July 2008. Second course of metronomic CPM administered in July prior to the start of DC vaccination was thus administered and significantly reduced circulating Tregs.

In vitro expansion of tumor-specific T cells in the prostate cancer patient

Patient underwent leukapheresis, and 2.7×10^8 of immature DCs were generated. As a proof of concept that DCs loaded with killed prostate cancer cell line can induce and expand tumor specific T cells, we performed the in vitro experiments using LNCap-pulsed, Poly I:C activated DCs as stimulators of patient's autologous lymphocytes. 1 week of in vitro stimulation of autologous T cells with LNCap-loaded DCs in the patient heavily pretreated with chemotherapy induced on average a 5-fold increase in the frequency of T cells producing IFN γ specifically in response to the restimulation

with tumor cell loaded DCs (Fig. 3A). Restimulation with unpulsed DCs induced no significant IFN γ production.

We then started subcutaneous vaccinations with 1×10^7 LNCap-loaded mature DCs injected in the inguinal area. Second and third doses were administered in 3 weeks interval, the fourth and subsequent vaccines were given at 4 weeks intervals. Most (>75%) of the injected cells were CD11c positive. Viability of injected DCs ranged between 40 and 60%. Phenotype was comparable to the cells in preliminary in vitro experiments, discrete upregulation of CD83 and a significant increase in the expression of CD86, CD80, and HLA-DR (Fig. 3B and data not shown). In addition to DC-based immunotherapy, patient has also been treated with palliative chemotherapy every 4–8 weeks. Tcell reconstitution was monitored regularly after the termination of chemotherapy and DCs were given only after the reconstitution of a T-cell compartment.

4 months after the start of combined chemo-immunotherapy, we analyzed peripheral blood samples from pre- and post-vaccination periods and evaluated changes in the frequency of T cells specific for LNCap cell line and PSA. The frequency of T cells specific to LNCap loaded on DCs doubled after the second DC vaccine and slightly increased after the administration of third dose. Similarly, the frequency of PSA-specific T cells significantly increased after vaccination with DCs loaded with killed LNCap cells. After the third vaccination, the frequency of PSA-specific T cells tripled from pre-vaccination levels (Fig. 4).

On combined chemo-immunotherapy, clinical status and metabolic parameters, including PSA and ALP, of the patient with progressive metastatic prostate cancer stabilized and his quality of life improved substantially. PSA levels and treatment modalities are summarized on Fig. 5.

Discussion

Treatment of tumors by protocols based on the combination of surgery, radiotherapy and systemic chemotherapy resulted in the improved prognosis of many human cancers. Despite the continuous introduction of new drugs and further improvements of chemotherapy protocols, it's likely that at some point chemotherapy will reach its limits and clinical efficacy will plateau. With recent rapid advances in the understanding of biology, of the immune response and the importance of an anti-tumor immune response for a long-term prognosis of cancer, immunotherapy has emerged as another treatment modality with the potential to contribute to further improvements in the survival.

Recent studies in mice and humans have convincingly documented that the immune system plays a crucial role in the control of tumorigenesis. Current view on the interaction between the immune system and transforming tumor cells has been formulated by R. Schreiber, GP. Dunn and LJ. Old in the "Cancer immunosurveillance and immunoediting hypothesis" [5–7]. They propose to distinguish three distinct stages in the process of cancer evolution: elimination, equilibrium and escape. Most likely, a transformed tumor cell will be recognized and destroyed and the process will terminate in the elimination phase. In the equilibrium phase, the host immune system and any surviving tumor cell variants enter into the state of dynamic equilibrium. The enormous plasticity of cancer cell arising from increasing genetic instability may eventually give rise to new phenotypes that have reduced immunogenicity and evolved various

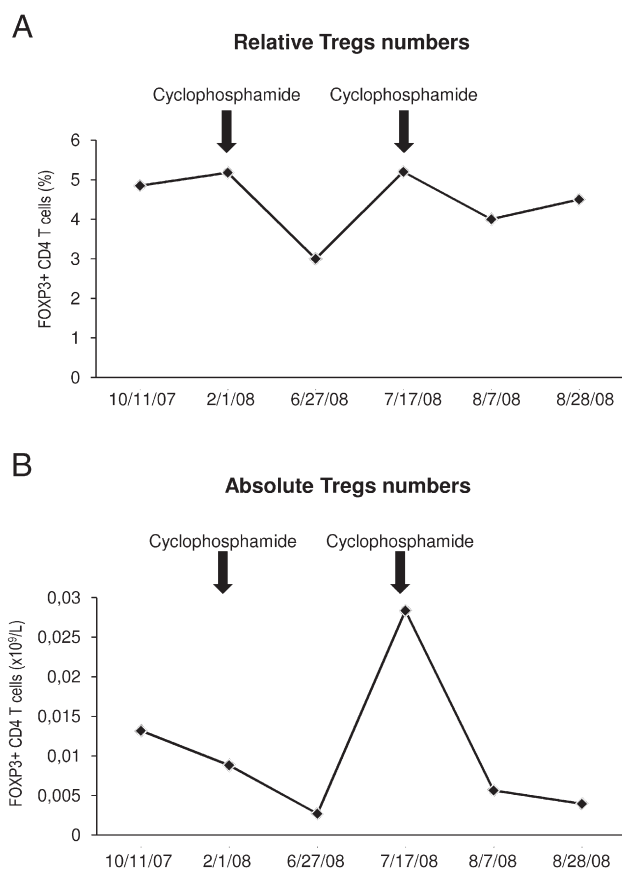


Figure 2 Relative and absolute numbers of Tregs diminish with metronomic cyclophosphamide administration. Tregs were identified as CD4+ CD25+ FoxP3+ cells by flow cytometry. The effect of CPM administration at 50 mg daily for 1 week on Tregs frequency (A) and absolute numbers (B) is shown.

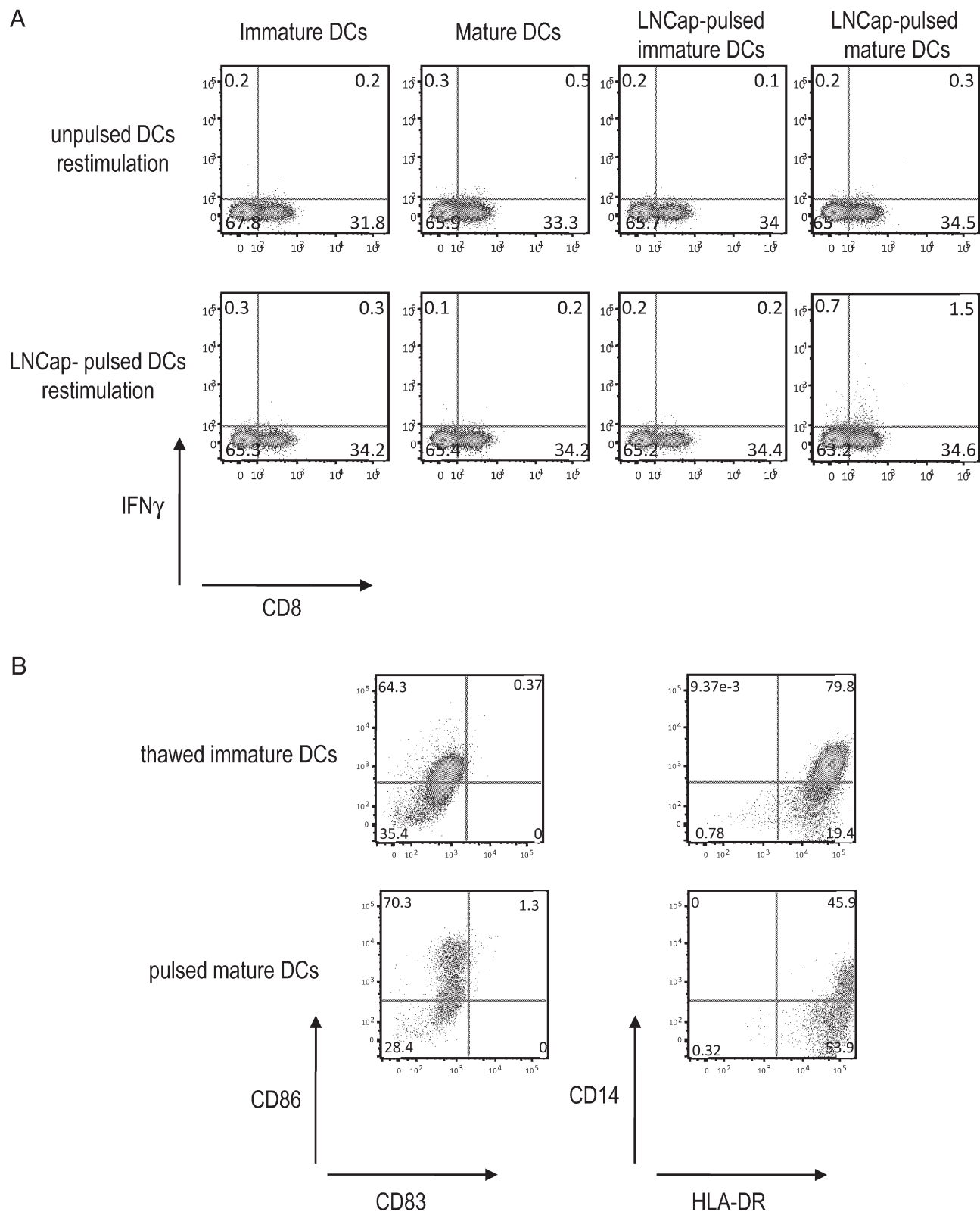


Figure 3 DCs delivered to prostate cancer patient were mature and promoted specific T-cell responses. (A) In vitro expansion of tumor-specific T cells in the prostate cancer patient. Immature DCs were loaded with killed LNCap cells, activated by Poly I:C and used as stimulators of autologous T cells. After 7 days of culture, T cells were restimulated and the frequency of LNCap-specific IFN γ producing T cells analyzed by intracellular flow cytometry. (B) Tumor cells pulsed DCs were activated by Poly I:C and analyzed for the expression of maturation-associated markers before s.c. injection.

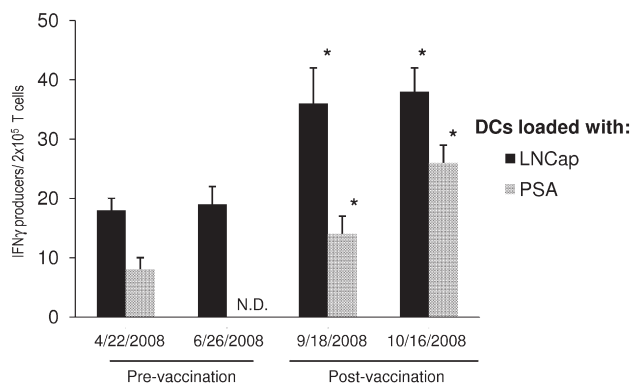


Figure 4 Vaccination with LNCap loaded mature DCs induces tumor cells and PSA-specific T cells responses. Expansion of prostate cancer-reactive T cells by DCs loaded with killed LNCap cells. Peripheral blood PBMCs were restimulated overnight in vitro with Poly I:C matured DCs loaded with killed LNCap cells or with recombinant PSA. Frequency of IFN γ producing cells was quantified by an ELISPOT assay. Data shown are mean/SD of triplicates after subtraction of spots induced by unpulsed DCs. *P value for comparison with pre-vaccination samples, $P < 0.05$. N.D.: Not done.

and IL-10 that may suppress or attenuate the antitumor immune response. Through production of these immunosuppressive factors, tumors may condition local DCs to induce suppressive T cells, such as FoxP3+, Tregs [8] and IL-13-producing CD4+ T cells [9]. Tumors may also escape the immune system by mutations in the antigen processing pathway, such as those in β 2-microglobulin, TAP or proteasome components [10]. These mutations are sufficient to confer a resistance to the CD8 T lymphocytes that is very difficult to overcome. Tumor then progresses to the escape phase and this is the stage when most of the tumors are diagnosed and treated. However, there is now solid evidence that, in the equilibrium stage, the immune system can restrain cancer growth for extended periods of time [11]. For example, a specific immune response against preneoplastic stem cell antigen SOX2-expressing clonogenic cells predicts favorable clinical outcome in patients with asymptomatic plasmaproliferative disorders [12,13]. Thus, there is a hope that similar to the success of vaccination against infections, immune response could also be harnessed to protect against cancer. This enthusiasm has further been fueled by the recent advances in the understanding of mechanisms controlling the activation of the anti-tumor immune response, together with the progress in laboratory techniques that allow detailed immunomonitoring of patients diagnosed with and treated for cancer. Furthermore, it is now possible to manipulate distinct components of the immune system in vitro and in vivo and design increasingly sophisticated cancer vaccines or

mechanisms for the evasion from the control of the immune response. Tumors often induce the expression or production of factors such as transforming growth factor-beta (TGF- β)

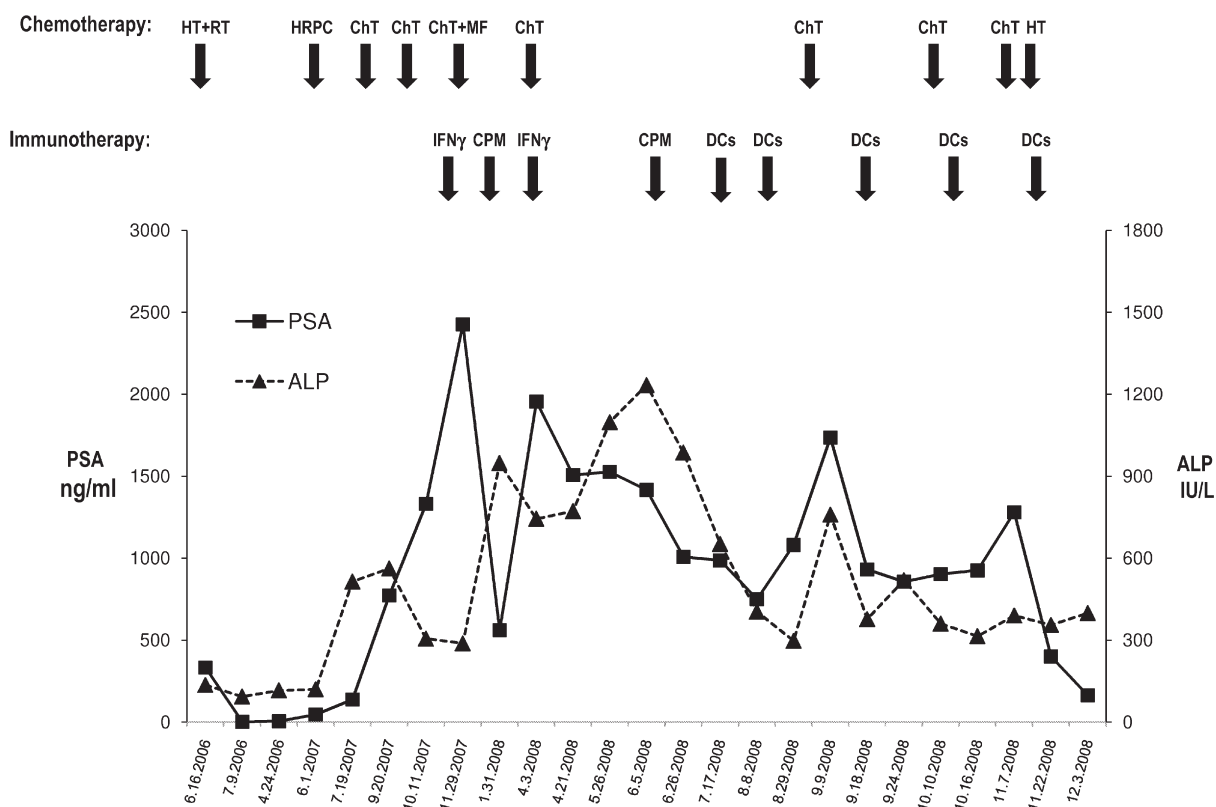


Figure 5 Serologic response to combined chemo-immunotherapy in patient with hormone-refractory prostate cancer. Summary of PSA (solid line) and ALP (dotted line) levels and administered treatment during the course of the disease. DCs: Dendritic cell-based vaccination, HRPC: hormone-refractory prostate cancer, ChT: cycle of palliative chemotherapy, MF: metabolic failure, HT+RT: hormone and radiotherapy, CPM—cyclophosphamide, IFN γ —interferon γ (Immunik[®]).

other immunointervention strategies. The cancer immunoe-diting model predicts that patients in the equilibrium phase would benefit the most from cancer immunotherapy, while in patients in the escape stage, immuno-therapy should not play a major role because tumor escaped from the control of the immune system. Skepticism of clinical immunologists has been further encouraged by clinical studies of cancer immunotherapy. Clinical trials attempting to induce an effective immune response in heavily pretreated patients with advanced, usually metastatic, disease have only had a limited success. Although the administration of anti-tumor vaccines usually induced a detectable anti-tumor specific immune response, the impact on tumor progression was limited [14].

One strategy is to develop immunotherapeutic strategies for patients in the equilibrium stage, i.e. those with preneoplasias. This, however, excludes the largest group of patients with advanced tumors, treated by standard protocols. The goal of immunotherapy in advanced cancer patients, however, does not have to be the complete eradication of tumor cells but rather a reversal from the escape phase back to the equilibrium stage. Appropriate combination of tumor mass reduction (by surgery and/or chemo/radiotherapy) and neutralization of tumor-induced immunosuppression might set the right conditions for the induction of anti-tumor immune response by the active immunotherapy of choice. Immune response could then keep the residual tumor cells in check and restore the balance between the host and the population of tumor cells. Therapy that is applied during the tumor escape phase not only affects the tumor but also modulates the relationship between the tumor and the immune system. In contrast to the prevailing view of chemotherapy as a immunosuppressive regimen, there is now ample evidence of chemotherapy promoting the immune response. Simple removal of the tumor mass can reverse tumor-induced immune tolerance, restoring the antibody- and cell-mediated immune responses, even in animals with metastatic breast cancer [15]. Certain forms of chemotherapy can cause immunogenic cancer cell death and thus promote induction of anticancer immunity [16–18]. Anthracyclines, oxaliplatin, and ionizing irradiation have been shown to induce immunogenic cells death characterized by the translocation of calreticulin from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane [19–22]. Bortezomib, a proteasome inhibitor used in the treatment of multiple myeloma, induces immunogenic cell death through translocation of HSP90 to the cell surface [3,18]. Pioneer studies also suggested that chemotherapy and immunotherapy can synergize, as prior immunotherapy sensitizes tumor cells to subsequent immunotherapy. Two clinical studies, in end-stage small cell lung cancer [23] and glioblastoma multiforme [24,25] in which DC vaccines were administered before salvage chemotherapy have reported increased response rates to chemotherapy administered after DC vaccination.

Rationale combined chemo-immunotherapy should be accompanied by a close immunomonitoring of key parameters. Follow-up of the immune reconstitution after chemotherapy cycles allows precise timing of active immunotherapy. The presence of tumor induced immunosuppressive mechanisms (Tregs, myeloid suppressor cells, IL-10, TGF β) is another parameter to follow in order to tailor immunotherapy. In the future, patients will also be tested for polymorphisms of genes that are important for the outcome of cancer. There are preliminary data on some genes, such as TLR4, IL-10 and IL-18,

and their role in therapeutic response in breast cancer, lymphoma and ovarian cancer, respectively [26–28]. Efficiency of active tumor immunotherapy can be monitored by evaluating the existence of tumor specific immunity. Successful cancer immunotherapy should lead to the establishment of a long-term tumor cell-specific immunological memory. Immunotherapy itself will without any doubt be further optimized. For instance, identification of important rejection antigens in patients with preneoplastic diseases or patients who experienced significant clinical responses after immunotherapy could yield better antigenic targets than studies in patients with advanced disease [13,29]. Ideally, chemotherapy used for the reduction of tumor burden should include drugs inducing immunogenic cell death.

We documented some of the concepts introduced in this review on the management of patient with hormone refractory metastatic prostate cancer with sinister prognosis. Radical prostatectomy for prostate cancer is followed by PSA recurrence in up to 40% of patients. One third of patients with biochemical relapse progresses to incurable metastatic disease. These data demonstrate the need for alternative treatment strategies for patients with relapsed or hormone-refractory prostate cancer [30]. Prostate cancer is thought to represent a good model for cancer immunotherapy. More than 400 prostate cancer patients have been treated with DC-based immunotherapy and tumor-specific immune responses have been reported in two-thirds of these as recently reviewed by Thomas-Kaskel et al. [31]. In half of these patients, DC immunotherapy resulted in transient clinical responses. Tregs, among other factors, potentially inhibit tumor-specific T cells. Prostate cancer patients have elevated numbers of circulating and tumor infiltrating Tregs and there is evidence that Tregs increase tumor growth in vivo [32,33].

In our patient, we thus monitored the crucial parameters of the immune system and developed a tailored chemo-immunotherapy protocol. Because of the high frequency of circulating Tregs, we administered metronomic CPM. In accordance with previous reports, CPM treatment normalized Tregs numbers [34]. After obtaining IRB approval, we started regular vaccinations with DCs loaded with killed prostate cancer cells [35–37]. Use of whole cells as the source of tumor antigens ensures the presentation of the rich spectrum of tumor antigens, induces a complex CD4 and CD8 T cells responses and limits the risk of formation of tumor escape variants. In accordance with the principles of combined immunotherapy, we continued palliative chemotherapy with docetaxel to reduce the tumor cell burden to set the right conditions for the induction of anti-tumor immune response. DC-based vaccination induced prostate cancer cell specific immune response and PSA was identified as a target of a large proportion of tumor specific T cells. In this patient, combined chemo-immunotherapy consisting of alternate courses of chemotherapy and vaccination with mature DCs pulsed with LNCap prostate cancer cell line, led to the marked improvement in the clinical and laboratory presentation and to the significant decrease of PSA levels by >90%. Patient remains in a good clinical status for over 18 months after the development of hormone refractory prostate cancer. Findings in this patient are supported by a recent study by Arlen et al. In 28 patients with hormone-resistant metastatic prostate cancer, they reported an increase in progression-free survival in patients who received

docetaxel in combination with prostate cancer vaccine versus patients treated with prostate cancer vaccine alone (6.1 versus 3.7 months, respectively) [38]. Patients receiving docetaxel following DC vaccination maintained PSA-specific T cells that correlated with declining serum levels of PSA.

Taken together, the implementation of modern cancer immunotherapeutic strategies into the management of cancer patients is highly desirable as the immune system has the capacity to recognize and eliminate neoplastic cells. Based on the above reviewed premises, chemotherapy and immunotherapy should not be considered as antagonist forms of therapy. It is conceivable that their rational combination could substantially improve prognosis of cancer patients. Researchers, clinical immunologists and oncologists, together, should make efforts to design combined chemo-immunotherapy strategies and to determine the optimal time schedule of such protocols. Rational and evidence-based combination of chemotherapy and immunotherapy could further improve prognosis and survival of cancer patients.

Acknowledgments

This study was supported by project MSM 0021620812 from the Czech Ministry of Education and grant GACR 310/08/0838. We would like to thank Prof. Václav Pelouch for his continuous support.

References

- [1] D. Rozkova, R. Horvath, J. Bartunkova, R. Spisek, Glucocorticoids severely impair differentiation and antigen presenting function of dendritic cells despite upregulation of Toll-like receptors, *Clin. Immunol.* 120 (3) (2006) 260–271.
- [2] K. Sochorova, R. Horvath, D. Rozkova, J. Litzman, J. Bartunkova, A. Sediva, R. Spisek, Impaired Toll-like receptor 8-mediated IL-6 and TNF-alpha production in antigen-presenting cells from patients with X-linked agammaglobulinemia, *Blood* 109 (6) (2007) 2553–2556.
- [3] R. Spisek, A. Charalambous, A. Mazumder, D.H. Vesole, S. Jagannath, M.V. Dhodapkar, Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications, *Blood* 109 (11) (2007) 4839–4845.
- [4] Z. Tobiasova, D. Pospisilova, A.M. Miller, I. Minarik, K. Sochorova, R. Spisek, L. Rob, J. Bartunkova, In vitro assessment of dendritic cells pulsed with apoptotic tumor cells as a vaccine for ovarian cancer patients, *Clin. Immunol.* 122 (1) (2007) 18–27.
- [5] G.P. Dunn, A.T. Bruce, H. Ikeda, L.J. Old, R.D. Schreiber, Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape, *Nat. Immunol.* 3 (11) (2002) 991–998.
- [6] G.P. Dunn, L.J. Old, R.D. Schreiber, The three Es of cancer immunoeediting, *Annu. Rev. Immunol.* 22 (2004) 329–360.
- [7] G.P. Dunn, L.J. Old, R.D. Schreiber, The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoeediting, *Immunity* 21 (2) (2004) 137–148.
- [8] F. Ghiringhelli, P.E. Puig, S. Roux, et al., Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation, *J. Exp. Med.* 202 (7) (2005) 919–929.
- [9] C. Aspod, A. Pedroza-Gonzalez, M. Gallegos, et al., Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development, *J. Exp. Med.* 204 (5) (2007) 1037–1047.
- [10] F.M. Marincola, E.M. Jaffee, D.J. Hicklin, S. Ferrone, Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance, *Adv. Immunol.* 74 (2000) 181–273.
- [11] C.M. Koebel, W. Vermi, J.B. Swann, N. Zerafa, S.J. Rodig, L.J. Old, M.J. Smyth, R.D. Schreiber, Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state, *Nature* 450 (7171) (2007) 903–907.
- [12] R. Spisek, A. Kukreja, L.C. Chen, et al., Frequent and specific immunity to the embryonal stem cell-associated antigen SOX2 in patients with monoclonal gammopathy, *J. Exp. Med.* 204 (4) (2007) 831–840.
- [13] M.V. Dhodapkar, Harnessing host immune responses to preneoplasia: promise and challenges, *Cancer. Immunol. Immunother.* 54 (5) (2005) 409–413.
- [14] S.A. Rosenberg, J.C. Yang, N.P. Restifo, Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines, *Nat. Med.* 10 (9) (2004) 909–915.
- [15] E.A. Danna, P. Sinha, M. Gilbert, V.K. Clements, B.A. Pulaski, S. Ostrand-Rosenberg, Surgical removal of primary tumor reverses tumor-induced immunosuppression despite the presence of metastatic disease, *Cancer Res.* 64 (6) (2004) 2205–2211.
- [16] L. Zitvogel, L. Apetoh, F. Ghiringhelli, F. Andre, A. Tesniere, G. Kroemer, The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *J. Clin. Invest.* 118 (6) (2008) 1991–2001.
- [17] L. Zitvogel, L. Apetoh, F. Ghiringhelli, G. Kroemer, Immunological aspects of cancer chemotherapy, *Nat. Rev. Immunol.* 8 (1) (2008) 59–73.
- [18] R. Spisek, M.V. Dhodapkar, Towards a better way to die with chemotherapy: role of heat shock protein exposure on dying tumor cells, *Cell Cycle* 6 (16) (2007) 1962–1965.
- [19] N. Casares, M.O. Pequignot, A. Tesniere, et al., Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death, *J. Exp. Med.* 202 (12) (2005) 1691–1701.
- [20] N. Chaput, S. De Botton, M. Obeid, et al., Molecular determinants of immunogenic cell death: surface exposure of calreticulin makes the difference, *J. Mol. Med.* 85 (10) (2007) 1069–1076.
- [21] M. Obeid, A. Tesniere, F. Ghiringhelli, et al., Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death, *Nat. Med.* 13 (1) (2007) 54–61.
- [22] M. Obeid, A. Tesniere, T. Panaretakis, et al., Ecto-calreticulin in immunogenic chemotherapy, *Immunol. Rev.* 220 (2007) 22–34.
- [23] S.J. Antonia, N. Mirza, I. Fricke, et al., Combination of p53 cancer vaccine with chemotherapy in patients with extensive stage small cell lung cancer, *Clin. Cancer Res.* 12 (3 Pt. 1) (2006) 878–887.
- [24] J.S. Yu, C.J. Wheeler, P.M. Zeltzer, et al., Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration, *Cancer Res.* 61 (3) (2001) 842–847.
- [25] C.J. Wheeler, A. Das, G. Liu, J.S. Yu, K.L. Black, Clinical responsiveness of glioblastoma multiforme to chemotherapy after vaccination, *Clin. Cancer Res.* 10 (16) (2004) 5316–5326.
- [26] L. Apetoh, F. Ghiringhelli, A. Tesniere, et al., Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anti-cancer chemotherapy and radiotherapy, *Nat. Med.* 13 (9) (2007) 1050–1059.
- [27] A.W. Bushley, R. Ferrell, K. McDuffie, et al., Polymorphisms of interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-6, IL-10, and IL-18 and the risk of ovarian cancer, *Gynecol. Oncol.* 95 (3) (2004) 672–679.
- [28] E. Lech-Maranda, L. Baseggio, J. Bienvenu, et al., Interleukin-10 gene promoter polymorphisms influence the clinical outcome of diffuse large B-cell lymphoma, *Blood* 103 (9) (2004) 3529–3534.
- [29] R. Spisek, M.V. Dhodapkar, Immunoprevention of cancer, *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 20 (3) (2006) 735–750.
- [30] A. Kiessling, S. Fussel, R. Wehner, M. Bachmann, M.P. Wirth, E.P. Rieber, M. Schmitz, Advances in specific immunotherapy for prostate cancer, *Eur. Urol.* 53 (4) (2008) 694–708.

- [31] A.K. Thomas-Kaskel, C.F. Waller, W. Schultze-Seemann, H. Veelken, Immunotherapy with dendritic cells for prostate cancer, *Int. J. Cancer* 121 (3) (2007) 467–473.
- [32] A.M. Miller, P. Pisa, Tumor escape mechanisms in prostate cancer, *Cancer Immunol. Immunother.* 56 (1) (2007) 81–87.
- [33] T.J. Curiel, G. Coukos, L. Zou, et al., Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival, *Nat. Med.* 10 (9) (2004) 942–949.
- [34] F. Ghiringhelli, C. Menard, P.E. Puig, et al., Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients, *Cancer Immunol. Immunother.* 56 (5) (2007) 641–648.
- [35] F. Berard, P. Blanco, J. Davoust, et al., Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells, *J. Exp. Med.* 192 (11) (2000) 1535–1544.
- [36] M. Nouri-Shirazi, J. Banchereau, D. Bell, S. Burkeholder, E.T. Kraus, J. Davoust, K.A. Palucka, Dendritic cells capture killed tumor cells and present their antigens to elicit tumor-specific immune responses, *J. Immunol.* 165 (7) (2000) 3797–3803.
- [37] R. Spisek, P. Chevallier, N. Morineau, N. Milpied, H. Avet-Loiseau, J.L. Harousseau, K. Meflah, M. Gregoire, Induction of leukemia-specific cytotoxic response by cross-presentation of late-apoptotic leukemic blasts by autologous dendritic cells of nonleukemic origin, *Cancer Res.* 62 (10) (2002) 2861–2868.
- [38] P.M. Arlen, J.L. Gulley, C. Parker, et al., A randomized phase II study of concurrent docetaxel plus vaccine versus vaccine alone in metastatic androgen-independent prostate cancer, *Clin. Cancer Res.* 12 (4) (2006) 1260–1269.

Phase I/II clinical trial of dendritic-cell based immunotherapy (DCVAC/PCa) combined with chemotherapy in patients with metastatic, castration-resistant prostate cancer

Michal Podrazil^{1,*}, Rudolf Horvath^{1,7,*}, Etienne Becht^{4,5,6}, Daniela Rozkova², Pavla Bilkova², Klara Sochorova^{1,2}, Hana Hromadkova¹, Jana Kayserova¹, Katerina Vavrova¹, Jan Lastovicka¹, Petra Vrabцова¹, Katerina Kubackova³, Zdenka Gasova⁸, Ladislav Jarolim⁹, Marek Babjuk⁹, Radek Spisek^{1,2}, Jirina Bartunkova^{1,2}, Jitka Fucikova^{1,2}

¹Department of Immunology, Charles University, 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

²Sotio, Prague, Czech Republic

³Department of Oncology, Charles University, 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

⁴Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France

⁵Université Pierre et Marie Curie-Paris, Paris, France

⁶Université Paris Descartes, Paris, France

⁷Department of Pediatric and Adult Rheumatology, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

⁸Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic

⁹Department of Urology, Charles University, 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

*These authors have contributed equally to this work

Correspondence to:

Jitka Fucikova, e-mail: fucikova@sotio.com

Keywords: immunotherapy, dendritic cell, prostate cancer, overall survival, castration-resistant prostate cancer

Received: February 10, 2015

Accepted: May 15, 2015

Published: May 29, 2015

ABSTRACT

Purpose: We conducted an open-label, single-arm Phase I/II clinical trial in metastatic CRPC (mCRPC) patients eligible for docetaxel combined with treatment with autologous mature dendritic cells (DCs) pulsed with killed LNCaP prostate cancer cells (DCVAC/PCa). The primary and secondary endpoints were safety and immune responses, respectively. Overall survival (OS), followed as a part of the safety evaluation, was compared to the predicted OS according to the Halabi and MSKCC nomograms.

Experimental design: Twenty-five patients with progressive mCRPC were enrolled. Treatment comprised of initial 7 days administration of metronomic cyclophosphamide 50 mg p.o. DCVAC/PCa treatment consisted of a median twelve doses of 1×10^7 dendritic cells per dose injected s.c. (Aldara creme was applied at the site of injection) during a one-year period. The initial 2 doses of DCVAC/PCa were administered at a 2-week interval, followed by the administration of docetaxel (75 mg/m²) and prednisone (5 mg twice daily) given every 3 weeks until toxicity or intolerance was observed. The DCVAC/PCa was then injected every 6 weeks up to the maximum number of doses manufactured from one leukapheresis.

Results: No serious DCVAC/PCa-related adverse events have been reported. The median OS was 19 months, whereas the predicted median OS was 11.8 months with the Halabi nomogram and 13 months with the MSKCC nomogram. Kaplan-Meier analyses showed that patients had a lower risk of death compared with both MSKCC (Hazard Ratio 0.26, 95% CI: 0.13–0.51) and Halabi (Hazard Ratio 0.33, 95% CI: 0.17–0.63) predictions. We observed a significant decrease in Tregs in the

peripheral blood. The long-term administration of DCVAC/PCa led to the induction and maintenance of PSA specific T cells. We did not identify any immunological parameter that significantly correlated with better OS.

Conclusions: In patients with mCRPC, the combined chemoimmunotherapy with DCVAC/PCa and docetaxel was safe and resulted in longer than expected survival. Concomitant chemotherapy did not preclude the induction of specific anti-tumor cytotoxic T cells.

INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is the most frequently diagnosed noncutaneous malignancy in elderly men and is the second leading cause of cancer-related death in Western countries [1]. Localized, early-stage disease is, in general, successfully treated with surgery or radiation therapy; however, approximately 30% of patients have recurrence and require further management. Androgen deprivation is the standard of care in such situations, achieving temporary tumor control or regression in up to 85% of cases [2]. Although castration is quite effective, most patients ultimately develop progressive disease, which is poorly responsive to traditional therapies and remains a significant clinical challenge [3]. Since 2004, docetaxel-based regimens have become the first-line chemotherapy in metastatic, castration-resistant prostate cancer (mCRPC) patients [4–6]. Apart from taxanes, three additional agents that directly target tumor cells have recently been reported to increase the median OS in mCRPC patients as well: enzalutamide, an anti-androgen therapy [7]; abiraterone - an inhibitor of testosterone synthesis [8]; and Alpharadin, an alpha-emitter that targets bone metastasis [9]. However, these strategies only modestly prolong patient survival and are linked to a wide range of undesirable side effects [10].

Cancer immunotherapy is being tested as an additional treatment modality in oncology [11]. Sipuleucel-T (Provenge; Dendreon Corporation), a prostatic acid phosphatase-granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor (PAP-GM-CSF) fusion protein-loaded autologous blood cell vaccine, was approved by the US Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of asymptomatic or minimally symptomatic mCRPC [12].

Active cellular immunotherapy (ACI) using antigen-loaded dendritic cells (DCs) is another immunotherapeutic approach in the clinical development [13, 14]. Although many trials reported the induction of antitumor immune responses after administration of cancer immunotherapy, the efficacy has been disappointing. The limited success of ACI in advanced cancer patients might be due to the establishment of tumor-induced immunosuppression [15]. In such situation, immunotherapy alone cannot be expected to radically reverse the progressive course of the disease. Experimental evidence supports the fact that the goal of the immunotherapy in the late stages is not

necessarily complete eradication tumor cells but rather the establishment of an equilibrium between the host immune system and the proliferating tumor cells [16]. Therefore, new directions have focused on combination strategies that could improve the vaccine efficacy without adding significant toxicity.

The concept of combined chemoimmunotherapy explores the fact that the treatment with chemotherapy might not only decrease the tumor cell load but also neutralize the tumor induced immunosuppression thus facilitating the effect of concurrent immunotherapy. In support of testing docetaxel in combination with a vaccine, experimental data obtained in mice and humans have contradicted the traditional thinking that taxanes suppress immune-cell functions [17, 18]. *In vitro* assays have revealed that a cohort of patients with stage II/III breast cancer had enhanced T cell and NK cell functions when treated with taxanes [19]. Docetaxel has also been shown to reverse myeloid derived suppressor cell-mediated immune suppression and to modulate the tumor microenvironment in a manner that improves the efficacy of immune-based therapies [20]. Moreover, patients previously vaccinated with an anti-cancer vaccine may respond longer to docetaxel compared with historical controls receiving docetaxel without prior immunotherapy [21].

In this Phase I/II trial, we tested the combined chemoimmunotherapy in patients with metastatic castration resistant prostate cancer. In addition to the standard chemotherapy, patients eligible for docetaxel were treated with autologous dendritic cell based vaccine, DCVAC/PCa. DCVAC/PCa is composed of autologous Poly I:C activated dendritic cells pulsed with killed LNCaP prostate cancer cell line.

MATERIALS AND METHODS

Patient eligibility

Eligible patients had prostatic adenocarcinoma and progression of PSA serum levels and/or radiographic progression after the failure of second-line hormonal manipulation in generalized, metastatic disease. Previous chemotherapy was allowed if the last dose was at least 3 months before the study entry. Other eligibility requirements were an Eastern Cooperative Oncology Group performance status (ECOG) of 0–2, adequate hematologic, hepatic, and renal function, and negative

status for hepatitis B and C viruses and HIV. Exclusion criteria included a history of primary immunodeficiency, a severe allergic or anaphylactic reaction following vaccination, the presence of pulmonary, cardiac, or other systemic diseases limiting patient survival.

Study design and treatment

This report includes summary data for 25 patients, including 15 patients from a single-institution, single-arm, open-label phase I/II clinical trial (EudraCT 2009-017295-24) and 10 patients from previous patient's named program (approved by University Hospital Motol IRB). These patients fulfilled the identical inclusion criteria and were treated by the analogous schedule which was later applied into the protocol of the clinical trial. The treatment schedule is summarized in Fig. 1. Briefly, DCVAC/PCa treatment consisted of a median of twelve doses of 1×10^7 dendritic cells injected s.c. at axillary and inguinal area (2.5 ml at each site). The initial two doses of DCVAC/PCa were administered at a 2-week interval, followed by the administration of docetaxel (75 mg/m²) and prednisone (5 mg twice daily) given every 3 weeks until toxicity or intolerance was observed. The vaccine was then injected every 6 weeks up to the maximum number of doses manufactured from one leukapheresis. Minimal interval between chemotherapy administration and immunotherapy was 7 days. Immune monitoring was performed before the 1st dose of DCVAC/PCa and after the 12th dose or after last dose if less than 12 doses were manufactured from the leukapheresis. Before the 1st DCVAC/PCa dose was administered, patients received metronomic

cyclophosphamide (Cyclophosphamide Orion® 50 mg daily for 1 week) [22–24]. To increase the motility of the injected cells and to support the accumulation of local dendritic cells *in vivo*, imiquimod (Aldara® cream 12.5 mg) was applied locally 24 hours before and after each injection. The primary endpoints were the safety and feasibility of DCVAC/PCa active cellular immunotherapy in mCRPC patients; the secondary endpoint was the immune response. The study protocol was approved by the Institutional Review Board (IRB) and the State Institute for Drug Control (SUKL). Written informed consent was obtained from all patients before any study procedures were conducted.

Assessment of clinical activity and toxicity

The patients were monitored at each visit by conducting a patient history and physical examination. The Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDRA, Version 15.1) was used for the coding of adverse events (AEs). All patients underwent relevant radiologic and laboratory tests, the Halabi and MSKCC predictions of survival, laboratory and clinical data related to the time of the 1st DCVAC/PCa administration were used. The real OS was calculated from the 1st DCVAC/PCa administration until death or until the data lock (information about all surviving patients were available at data lock). Even if not included in the study protocol as an endpoint, we evaluated PSA response as a part of laboratory monitoring. Serum PSA was measured every six weeks and a response (for patients with a baseline PSA level of at least 20 ng per milliliter) was defined as a reduction from baseline of at

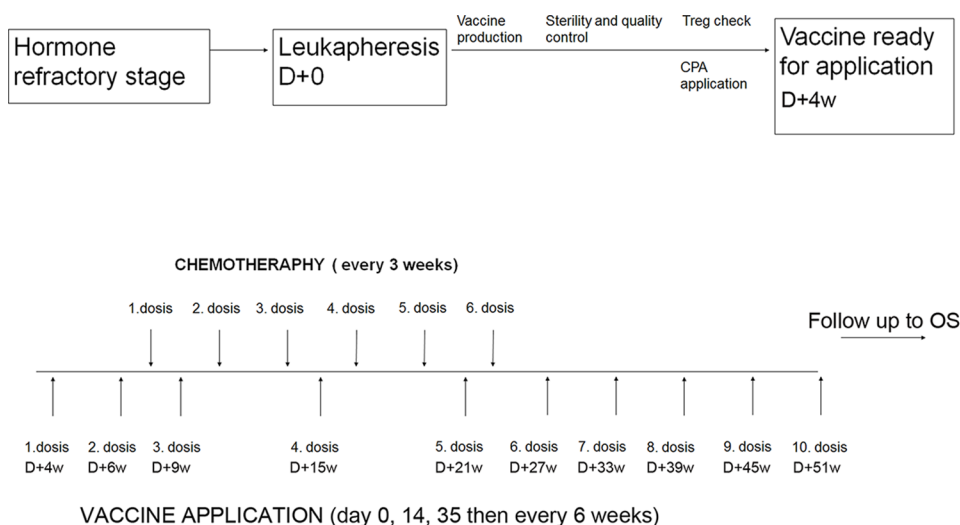


Figure 1: Study design. The DCVAC/PCa treatment consisted of a median twelve doses of 1×10^7 dendritic cells injected s.c. The treatment comprised an initial 7 days of metronomic cyclophosphamide administration 50 mg p.o. and 2 subsequent doses of DCVAC/PCa. Patients then started docetaxel (75 mg/m²) and prednisone (5 mg twice daily) treatment, which was administered every 3 weeks; DCVAC/PCa was then given every 6 weeks up to the maximum number of doses manufactured from one leukapheresis. Imiquimod 5% (Aldara® 5% drm cream) was applied locally 24 hours before and after each DCVAC/PCa administration. Immunomonitoring (IM) was evaluated after the first and twelfth doses of DCVAC/PCa. Clinical evaluation (CE) was performed after every single DCVAC/PCa dose.

least 50 percent that was maintained for at least six weeks during the combined chemoimmunotherapy treatment.

DCVAC/PCa production

Generation of DCs under GMP conditions

Leukapheresis was performed using a Cobe Spectra separator (Cobe BCT, Lakewood, CO, USA). All of the following operations were performed under Good Manufacturing Practice (GMP) conditions in the GMP facility of University Hospital Motol using the protocol for DC generation that was approved by the State Institute for Drug Control, as previously described [25, 26]. The leukapheretic product was diluted in PBS + 1 mM EDTA (Lonza, Verviers, Belgium), and mononuclear cells were separated by Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) gradient centrifugation. Collected mononuclear cells (PBMC) were washed in PBS + 1 mM EDTA (Lonza), resuspended in CellGro medium (CellGenix, Freiburg, Germany) and plated in triple flasks (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) at 1×10^6 cells per cm^2 of surface area. After 2 h, non-adherent cells were washed with PBS (Lonza). Adherent monocytes were cultured for 6 days in CellGro (CellGenix) medium with 20 ng/ml of IL-4 (Gentaur, Kampenhout, Belgium) and 500 U/ml of GM-CSF (Gentaur); fresh cytokines were added on day 3. Immature DCs were harvested on day 6, washed in PBS (Lonza) and resuspended in CellGro (CellGenix).

Loading of immature DCs with killed prostate cancer cells and maturation of DCs

The PSA-positive prostate cancer cell line LNCaP was obtained from the American Type Culture Collection and grown in UltraCULTURE (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with GlutaMax (Life Technologies, Carlsbad, CA) under GMP conditions. LNCaP cells were detached with 0.05% Trypsin-EDTA (Lonza), washed and killed by UV irradiation (312 nm for 10 min). Harvested immature DCs (day 6) were pulsed with tumor cells at a DC:tumor cell ratio of 5:1 for 4 h. Tumor cell-pulsed DCs were then matured with 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Poly I:C (*Invivogen*) overnight. Mature DCs were harvested, resuspended in Cryostor CS10 (BioLife Solutions, Bothell, WA, USA) and stored in liquid nitrogen.

Assessment of immunological parameters

Routine immunological testing

Serum levels of immunoglobulin G, A, and M and C-reactive protein (in g/L) were assessed by automated nephelometry using an Image 800 Immunochemistry System (Beckman Coulter). Serum autoantibodies, ANCA, RF and anti-cardiolipin were detected using the ANA test (BioRad, Philadelphia, PA), ANCA test (Inova Diagnostics, San Diego, CA), and ACA test (Orgentec

Diagnostic, Mainz, Germany), respectively. Lymphocyte subsets were enumerated by flow cytometry using FACS CANTO II (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ) and were subsequently analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA). Monoclonal antibodies against CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 and HLA-DR were purchased from BD Biosciences.

Detection of regulatory T cells

Regulatory T cells (Tregs) were identified by surface staining with anti-CD3 Alexa700 (Exbio, Vestec, Czech Republic), CD4 PC7 (eBioscience, San Diego, CA), CD8 PE-Dy590 (Exbio), CD25 PerCPCy5.5 and CD127 Alexa647 (BioLegend, San Diego, CA) antibodies, followed by fixation and permeabilization with a FoxP3 staining buffer set (eBioscience) and intracellular staining with anti-FoxP3 FITC (eBioscience), as previously described [27, 28]. All samples were processed and analyzed immediately after blood sampling on FACSARIA™ (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) and analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

Detection of antigen-specific T cells against PSA, MAGE-A1 and MAGE-A3

For each patient, the frequency of antigen-specific T cells against tumor antigens (PSA, MAGE-A1, MAGE-A3) was measured by flow cytometry. Antigens were included in the testing based on the previous analysis of the expression of tumor associated antigens in LNCaP cell line using real-time quantitative PCR. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were incubated for 10 days in RPMI 1640 medium (Life Technologies) supplemented with 10% heat-inactivated pooled human AB serum, 100 U/ml penicillin, 2 mmol/l L-glutamine, non-essential amino acid mix and sodium pyruvate (all from Life Technologies), as well as with mixtures of overlapping peptides (PepMix; JPT Peptide Technologies, Berlin, Germany) that spanned the whole sequence of prostate specific antigen (PSA), melanoma-associated antigen 1 (MAGE-A1) and melanoma associated antigen 3 (MAGE-A3), each at a concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. On days 4 and 7, IL-2 was added (20 UI/ml; Gentaur, Kampenhout, Belgium). On day 9, PBMCs were restimulated for 12 hours with each peptide mixture mentioned above, and brefeldin (BioLegend, San Diego, CA, USA) was added after 4 hours of incubation. The cells were first stained with antibodies against CD3-PC5, CD4-PC7 (eBioscience), and CD8-PE-Dy590 (Exbio). Then, the Aqua Blue Live/Dead cell viability assay (Life Technologies) was used to measure the population of dead cells. Thereafter, the cells were fixed with Fixation/Permeabilization buffer (BD Bioscience) and permeabilized with Permeabilization buffer (BD Bioscience). Intracellular IFN- γ staining was performed with a FITC-conjugated antibody (BD Bioscience), and IL-2 staining was performed with an APC-conjugated antibody (BD Bioscience), according to the manufacturer's

instructions. Stained cells were immediately measured using a BD LSR II flow cytometer (BD Biosciences) and data analysis was performed using FlowJo software (Tree Star) after the exclusion of Live/Dead-positive cells. IFN- γ secretion was only considered to be antigen specific if the frequency of IFN- γ -secreting T cells that responded to peptide-pulsed PBMCs was at least 2 times greater than the frequency of IFN- γ secretion in response to the negative control (unpulsed PBMCs).

Detection of tumor antigen-specific antibodies against PSA and MAGE-A3

The recombinant proteins PSA and MAGE-3 (Abnova, Taipei, Taiwan) were diluted in Carbonate Coating Buffer (Life Technologies) to a final concentration of 1 μ g/ml and were adhered to 96-well plates overnight at 4°C. The plates were blocked for 1 hour with Assay Buffer (Life Technologies), and then human sera diluted to 1:50, 1:100 and 1:200 were incubated in the antigen-coated wells for 2 h. The plates were then incubated with secondary antibody (goat polyclonal antibody to human IgG; Abcam, Cambridge, UK) for 1 hour. TMB substrate (Life Technologies) was then added and incubated for 20 minutes. The reaction was stopped by adding Stop Solution (Invitrogen, Prague, Czech Republic), and the plates were immediately read at an absorbance of 450 nm. As a positive control, cytomegalovirus glycoprotein B was used. The cutoff value designating a positive reaction was assessed as the mean OD of 15 healthy control human sera (NHS) + 3SD.

Statistical analysis

Group comparisons were performed using the GraphPad Prism software (GraphPad software, La Jolla, CA). The effect of the treatment on immune parameters was assessed using the Wilcoxon signed-rank test. Scatterplots feature least square linear regressions lines.

Survival analysis was performed using the R-package 'survival.' The log-rank test was used to compare the survival of treated patients to their expected survival using the Halabi [29] or Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC) nomograms [30]. Cox proportional hazards models were used to assess univariate and multivariate associations between clinical variables and prognosis. Variables that were significantly associated with prognosis in the univariate analysis were further included in the multivariate analysis.

RESULTS

Characteristics of the patients

Between August 2008 and March 2014, twenty-five patients were treated with DCVAC/PCa. The median age at the start of immunotherapy was 73 years (age range 48–82 years), 88% of the patients had tumors with Gleason score ≥ 7 and none of them had signs of visceral disease. The median entry levels of prostate specific antigen (PSA) were 186 ng/mL (range 1–749 ng/mL), of lactate dehydrogenase (LDH) were 234 IU/L (range 129–399 IU/L), of alkaline phosphatase (ALP) were 192 IU/L (range 37–1843 IU/L), of hemoglobin (Hgb) were 11.9 g/dL (range 9–14.8 g/dL) and of C-reactive protein (CRP) were 5.6 mg/L. All patients had experienced progression on androgen deprivation therapy as an initial or secondary treatment. Testosterone levels were maintained at castrate levels during the study. Eight patients had received docetaxel-based chemotherapy prior to the enrollment (> 3 months before entering the study), with a median of 8 months long chemotherapy free period. During the study period, approximately 350 doses of ACI were administered, with a median of 12 doses per patient. After chemotherapy failure, the patients were treated with supportive care. None received abiraterone, enzalutamide or alpharadin. The patients' baseline characteristics are shown in Table 1.

Table 1: Patients' baseline characteristics.

Patient characteristics	
Total number of patients	25
Race	
Caucasian	25
Age (years)	
Median	73
Mean	67
Range	48–82

(Continued)

Patient characteristics	
ECOG performance status	
0	8
1	15
2	2
Disease location	
Bone only	13
Nodal only	4
Bone and nodal	8
Gleason score	
5	1
6	2
7	10
8	3
9	9
Median	7
PSA, ng/mL	
Median	186
Mean	245
Range	1–749
Lactate dehydrogenase, IU/L	
Median	234
Mean	248
Range	129–399
Alkaline phosphatase, IU/L	
Median	192
Mean	327
Range	37–1843
Hemoglobin, g/dL	
Median	11, 9
Mean	11, 9
Range	9–14, 8

Abbreviations: ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; PSA, prostate specific antigen.

Adverse events

The overall toxicities are summarized in Table 2. During the administration of cumulative 350 doses, we recorded following adverse events (AEs): 17x fatigue, 13x back pain, 5x diarrhea, 3x constipation and 13x other gastrointestinal discomfort, 12x paresthesias, 8x mild

infections, 3x loss of appetite, 1x hypersensitivity-like reaction and 1x myalgia (number of events). All AEs were grade 1 or 2, and there were no grade 4 toxicities or treatment-related deaths. None of the 44 reported serious adverse events (SAEs) were related to the immunotherapy but rather were related to the progression of the underlying disease or the concomitant chemotherapy. In addition, no

Table 2: Cumulative summary tabulation of serious adverse events (SAEs). The Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDRA) version 15.1 was used for the coding of adverse events (AEs). The summary tabulations of SAEs are arranged by the primary System Organ Class (SOC) and Preferred Term (PT) level.

System organ class	Active study drug (DCVAC/PCa)
Preferred term	
Blood and lymphatic system disorders	
Anaemia	4
Bone marrow failure	1
Febrile neutropenia	2
Leukopenia	1
Pancytopenia	1
Thrombocytopenia	1
Cardiac disorders	
Myocardial infarction	1
Pulmonary oedema	1
General disorders and administration site conditions	
Death	2
Immune system disorders	
Hypogammaglobulinaemia	1
Injury, poisoning and procedural complications	
Myopathy toxic	1
Spinal compression fracture	1
Metabolism and nutrition disorders	
Diabetes mellitus	1
Hypokalaemia	1
Musculoskeletal and connective tissue disorders	
Pain in extremity	1
Osteonecrosis of jaw	1
Pathological fracture	1
Neoplasms benign, malignant and unspecified (incl cysts and polyps)	
Choroid melanoma	1
Meningioma	1
Neuroendocrine carcinoma	1
Nervous system disorders	
Cognitive disorder	1
Epilepsy	1
Hemiparesis	1

(Continued)

System organ class	Active study drug (DCVAC/PCa)
Preferred term	
Paraparesis	1
Paraplegia	1
Renal and urinary disorders	
Hydronephrosis	1
Incontinence	1
Renal failure	1
Urinary retention	2
Urinary tract inflammation	1
Urinary tract obstruction	2
Respiratory, thoracic and mediastinal disorders	
Pulmonary embolism	1
Vascular disorders	
Circulatory collapse	1
Hypotension	1
Thrombosis	3
TOTAL	44

suspected unexpected serious adverse reactions (SUSARs) were reported. In summary, DCVAC/PCa therapy was well tolerated with the favorable safety profile.

Clinical efficacy

PSA response

In patients with PSA response assessed, reduction by at least 50% on two visits at least 6 weeks apart was observed in 9 of 23 patients (39, 1%) (8/9 were chemo-naïve). At 6 months (6th dose of DCVAC/PCa) after the initiation of chemo/immunotherapy, a $\geq 50\%$ decrease in PSA was observed in 8 of 23 patients (34, 8%) and 25–50% decrease of PSA in additional 5 patients (21, 7%).

Overall survival

Overall survival, followed as a part of the safety evaluation, was compared to the predicted values calculated by the Halabi and MSKCC nomograms. Fig. 2A shows Kaplan-Meier estimation of the survival distributions. The estimated median survival for the DCVAC/PCa-treated group was 19 months compared to 11.8 months in the Halabi and 13 months in the MSKCC control predictions. Log-rank tests showed that patients had a significantly better observed survival than that of the MSKCC ($*p = 0.0008$) and Halabi ($*p = 0.0001$) predictions. Univariate Cox regressions showed that patients had a lower risk of

death compared with both MSKCC (Hazard Ratio 0.26, 95% CI: 0.13–0.51) and Halabi (Hazard Ratio 0.33, 95% CI: 0.17–0.63) predictions (Fig. 2B).

Immunological response

To evaluate the effect of DCVAC/PCa on the immune system, PBMCs were isolated pre and post vaccination and subsequently analyzed for T cell subsets. We observed no significant changes in the frequency or absolute numbers of peripheral blood CD3⁺, CD4⁺ and NK cells during the course of the trial (Fig. S1). Conversely, the frequency of activated CD3⁺/HLA-DR⁺ cells and CD8⁺ T cells significantly increased ($*p > 0.05$) (Fig. 3A, 3B). Additionally, a significant decrease in the frequency of regulatory T cells was observed ($*p = 0.0402$) (Fig. 3C). Furthermore, after the course of treatment, the levels of IgG and IgM were significantly decreased (Supplemental Fig. 2A, 2B). There was no significant trend in the occurrence of autoantibodies (data not shown).

We also assessed the presence of antigen-specific T cells and antibody response against prostate-specific tumor antigens. The peripheral blood of the patients was stimulated by peptide mixes (PSA, MAGE-A1 and MAGE-A3), and the frequency of IFN- γ -secreting T cells was analyzed by flow cytometry. Eleven out of 23 patients had significantly higher numbers of antigen-specific T cells against PSA before treatment compared with healthy controls (data not shown).

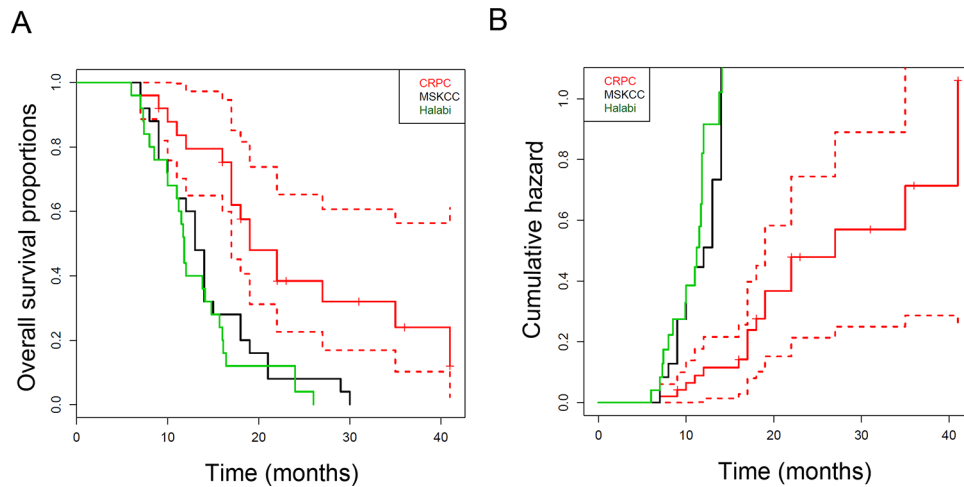


Figure 2: Overall survival of docetaxel and DCVAC/PCa treated patients ($n = 25$). A. Kaplan-Meier curves for overall survival and B. the cumulative hazard values of DCVAC/PCa-treated patients and the corresponding expected survival and hazard values predicted using the Halabi and MSKCC nomograms. The median overall survival was 19 months with DCVAC/PCa vs 11.8 months (Halabi) or 13 months (MSKCC) predicted by the nomograms, $*p = 0.00005$.

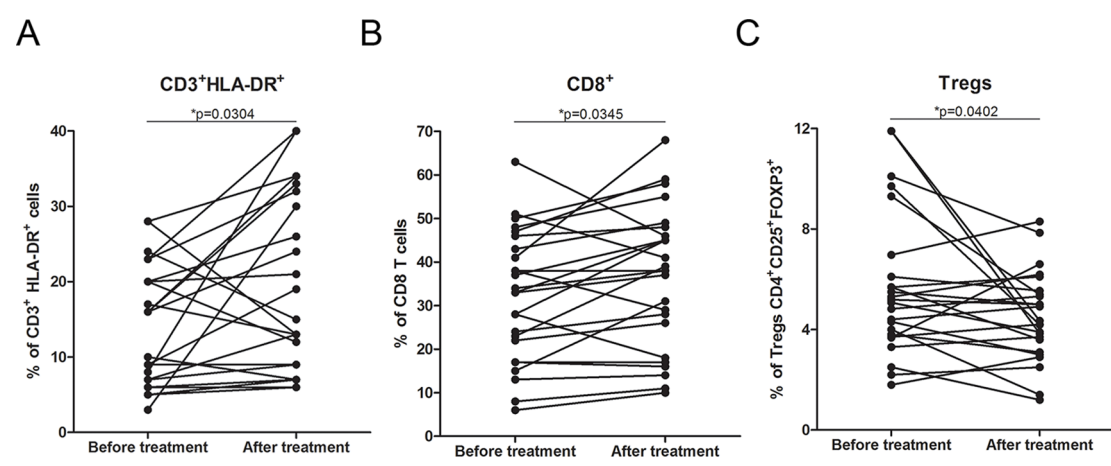


Figure 3: Immune parameters in the peripheral blood during DCVAC/PCa/docetaxel treatment. A. The proportions of CD3⁺/HLA-DR⁺ and B. CD8⁺ cells were significantly increased after the treatment in the 25 evaluated patients, $*p < 0.05$. Data are expressed as the proportion of CD3⁺/HLA-DR⁺ and CD8⁺ cells among CD45⁺ cells. C. The percentage of regulatory T cells (CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺) was significantly decreased after the treatment, $*p < 0.05$. Data are expressed as the proportion of CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Tregs among CD4⁺ T cells.

Similar results were obtained for MAGE-A1 and MAGE-A3 antigen-specific T cells, for which 6 out of 23 and 3 out of 23 patients had significantly increased numbers of antigen-specific T cells compared with the healthy controls (data not shown). Long-term administration of DCVAC/PCa induced a statistically significant increase in the PSA-specific T cells PSA ($*p < 0.05$) (Fig. 4A). However, we did not observe significant changes in the frequency of antigen-specific T cells against MAGE-A1 and MAGE-A3 antigens during the course of the trial (Fig. 4B, 4C).

Furthermore, we evaluated the induction of tumor antigen-reactive IgG antibodies by DCVAC/PCa vaccination. The presence of IgG antibodies against PSA and MAGE-3 was analyzed in patient sera. We detected

IgG-positive antibodies against PSA in 6 out of 23 (26%) patients (Supplemental Fig. 2C) and against MAGE-A3 in 8 out of 23 (34%) patients (Supplemental Fig. 2D). There was no obvious correlation between the presence of PSA or MAGE-A3 specific antibodies and frequency of tumor antigen specific T cells (Supplemental Fig. 3A, 3B). We did not observe any significant correlation between the OS and the presence of antibody or cellular immunity against tumor antigens (Supplemental Fig. 3C, 3D, 3E, 3F, 3G).

Cox proportional hazards regression

Cox proportional hazards regression analysis was performed to determine factors that could predict

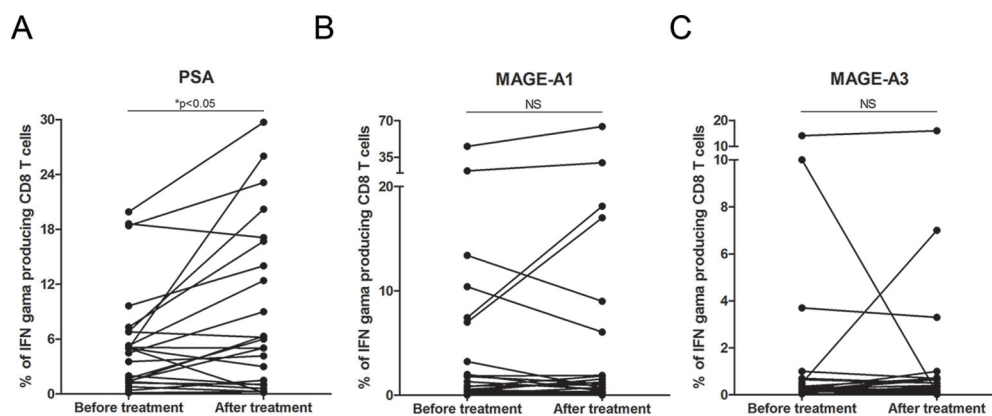


Figure 4: Tumor antigen-specific T cell response during DCVAC/PCa/docetaxel treatment in the peripheral blood. A. The increase in the frequency of PSA-specific T cells, $*p < 0.05$, as well as the maintenance of stable levels of T cells specific against MAGE-A1 B. and MAGE-A3 C. was detected.

disease progression or death. First, univariate analysis was performed to evaluate the impact of 24 biological parameters measured at the beginning of the treatment (Table 3). Among those, C-reactive protein (CRP) was associated with a poor outcome after treatment (Hazard Ratio: 1.01), whereas ECOG and hemoglobin (Hgb) were associated with a favorable outcome after treatment (Hazard Ratio: 0.89 and 0.64, respectively). No other parameters reached significance. Multivariate analysis indicated that Hgb (Hazard ratio 0.68, 95% CI: 0.48–0.95) was the only independent prognostic factor associated with a positive outcome of treated patients, although the performance status of ECOG was close to being significantly associated with a good prognosis (Hazard ratio 0.91, 95% CI 0.99–7.1, p -value 0.052). None of the routine immunological parameters evaluated before treatment had any impact on the overall survival of vaccinated subjects.

DISCUSSION

Prostate cancer represents a relevant candidate disease for the development of cancer immunotherapy strategies. Prostate cancer cells express tissue-specific proteins that could act as therapeutic targets, among others PSA, PAP, PSMA and prostate cancer usually progresses at relatively slow pace, which might allow for the elicitation of an effective immune response [31]. DC-based vaccination strategies have shown promising results in the past; however, the limitations observed in late-stage cancer patients led to the idea that combination strategies might improve the efficacy and long-term effects of immunotherapy [32, 33]. Experimental evidence supports the fact that the goal of immunotherapy in advanced-stage cancer does not have to be the complete eradication of tumor cells but rather the reversal from the escape phase back to the equilibrium stage as predicted by the cancer immunoediting model [34]. A plausible strategy

for testing cancer immunotherapy would be to design trials in early stages of the disease, with minimal burden of tumor cells [35, 36]. It is, however, very challenging to define studies in early stage patients with efficacy indicating endpoints that could be reached in a realistic timeframe. Current regulatory environment pushes for the improved overall survival as the most relevant indicator of a clinical benefit. Cancer immunotherapy approaches thus need to be tested in late stage patients, often pretreated or treated by chemotherapy with large tumor burden and metastatic disease. It's very challenging to induce anti-tumor responses in late stages in the settings of a profound tumor induced immunosuppression. Possible strategy how to circumvent these practical concerns might be the appropriate combination of tumor mass reduction by surgery or chemo/radiotherapy along with the neutralization of tumor-induced immunosuppression [17]. This might establish the proper conditions for the induction of an anti-tumor immune response by active immunotherapy.

Recent studies indicate that despite the common view of chemotherapy and immunotherapy as antagonistic, there are synergies between the two approaches. For example, certain chemotherapeutics were described to induce immunogenic cell death [37–40]. Chemotherapy can also reduce tumor induced immunosuppression by eliminating suppressive populations of immune cells, such as Tregs or myeloid derived suppressor cells [37]. Immunotherapy has been reported to sensitize tumor cells to subsequent chemotherapy in various models, including small cell lung cancer or glioblastoma [41] [42].

With respect to the concept of combined chemoimmunotherapy, we performed an open-label, single-arm clinical trial in patients with metastatic, castration-resistant prostate cancer (mCRPC) eligible for first- or second-line docetaxel treatment using DCVAC/PCa. We did not see any serious anaphylactic reactions or any evidence of autoimmunity in treated

Table 3: Cox proportional hazards regression analysis of the association between potential factors and death after DCVAC/PCa in mCRPC patients.

Factor	Univariate				Multivariate			
	95% Confidence Interval				95% Confidence Interval			
	Hazard Ratio	<i>p</i> -value	Lower bound	Upper bound	Hazard Ratio	<i>p</i> -value	Lower bound	Upper bound
ECOG	0.89	0.0059	0.81	0.96	0.91	0.05	0.99	7.1
Hemoglobin	0.65	0.0046	0.47	0.87	0.68	0.02	0.48	0.95
CRP	1.01	0.04	1.00	1.03	1.00	0.76	0.99	1.02
Pts. age	0.99	0.95	0.92	1.08	-	-	-	-
iPSA	0.99	0.48	0.99	1.00	-	-	-	-
PSA	1.00	0.19	0.99	1.00	-	-	-	-
Gleason score	0.87	0.55	0.54	1.39	-	-	-	-
IgG	1.13	0.21	0.93	1.37	-	-	-	-
IgA	1.54	0.18	0.81	2.92	-	-	-	-
IgM	0.73	0.59	0.23	2.33	-	-	-	-
LE	0.95	0.55	0.79	1.13	-	-	-	-
LY	0.86	0.95	0.004	180.2	-	-	-	-
T lymphocytes (CD3)	1.00	0.73	0.97	1.03	-	-	-	-
CD3 ⁺ HLADR ⁺	0.98	0.55	0.92	1.04	-	-	-	-
CD3 ⁺ CD16 ⁺ cells	0.99	0.86	0.96	1.03	-	-	-	-
CD4 ⁺ T cells	1.01	0.6	0.96	1.06	-	-	-	-
CD8 ⁺ T cells	1.00	0.9	0.97	1.03	-	-	-	-
B Lymphocytes	0.98	0.64	0, 9	1.06	-	-	-	-
Treg	0.84	0.1	0.67	1.03	-	-	-	-
Alkaline phosphatase	1.17	0.07	0.91	1.39	-	-	-	-
LDH	1.77	0.14	0.82	3.77	-	-	-	-
PSA specific T cells	1.06	0.27	0.95	1.17	-	-	-	-
MAGE-A1 specific T cells	1.01	0.48	0.97	1.05	-	-	-	-
MAGE-A3 specific T cells	1.00	0.97	0.87	1.15	-	-	-	-

Abbreviations: ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; CRP, C-reactive protein; iPSA, initial PSA; LE, leukocytes; LY, Lymphocytes; Treg, regulatory T cells; LDH, lactate dehydrogenate

subjects. Our data are consistent with the published reports, showing a favourable safety profile of DC-based approaches [32]. Moreover, no additional toxicity of combining chemotherapy with vaccination has been observed. Importantly, patients receiving combined treatment with standard docetaxel chemotherapy and DCVAC/PCa survived significantly longer than predicted by standard Halabi and MSKCC nomograms. With a median follow-up of 19 months, combined docetaxel and DCVAC/PCa resulted in a 7.2- and 6-month improvement

in the median overall survival compared with that of the Halabi or MSKCC nomogram, respectively. The effect of on survival was consistently observed across patient subgroups, including those with prognostic factors known to be adversely correlated with overall survival such as increased prostate specific antigen, alkaline phosphatase and lactate dehydrogenase levels, the Gleason score, the presence of pain, and an increased number of bone metastases. Our results showed that factors reflecting satisfactory clinical condition of the treated patients (good

performance status, low CRP levels, higher Hgb levels) were associated with longer overall survival. None of the assessed routine immunological parameters had an important predictive value for the outcome of the therapy. This is in contrast with the data published by Sheikh N et al [12].

In a pivotal clinical trial with docetaxel (5), rates of PSA response were detected in 45% of docetaxel treated patients. In this study, we detected PSA response in 39, 1% patients. However, 9 patients in our study were advanced patients who previously failed on docetaxel before the study entry. When restricting the analysis of the PSA response to chemo-naïve patients, the PSA response was detected in 60%. This suggests that combined chemo-immunotherapy might lead to the PSA response in higher proportion of patients than docetaxel alone. This, however, needs to be analyzed in larger randomized trials.

Immune responses were evaluated as a secondary endpoint in our study. We evaluated antigen-specific CD8⁺ T cell responses by intracellular staining for IFN- γ following stimulation with tumor antigens and antibody responses by measuring tumor antigen specific IgGs. We detected a significant increase in the frequency of PSA-specific CD8⁺ T cells, with no increase in the number of antigen-specific T cells against MAGE-A1 and MAGE-A3. The total number of activated CD3⁺HLADR⁺ T cells, as well as of cytotoxic CD8⁺ T cells, was significantly increased after the treatment cycle.

In accordance with previously published reports, we detected lower levels of total IgG and IgM in the sera after the treatment. The decline is most probably linked to the chemotherapy treatment [43]. In 6 and 8 patients' sera, we detected the presence of IgG antibodies against PSA and MAGE-A3, respectively. There was no direct correlation between patients with antigen-specific T cells and positive antibodies against the respective tumor antigen. We did not see any correlation between the presence of anti-tumor immune response and survival, although this analysis is preliminary given the small number of patients. It's also important to note that although easily accessible, peripheral blood might not represent the most relevant compartment for the analysis of anti-tumor immunity. Analysis of the tumor microenvironment might provide more pertinent information.

Prostate cancer patients were reported to have increased numbers of circulating and tumor-infiltrating Tregs, and there is evidence that Tregs promote tumor growth *in vivo* [44]. We detected significantly lower frequency of Tregs after chemo-immunotherapy.

Taken together, it's hard to dissect which changes in immune parameters are attributable to chemo-immunotherapy and which are caused by the disease progression. We conclude that chemotherapy does not preclude the induction and long term maintenance of PSA-specific T cells and that DCVAC/PCa does not induce detectable autoimmunity. The observed changes in

immune parameters (reduction of Tregs, increase in CD8⁺ T cells, HLA DR⁺CD3⁺ cells and PSA-specific CD8⁺ cells) fit into the concept that successful cancer immunotherapy should not increase the percentage of regulatory T cells and should lead to the establishment of a long-term tumor cell-specific immunity [45].

Combined chemoimmunotherapy by docetaxel and DCVAC/PCa was well tolerated and led to an improved overall survival of mCRPC patients compared with the predicted survival using the nomograms [29, 30]. Better than predicted survival, favorable safety profile, augmentation of the antigen-specific immune responses and decrease in Treg numbers provide rationale for conducting larger randomized studies, including placebo-control group, to evaluate the clinical efficacy of this treatment strategy.

ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by grant IGA NT 11559-5, Ministry of Health, Czech Republic and by Ministry of Health, Czech Republic - conceptual development of research organization, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic 00064203.

REFERENCES

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. CA: a cancer journal for clinicians. 2014; 64:9–29.
2. Ross RW, Xie W, Regan MM, Pomerantz M, Nakabayashi M, Daskivich TJ, Sartor O, Taplin ME, Kantoff PW, Oh WK. Efficacy of androgen deprivation therapy (ADT) in patients with advanced prostate cancer: association between Gleason score, prostate-specific antigen level, and prior ADT exposure with duration of ADT effect. Cancer. 2008; 112:1247–1253.
3. Beltran H, Beer TM, Carducci MA, de Bono J, Gleave M, Hussain M, Kelly WK, Saad F, Sternberg C, Tagawa ST, Tannock IF. New therapies for castration-resistant prostate cancer: efficacy and safety. European urology. 2011; 60:279–290.
4. Maluf FC, Smaletz O, Herchenhorn D. Castration-resistant prostate cancer: systemic therapy in 2012. Clinics. 2012; 67:389–394.
5. Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, Lara PN Jr., Jones JA, Taplin ME, Burch PA, Berry D, Moynour C, Kohli M, Benson MC, Small EJ, Raghavan D, Crawford ED. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. The New England journal of medicine. 2004; 351:1513–1520.
6. Berthold DR, Pond GR, Soban F, de Wit R, Eisenberger M, Tannock IF. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer: updated

- survival in the TAX 327 study. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008; 26:242–245.
7. Scher HI, Fizazi K, Saad F, Taplin ME, Sternberg CN, Miller K, de Wit R, Mulders P, Chi KN, Shore ND, Armstrong AJ, Flaig TW, Flechon A, Mainwaring P, Fleming M, Hainsworth JD, et al. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *The New England journal of medicine*. 2012; 367:1187–1197.
 8. de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, Fizazi K, North S, Chu L, Chi KN, Jones RJ, Goodman OB, Jr., Saad F, Staffurth JN, Mainwaring P, Harland S, Flaig TW, Hutson TE, Cheng T, et al. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *The New England journal of medicine*. 2011; 364:1995–2005.
 9. Harrison MR, Wong TZ, Armstrong AJ, George DJ. Radium-223 chloride: a potential new treatment for castration-resistant prostate cancer patients with metastatic bone disease. *Cancer management and research*. 2013; 5:1–14.
 10. Denmeade SR, Isaacs JT. A history of prostate cancer treatment. *Nature reviews Cancer*. 2002; 2:389–396.
 11. Galluzzi L, Vacchelli E, Bravo-San Pedro JM, Buque A, Senovilla L, Baracco EE, Bloy N, Castoldi F, Abastado JP, Agostinis P, Apte RN, Aranda F, Ayyoub M, Beckhove P, Blay JY, Bracci L, et al. Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget*. 2014; 5:12472–12508.
 12. Sheikh NA, Petrylak D, Kantoff PW, Dela Rosa C, Stewart FP, Kuan LY, Whitmore JB, Trager JB, Poehlein CH, Frohlich MW, Urdal DL. Sipuleucel-T immune parameters correlate with survival: an analysis of the randomized phase 3 clinical trials in men with castration-resistant prostate cancer. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII. 2013; 62:137–147.
 13. Lesterhuis WJ, Haanen JB, Punt CJ. Cancer immunotherapy—revisited. *Nature reviews Drug discovery*. 2011; 10:591–600.
 14. Butterfield LH. Dendritic Cells in Cancer Immunotherapy Clinical Trials: Are We Making Progress? *Frontiers in immunology*. 2013; 4:454.
 15. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature reviews Cancer*. 2006; 6:24–37.
 16. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004; 21:137–148.
 17. Galluzzi L, Senovilla L, Zitvogel L, Kroemer G. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nature reviews Drug discovery*. 2012; 11:215–233.
 18. Hodge JW, Garnett CT, Farsaci B, Palena C, Tsang KY, Ferrone S, Gameiro SR. Chemotherapy-induced immunogenic modulation of tumor cells enhances killing by cytotoxic T lymphocytes and is distinct from immunogenic cell death. *International journal of cancer*. 2013; 133:624–636.
 19. Carson WE 3rd, Shapiro CL, Crespin TR, Thornton LM, Andersen BL. Cellular immunity in breast cancer patients completing taxane treatment. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004; 10:3401–3409.
 20. Kodumudi KN, Woan K, Gilvary DL, Sahakian E, Wei S, Djeu JY. A novel chemoimmunomodulating property of docetaxel: suppression of myeloid-derived suppressor cells in tumor bearers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010; 16:4583–4594.
 21. Aragon-Ching JB, Williams KM, Gulley JL. Impact of androgen-deprivation therapy on the immune system: implications for combination therapy of prostate cancer. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2007; 12:4957–4971.
 22. Lutsiak ME, Semnani RT, De Pascalis R, Kashmiri SV, Schlom J, Sabzevari H. Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood*. 2005; 105:2862–2868.
 23. Hermans IF, Chong TW, Palmowski MJ, Harris AL, Cerundolo V. Synergistic effect of metronomic dosing of cyclophosphamide combined with specific antitumor immunotherapy in a murine melanoma model. *Cancer research*. 2003; 63:8408–8413.
 24. Schiavoni G, Mattei F, Di Pucchio T, Santini SM, Bracci L, Belardelli F, Proietti E. Cyclophosphamide induces type I interferon and augments the number of CD44(hi) T lymphocytes in mice: implications for strategies of chemoimmunotherapy of cancer. *Blood*. 2000; 95:2024–2030.
 25. Rozkova D, Tiserova H, Fucikova J, Last'ovicka J, Podrazil M, Ulcova H, Budinsky V, Prausova J, Linke Z, Minarik I, Sediva A, Spisek R, Bartunkova J. FOCUS on FOCIS: combined chemo-immunotherapy for the treatment of hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Clinical immunology*. 2009; 131:1–10.
 26. Fucikova J, Rozkova D, Ulcova H, Budinsky V, Sochorova K, Pokorna K, Bartunkova J, Spisek R. Poly I: C-activated dendritic cells that were generated in CellGro for use in cancer immunotherapy trials. *Journal of translational medicine*. 2011; 9:223.
 27. Fucikova J, Moserova I, Truxova I, Hermanova I, Vancurova I, Partlova S, Fialova A, Sojka L, Cartron PF, Houska M, Rob L, Bartunkova J, Spisek R. High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells. *International journal of cancer*. 2014; 135:1165–1177.
 28. Fialova A, Partlova S, Sojka L, Hromadkova H, Brtnicky T, Fucikova J, Kocian P, Rob L, Bartunkova J, Spisek R. Dynamics of T-cell infiltration during the course of ovarian cancer: the gradual shift from a Th17 effector cell response to a predominant infiltration by regulatory T-cells. *International journal of cancer*. 2013; 132:1070–1079.

29. Halabi S, Small EJ, Kantoff PW, Kattan MW, Kaplan EB, Dawson NA, Levine EG, Blumenstein BA, Vogelzang NJ. 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*. 2003; 21:1232–1237.
30. Smaletz O, Scher HI, Small EJ, Verbel DA, McMillan A, Regan K, Kelly WK, Kattan MW. Nomogram for overall survival of patients with progressive metastatic prostate cancer after castration. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002; 20:3972–3982.
31. Drake CG. Prostate cancer as a model for tumour immunotherapy. *Nature reviews Immunology*. 2010; 10:580–593.
32. Vacchelli E, Vitale I, Eggermont A, Fridman WH, Fucikova J, Cremer I, Galon J, Tartour E, Zitvogel L, Kroemer G, Galluzzi L. Trial watch: Dendritic cell-based interventions for cancer therapy. *Oncoimmunology*. 2013; 2:e25771.
33. Thomas-Kaskel AK, Waller CF, Schultze-Seemann W, Veelken H. Immunotherapy with dendritic cells for prostate cancer. *International journal of cancer*. 2007; 121:467–473.
34. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, Smyth MJ, Schreiber RD. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*. 2007; 450:903–907.
35. Spisek R. Immunoprevention of cancer: time to reconsider timing of vaccination against cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2006; 6:1689–1691.
36. Spisek R, Dhodapkar MV. Immunoprevention of cancer. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2006; 20:735–750.
37. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annual review of immunology*. 2013; 31:51–72.
38. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, Metivier D, Larochette N, van Endert P, Ciccocanti F, Piacentini M, Zitvogel L, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nature medicine*. 2007; 13:54–61.
39. Fucikova J, Kralikova P, Fialova A, Brtnicky T, Rob L, Bartunkova J, Spisek R. Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response. *Cancer research*. 2011; 71:4821–4833.
40. Spisek R, Charalambous A, Mazumder A, Vesole DH, Jagannath S, Dhodapkar MV. Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications. *Blood*. 2007; 109:4839–4845.
41. Walsh PC, DeWeese TL, Eisenberger MA. Clinical practice. Localized prostate cancer. *The New England journal of medicine*. 2007; 357:2696–2705.
42. Weber J. Ipilimumab: controversies in its development, utility and autoimmune adverse events. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*. 2009; 58:823–830.
43. Nouri-Shirazi M, Banchereau J, Fay J, Palucka K. Dendritic cell based tumor vaccines. *Immunol Lett*. 2000; 74:5–10.
44. Vergati M, Cereda V, Madan RA, Gulley JL, Huen NY, Rogers CJ, Hance KW, Arlen PM, Schlom J, Tsang KY. Analysis of circulating regulatory T cells in patients with metastatic prostate cancer pre- versus post-vaccination. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*. 2011; 60:197–206.
45. Schweizer MT, Drake CG. Immunotherapy for prostate cancer: recent developments and future challenges. *Cancer metastasis reviews*. 2014; 33:641–655.

Phase I/II trial of dendritic-cell based active cellular immunotherapy with DCVAC/PCa in patients with rising PSA after primary prostatectomy or salvage radiotherapy for prostate cancer

Fucikova J.^{1,2*}, **Podrazil M.**^{1*}, Jarolím L.³, Bilkova P.², Hensler M.², Becht, E.⁵, Gasova Z.⁴, Kayserova J.¹, Horvath R.¹, Fialova A.², Vavrova K.¹, Spisek R.^{1,2} a Bartunkova J.^{1,2}

Affiliations:

1. Department of Immunology, Charles University, 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic
2. Sotio, Prague, Czech Republic
3. Department of Urology, Charles University, 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic
4. Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic
5. Laboratory 'Cancer, Immune Control and Escape', INSERM U1138, Cordeliers Research Centre, Paris, France; University Pierre and Marie Curie, UMRS 1138, Paris, France; University Paris Descartes, UMRS 1138, Paris, France.

Corresponding author: J. Bartůňková

Jirina.bartunkova@lfmotol.cuni.cz

Running title: Immunotherapy with dendritic cells in patients with biochemical recurrence of prostate cancer

Key words: immunotherapy, dendritic cell, biochemically recurrent prostate cancer

Abstract

Objective: Immunotherapy of cancer has the potential to be efficient mostly in patients with low tumor burden. Rising PSA (prostate specific antigen) in patients with prostate cancer after radical prostatectomy (RP) or salvage radiotherapy (SRT) represents such a situation. We conducted a clinical study with dendritic cell based vaccine immunotherapy in this patient population.

Material and methods: A single arm phase I/II trial registered as EudraCT 2009-017259-91 involved 27 patients with rising PSA after RP or SRT. Study medication containing 1×10^7 autologous dendritic cells pulsed with killed prostate-cancer cell line LNCap (DCVAC/PCa, manufactured from a leukapheretic product) was administered s.c. at monthly intervals. The first cycle contained at least 12 doses. Twelve of the patients with the best PSA-reponse continued with a second cycle of immunotherapy after a 2nd leukapheresis.

The primary objective of the study was to assess safety. Secondary objectives were PSA kinetics measured as PSA doubling time (PSADT) and detection of tumor specific T cells in the peripheral blood.

Results: Twenty five patients were evaluable after the first DCVAC/PCa cycle and 12 patients after the second cycle. No significant side effects were recorded. The median PSADT in all treated patients increased from 5,67 months prior to immunotherapy to 18,85 months after 12 doses ($p < 0.0018$). Twelve patients who continued the immunotherapy with the 2nd cycle had median PSADT of 58 month which remained stable after the second cycle. In the peripheral blood, specific PSA- reacting T lymphocytes increased significantly already after the 4th dosis and sustained frequency was detected after the 1st and 2nd cycle, respectively.

Summary: Long-term immunotherapy of prostate cancer patients experiencing early sign of PSA recurrence using dendritic cells pulsed by killed LNCAP cell line was safe, induced immune response and led to significant extension of PSADT. Further long-term follow-up

may show whether the changes in PSADT could affect the clinical course in patients with biochemically recurrent prostate cancer.

Introduction:

Prostate cancer (PCa) is the second most common cause of cancer and the fifth leading cause of cancer death among men worldwide with an estimated 1.1 million new cases and 307 000 new deaths in 2012 (1). The worldwide PCa burden is expected to grow to 1.7 million new cases and 499 000 new deaths by 2030 simply due to the growth and aging of the global population (2-4) Prostate cancer can be cured at the stage of localized organ-confined disease (5, 6). Up to 40% of patients experience an isolated rise of PSA within 10 years after primary therapy, a so-called biochemical relapse (BCR) (7). Due to improved diagnosis, especially based on PSA (prostate specific antigen) screening, the patient population with PSA-recurrent prostate cancer will grow in the near future and will concern younger men. For patients after radical prostatectomy (RP) with PSA recurrent prostate cancer, salvage radiotherapy (SRT) is a treatment option. If SRT is administered at early sign of disease progression preferably before PSA reaches the level of 0,5 ng/ml it may lead to the long-term control of the disease in patients with presumably local recurrence (8). However, acute as well as chronic side effects connected with the pelvis irradiation including possible long-term sequelae represents the limits of this treatment modality, especially in young men with long life expectancy. For patients with rising PSA after SRT before evidence of metastatic disease, there is no efficient treatment and no consensus about optimal management which include watchfull waiting and androgen-deprivation therapies. It has been repeatedly proven that the kinetics of PSA doubling time (PSADT) determines the further fate of patients, shorter is the time to metastasis and cancer specific death (9). Any treatment which may stabilize PSA may have a potential impact on the progression of the disease. However, as this stage of the disease is asymptomatic, only treatment with minimal toxicity might be considered.

From an immunological perspective, biochemical recurrence provides a unique opportunity for immunological intervention in patients with cancer, as the many immunosuppressive mechanism (such as regulatory T cells, myeloid-derived suppressor cells, etc) associated with an advanced tumor burden are expected to be at a minimum at this stage (10, 11). Greater understanding of basic immunologic principles and interactions between the immune system and tumors led to the development of therapeutic cancer vaccines for PCa. Immune-based therapies are used prophylactically to boost and harness the immune system and to mount a beneficial antitumor response to prevent the development of a tumor or therapeutically to enhance antitumor targeting, leading to destruction of tumor cells (12). The recent U.S. Food and Drug Administration approval of 2 first-in-class proof-of-concept immunotherapies (sipuleucel-T and ipilimumab) has stimulated broader interest in manipulating immunity to fight cancer (13, 14).

Sipuleucel-T was approved as a therapy for patients with advanced castrate resistant metastatic prostate cancer based on a 4,5 months survival benefit over placebo (15, 16). Another therapy, ipilimumab, was approved for patients with metastatic melanoma and is now tested in patients with advanced metastatic prostate cancer (17). Due to serious side-effects of ipilimumab, its application at early stages of the disease may not be acceptable (18).

Among a wide array of immunotherapeutic strategies developed and successfully tested for prostate cancer, the vaccination with tumor antigen-loaded dendritic cells (DCs) has been one of the treatment modalities most extensively studied (19-23). A comprehensive review and meta-analysis of 29 clinical trials including 906 patients treated with dendritic cell based immunotherapy including sipuleucel-T for the prostate and renal cancer has been recently published (20). In this analysis, efficacy measured as a clinical benefit rate (CBR, counted as the combined percentages of objective responses - OR and stable diseases) has been achieved in 54% of patients with prostate cancer. On the basis of few side effects reported in these trials, DC-based immunotherapies are generally considered as a safe approach (12).

The objectives of the current study were to evaluate DCVAC/PCa using autologous, mature dendritic cells pulsed with killed LNCaP prostate cancer cells in patients with biochemical recurrence of prostate cancer who were eligible for the treatment (EudraCT 2009-017259-91). DCVAC/PCa is an autologous active cellular immunotherapy (ACI) which is classified according EC No 1394/2007 as an advanced-therapies medicinal product (ATMP).

The primary endpoint of the study was safety, secondary endpoints included monitoring of immune response and PSA kinetics. Furthermore, based on theoretical assumptions, we have also examined in a suitable cohort of patients the effect of long term immunotherapy application. We hypothesized that the repeated administration of DCVAC/PCa at an early stage of the disease may induce an immune response which may control the proliferation of residual PCa cells reflected as a stabilization of PSA kinetics.

Materials and methods

Patient eligibility

Eligibility required histologically confirmed prostatic adenocarcinoma. Patients after RP and rising of PSA serum concentration measured by an ultrasensitive test above the nadir within 2 years from RP or patients after SRT for PSA-recurrent prostate cancer who experienced at least two subsequent increases of serum PSA above the nadir after SRT has been enrolled in the clinical trial. Other eligibility requirements were a Karnofsky performance status >80%, absence of hormonal therapy, normal bone marrow, liver and renal function as defined by a WBC > $4 \times 10^9/L$; platelets > $100 \times 10^9/L$; Hct > 30%. Creatinine up to 1.5 fold of the upper limit of normal, bilirubin, AST and ALT up to double value of upper limit of normal. Exclusion criteria included a history of primary immunodeficiency, a severe allergic or anaphylactic reaction following vaccination, the presence of pulmonary, cardiac, or other systemic diseases limiting patient survival, or other inappropriate conditions for enrollment as judged by the clinicians. All patients were also required to have at least 3 serum PSA values

collected over at least 3 month period prior to study entry, all obtained from the same clinical laboratory and measured by an ultrasensitive test, to determine a pretreatment PSADT.

Study design and treatment

This report includes summary data from 27 patients treated with DCVAC/PCa in a single-institution, single-arm, open-label phase I/II clinical trial (EudraCT 2009-017259-91). The treatment schedule is summarized in Fig. 1. Briefly, Active Cellular Immunotherapy (ACI, dendritic cell based vaccine DCVAC/PCa) consisted of, on average, twelve doses of 1×10^7 dendritic cells injected s.c. at axillary and inguinal area (2.5 ml at each site). The initial dose of DCVAC/PCa was applied at 4 weeks after the leukapheresis, then after 2 weeks and then injected every 4-6 weeks up to the maximum number of doses manufactured from one leukapheresis. One leukapheresis yields sufficient amount of DCVAC/PCa for approximately one year of treatment. By a protocol amendment, a second or third leukapheresis was performed and a second/third cycle of DCVAC/PCa was administered to those patients in whom PSADT increased during the 1st cycle immunotherapy and who were not indicated for other treatment. In the first cycle of immunotherapy, immune monitoring was performed before the 1st dose of DCVAC/PCa and after the 4th and 12th doses or after last dose before other treatment was introduced during the immunotherapy. During the additional cycles of the treatment, immune monitoring was performed before the 1st dose and after the last dose of administered DCVAC/PCa.

Before the 1st DCVAC/PCa dose was administered, the immune system of the patients were modulated by cyclophosphamide treatment (50 mg daily for 1 week) (24). To increase the motility of the injected cells and to support the accumulation of local dendritic cells *in vivo*, imiquimod (Aldara® cream) was applied locally 24 hours before and after each ACI administration. The primary endpoint was the safety of DCVAC/PCa active cellular immunotherapy in patients with BR of prostate cancer; the secondary endpoints included the immune response and PSA kinetics. The study protocol was approved by the Institutional

Review Board (IRB) and the State Institute for Drug Control (SUKL), Czech republic. Written informed consent was obtained from all patients before any study procedures were conducted.

Assesment of clinical activity and toxicity

The patients were monitored at each visit by obtaining patient history and physical examination. The Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDRA, Version 15.1) was used for the coding of adverse events (AEs). All patients underwent a relevant radiologic examination, CT, PET/CT, NMR of the abdomen and pelvis, chest radiography, bone scintigraphy and laboratory tests. Serum PSA was evaluated before each vaccination by an ultrasensitive method using a chemiluminiscence analyser Immulite 1000 (Siemens) in the certified clinical hospital laboratory. PSADT was calculated using all serum PSA values available from the pre-treatment period using a minimum of four PSA values by the formula $\ln(2)/b$, where b denotes the least square estimator of the linear regression model of the log-transformed PSA values on time. If PSADT was negative (which means that the curve was declining), an arbitral value of 150 months was used for further statistical evaluation. For the pretreatment PSADT, all data available from the nadir were used, or at least values from the period 6 months prior to treatment, up to and including day 1 of treatment. The treatment PSADT was determined using all PSA values from the first application of DCVAC/PCa to the 12 dosis or to the last dosis before introduction of another treatment (hormonal therapy or radiotherapy if indicated), if at least 5 doses of DCVAC were administered. According to the PSA kinetics, we classified patients as strong responders (their PSADT was longer then 15 months on immunotherapy), responders (whom PSADT increased in the comparison with pre-treatment period but was shorter then 15 months) and non-responders (PSADT on therapy did not differ from the pretreatment period or decreased). For statistical correlations of PSA kinetics to laboratory markers, we classified patients into responders (strong responders and responders) and non-responders.

DCVAC/PCa production

Generation of DCs under GMP conditions

Leukapheresis was performed using a Cobe Spectra separator (Cobe BCT, Lakewood, CO, USA). All of the following operations were performed under Good Manufacturing Practice (GMP) conditions in the GMP facility of University Hospital Motol using the protocol for DC generation that was approved by the State Institute for Drug Control, as previously described (25, 26). The leukapheretic product was diluted in PBS+1 mM EDTA (Lonza, Verviers, Belgium), and mononuclear cells were separated out by Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) gradient centrifugation. Collected mononuclear cells (PBMC) were washed in PBS+1 mM EDTA (Lonza), resuspended in CellGro medium (CellGenix, Freiburg, Germany) and plated in triple flasks (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) at 1×10^6 cells per cm^2 of surface area. After 2 h, non-adherent cells were washed with PBS (Lonza). Adherent monocytes were cultured for 6 days in CellGro (CellGenix) medium with 20 ng/ml of IL-4 (Gentaur, Kampenhout, Belgium) and 500 U/ml of GM-CSF (Gentaur); fresh cytokines were added on day 3. Immature DCs were harvested on day 6, washed in PBS (Lonza) and resuspended in CellGro (CellGenix) and were prepared to be pulsed with the prostate cancer cell line LNCaP.

Loading of immature DCs with killed prostate cancer cells and maturation of DCs

The PSA-positive prostate cancer cell line LNCaP was obtained from the American Type Culture Collection and grown in UltraCULTURE (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with GlutaMax (Life Technologies, Carlsbad, CA) under GMP conditions. LNCaP cells were detached with 0.05% Trypsin-EDTA (Lonza), washed and killed by UV irradiation (312 nm for 10 min). Harvested immature DCs (day 6) were fed with killed tumor cells at a DC:tumor cell ratio of 5:1 for 4 h. Tumor cell-pulsed DCs were then matured with 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Poly I:C

(InvivoGen) overnight. Mature DCs were harvested, cryopreserved in Cryostor CS10 (BioLife Solutions, Bothell, WA, USA) and stored in liquid nitrogen.

Measurement of humoral and T cell response

Basic immunological and laboratory tests

Serum levels of immunoglobulin G, A, and M and C-reactive protein (in g/L) were assessed by automated nephelometry using an Immage 800 Immunochemistry System (Beckman Coulter). Serum autoantibodies, ANCA, RF and anti-cardiolipin were detected using the ANA test (BioRad, Philadelphia, PA), ANCA test (Inova Diagnostics, San Diego, CA), and ACA test (Orgentec Diagnostic, Mainz, Germany), respectively. Lymphocyte subsets were enumerated by flow cytometry using a FACS CANTO II (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ) and were subsequently analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA). Monoclonal antibodies against CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 and HLA-DR were purchased from BD Biosciences.

Detection of T regulatory cells

T Regulatory cells (Tregs) were identified by surface staining with anti-CD3 Alexa700 (Exbio, Vestec, Czech Republic), CD4 PC7 (eBioscience, San Diego, CA), CD8 PE-Dy590 (Exbio), CD25 PerCPCy5.5 and CD127 Alexa647 (BioLegend, San Diego, CA) antibodies, followed by fixation and permeabilization with a FoxP3 staining buffer set (eBioscience) and intracellular staining with anti-FoxP3 FITC (eBioscience), as described previously (27). All samples were processed and analyzed immediately after blood sampling. One million PBMCs from each sample were acquired using FACS AriaTM (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) and were subsequently analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

Detection of antigen-specific T cells against PSA, MAGE-A1 and MAGE-A3

For each patient, the frequency of antigen-specific T cells against tumor antigens (PSA, MAGE-A1, MAGE-A3) was measured by flow cytometric analysis at different time points. Briefly, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were incubated for 10 days in RPMI 1640 medium (Life Technologies) supplemented with 10% heat-inactivated pooled human AB serum, 100 U/ml penicillin, 2 mmol/l L-glutamine, non-essential amino acid mix and sodium pyruvate (all from Life Technologies), as well as with mixtures of overlapping peptides (PepMix; JPT Peptide Technologies, Berlin, Germany) that spanned the whole sequence of prostate specific antigen (PSA), melanoma-associated antigen 1 (MAGE-A1) and melanoma associated antigen 3 (MAGE-A3), each at a concentration of 1 µg/ml. On days 4 and 7, IL-2 was added (20 UI/ml; Gentaur, Kampenhout, Belgium). On day 9, PBMCs were restimulated and incubated for 12 hours with each peptide mixture mentioned above, and brefeldin (BioLegend, San Diego, CA, USA) was added after 4 hours of incubation. The cells were first stained with antibodies against CD3-PC5, CD4-PC7 (eBioscience), and CD8-PE-Dy590 (Exbio). Then, the Aqua Blue Live/Dead cell viability assay (Life Technologies) was used to measure the population of dead cells. Thereafter, the cells were fixed with Fixation/Permeabilization buffer (BD Bioscience) and permeabilized with Permeabilization buffer (BD Bioscience). Intracellular IFN- γ staining was performed with a FITC-conjugated antibody (BD Bioscience), and IL-2 staining was performed with an APC-conjugated antibody (BD Bioscience), according to the manufacturer's instructions. The staining was immediately measured using a BD LSR II flow cytometer (BD Biosciences). Flow cytometric data analysis was performed using FlowJo software (Tree Star) after the exclusion of Live/Dead-positive cells. IFN- γ secretion was only considered to be antigen specific if the frequency of IFN- γ -positive T cells that responded to peptide-pulsed PBMCs was at least 2 times greater than the frequency of IFN- γ secretion in response to the negative control (unpulsed PBMCs).

Detection of tumor antigen-specific antibodies against PSA and MAGE-A3

The recombinant proteins PSA and MAGE-3 (Abnova, Taipei, Taiwan) were diluted in Carbonate Coating Buffer (Life Technologies) to a final concentration of 1 µg/ml and were adhered to 96-well plates overnight at 4°C. The plates were blocked for 1 hour with Assay Buffer (Life Technologies), and then human sera diluted to 1:50, 1:100 and 1:200 were incubated in the antigen-coated wells for 2 h. The plates were then incubated with secondary antibody (goat polyclonal antibody to human IgG; Abcam, Cambridge, UK) for 1 hour. TMB substrate (Life Technologies) was then added and incubated for 20 minutes. The reaction was stopped by adding Stop Solution (Invitrogen, Prague, Czech Republic), and the plates were immediately read at an absorbance of 450 nm. As a positive control, cytomegalovirus glycoprotein B was used. The cutoff value designating a positive reaction was assessed as the mean OD of 15 healthy control human sera (NHS) + 3SD.

RNA extraction and reverse transcription

Total RNA from frozen PBMC was extracted with the RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions, and RNA quantity and quality were determined with 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Samples with a RNA integrity number 7 were reverse transcribed into cDNA using the High Capacity cDNA Kit (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions.

Quantitative PCR

Complementary DNA samples were amplified using the Low Density Array System according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems). The arrays (Human Immune Array; TaqMan) were processed on a TaqMan 2900HD (Life Technologies). Four nanograms of cDNA per qRT-PCR was used. Expression levels of genes were determined

using threshold cycle (Ct) values normalized to b-actin expression as an endogenous control (DCt).

Statistical analysis

Group comparisons were performed using the GraphPad Prism software (GraphPad software, La Jolla, CA). The effect of the treatment on immune parameters was assessed using the Wilcoxon signed-rank test. Scatterplots feature least square linear regressions lines.

Results

Characteristics of the patients

Between March 2010 and March 2014, twenty-seven patients were treated with DCVAC/PCa. The median age at the start of immunotherapy was 63 (age range 49-77 years). The median entry level of initial prostate specific antigen (iPSA) at diagnosis was 7,3 (2,9-19,6 ng/ml), median PSA at the beginning of immunotherapy was 0,153 ng/ml (range 0, 028 - 0,812 ng/ml), the median of lactate dehydrogenase (LDH) was 188,4 IU/L (range 141-340 IU/L), of alkaline phosphatase (ALP) was 66 IU/L (range 41-107 IU/L) and of hemoglobin (Hgb) was 15,5 g/dL (range 13,8-17,4 g/dL). The patients' baseline characteristics are shown in Tab. 1. Twenty six patients received at least 12 DCVAC doses. Two patients were excluded from the statistical analysis of PSA kinetics. Patient No. 203 underwent salvage radiotherapy as residue in prostate bed was detected on control CT performed at the beginning of the study, so he received only 3 dosis of DCVAC/PCa before SRT and patient No. 227 who did not fulfill the entry criteria of increase of PSA above nadir within 2 years after surgery was classified as protocol violation. These patients however consented to complete the immunotherapy protocol so that they all are included in AE reports.

Adverse events

The overall toxicities are summarized in Tab. 2. During the administration of cumulative 510 doses, the most frequent adverse events (AEs) were: 15x fatigue, 12x mild infections, 8x bone and muscle pain, 6x injection site reactions (induration, erythema, pain), 4x gastrointestinal disorders, 3x urticaria, 3x renal and urinary disorders, 1x headache, 1x thrombophlebitis (number of events). All AEs were grade 1 or 2 and there were no grade 4 toxicities or treatment-related deaths. None of the 8 reported cumulative serious adverse events (SAEs) were related to the immunotherapy and none of these SAEs were assessed as suspected unexpected serious adverse reaction (SUSAR) or serious adverse drug reaction (ADR). Possible induction of autoimmunity is considered in the context of immunotherapy. No clinical sign of autoimmune disease occurred during the clinical trial. One patient had high titers of rheumatoid factor IgG, IgA and IgM before and during the immunotherapy without clinical signs of arthritis (anti-CCP was negative). All other autoantibodies detected in a few patients before or during the trial were in low titer. In summary, DCVAC/PCa therapy was well tolerated and the overall safety profile remained favorable.

Clinical efficacy

PSA kinetics expressed as PSADT was calculated for 25 patients who received at least 5 doses of DCVAC without other treatment modalities. Figure 2A and B displays graphs of the PSADT in these patients. Median PSADT increased from 5,67 months prior to the treatment to 18,85 months after completing of the 1st cycle of immunotherapy by DCVAC/PCa. There were 17 strong responders (PSADT was longer than 15 months on immunotherapy, 5 responders (PSADT increased in the comparison with pre-treatment period but was shorter than 15 months) and 3 non-responders (PSADT on therapy did not differ from the pretreatment period or decreased). Twelve of 25 patients, who had stable PSA levels during the treatment duration (median PSADT 39,79 months after the 1st cycle of immunotherapy), agreed with an additional cycle and their PSADT remained stable during the additional cycle

of the treatment (Fig. 2C). None of the patients received any other form of treatment (median PSADT of 58,03 months). Three patients underwent a 3rd cycle of immunotherapy with a median PSADT of 32,13 months after completion. No patient died during the study and follow-up and none developed detectable metastasis with the exception of patient 202 (GS=9) who had PSADT about 3 months before and on study. Pelvic nodes metastases were detected on 18 F-choline-PET-CT (after administered 10 doses of DCVAC/PCa).

Immunological response

To evaluate the effect of DCVAC/PCa on the immune system, PBMCs were isolated pre and post vaccination and subsequently analyzed for T cell subsets by multicolored flow cytometry. We observed significant changes in the peripheral CD3⁺ T cells during the course of the trial, (*p>0.05) (Fig. S2A). Conversely, the percentage of activated CD3⁺/HLA-DR⁺ cells as well as CD4⁺ and CD8⁺ were not significantly changed (Fig. S2B, C, D). Additionally, we haven't observed any significant decrease in frequencies of regulatory T cells in the peripheral blood (Fig. S2G). Furthermore, after the course of treatment, the levels of IgG and IgM were not significantly changed (Fig. S2E, F). No trend in the occurrence of autoantibodies was observed (data not shown). In 9 patients with stable PSA levels during the treatment duration and who opted for an additional cycle of DCVAC/PCa treatment we have observed stable frequencies of monitored immune parameters in peripheral blood CD3⁺, CD3⁺HLA-DR⁺, CD4⁺, CD8⁺ (Fig. S3A, B, C, D) and stable levels of IgG and IgM (Fig. S3 E and F). Only the frequencies of regulatory T cells in the peripheral blood has been significantly decreased after the second cycle of DCVAC/PCa treatment (*p>0.05) (Fig. S3G).

In all vaccinated patients, we assessed the antigen-specific T cell and humoral response against prostate-specific tumor antigens. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of the patients was stimulated by peptide mixes (PSA, MAGE-A1 and MAGE-A3), and the frequency of IFN- γ -producing antigen-specific T cells was determined by intracellular

staining and analyzed by flow cytometry. Twelve out of 27 patients had significantly higher numbers of antigen-specific T cells against PSA before treatment compared with healthy controls (Fig. S4A). Similar results were obtained for MAGE-A1 and MAGE-A3 antigen-specific T cells, for which 6 out of 27 had significantly increased numbers of antigen-specific T cells compared with the healthy controls (Fig. S4B, C). Long-term administration of DCVAC/PCa induced a statistically significant increase in the antigen-specific T cells against PSA in both tested time points (DCVAC-4 and DCVAC-12) (*p<0.05) (Fig. 3A) and against MAGE-A1 only in first tested time point (DCVAC-4), conversely after the course of treatment (DCVAC-12) we haven't observed significant increase in the antigen specific frequencies. However, we did not observe significant changes in the frequency of antigen-specific T cells against MAGE-A3 antigen during the course of the trial (Fig. 3B, C).

We also evaluated the induction of tumor-reactive IgG antibodies by DCVAC/PCa vaccination. The presence of IgG antibodies against PSA and MAGE-3 was analyzed in patient sera. We detected IgG-positive antibodies against PSA in 9 out of 27 (33%) patients (Fig. 3D) and against MAGE-A3 in 9 out of 27 (33%) patients (Fig. 3E). There was no obvious correlation between IgG and the CTL response against either PSA or MAGE-A3 (Fig. S5A, B). In comparing the immune response with the clinical status, we did not observe any significant correlations of PSADT with specific humoral IgG responses or cellular CTL responses (data not shown).

Because the T cell populations may play an important role in patients response to DCVAC/PCa, we next evaluated the peripheral blood mononuclear cells with a focus on T lymphocytes. Gene expression levels related to the main immune populations, Th1, CD8 T cell cytotoxicity, T-cell activation, immunosuppression, inflammation and angiogenesis were assessed in peripheral blood of 18 patients (4 patients classified as non-responders and 14 classified as responders) (Fig. 4). Only genes related to CD8/NK cytotoxicity (Fas, Fas-L, granzyme, granulysin, PRF1) were significantly overexpressed among patients classified as responders compared to non-responders before the DCVAC/PCa vaccination (Fig. 4A). We

haven't observed similar significance after the DCVAC/PCa treatment (Fig. 4B). In contrast, genes involved in Th1, immunosuppression, inflammation, angiogenesis, T cell activation were not differentially expressed between these two groups of patients either before or after DCVAC/PCa treatment. Altogether, these results demonstrate that up-regulation of genes associated with immune cell-cytotoxicity in peripheral blood before initiation of treatment might indicate patients with a subsequent favorable PSA kinetic.

Discussion:

Patients with early stage biochemical recurrence as determined by rising PSA measured by an ultrasensitive test represent a population with minimal residual tumor disease which might be an ideal situation for immunotherapy (11, 28). Low concentration of PSA such as 0,0035 ng/ml, however, still might represent an amount of 10^{5-6} tumor cells (29-31). In this phase I/II trial we tested DC-based immunotherapy in such a patients population. Administration of DCVAC/PCa was safe. Prolongation of PSADT was recorded in 22 out of 25 evaluable patients after 1 year of treatment. In twelve patients who underwent a second cycle of immunotherapy, the median PSADT remained stable. While median pre-treatment PSA doubling time was about 5,67 months, it more than tripled after approximately one year of immunotherapy to a median of 18,85 months. In comparison, in a recent study published by DiPaola in a similar patient population, PSADT has been reported to increase from 5,3 to 7,7 months after 6 months of immunotherapy by PROSTVAC, a viral -vector based PSA vaccine (32). In 16 our patients PSADT exceeds 15 months after the first cycle of immunotherapy and in four of them the PSA curve was even declining. The prognosis of patients with biochemical recurrence of prostate cancer is related to the PSADT as has been confirmed by several studies (9). If PSADT is less than 3 months, the median metastasis free survival can be as short as 2 years while if PSADT longer than 15 months, patients can live without metastasis more than 10 years. As reported by Freedland, if PSADT after biochemical recurrence exceeds 15 months, the probability for men to die from prostate cancer is

negligible (9). Although the benefit modulating the rate of PSA rise determined by ultrasensitive PSA test has not been validated as an end point that will ultimately lead to improvement in metastasis-free or overall survival, it suggests possible biologic activity of the DCVAC which is further supported by the increase of PSA-specific T cells in the peripheral blood. However, the limitation of this study is that it was a single arm study, so the possibility remains that alteration of PSADT occurred by chance in the absence of treatment effect. It is not likely that DCVAC altered PSA secretion or elimination as we did not find any correlation with anti-PSA antibodies and PSADT. The single-arm character of this study also limits the interpretation of our finding that patients classified as responders have up-regulated genes associated with T/NK cell cytotoxicity in the peripheral blood before the start of the immunotherapy. If validated in ongoing trial phase II with control group, this relatively simple test could identify patients who are likely to respond to the immunotherapy. However, no conclusion can be drawn in the reported single arm study as it might also mean that patients with up-regulated cytotoxic markers are likely to control spontaneously their tumor growth even in the absence of any immunotherapy. Despite these potential limitations, this study supports the feasibility of immunotherapy with DCVAC/PCa in patients with low-volume disease which is further justified by its safety profile.

A significant increase of antigen specific T cells against PSA already after the 4th dose support the immunomodulating effect of DCVAC. Sustained levels of PSA-reacting T cells were detected through out the study. Changes in other immune parameters evaluated were insignificant with the exception of a significant decrease in T regulatory cell frequency in patients with long-term (2nd cycle) immunotherapy. The lack of correlation between PSA serum kinetic and induction of tumor-specific immune response further highlights the urgent need of identification of other biomarkers predictive of clinical outcome in immune-based therapies.

Conclusion:

This study indicates that continuous cancer immunotherapy with DCVAC/PCa represents a promising treatment modality for patients with prostate cancer early signs of disease recurrence. This study supports the use of immunotherapy early in the course of the disease provided that relevant surrogate endpoints are shown to be predictive of improved prognosis of early stage disease. Further long-term follow-up may show whether the changes in PSADT could affect clinical courses in patients with biochemically recurrent prostate cancer.

Acknowledgment: *The project was supported by grant IGA NT 11559-5 of Ministry of Health, Czech Republic.*

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2014;64:9-29.
2. Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, Ward E, Ferlay J, Brawley O, et al. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *European urology*. 2012;61:1079-92.
3. Denmeade SR, Isaacs JT. A history of prostate cancer treatment. *Nature reviews Cancer*. 2002;2:389-96.
4. Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, Chan DW, Pearson JD, Walsh PC. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1999;281:1591-7.
5. Walsh PC, DeWeese TL, Eisenberger MA. Clinical practice. Localized prostate cancer. *The New England journal of medicine*. 2007;357:2696-705.
6. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1998;280:969-74.
7. Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Advances in immunology*. 2006;90:51-81.
8. Abdollah F, Schmitges J, Sun M, Jeldres C, Tian Z, Briganti A, et al. Comparison of mortality outcomes after radical prostatectomy versus radiotherapy in patients with localized prostate cancer: a population-based analysis. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*. 2012;19:836-44; author reply 44-5.
9. Freedland SJ, Humphreys EB, Mangold LA, Eisenberger M, Dorey FJ, Walsh PC, et al. Death in patients with recurrent prostate cancer after radical prostatectomy: prostate-specific antigen doubling time subgroups and their associated contributions to all-cause mortality. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25:1765-71.
10. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature reviews Immunology*. 2006;6:715-27.
11. Drake CG. Prostate cancer as a model for tumour immunotherapy. *Nature reviews Immunology*. 2010;10:580-93.
12. Galluzzi L, Vacchelli E, Bravo-San Pedro JM, Buque A, Senovilla L, Baracco EE, et al. Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget*. 2014;5:12472-508.
13. Drake CG. Update on prostate cancer vaccines. *Cancer journal*. 2011;17:294-9.
14. Frank MO, Kaufman J, Tian S, Suarez-Farinas M, Parveen S, Blachere NE, et al. Harnessing naturally occurring tumor immunity: a clinical vaccine trial in prostate cancer. *PloS one*. 2010;5.
15. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *The New England journal of medicine*. 2010;363:411-22.
16. Sheikh NA, Petrylak D, Kantoff PW, Dela Rosa C, Stewart FP, Kuan LY, et al. Sipuleucel-T immune parameters correlate with survival: an analysis of the randomized phase 3 clinical trials in men with castration-resistant prostate cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2013;62:137-47.
17. Weber J, Thompson JA, Hamid O, Minor D, Amin A, Ron I, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II study comparing the tolerability and efficacy of ipilimumab administered with or without prophylactic budesonide in patients with unresectable stage III or IV melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15:5591-8.
18. Weber J. Ipilimumab: controversies in its development, utility and autoimmune adverse events. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2009;58:823-30.

19. Vacchelli E, Vitale I, Eggermont A, Fridman WH, Fucikova J, Cremer I, et al. Trial watch: Dendritic cell-based interventions for cancer therapy. *Oncoimmunology*. 2013;2:e25771.
20. Draube A, Klein-Gonzalez N, Mattheus S, Brilliant C, Hellmich M, Engert A, et al. Dendritic cell based tumor vaccination in prostate and renal cell cancer: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*. 2011;6:e18801.
21. Geary SM, Salem AK. Prostate cancer vaccines: Update on clinical development. *Oncoimmunology*. 2013;2:e24523.
22. Lubaroff DM. Prostate cancer vaccines in clinical trials. *Expert review of vaccines*. 2012;11:857-68.
23. Butterfield LH. Dendritic Cells in Cancer Immunotherapy Clinical Trials: Are We Making Progress? *Frontiers in immunology*. 2013;4:454.
24. Hermans IF, Chong TW, Palmowski MJ, Harris AL, Cerundolo V. Synergistic effect of metronomic dosing of cyclophosphamide combined with specific antitumor immunotherapy in a murine melanoma model. *Cancer research*. 2003;63:8408-13.
25. Fucikova J, Rozkova D, Ulcova H, Budinsky V, Sochorova K, Pokorna K, et al. Poly I: C-activated dendritic cells that were generated in CellGro for use in cancer immunotherapy trials. *Journal of translational medicine*. 2011;9:223.
26. Rozkova D, Tiserova H, Fucikova J, Last'ovicka J, Podrazil M, Ulcova H, et al. FOCUS on FOCIS: combined chemo-immunotherapy for the treatment of hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Clinical immunology*. 2009;131:1-10.
27. Fialova A, Partlova S, Sojka L, Hromadkova H, Brtnicky T, Fucikova J, et al. Dynamics of T-cell infiltration during the course of ovarian cancer: the gradual shift from a Th17 effector cell response to a predominant infiltration by regulatory T-cells. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2013;132:1070-9.
28. Schweizer MT, Drake CG. Immunotherapy for prostate cancer: recent developments and future challenges. *Cancer metastasis reviews*. 2014;33:641-55.
29. Dimonte G. A cell kinetics model for prostate cancer and its application to clinical data and individual patients. *Journal of theoretical biology*. 2010;264:420-42.
30. Dimonte G, Bergstralh EJ, Bolander ME, Karnes RJ, Tindall DJ. Use of tumor dynamics to clarify the observed variability among biochemical recurrence nomograms for prostate cancer. *The Prostate*. 2012;72:280-90.
31. Anscher MS. Adjuvant radiotherapy following radical prostatectomy is more effective and less toxic than salvage radiotherapy for a rising prostate specific antigen. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2001;96:91-3.
32. DiPaola RS, Chen YH, Bubley GJ, Stein MN, Hahn NM, Carducci MA, et al. A National Multicenter Phase 2 Study of Prostate-specific Antigen (PSA) Pox Virus Vaccine with Sequential Androgen Ablation Therapy in Patients with PSA Progression: ECOG 9802. *European urology*. 2014.

Figure legends:

Figure 1. Study design. The DCVAC/PCa treatment consisted of on average twelve doses of 1×10^7 dendritic cells injected s.c. The treatment comprised an initial 7 days of metronomic cyclophosphamide administration. DCVAC/PCa was then given every 2-6 weeks up to the maximum number of doses manufactured from one leukapheresis. Immunomonitoring (IM) was evaluated after the first, fourth and twelve dose or after last dose DCVAC/PCa if less than 12 doses were manufactured from 1 leukapheresis. Clinical evaluation (CE) was performed after every single DCVAC/PCa dose.

Figure 2. PSADT pre- and post-DCVAC/PCa treatment and in subsequent cycles of treatment for biochemical relapse prostate cancer patients (n=25). The PSADT value for each patient pre- and post-treatment is plotted. PSADT was significantly prolonged, on average there was a 3.32-times increase of median PSADT after completion of the treatment. Median PSADT prior to immunotherapy was 5,67 months and increased to 18,85 months after completion of the first cycle of immunotherapy (A, B). PSADT remained stable during the second cycle of the treatment, median PSADT of 58,03 months (C).

Figure 3. Tumor antigen-specific response during DCVAC/PCa treatment in the peripheral blood. (A) The increase in the frequency of PSA-specific T cells in both tested time points (DCVAC-4 and DCVAC-12), $*p < 0.05$, as well as the maintenance of stable levels of T cells specific against MAGE-A1 (B) and MAGE-A3 (C), was detected. Concentrations of IgG antibodies against PSA (D) and MAGE-A3 (E) were measured in the patients' sera. The cutoff value (red line) designating a positive reaction was calculated as the mean OD of the 15 healthy control human sera + 3SD. (F) The increase in the frequency of PSA-specific T cells in subsequent DCVAC/PCa cycle, $*p < 0.05$, as well as the maintenance of stable levels of T cells specific against MAGE-A1 (G) and MAGE-A3 (H).

Figure 4. Gene expression levels related to Immune populations, Th-orientation, cytotoxicity, T-cell activation, Immunosuppression, inflammation, and angiogenesis according to the patients clinical status. Gene expression levels were assessed by qRT-PCR and determined using threshold cycle values normalized to the actin housekeeping gene in 18 patients (4 classified based on clinical data as non-responders, 14 classified as responders). The heat maps representation of clusters of genes related to immune populations, Th1 and Th2 orientation, cytotoxicity, T-cell activation, immunosuppression, inflammation, and angiogenesis before and after treatment with DCVAC/PCa is shown in A and B respectively. Genes are plotted from the minimal level of expression (green) to the maximal level (red). The statistical analysis was performed using unpaired T-test.

Supplemental figure 1. PSA levels before and in the course of DCVAC/PCa treatment

Supplemental figure 2. Immunological response in the peripheral blood during DCVAC/PCa treatment. (A) The proportion of CD3⁺ was significantly increased after the treatment in the 27 evaluated patients, *p<0.05. The proportions of CD3⁺HLA-DR⁺, CD4⁺ and CD8⁺ were stable during the course of treatment (B, C, D). Data are expressed as the proportion of CD3⁺ cells among CD45⁺ cells. The serum concentrations of IgG (E) and IgM (F) were stable during the course of treatment and the frequency of regulatory T cells (CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺) was stable after the treatment. Data are expressed as the proportion of CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Tregs among CD4⁺ T cells.

Supplemental figure 3. Immunological response in the peripheral blood in subsequent DCVAC/PCa cycle. The proportion of CD3⁺ (A), CD3⁺HLA-DR⁺ (B), CD4⁺ (C) and CD8⁺ (D) were stable during the course of subsequent DCVAC/PCa cycle. (E) The frequency of regulatory T cells (CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺) was significantly decreased after the subsequent

DCVAC/PCa cycle, *p<0.05. Data are expressed as the proportion of CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Tregs among CD4⁺ T cells.

Supplemental figure 4. Tumor antigen-specific T cell responses during DCVAC/PCa treatment in the peripheral blood versus those of healthy controls. The frequency of PSA (A), MAGE-A1 (B) and MAGE-A3 (C) specific T cells before and after the treatment compared with healthy controls.

Supplemental figure 5. Correlation graph for antigen-specific T cells against PSA (A) and MAGE-A3 (B) and antibody concentrations (OD) detected in the peripheral blood of 27 patients.

Table 1. Patients' baseline characteristics. Abbreviations: ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; PSA, prostate specific antigen; IT, immunotherapy; * values at the start of immunotherapy

Table 2. Cumulative summary tabulation of serious adverse events (SAEs) in the time period from March 2010 to March 2014. The Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDRA) version 15.1 was used for the coding of adverse events (AEs). The summary tabulations of SAEs are arranged by the primary System Organ Class (SOC) and Preferred Term (PT) level.

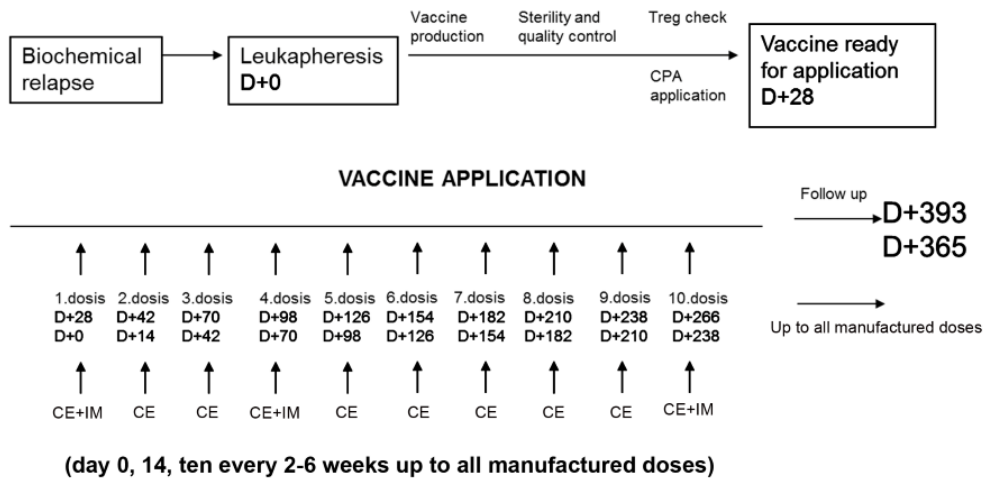
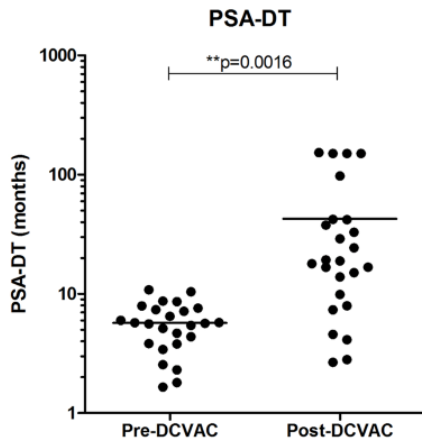
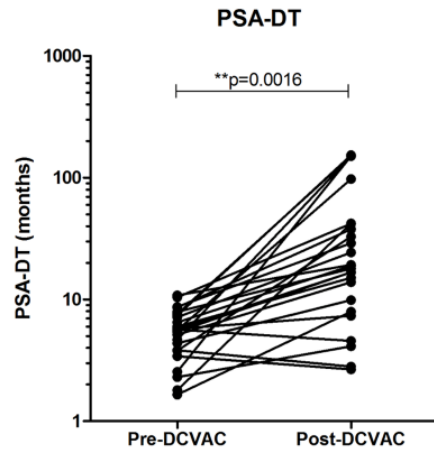


Figure 1

A



B



C

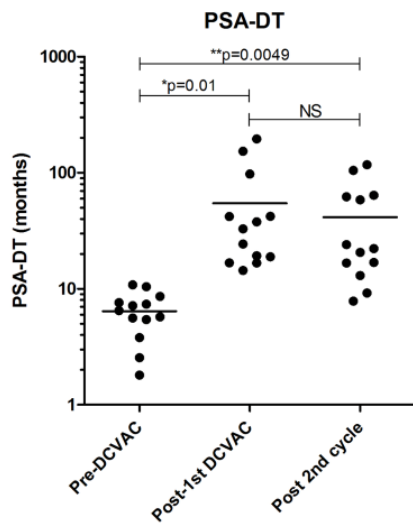


Figure 2

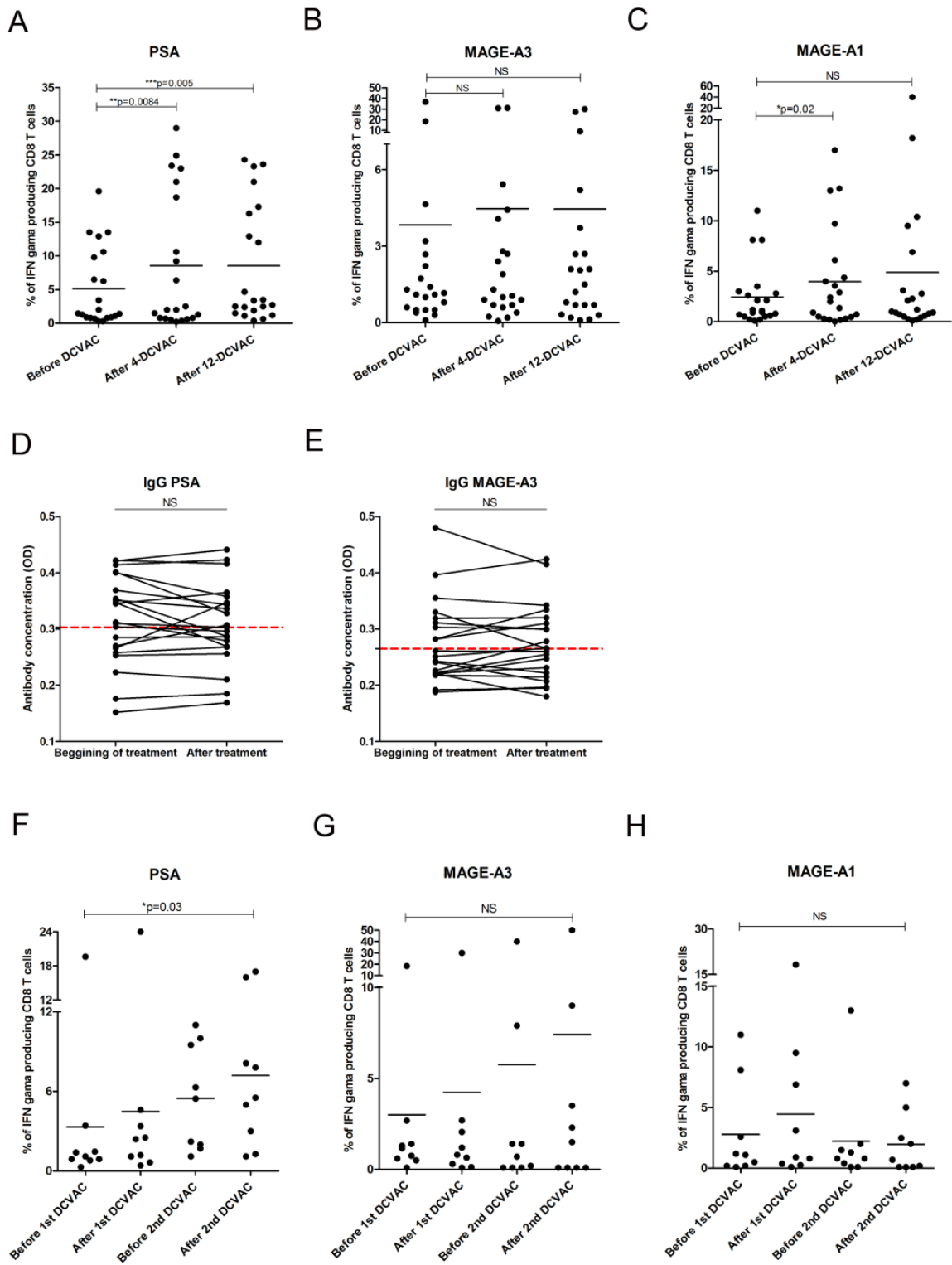
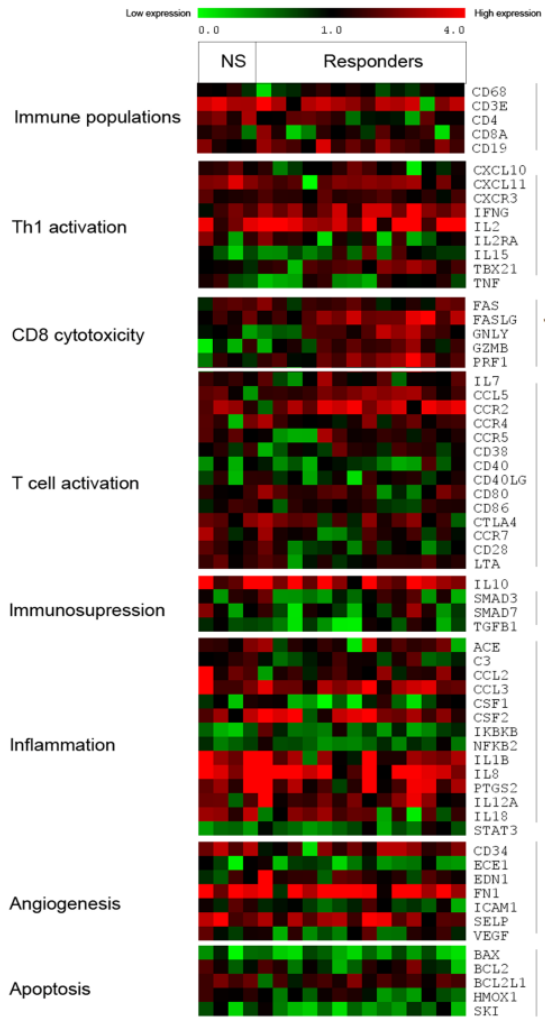


Figure 3

A



B

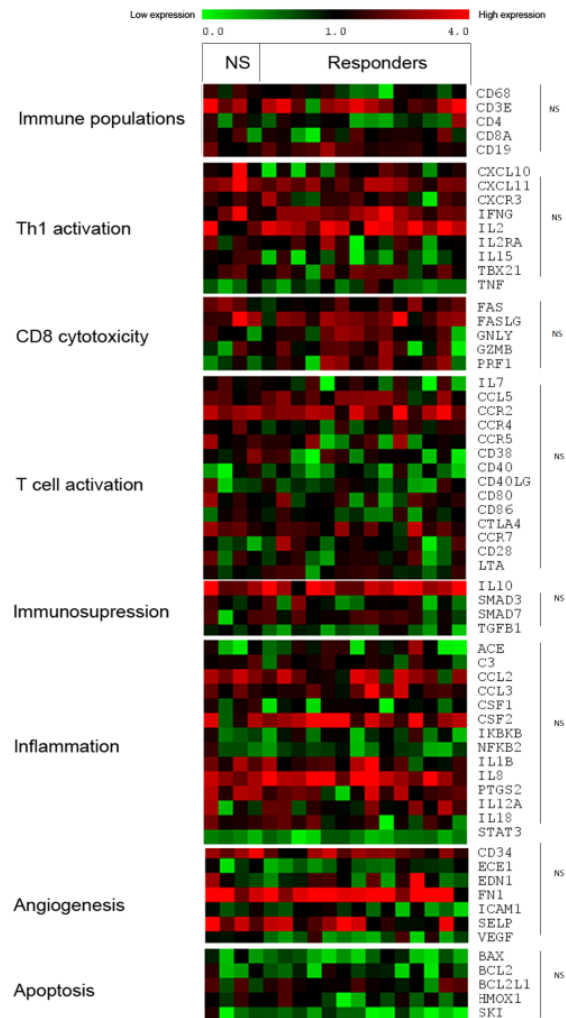
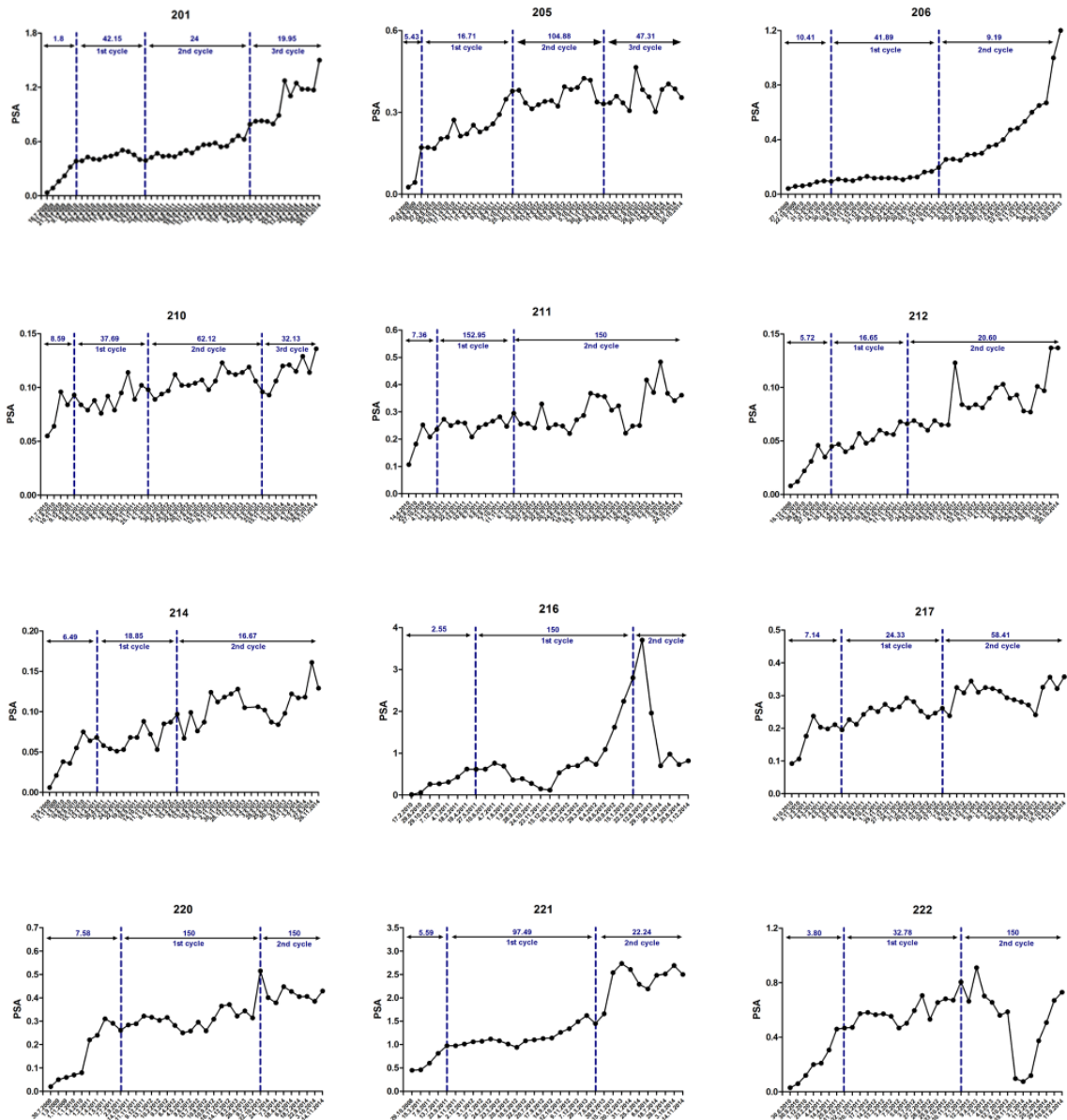
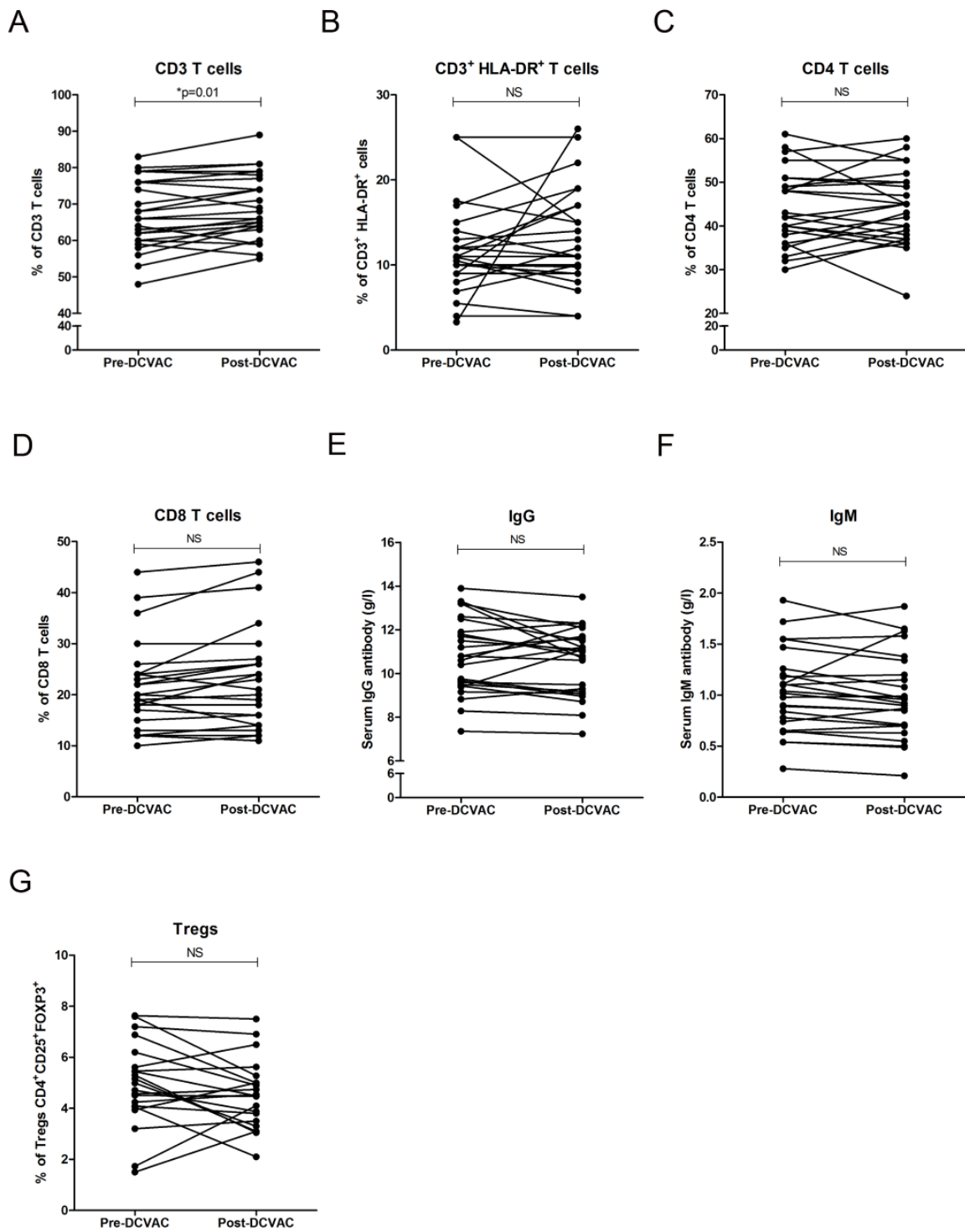


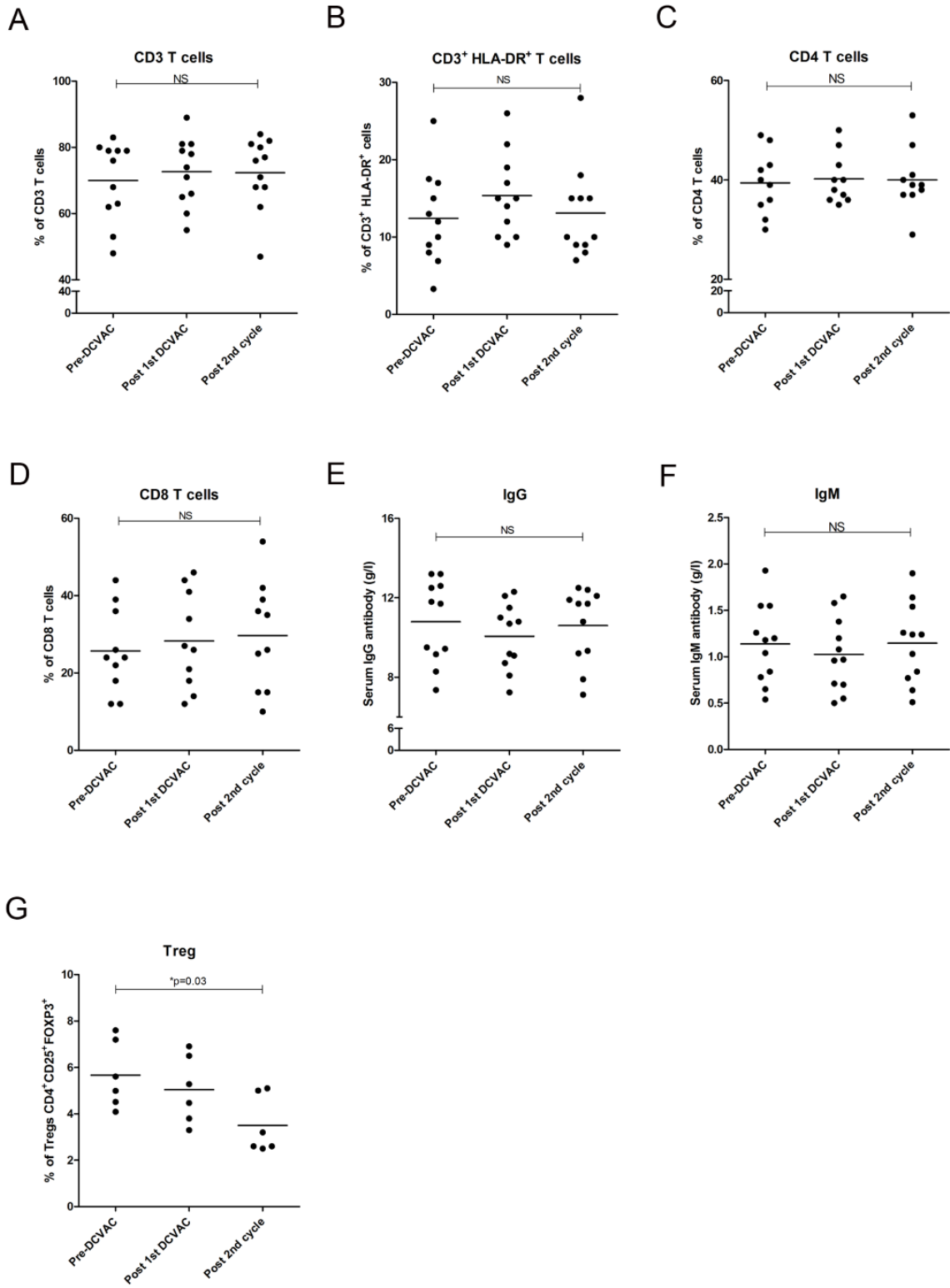
Figure 4



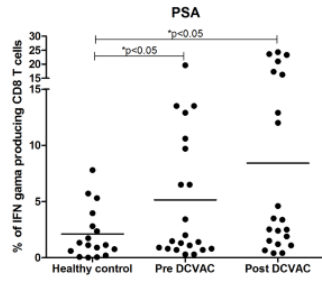
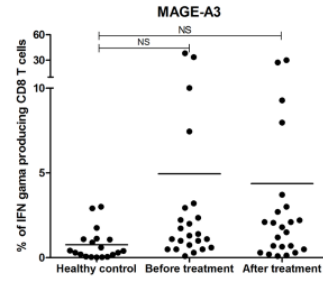
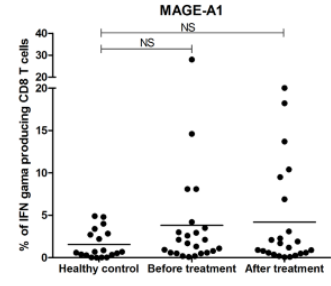
Supplemental figure 1



Supplemental figure 2

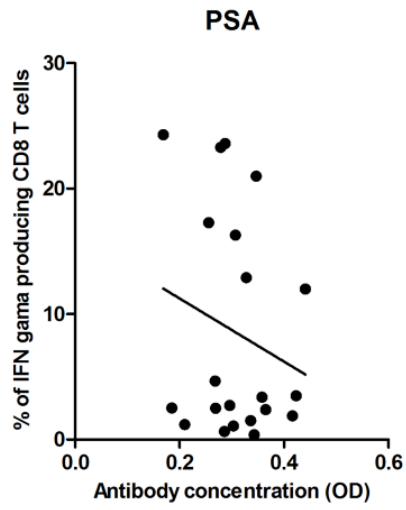


Supplementary figure 3

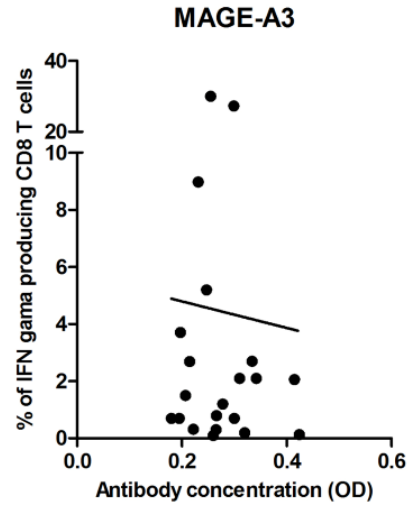
A**B****C**

Supplemental figure 4

A



B



Supplementary figure 5

Patient characteristics	
Total number of patients	27
Race	
Caucasian	27
Age (years)*	
Median	63
Mean	64
Range	49-77
ECOG performance status*	
0	27
PSA, ng/mL*	
Median	0,171
Mean	0,246
Range	0,038-0,983
PSADT before immunotherapy, mo*	n=27 pts
Median	5,67
Mean	5,7
Range	1,65-10,81
PSADT after 1 st cycle of IT, mo	n=25 pts
Median	18,85
Mean	42,52
Range	2,67-150
PSADT after 2 nd cycle of IT, mo	n=12 pts
Median	58,03
Mean	76,93
Range	8,24-150
Hemoglobin, g/dL*	
Median	15,5
Mean	15,6
Range	13,8-17,4
Lactate dehydrogenase, IU/L*	
Median	188,4
Mean	190,56
Range	141-340
Alkaline phosphatase, IU/L*	
Median	66
Mean	66
Range	41-107
Initial Gleason score, n (%)	
5	5 (19)
6	10 (37)
7	8 (30)
8	1 (3)
9	3 (11)
Median	6
PSA levels at the time of initial dg.	
Median	7,3
Mean	8,4
Range	2,9-19,6
Prior treatment- surgery, n (%)	
Radical prostatectomy	14 (52)
Radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy	13 (48)
Salvage radiotherapy	8 (30)

Table 1. Patients' baseline characteristics. Abbreviations: ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; PSA, prostate specific antigen; IT, immunotherapy; * values at the start of immunotherapy

System Organ Class	Active study drug (DCVAC/PCa)
Preferred Term	
Study EudraCT number 2009-017259-91	
Neoplasms benign, malignant and unspecified (incl cysts and polyps)	
Thyroid cancer	1
Cardiac disorders	
Angina pectoris	1
Atrial fibrillation	1
Dyspnoea exertional	1
Renal and urinary disorders	
Haematuria	1
Urinary retention	1
Nervous system disorders	
Cerebrovascular accident	1
Injury, poisoning and procedural complications	
Tendon rupture	1
TOTAL	8

Table 2. Cumulative summary tabulation of serious adverse events (SAEs) in the time period from March 2010 to March 2014. The Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDRA) version 15.1 was used for the coding of adverse events (AEs). The summary tabulations of SAEs are arranged by the primary System Organ Class (SOC) and Preferred Term (PT) level.