

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Experimentální chirurgie

Studijní obor: Experimentální chirurgie



MUDr. Dagmar Myšíková

Studium protinádorové imunitní reakce u pacientů s karcinomem plic

Study of anti-tumor immune response in patients with lung cancer

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: prof. MUDr. Robert Lischke Ph.D.

Konzultant: prof. MUDr. Radek Špíšek Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala 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, 06.06.2018

Dagmar Myšíková

Podpis

Identifikační záznam:

Myšíková, Dagmar. *Studium protinádorové imunitní reakce u pacientů s karcinomem plic. [Study of anti-tumor immune response in patients with lung cancer]*. Praha, 2018. 91 s., 8 příl. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, III.chirurgická klinika 1.LF UK a FNM. Vedoucí závěrečné práce Lischke, Robert.

Abstrakt

Karcinom plic je celosvětově vedoucí příčinou úmrtí pro maligní onemocnění. Pochopení biologických procesů specifické protinádorové imunitní odpovědi zůstává prioritním zájmem a nezbytností pro navržení úspěšných imunoterapeutických strategií. V teoretické části této práce se zabýváme složkami imunitního systému, které se účastní protinádorové odpovědi, a jejich rolí v dosud známé a používané imunoterapii. V praktické části popisujeme dvě studie studující různé aspekty protinádorové imunitní odpovědi, obě realizované ve spolupráci III. chirurgické kliniky 1. LF UK a FNM se společností Sotio a.s. První ze dvou studií je zaměřena na humorální složku specifické protinádorové odpovědi a prospektivně analyzuje sérové frekvence protinádorových protilátek NY-ESO-1, Her2/*neu* and MAGE-A4 u 121 pacientů s NSCLC. V této studii poprvé prokazujeme, že kouření tabáku významně ovlivňuje specifickou humorální imunitní odpověď, frekvence NY-ESO-1 protilátek je signifikantně vyšší v séru kuřáků a ex-kuřáků. Druhá ze dvou studií je více zaměřena na T buněčnou složku specifické protinádorové odpovědi a testuje vakcínu připravenou z dendritických buněk prezentujících antigeny buněk karcinomu plic, usmrcených vysokým hydrostatickým tlakem (DC-HHP vakcína). DC-HHP vakcína vykazuje zralý fenotyp dendritických buněk, produkuje prozánětlivé cytokiny, zvyšuje chemotaktickou migraci, indukuje nádorově specifické CD8⁺ a CD4⁺ T lymfocyty. Vysoký hydrostatický tlak (HHP) indukuje v nádorových buňkách imunogenní smrt, která je stěžejní pro navození účinné protinádorové imunitní odpovědi.

Klíčová slova:

Karcinom plic; NSCLC; Imunoterapie; Protinádorové protilátky; Dendritické buňky

Abstract

Lung cancer is the leading cause of cancer mortality worldwide. Understanding biological processes of specific antitumor immune response remains of an eminent interest and represents necessity for designing successful antitumor immunotherapeutic strategies. The theoretical part of the thesis describes components of the immune system that are involved in antitumor response and discusses their role in the hitherto known and used lung cancer immunotherapy. In the practical part of the thesis, two studies studying different aspects of anticancer immune response are described. Both studies were conducted in cooperation with 3rd Surgical Department 1st Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol and with the biotechnology company Sotio a.s. The first study is focused on the humoral component of the specific antitumor response and prospectively analyses serum frequency of antitumor antibodies against NY-ESO-1, Her2/*neu* and MAGE-A4 antigens in 121 patients with NSCLC. Here it was shown for the first time that tobacco smoking significantly increases the frequency of NY-ESO-1 antibodies in sera of smokers in comparison to ex-smokers and non-smokers. The second study is focused on the cellular component of the specific antitumor response investigating the activity of the dendritic cell-based vaccine to present antigens of lung cancer cells killed by high hydrostatic pressure (DC-HHP vaccine) to T cells. High hydrostatic pressure (HHP) induces immunogenic death in tumor cells, which is crucial for induction of an effective antitumor immune response. DC-HHP vaccine displays mature dendritic cell phenotype, produces pro-inflammatory cytokines, increases the chemotactic migration and more importantly induces tumor-specific CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes in blood of NSCLC patients.

Keywords:

Lung Cancer; NSCLC; Immunotherapy; Antitumor antibodies; Dendritic cells

Obsah

1	Literární úvod a přehled dané problematiky	8
1.1	Principy nádorové imunologie, role imunitního systému v obraně proti nádorům, teorie 3E	8
1.1.1	Přírozená (vrozená) protinádorová imunita.....	9
1.1.2	Adaptivní (získaná) protinádorová imunita.....	10
1.1.3	Imunogenní buněčná smrt	14
1.1.4	Mechanismy úniku nádoru imunitnímu dohledu	15
1.2	Vliv kouření tabáku na imunitní systém.....	19
1.3	Principy imunoterapie.....	22
1.3.1	Nespecifická imunoterapie	22
1.3.2	Specifická imunoterapie	23
1.3.3	Nová hodnotící kritéria imuno-onkologie	28
1.3.1	Imunitní klasifikace nádorů (Immunoscore)	31
1.4	Nádorová imunologie karcinomu plic	35
1.4.1	Epidemiologie karcinomu plic a klinické souvislosti	35
1.4.2	Specifická humorální odpověď proti karcinomu plic.....	36
1.4.3	Současné možnosti imunoterapie u NSCLC	36
2	Vymezení cílů práce, včetně stanovení hypotéz	46
2.1	Humorální protinádorová imunitní odpověď: frekvence specifických protilátek	46
2.2	Celulární protinádorová imunitní odpověď: in vitro imunogenicita a stabilita vakcíny z dendritických buněk	46
3	Popis použitých experimentálních metod, včetně statistických	48
3.1	Metody ve studii specifické humorální protinádorové imunitní odpovědi.....	48
3.1.1	Charakteristika souboru pacientů	48
3.1.2	qPCR analýza exprese antigenů NY-ESO-1, Her2/neu and MAGE-A4	49
3.1.3	ELISA pro stanovení frekvence protilátek NY-ESO-1, Her2/neu a MAGE-A4	49
3.1.4	Hodnocení dat	50
3.1.5	Statistické metody	51
3.2	Metody ve studii specifické celulární protinádorové imunity	52
3.2.1	NSCLC nádorové linie	52
3.2.2	Příprava nádorových buněk usmrcených vysokým hydrostatickým tlakem	52
3.2.3	Příprava DC-HHP vakcíny	52
3.2.4	Fenotyp a cytokinová produkce DC-HHP vakcíny	53
3.2.5	Migrační a fagocytární kapacita DC-HHP vakcíny	53
3.2.6	Stimulace DC-HHP vakcíny v médiu obsahujícím humánní sérum	54
3.2.7	Příprava DC-HHP vakcíny z PBMC pacientů s NSCLC	54

3.2.8	Indukce nádorově specifických T lymfocytů a CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg lymfocytů	55
3.2.9	Příprava buněk exprimujících na membráně MP1 a detekce MP1-specifických CD8 ⁺ T lymfocytů	56
3.2.10	Detekce T buněk specifických pro nádorové antigeny u pacientů s NSCLC	57
3.2.11	qPCR analýza exprese antigenů	57
3.2.12	Statistické metody	58
4	Přehled dosažených, náležitě dokumentovaných a adekvátně statisticky zhodnocených vlastních výsledků	59
4.1	Výsledky ve studii specifické humorální protinádorové odpovědi	59
4.1.1	Klinicko-patologické charakteristiky souboru pacientů s NSCLC a jejich korelace s anamnézou kouření tabáku.....	59
4.1.2	Frekvence protilátek NY-ESO-1, Her2/neu and MAGE-A4 u pacientů s NSCLC a kontrolních pacientů ve vztahu k anamnéze kouření tabáku.....	62
4.1.3	Expresce NY-ESO-1, Her2/neu and MAGE-A4 antigenů v nádorové tkáni ve vztahu k anamnéze kouření, histologickému typu nádoru a pohlaví pacientů.....	64
4.1.4	Vztah mezi mRNA expresí NY-ESO-1 a pozitivitou NY-ESO-1 protilátek v séru pacientů s NSCLC	65
4.2	Výsledky ve studii specifické celulární protinádorové odpovědi.....	66
4.2.1	Imunogenní buněčná smrt nádorových linií karcinomu plic indukovaná vysokým hydrostatickým tlakem	66
4.2.2	DC-HHP vakcína manifestuje zralý fenotyp, produkuje prozánětlivé cytokiny a zvyšuje chemotaktickou migraci	66
4.2.3	DC-HHP vakcína vykazuje vyšší maturaci a cytokinovou produkci v mediu obsahujícím sérum po následné LPS a CD40L stimulaci	67
4.2.4	DC-HHP vakcína stimuluje antigen-specifické CD8 ⁺ T lymfocyty a zvyšuje počet CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg lymfocytů	68
4.2.5	DC-HHP vakcína připravená z monocytů pacientů s NSCLC indukuje nádor specifické CD8 ⁺ a CD4 ⁺ T lymfocyty	69
5	Diskuze metodických postupů a výsledků, včetně srovnání s literaturou.....	71
5.1	Diskuse specifické protinádorové humorální odpovědi	71
5.2	Diskuse specifické protinádorové celulární odpovědi.....	74
6	Závěry a zhodnocení cílů a hypotéz práce	77
6.1	Závěry týkající se specifické protinádorové humorální odpovědi.....	77
6.2	Závěry týkající se specifické protinádorové celulární odpovědi	77
7	Souhrn	78
	Summary	79
8	Seznam použité literatury	80
9	Seznam příloh.....	91

1 Literární úvod a přehled dané problematiky

1.1 *Principy nádorové imunologie, role imunitního systému v obraně proti nádorům, teorie 3E*

Imunologie a onkologie jsou spjaté od konce 19. století, kdy lékař William Coley poprvé dokázal, že podání usmrcených bakterií streptokoka způsobilo navozením antibakteriální imunitní reakce abskopální efekt spojený s regresí nádorů (Coley WB, 1893). Každým dnem vznikne v lidském těle tisíce nádorových buněk, které imunitní systém dokáže rozpoznávat a úspěšně eliminovat. Poprvé zformuloval **hypotézu imunitního dohledu** (immunosurveillance) Sir MacFarlane Burnet v roce 1957: Úlohou imunitního systému je rozpoznat pro organismus potenciálně nebezpečné buňky, včetně buněk nádorových, a zlikvidovat je pomocí efektorových mechanismů jak vrozené, tak získané imunity (Burnet FM, 1957). Tato hypotéza byla postupem času zpochybňována a následně nahrazena jiným pohledem na věc. Vzhledem k tomu, že některé nádorové buňky jsou schopné imunitnímu dohledu uniknout, dát za vznik nádoru a metastazovat, byla tato teorie nahrazena komplexnější **hypotézou imunoeditace**, někdy nazývanou **teorií 3E** (elimination, equilibrium, escape). V tomto pojetí se shoduje Burnetův imunitní dohled s prvním obdobím vývoje nádoru, kterým je „**eliminace**“ (elimination), kdy jsou všechny premaligní buňky imunitním systémem zničeny. Pokud ale není eliminace dostatečně úspěšná, následuje stádium „**rovnováhy**“ (equilibrium), kdy se objevují buňky s dalšími mutacemi, jichž mohou být v průběhu onemocnění tisíce, ale nemusejí být nutně všechny imunogenní. Tato rovnovážná fáze může podle některých autorů trvat i desetiletí, představuje stálou interakci imunitního systému s extrémně heterogenní, geneticky nestabilní populací nádorových buněk, jejichž imunologicky rozpoznatelné fenotypy jsou stále likvidovány, ale v důsledku početných mutací vznikají stále nové. V tomto období nemusí nádor svému hostiteli způsobovat žádné obtíže, většinou o něm neví. Posledním stádiem imunoeditace je „**únik**“ (escape). Nastává v okamžiku, kdy vznikne klon nádorových buněk, který není imunitní systém schopen rozpoznat a/nebo efektorové mechanismy imunity nemají dostatečnou kapacitu na to všechny rizikové nádorové buňky zlikvidovat. Dochází k nekontrolovanému agresivnímu růstu primárního nádoru a většinou i jeho rozsevu do celého organismu, tedy k metastazování (Dunn GP et al.,2002).

1.1.1 Přírozená (vrozená) protinádorová imunita

Přírozenou efektorovou odpověď proti nádorům zajišťují dva hlavní typy buněk. Jsou to NK buňky (NK = natural killer = „přírozený zabíječ“) a makrofágy.

1.1.1.1 NK buňky

NK buňky byly původně identifikovány jako lymfoidní populace představující 10-20% PBMC (peripheral blood mononuclear cells = periferní krevní mononukleární buňky) a to populace schopná lýzy MHC-I negativních nádorových nebo virem infikovaných buněk (MHC = major histocompatibility complex = hlavní histokompatibilní komplex)(Zamai et al., 2007). Zda dojde k aktivaci nebo inhibici NK buněk, záleží na poměru aktivačních a inhibičních signálů. Obecně platí, že aktivační receptory rozpoznávají ligandy na infikovaných a poškozených buňkách, které mají být zničeny a inhibiční receptory rozpoznávají normální, zdravé buňky, které mají být zachovány.

Inhibiční receptory rozpoznávají na zdravých buňkách především MHC molekuly I. třídy, dvě hlavní skupiny těchto receptorů jsou KIR (killer cell immunoglobulin-like receptors) vázající HLA-I (human leukocyte antigen)(Bottino C. et al., 2004) a CD94-NKG2A/B, který rozpoznává HLA-E (Braud VM et al., 1998). Chybění pouze jediné MHC-I alely, což je častým jevem u nádorových buněk, vede k jejich zvýšené citlivosti k NK toxicitě (Bottino C. et al., 2004).

Nicméně při absenci inhibičních signálů musí být cytotoxicita NK buněk aktivována sadou spouštěcích receptorů. Spontánní cytotoxická aktivita je spuštěna zejména pomocí NKG2D, zatímco CD16 (FcγRIIIA, nízkofinální receptor pro IgG protilátky) se váže na Fc fragmenty IgG opsonizovaných buněk a zprostředkovává ADCC (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity = na protilátkách závislá a buňkami zprostředkovaná cytotoxicita)(Moretta L et al., 2004). Tumoricidní aktivitu NK buněk zvyšují cytokiny, jako je IL-2, IFN- γ , IL-15, či IL-12, které tyto buňky aktivují (Zamai et al., 2007).

1.1.1.2 Makrofágy

Makrofágy mohou růst nádorů inhibovat nebo naopak podporovat. Heterogenita makrofágů byla zjednodušena konceptem polarizace, kde jsou dva extrémní fenotypy, M1 a M2 makrofágy, s odlišnými funkcemi (Murray PJ, WynnTA, 2011). Klasickou aktivací, na

kteře se podílejí interferon γ , T_H1 buňky, a TLR ligandy, vznikají makrofágy označované jako **M1** s výrazně prozánětlivým fenotypem. M1 makrofágy zabíjejí nádorové buňky obdobně jako pohlcené infekční mikroorganismy, produkují reaktivní formy kyslíku (ROS = Reactive Oxygen Species) a oxid dusnatý (NO) (MacMicking J et al., 1997), u kterého bylo prokázáno, že zabíjí nádorové linie *in vitro* a myší nádory *in vivo* (Rahat MA, Hemmerlein B, 2013). M1 makrofágy dále produkují interferon γ , který aktivuje další imunitní buňky, jakými jsou např. T buňky či NK buňky, u kterých se poté zvyšuje schopnost zabíjet nádorové buňky.

Makrofágy fenotypu **M2** vznikají alternativní aktivací pod vlivem cytokinů IL-4 a IL-13. Mají výrazně protizánětlivý charakter a účastní se především reparačních procesů. Růst nádoru podporují tím, že produkují VEGF, TGF- β a některé další cytokiny a chemokiny, jež stimulují nádorovou neoangiogenezi, podílejí na udržování chronického zánětu a tlumí protinádorovou funkci imunitních buněk. Chronický zánět, na rozdíl od zánětu akutního vytváří prostředí pro vývoj maligního nádoru (Allavena P et al., 2008; Allavena P, Mantovani A, 2012).

1.1.2 Adaptivní (získaná) protinádorová imunita

Pro specifickou imunitní odpověď je charakteristický mechanismus imunologické paměti. Nádory mohou indukovat jak T-buněčnou, tak protilátkovou imunitní reakci. Je opakovaně prokazováno, že přítomnost imunitního infiltrátu v nádorové tkáni, zejména aktivovaných $CD4^+$ nebo $CD8^+$ T lymfocytů, koreluje s lepší prognózou a příznivějším průběhem onemocnění (Donnem T. et al., 2015; Donnem T et al., 2016).

1.1.2.1 T- buněčná protinádorová odpověď

Nádorová buňka nebo jen její části, které se z umírající buňky uvolňují, jsou pohlceny některou z profesionálních antigen prezentujících buněk (antigen-presenting cells, APC), například buňkou dendritickou. Ta pohlcené nádorové antigeny rozštěpí, zpracuje a vystaví na povrchu v komplexu s MHC molekulami I. a II. třídy (major histocompatibility complex, MHC). Prezentaci pohlceného/exogenního antigenu v komplexu s MHC molekulami I. třídy se říká zkřížená prezentace nebo zkřížený priming (cross-presentation, cross-priming) (Joffre OP et al.) a z profesionálních antigen prezentujících buněk mají tuto schopnost pouze dendritické buňky (Petersen TR et al., 2010). Jinak je pravidlem, že pohlcené extracelulární antigeny se intracelulárně zpracovávají a vystavují na povrchu APC v komplexu s MHC

molekulami II. třídy a jsou rozpoznávány pomocnými T lymfocyty ($CD4^+$, T helper, T_H lymfocyty), zatímco endogenně syntetizované antigeny jsou intracelulárně zpracovány proteazómen a vystaveny na povrchu v komplexu s MHC molekulami I. třídy. Rozpoznávají jsou cytotoxickými T lymfocyty ($CD8^+$, CTL), jež vykonávají efektorovou / zabíječskou funkci. Jako nebezpečné vyhodnotí ty buňky, které na svém povrchu exprimují MHC molekuly I. třídy v komplexu s nádorovými antigeny (Germain RN, 1994). Naivní, tj. klidové cytotoxické $CD8^+$ T buňky sice dokáží nebezpečnou nádorovou buňku rozpoznat, ale většinou ji nedokáží účinně zlikvidovat. K získání takové schopnosti se potřebují diferencovat do efektorových cytotoxických T lymfocytů (CTL), a to za pomoci cytokinů a kostimulátorů poskytovaných dendritickými buňkami a IL-2, který produkují současně aktivované T_H lymfocyty (Hivroz C et al., 2012). Oba typy T lymfocytů rozpoznávají komplexy MHC molekul a antigenů, včetně nádorových, pomocí specifických TCR komplexů. Ty jsou tvořeny T buněčným receptorem (TCR) který je nekovalentně spojen s CD3 komplexem. TCR umožňuje rozpoznávání antigenů, CD3 komplex tvořený CD3 heterodimery ($\epsilon\gamma$ a $\epsilon\delta$) a homodimerem ζ realizuje signalizaci směrem k jádru. K aktivaci T lymfocytů však tento první signál nestačí. K tomu je zapotřebí druhý, tzv. kostimulační signál, který reakci na první signál potvrzuje, aby nedocházelo k nespecifické aktivaci T buněk (Bernard A et al., 2002). Kostimulačních dvojic, tj. povrchových receptorů na straně imunokompetentních buněk a ligandů na straně antigen prezentujících buněk, je řada a buď jsou většinou inducibilní hlavně na antigen prezentujících buňkách. Konstitutivní kostimulační receptor T lymfocytů je CD28 s ligandem B7-1/B7-2 ($CD80/CD86$). Inducibilní kostimulační receptor T lymfocytů je ICOS ($CD 278$) s ligandem ICOS-L ($CD275$). Inhibiční receptory jsou vesměs inducibilní a patří k nim molekuly CTLA-4 ($CD 152$) s ligandem B7-1/B7-2 ($CD80/CD86$) a PD-1 ($CD279$) s ligandem PD-L1 ($CD274$) a PD-L2 ($CD273$). Oba se vyskytují na povrchu T lymfocytů (Chen L, Flies DB, 2013). PD-1 je kromě toho prokazován také na B buňkách (Thibult ML et al., 2012) a myeloidních buňkách (Balbach M et al., 2017). Jakmile efektorové nádorově specifické CTL jednou vzniknou, rozpoznávají a zabíjejí nádorové buňky již bez pomoci kostimulátorů. Z hlediska moderní imunoonkoterapie je asi nejdůležitější blokace inhibičních signálů vedoucí přes receptory CTLA-4 a PD-1, event. blokace ligandu PD-L1 (viz další text). Aktivované $CD4^+$ pomocné T_H lymfocyty zvyšují expresi kostimulačních molekul $CD80/CD86$ a indukují produkci IL-12 dendritickými buňkami. Tím přispívají k efektivnímu primingu a následnému vývoji a diferenciaci $CD8^+$ T lymfocytů do efektorových CTL (Andersen MH et al., 2006). Protinádorové T_H buňky také produkují IFN- γ a TNF, jež zvyšují expresi MHC molekul I. třídy na nádorových buňkách, zvyšují jejich citlivost k lýze a

zpětnovazebně také podporují zabíjení nádorových buněk makrofágy typu M1 a NK buňkami. TNF se dokonce podílí na odstraňování některých typů nádorů tím, že v nádorových buňkách spouští signalizaci vedoucí k buněčné smrti. (Závadová E., Říhová B., 2015).

1.1.2.2 Protilátková protinádorová odpověď

V séru řady pacientů trpících nádory je možné prokázat nádorově specifické protilátky. Protilátky se v protinádorové obraně uplatňují především tak, že se navazují na povrchové nádorové antigeny (typu TSA-tumor specifické antigeny či TAA- tumor asociované antigeny; viz níže) (Kobold S et al, 2010), tím je opsonizují, a tak umožňují jejich napadání fagocyty (makrofágy M1, neutrofilními granulocyty) či NK buňkami, jedná se o mechanismus ADCC- na protilátkách závislá a buňkami zprostředkovaná cytotoxicita (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity). Při té se protilátky svou Fc částí váží na NK buňky nebo makrofágy s povrchovým FC receptorem (Fc γ RIII; CD16) a Fab částí na specificky rozpoznané nádorové buňky (Moretta L et al., 2004).. Ty jsou pak zabity buď granzymy uvolněnými z NK buněk (Zamai et al., 2007)., nebo kyslíčným dusnatým, který produkují makrofágy (MacMicking J et al., 1997;Rahat MA, Hemmerlein B, 2013).

Uplatňovat se může také aktivace komplementu: protilátky některých izotypů navázané na povrch nádorové buňky mohou aktivovat klasickou cestu komplementu, což přispívá k opsonizaci, chemotaxi fagocytů, rozvoji zánětlivé reakce a finálně i k osmotické lýze membranolytickým komplexem komplementu. Vazba protilátek na určité povrchové receptory může vyvolat v takto napadené nádorové buňce i její apoptotickou smrt. Zásadně důležité je, že pro vznik kvalitních vysokoafinních protilátek proti nádorovým antigenům nestačí, aby tyto nádorové antigeny byly rozpoznány specifickými B lymfocyty pomocí jejich antigenně specifických receptorů (B-cell receptor - BCR). Nezbytná je spolupráce těchto B lymfocytů s pomocnými T lymfocyty, které jim dodávají nepostradatelné kostimulační signály. Proto je nutné, aby nádorové antigeny (resp. jejich peptidové fragmenty navázané na HLA proteiny) byly těmto pomocným buňkám předkládány zpravidla prostřednictvím zralých dendritických buněk (Hořejší V., 2015).

O schopnosti protilátek eliminovat nádorové buňky *in vivo* se však stále vedou diskuse, a proto se nejvíce uplatňují v pasivní imunoterapii, nejčastěji jako protilátky monoklonální (Weiner LM et al., 2012; Závadová E., Říhová B., 2015).

1.1.2.3 Nádorové antigeny

Základním předpokladem reakce imunitního systému s nádorovými buňkami je existence povrchových antigenů, které by umožnily imunitnímu systému jejich rozpoznání. Jsou známy dva typy nádorových antigenů: antigeny specifické pro nádory (tumor-specific antigens - TSA) a antigeny asociované s nádory (tumor-associated antigens - TAA), (Hořejší V.,2015).

Mezi **TSA** patří molekuly, které se na normálních buňkách vůbec nevyskytují, příkladem může být AFP (alfa-fetoprotein), produkovaný germinálními nádory a hepatocelulárním karcinomem a nepřítomný v normálních somatických buňkách.

Oproti tomu **TAA** se vyskytují v tumorech a zároveň v normálních somatických buňkách, což ponechává prostor k imunitní toleranci. Patří sem mimo jiné:

- a) tzv. nádorové testikulární antigeny (**cancer testis antigens** - CTA), zástupcem můžeme jmenovat rodinu MAGE antigenů (melanoma-associated antigen, antigen asociovaný s melanomem), nebo antigen NY-ESO-1 (New York Esophageal Squamous Cell Carcinoma-1, NewYork dlaždicobuněčný karcinom jícnu), MAGE i NY-ESO-1 jsou produkovány nádory a zároveň normálními somatickými buňkami varlete (Simpson AJ et al., 2005).
- b) HER2/*neu*- receptor růstového faktoru epiteliálních buněk (human epidermal growth factor receptor 2), který je v malém množství přítomen na normálních epiteliálních buňkách; na buňkách některých karcinomů mléčné žlázy je exprimován silně, ale vyskytuje se i u karcinomů plic, žaludku, ovaríí a endometria (Gutierrez C, Schiff R., 2011).

Časem a s pokračujícím výzkumem ale řada antigenů přešla ze skupiny TSA do skupiny TAA, protože byly objeveny v somatických buňkách. Postupně začínají být používány nové klasifikace nádorových antigenů, antigeny jsou zařazovány do skupin dle jejich molekulární struktury a původu.

1.1.3 Imunogenní buněčná smrt

Programovaná buněčná smrt neboli apoptóza je způsob, kterým jsou každou minutu z těla odstraňovány miliony již nefunkčních nebo poškozených buněk. Až donedávna se apoptóza považovala za neimunogenní proces. Teprve v posledních letech byl formulován koncept imunogenní buněčné smrti (immunogenic cell death, ICD) tj. způsob umírání buněk, který stimuluje imunitní reakci. Naopak nekróza byla označována za imunogenní, neboť při ní dochází k porušení plazmatické membrány a uvolnění buněčných komponent a prozánětlivých cytokinů. Toto dogma bylo v uplynulých 10 letech popřeno řadou prací popisujících význam imunogenní apoptózy navozené různými modalitami a upozorňujících na její význam v konceptu ICD (Kroemer G et al., 2013). Z těchto prací vyplývá, že typ buněčné smrti neurčuje, zda jde o imunogenní smrt, rozhodující je typ podnětu, který buněčnou smrt zahájí (Dudek AM et al., 2013). ICD na rozdíl od fyziologické apoptózy vede ke stimulaci imunitního systému pomocí molekul, které jsou označovány jako DAMPs (danger associated molecular pattern). DAMPs mají za fyziologických podmínek řadu funkcí ovlivňujících metabolismus, proliferaci a komunikaci buněk (Garg AD et al., 2010). Pokud se nádorová buňka dostane do stresového prostředí, jsou tyto molekuly exprimovány na buněčném povrchu nebo uvolňovány do mezibuněčného prostoru v nádorovém ložisku, kde aktivují různým způsobem rozličné složky imunity a obvykle indukují protinádorovou imunitní reakci (Garg AD et al., 2010; Garg AD et al., 2013). V prvních hodinách imunogenní buněčné apoptózy dochází k: **1)** rychlé translokaci chaperonového proteinu kalretikulínu (calreticulin, CRT) a proteinů teplotního stresu 70 a 90 (heat-shock, HSP70 a HSP90) z endoplazmatického retikula (ER) na buněčný povrch. Následně dochází **2)** k aktivní sekreci molekuly ATP (adenosintrifosfát) a **3)** k pasivnímu uvolnění nukleárního proteinu HMGB1 (high mobility group box 1) do extracelulárního prostoru (Panaretakis T et al., 2009; Špišek R et al., 2007; Garg AD et al., 2012; Apetoh L et al. 2007). Společnou vlastností těchto molekul je aktivace buněk imunitního systému, zejména pak dendritických buněk (dendritic cells, DC), které se řadí mezi profesionální antigen prezentující buňky (antigen presenting cell, APC) (Krysko DV, Vandenabeele P, 2008). Význam těchto molekul pro aktivaci imunitního systému byl prokázán na mnoha *in vitro* modelech nádorových buněk (Fučíková J et al., 2011 et 2014) a v *in vivo* myších imunizačních experimentech (Krysko DV et al., 2012). Řada preklinických a retrospektivních prací dokumentuje klinický význam DAMP molekul pro predikci prognózy pacientů s nádorovými chorobami (Kroemer G et al., 2013).

Vyšší exprese DAMP molekul na nádorových buňkách nebo jejich vyšší koncentrace v nádorovém mikroprostředí jsou spojovány s lepší prognózou onemocnění.

Jako první induktory ICD byly popsány v letech 2002– 2006 chemoterapeutika mitoxantron, antracykliny (doxorubicin a idarubicin) a radioterapie (Apetoh L et al., 2007; Fučíková J et al., 2011; Obeid M et al., 2007). V současné době je identifikována skupina chemoterapeutik a fyzikálních modalit, jejichž společnou vlastností je indukovat imunogenní smrt nádorových buněk (Dudek AM et al, 2013). Díky mnoha biologickým a chemickým odlišnostem těchto modalit vznikl nový systém klasifikace na induktory I. a II. třídy. Induktory imunogenní smrti, které způsobují stres ER nepřímo přes cytozolické proteiny, proteiny plazmatické membrány a DNA replikaci jsou označovány jako induktory I. třídy. Do této skupiny řadíme některá chemoterapeutika (mitoxantron, antracykliny, oxaliplatin a bortezomib) a fyzikální modalit (UVC záření, radioterapie a vysoký hydrostatický tlak). Naopak modalit, které primárně indukují stres ER, jsou označovány jako induktory II. třídy a řadíme mezi ně zejména fotodynamickou terapii a některé onkolytické viry (Kryska DV et al., 2012). Společným rysem obou skupin induktorů je přímá (II. třída) či nepřímá (I. třída) aktivace stresu ER, díky které dochází k fosforylaci eukaryotického translačního iniciačního faktoru eIF2 α pomocí serin-threonin kinázy PERK. Následuje proteolýza proteinu BAP31 mediovaná kaspázou- 8 a aktivace proapoptotických proteinů BAX a BAK. Následně je CRT transportován z ER do Golgiho aparátu a pomocí exocytózy přenesen na buněčný povrch. Blokace jakéhokoliv proteinu v této dráze znemožní expresi CRT, zastaví ICD a redukuje imunitní odpověď navozenou imunogenní modalitou (Panaretakis T et al, 2009; Fučíková J. et al, 2015).

1.1.4 Mechanismy úniku nádoru imunitnímu dohledu

Imunitní systém je v mnoha případech schopen nádory rozpoznat a zabít. Nádory však imunitní odpovědi unikají. Využívají k tomu řadu aktivních a pasivních mechanismů.

1.1.4.1 Pasivní mechanismy úniku imunitní odpovědi

K těm nejdůležitějším pasivním mechanismům úniku imunitnímu systému počítáme absenci mutovaného antigenu a ztrátu exprese MHC molekul I. třídy a v důsledku toho nerozpoznatelnost pro specifické CD8⁺ cytotoxické T lymfocyty. MHC molekuly I., ale i II.

třídy (major histocompatibility complex; u lidí HLA, human leukocyte antigens) jsou využívány k vystavování antigenů na povrchu buněk (viz kapitola o T buněčné protinádorové odpovědi).

1.1.4.2 Pasivní mechanismy úniku imunitní odpovědi

Na aktivní inhibici protinádorové imunitní reakce se podílejí:

- a) nádorovými buňkami sekretované imunosupresivní cytokiny typu TGF- β (tumor growth factor β , transformující růstový faktor β), které inhibují proliferaci a efektorové funkce lymfocytů a makrofágů
- b) regulační Treg lymfocyty
- c) MDSC (myeloid-derived suppressor cells), heterogenní populace prekurzorů dendritických buněk, monocytů a neutrofilů s některými společnými povrchovými znaky a imunosupresivní schopností
- d) Makrofágy typu M2 sekretující supresivní mediátory typu IL-10 a prostaglandinu E, které snižují T- buněčnou aktivaci a efektorové funkce a podporují růst nádorů produkcí proangiogenních cytokinů, jakými jsou TGF- β a VEGF (vascular endothelial growth factor, vaskulární endotelový růstový faktor)
- e) Pravděpodobně i T_H17 lymfocyty (Závadová E., Říhová B., 2015).

1.1.4.3 Kontrolní body imunitní reakce (KBIR)

Imunitní checkpoints neboli kontrolní body imunitní reakce (KBIR) se významně podílejí na inhibici protinádorové imunitní reakce. KBIR jsou molekuly/receptory prokazatelné na povrchu imunokompetentních buněk, hlavně T lymfocytů, které zásadním způsobem kontrolují imunitní odpověď na antigeny. Jsou buď **aktivační** CD28 nebo **inhibiční** CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4) a PD-1 (programmed cell death protein 1).

Aktivační molekula CD28 a inhibiční molekula CTLA-4 mají stejné ligandy. Jsou to CD80 (B7-1) a CD86 (B7-2) exprimované na antigen prezentujících buňkách. Vazba mezi ligandy a CTLA-4 je silnější, než je vazba s CD28 a to je důležité z regulačního hlediska. Umožňuje to zastavení už případně „nadbytečné“ imunitní reakce. Z hlediska nutné dlouhotrvající protinádorové reakce je to ale nevýhodné. CTLA-4 receptor exprimují také

tlumící Treg (regulační CD25+ FOXP3+ buňky), vyšší počet Treg v nádorovém mikroprostředí je spojován s horší prognózou (Mockler MB et al., 2014).

PD-1 je exprimován na aktivovaných T- a B-buňkách. Je to molekula strukturálně podobná CTLA-4, ale má jiné biologické vlastnosti a také jiné ligandy. V nádorovém mikroprostředí je aktivována vazbou s ligandy PD-L1 a PD-L2, které jsou fyziologicky prokazatelné na T- a B-lymfocytech, makrofázích, NK-buňkách, dendritických a žírných buňkách, a velmi často na nádorových buňkách. Ligace PD-1 molekuly na povrchu T buněk způsobuje jejich inaktivaci, eventuálně i smrt (Alhaab HO et al., 2017).

Kontrolních bodů imunitní reakce je však mnohem více a jsou detekovatelné nejenom na T- buňkách, ale i na NK buňkách. V současné době probíhá řada klinických studií, které ověřují možnost zvýšení protinádorové imunitní reakce pomocí cílení těchto molekul, podobně jako v případě PD-1 a jeho ligandů, či CTLA-4. Mezi tyto KIRB patří LAG3 (lymphocyte-activation gene3, lymfocyty aktivující gen3) (Andrews LP et al., 2017), CD 137 (4-1-BB) (Makkouk A et al., 2016) anebo TIM-3 (mucin- protein 3) (Du W et al., 2017)

1.1.4.4 Nádorové mikroprostředí

Nádorové mikroprostředí je primárně imunosupresivní a nádor se tím protinádorové reakci a tím i vlastní eliminaci aktivně brání. Suprese vychází ze schopnosti nádorových buněk potlačit, nebo dokonce znemožnit normální protinádorovou imunitní odpověď tím, že ztrácí MHC glykoproteiny I. třídy, nevytváří dostatek dobře rozpoznatelných nádorových antigenů, ztrácí citlivost na komplement a exprimují PD-L1/L2 ligandy. Vlastní prostředí nádoru pak brání vyžívání dendritických buněk, expanzi nádorově specifických cytotoxických T lymfocytů (CTL) a pomocných T_H lymfocytů naopak umožňuje lokální expanzi populací se supresorovou aktivitou, jakými jsou Treg lymfocyty a MDSC. U řady nádorů infiltrace Treg buňkami koreluje se špatnou prognózou (Mockler MB et al., 2014). Nádory také produkují imunosupresivní molekuly typu IDO (indoleamine 2,3-dioxygenáza) a PGE2. K dalším supresorovým molekulám, které lze v nádoru prokázat, patří argináza a NO syntáza (iNOS), které produkují MDSC. Kromě toho hypoxické prostředí nádoru podporuje tvorbu adenosinu a produkci CCL28. Adenosin omezuje funkci T lymfocytů a CCL28 zvyšuje akumulaci Treg buněk. Mezenchymální kmenové buňky nádorového stromatu blokují proliferaci a funkci efektorových T buněk a nádorové vaskulární buňky potlačují T buněčnou adhezi k stěně nádorových cév. Tím omezují infiltraci solidního nádoru imunokompetentními

buňkami. Tento efekt se zčásti připisuje vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru (vascular endothelial growth factor, VEGF) a zčásti endotelin-B receptoru (ETBR)(Říhová B, Šťastný M, 2015).

1.2 *Vliv kouření tabáku na imunitní systém*

Zničující dopad kouření na zdraví je dobře znám a zdokumentován v řadě publikací. Cigaretový kouř má nepříznivý vliv na každý aspekt lidského zdraví, přičemž nejvíce úmrtí mají na svědomí kardiovaskulární a respirační choroby asociované s kouřením a malignity. Mezi další zdravotní rizika spojená s kouřením cigaret patří oslabení imunitního systému, zhoršené hojení ran, diabetes, snížení plodnosti u mužů i žen a zvýšené riziko pohlavně přenosných chorob, především lidského papilomaviru (HPV, human papilomavirus)(Kuper H et al., 2002; Stewart SL et al., 2008). I přes pokračující úsilí o snížení incidence kouření, celosvětově více než 1,1 miliardy lidí nadále kouří, což představuje jednu šestinu světové populace (Jha P et al., 2002). U poloviny všech kuřáků se přitom vyvinou závažná onemocnění s kouřením spojená, jako je chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN, chronic obstructive pulmonary disease -COPD), nebo kardiovaskulární onemocnění. U 1-5% kuřáků dojde k rozvoji malignity asociované s kouřením, které je téměř vždy fatální (Alberg AJ et al., 2005). Vystavení účinkům cigaretového kouře, a to jak aktivní, tak pasivní, je hlavní epidemiologicky prokázanou příčinou karcinomu plic, a nejčastější příčinou úmrtí pro maligní onemocnění celosvětově. Kouření také zvyšuje riziko karcinomu močového měchýře, mezoteliomu (současně s expozicí asbestu) a karcinomu hlavy a krku (spolu s infekcí lidským papilomavirem) a je pravděpodobně kofaktorem ve vývoji karcinomu žaludku, dělohy a ledvin, hepatocelulárního karcinomu a myeloidní leukémie. Velmi znepokojivé je zjištění některých epidemiologických studií, že vystavení složkám cigaretového kouře za intrauterinního vývoje zvyšuje celoživotní riziko vzniku maligního onemocnění. V experimentálních modelech u myši a psů, bylo dokázáno, že kouření během gravidity vede ke snížení aktivity cytotoxických T lymfocytů (CTL) a snížení rezistence proti implantovaným nádorovým buňkám u prenatálně exponovaného potomstva (Ng SP et al., 2006).

Vliv cigaretového kouře na imunitní systém má zdánlivě protichůdné aspekty- na jedné straně výrazně poškozující a prozánětlivý vliv, ale v mnoha případech i vliv imunosupresivní. Cigaretový kouř obsahuje více než 4500 složek v jeho plynné fázi. Tyto sloučeniny zahrnují přímé karcinogeny (například methylcholanthren, benzo[a]pyren a akrolein); toxiny (jako je například oxid uhelnatý, amoniak, aceton, nikotin a hydrochinon); reaktivní pevné látky s chemicky katalytickými povrchy; a oxidační činidla (jako jsou

například superoxid a oxidy dusíku). Zejména čerstvý kouř je chemicky vysoce reaktivní kondenzát, který obsahuje miliardy oxidačních skupin (Smith CJ, Hansch C, 2000).

Kouř je sám o sobě mutagenní, ale rozhodujícím indukujícím kofaktorem je při vzniku karcinomu plic v experimentálních modelech **zánět**. Zánětlivé prostředí způsobené a modifikované inhalací cigaretového kouře pravděpodobně přispívá k indukci malignit několika způsoby:

- a) zvýšením počtu genetických mutací (např. zkrácením, delecí a translokací). V experimentálních modelech bylo prokázáno, že jak epitelové buňky postupně získávají somatické mutace (například KRAS), zánět a bakteriální nálož v plicích se zvyšují (Ji H. et al., 2006).
- b) epigenetickým umlčením tumor-supresorových genů prostřednictvím oxidačního a nitrosylativního stresu
- c) zvýšením lokálního uvolňování růstového faktoru a indukce exprese receptoru (jako je například receptor pro epidermální růstový faktor, EGFR- epidermal growth factor receptor)
- d) podporováním angiogeneze a lymfangiogeneze
- e) změnou fenotypu makrofágů- kouření vyvolává výraznou aktivaci alveolárních makrofágů, odlišnou od nekuřáků (Woodruff PG et al., 2005). Kouř může vyvolat částečnou deaktivaci M1 nebo částečnou aktivaci M2 makrofágů. Rovnováha a intenzita tohoto jevu má přímý vliv na imunitní systém a průběh onemocnění, protože účinná hostitelská obrana vyžaduje aktivaci makrofágů takovým programem, který je vhodný pro konkrétní typ patogenu. Makrofágy M1 typu mohou způsobit výrazné poškození plic (emfyzém), zatímco makrofágy typu M2 jsou spojeny s progresí nádoru.
- f) Snížením počtu a aktivity NK buněk- přirození zabíječi, NK buňky, mají významnou úlohu v přirozené obraně hostitele proti mikrobiálním agens a účastní se imunitního protinádorového dohledu. NK buňky působí přímo cytotoxicky prostřednictvím perforinu a granzymu, dále pomocí CD95 ligandem-indukované apoptózy (APO-1, FAS) a uvolněním prozánětlivých cytokinů a chemokinů (Hamerman JA et al., 2005; Swann JB et al., 2007). Několik studií ukázalo, že počet NK buněk a jejich aktivita se snižují u kuřáků ve srovnání s nekuřáky (Tollerud DJ et al., 1989). Vystavení cigaretovému kouři oslabuje cytotoxickou aktivitu a produkci cytokinů NK buněk (Milan MF et al., 2008), což následně zvyšuje riziko infekce i vývoje malignity. Je tragické, že přibližně polovina všech

pacientů s karcinomem plic v prvním časném stadiu onemocnění, jejichž nádor je chirurgicky odstraněn, nakonec zemře pro metastatický rozsev onemocnění. Tato skutečnost je pravděpodobně důsledkem defektního NK buňkami zprostředkovaného imunitního dohledu: bylo dokázáno, že porucha NK buněčné funkce u kuřáků zvyšuje riziko relapsu karcinomu v krčních uzlinách (Ng AK, Travis LB, 2008).

1.3 *Principy imunoterapie*

Imunoterapie má své nesporné přednosti, ale i problémy. Pokud má být imunitní reakce specifická a nenapadat normální buňky, pak musí být především aktivovány efektorové mechanismy adaptivní, specifické neboli získané imunity, a to jak její buněčné (subpopulace T-lymfocytů), tak humorální (protilátkové) složky. Úkolem je posílit slabou protinádorovou reakci pacienta (aktivní imunita) nebo podat nádorově specifické T-lymfocyty či protilátky (pasivní imunita). V ideálním případě by imunoterapie měla nejenom pomoci zlikvidovat agresivní nádorovou masu, ale měla by významně přispět i k odstranění tzv.zbytkové nemoci (minimal residual disease, MRD) a umožnit tím případně i trvalé vyléčení.

1.3.1 **Nespecifická imunoterapie**

Z empirických zkušeností z minulosti vyplývá, že intenzivní anti-infekční imunitní reakce může způsobit regresí nádorů. Na podobném principu je založena i schválená metoda instilační imunoterapie povrchových nádorů močového měchýře pomocí nálevů obsahujících oslabené živé mykobakterie (BCG; bacillus Calmette-Guérin). Tento postup vede zřejmě k aktivaci několika typů imunocytů (především makrofágů), které likvidují nádorové buňky (Hořejší V., 2015).

Některá chemoterapeutika (např. imatinib mesylát, cyklofosfamid, antracykliny, 5-fluorouracil) i určité režimy ozařování mají překvapivě imunostimulační účinky nádorové buňky hynou jejich působením imunogenní buněčnou smrtí (viz výše), ta je charakterizována hlavně stresovou reakcí endoplazmatického retikula a prezentací intracelulárních molekul „signálů nebezpečí“, což dále aktivuje imunitní systém a především antigen prezentující buňky (Adkins I et al, 2014).

1.3.2 Specifická imunoterapie

1.3.2.1 Pasivní imunoterapie

Pasivní imunoterapie využívá přenosu imunitních efektorů, tj. protilátek nebo nádorově specifických T- lymfocytů, je sice rychlá, ale většinou krátkodobá.

1.3.2.1.1 Protilátky proti nádorovým antigenům (TSA a TAA)

První monoklonální protilátky byly zvířecího původu (většinou myšího) a vyvolávaly u pacientů tvorbu HAMA (human anti-mouse antibody) protilátek, což byly protilátky pacienta vytvářené proti léčebným myším monoklonálním protilátkám, což vedlo k jejich zrychlenému vychytávání. Proto byly postupně tyto prvotní zvířecí protilátky nahrazovány protilátkami chimérickými a humanizovanými. Mechanizmy jejich působení zahrnují většinu fyziologických funkcí protilátek, jako je blokování receptorů růstových faktorů nádorových buněk, opsonizace, aktivace fagocytů a NK buněk prostřednictvím Fc-receptorů (mechanismus zvaný ADCC, tedy „antibody-dependent cellular cytotoxicity“), aktivace komplementu, indukce apoptózy. Poměrně úspěšně se klinicky používají např. následující monoklonální protilátky (v závorce příslušný antigen a onemocnění):

- trastuzumab, pertuzumab (ERBB2; karcinom prsu)
- rituximab, tositumomab (CD20; lymfomy)
- alemtuzumab (CD52; chronická lymfocytická leukemie)
- cetuximab, panitumumab (EGFR; kolorektální karcinom).

Kromě samotných monoklonálních protilátek je možno použít i jejich konjugátů s účinnými toxiny (antibody drug conjugates) nebo radioizotopy (radioimunotoxiny).

Příkladem je:

- gentuzumab ozogamicin (konjugát monoklonální protilátky proti antigenu myeloidních buněk CD33 s cytostatikem kalicheamycinem) použitelný k léčbě myeloidních leukemií
- trastuzumab emtansin –Kadcyla (konjugát monoklonální protilátky proti HER2/neu receptoru s cytostatikem emtansinem) k léčbě HER2 pozitivního karcinomu prsu

-tositumomab-I-131 (konjugát monoklonální protilátky proti antigenu B lymfocytů CD20 s radioizotopem I-131)

U těchto preparátů protilátka zanese toxin či radioizotop specificky do místa nádoru, čímž se snižuje nespecifické postižení zdravých tkání (Hořejší V., 2015)

1.3.2.1.2 Adoptivní T buněčné terapie (adoptive cellular transfer- ACT)

Tento přístup spočívá v namnožení a aktivaci pacientových T lymfocytů ex vivo-a vrácení zpět nitrožilní infuzí. Lymfocyty se získávají z krve nebo přímo z infiltrátu nádoru. V prvním případě jde o tzv. LAK buňky (lymphokine activated killers), v druhém o TIL (tumor infiltrating lymphocytes) buňky. LAK buňky se získají stimulací směsí T a NK buněk pacienta in vitro cytokiny (hlavně IL-2); předpokládá se, že se tím aktivují i utlumené nádorově specifické buňky. Takto stimulované buňky se vrátí zpět do krevního oběhu pacienta a v některých případech alespoň zčásti potlačí růst nádoru. Podobně je tomu u buněk TIL; v tomto případě se však izolují lymfocyty, které infiltrovaly do nádoru (získají se z chirurgicky odstraněného nádoru). Takové buňky by měly být nádorově specifické a pravděpodobně utlumené stykem s nádorem, který neposkytuje kostimulační signály; stimulace cytokiny in vitro může tento defekt částečně napravit.

S přibývajícimi zkušenostmi se technika adoptivního buněčného přenosu značně vylepšila, takže dnes se ví, že přenos je daleko účinnější, pokud jsou před ním eliminovány endogenní T regulační lymfocyty (Treg) a buňky MDSC (myeloid-derived suppressor cells), které jinak kompetují s přenesenými buňkami o růstové cytokiny.

V moderní době se využívá genetická manipulace TIL ke zvýšení jejich protinádorové specifity pomocí tzv. **chimérického antigenního receptoru** (chimeric antigen receptor, CAR). Imunitní systém obsahuje sice obrovské množství klonů lymfocytů, ale jen nepatrný zlomek z nich nese receptory vážící nádorové antigeny. Pomocí moderních molekulárně-biologických metod lze ovšem vybavit velký počet T lymfocytů receptory žádoucí specifity. CAR je rekombinantní T buněčný receptor připravený fúzí části T-buněčného receptoru a monoklonální protilátky cílené proti zvolenému povrchovému nádorovému antigenu. Vnesení CAR (obvykle pomocí lentivirových vektorů) do T lymfocytů vede k vytvoření tzv. CAR-T-lymfocytů. Jde v podstatě o kombinaci specifické protinádorové protilátky a efektorových cytotoxických T- lymfocytů (CTL). Mimořádně důležitý je fakt, že k aktivaci CTL nejsou zapotřebí kostimulátory, protože už vazba extracelulární části CAR (tj. monoklonální protilátky) na cílový antigen T buňku aktivuje. Poprvé byl klinicky úspěšně

využit CAR nasměřovaný proti CD 19, navodil regresi u CD pozitivního non- Hodgkinského lymfomu, později byla tato strategie ještě úspěšně použita u hematologických malignit se specifitou proti CD20 a CD22 u pacientů trpících akutní B-lymfoblastickou leukémií (Říhová B, Havel L, 2014; Hořejší V., 2015). První ze skupiny těchto geneticky modifikovaných T lymfocytů byl registrován FDA pro klinické použití v léčbě akutní lymfoblastické leukémie z B buněk v srpnu 2017(<https://www.novartis.com/news/media-releases/novartis-receives-first-ever-fda-approval-car-t-cell-therapy-kymriahtm-ctl019>).

1.3.2.2 Aktivní imunoterapie

Aktivní imunoterapie je atraktivní moderní přístup pro léčbu nádorů. Ve srovnání s pasivní imunoterapií je sice pomalejší, ale její trvání by mělo být podstatně delší. Přístupů je celá řada a jejich společným jmenovatelem je snaha překonat „immuno-evasion“, tj. snahu nádorů imunitní reakci uniknout (viz výše).

1.3.2.2.1 Cytokiny

Cytokiny jsou v imunoterapii používány od roku 1984, kdy byl poprvé podán ženě trpící metastatickým melanomem **rekombinantní IL-2**. Léčba byla úspěšná, protože následujících 29 let nebyla u této ženy pozorována progresse onemocnění. U dalších pacientů, ale léčba tak úspěšná nebyla, protinádorový efekt byl slabší a navíc docházelo k závažným vedlejším projevům, jako byla na dávce závislá horečka, slabá reversibilní jaterní a renální dysfunkce, a v některých případech došlo i ke generalizovanému syndromu kapilárního úniku. Proto byly zahájeny pokusy s technikou adoptivního buněčného přenosu, kde byl IL-2 užíván ke stimulaci T lymfocytů *ex vivo*, IL-2 působí jako růstový faktor efektorových subpopulací T- buněk a NK buněk. (Říhová B, Havel L, 2014; Choudhry H et al, 2018).

Dalším cytokinem užívaným v terapii nádorů je **interferon α** . Interferon α je účinný v léčbě maligního melanomu, trichocelulární leukémie, chronické myeloidní leukémie, kožních T-lymfomů, nízkomaligních nehodgkinských lymfomů, mnohočetného myelomu, Kaposiho sarkomu, karcinomu ledviny. Protinádorový účinek interferonu α se vysvětluje přímým antiproliferačním účinkem a účinky imunomodulačními. Antiproliferační účinek je dán zásahem do buněčného cyklu indukci exprese inhibitorů cyklin dependentních kináz, čímž dochází ke zpomalení přechodu buněk z fáze G1 do fáze S, ovlivnění fáze G0 i průběhu ostatních fází buněčného cyklu, dále je dán stimulací diferenciací, alterací buněčných

membrán a povrchových antigenů a inhibicí angiogeneze ovlivněním proliferace endotelií. Z imunomodulačních účinků má pro protinádorovou aktivitu význam stimulace aktivity cytotoxických lymfocytů, zvýšení produkce toxických cytokinů, IL- 2 a TNF, dále zvýšení fagocytární aktivity a účinnosti makrofágů a NK-buněk, modulace genové exprese, a zejména zvýšení exprese antigenů MHC I a II nutných pro indukci cytotoxické reakce (Vantuchová Y, 2010).

1.3.2.2.2 Vakcíny

Vakcíny jsou dalším prostředkem aktivní imunoterapie. V minulosti se k imunizaci používaly celé mrtvé nádorové buňky nebo pouze jejich purifikované antigeny. Moderní vakcíny na bázi dendritických buněk (dendritic cell, DC), tzv. **DC-vakcíny** jsou připravené tak, že přímo zahajují specifickou protinádorovou (zejména buněčnou) reakci imunitního systému pacienta proti antigenům, exprimovaným na nádorových buňkách. Tyto vakcíny využívají jedinečné antigen prezentující schopnosti dendritických buněk, které účinně prezentují antigen i subpopulaci naivních CD4⁺ (T_H buňky) a CD8⁺ (Tc buňky, CTL) T-lymfocytům. Jejich smyslem je podpořit slabou existující, nebo nastartovat neexistující protinádorovou imunitní reakci. Nepochybnou předností je bezpečnost a účinnost dokonce i u pacientů s pokročilou chorobou. Testuje se nejčastěji u metastazujících melanomů, nádorů prostaty, kolorektálního karcinomu, ovárií, maligního gliomy a nově i u karcinomu plic. Prototypovou chorobou vhodnou pro vývoj vakcíny je zejména prostatický karcinom, hned z několika důvodů. Je to choroba, která nemusí řadu let metastazovat a způsobovat svému hostiteli problémy, je tak dostatek času na to vytvořit dostačující imunitní odpověď. Dále nádorové buňky exprimují několik dobře charakterizovaných antigenů asociovaných s nádory (tumor associated antigens, TAA). A poslední důležitou vlastností je možnost sledovat progresi/regresi onemocnění dle hladiny sérového PSA a tak objektivně posoudit odpověď na léčbu. Doposud jediným případem takovéto vakcíny použitelné v praxi je Sipuleucel-T schválený pro terapii karcinomu prostaty. Řada dalších obdobných vakcín je ve fázi II–III klinických zkoušek u pacientů s melanomem nebo karcinomem prostaty či ledvin a zkouší se u celé řady dalších nádorových onemocnění.

Současných technik, které připravují DC vakcíny je nespočetně. První generace využívala nezralé dendritické buňky a jejich progenitory izolované z periferní krve pacienta, které byly in vitro vystaveny lyzátu nádorových buněk nebo kultivovány v přítomnosti izolovaného nádorového proteinového antigenu nebo jen peptidu.

V další generaci už byly DC současně vystaveny účinku rozličných cytokinů a polyklonálních stimulátorů tak, aby se z nezralých, pouze fagocytujících buněk staly dobře vyžralé antigen prezentující efekторы.

Ve třetí generaci je již pozornost soustředěna na schopnost DC dostávat se přednostně do míst, kde se protinádorová imunita realizuje (Říhová B, Havel L, 2014; Garg AD et al, 2017).

Nadějná je zejména kombinovaná léčba DC vakcín s jinou protinádorovou terapií. Budoucí generace vakcín by se měly zaměřit i na fenotypově odlišné „stemness“ buňky; to jsou takové, které nejsou ve vlastním slova smyslu nádorové, ale jsou přítomny a výrazným způsobem mohou vývoj nádoru ovlivnit. Patří mezi ně buňky kmenové anebo buňky zúčastňující se epiteliálně-mezenchymového přechodu (epithelial to mesenchymal transition, EMT). Jedná se o reverzibilní proces, během kterého se buňky mění z polarizovaného, epiteliálního fenotypu ve vysoce mobilní fenotyp mesenchymální. Je to normální proces, ke kterému dochází během embryogeneze a organogeneze, v postnatálním období má pravděpodobně zásadní úlohu při progresi karcinomů. Jsou práce, které dokazují, že nádorové buňky během EMT získávají charakter kmenových buněk a současně i rezistenci na léčiva, protože indukce EMT u různých nádorových linií pozitivně koreluje s jejich radio- a chemorezistencí (Říhová B, Havel L, 2014).

1.3.2.2.3 Protilátky proti kontrolním bodům imunitní reakce (checkpoint inhibitory)

Kontrolní body imunitní reakce (KBIR) jsou molekuly/receptory prokazatelné na povrchu imunokompetentních buněk, hlavně T-lymfocytů, které zásadním způsobem kontrolují imunitní odpověď na antigeny. Jsou buď aktivační (CD28), nebo inhibiční (cytotoxic T-lymfocyte antigen 4,CTLA-4 a programmed death-1, PD-1). V imunoterapii jsou využívány monoklonální protilátky zaměřené proti inhibičním molekulám a tím významným způsobem modulující protinádorovou odpověď. V klinických studiích jde o protilátku anti-CTLA-4 (ipililumab) zaměřenou proti inhibičnímu receptoru na T buňkách, dále pak anti-PD-1 (nivolumab a pembrolizumab) exprimovaném na aktivovaných T- a B-buňkách.

Aktivační molekula CD28 a inhibiční molekula CTLA-4 mají stejné ligandy. Jsou to CD80 (B-7.1) a CD 86 (B-7.2) exprimované na antigen prezentujících buňkách. Vazba mezi ligandy a CTLA-4 je silnější, než je vazba s CD28, to je důležité z regulačního hlediska. Umožňuje to zastavení „nadbytečné“ imunitní reakce. Z hlediska nutné dlouhotrvající protinádorové reakce je to ale nevýhodné. Protože CTLA-4 exprimují také tlumící Treg

(regulační CD25⁺FOXP3⁺ T buňky). Inhibiční **anti-CTLA-4 protilátka** (ipililumab) udržuje stimulaci přes CD28 receptor, ale také napomáhá selektivní depleci intratumorálních Treg pomocí ADCC, a dokonce má i významnou úlohu při určování poměru CD4⁺/CD8⁺ v nádorovém mikroprostředí (tumor microenvironment, TME) (Mockler MB et al., 2014).

PD-1 je exprimován na **aktivovaných** T- a B-buňkách. V nádorovém mikroprostředí je aktivována vazbou s ligandy PD-L1 a PD-L2, které jsou fyziologicky prokazatelné na T- a B-lymfocytech, makrofázích, NK-buňkách, dendritických a žírných buňkách, které ale mohou nefyziologicky exprimovat i nádory, jako jsou melanomy, nemalobuňčné karcinomy plic (non-small lung cancer, NSCLC), urogenitální nádory, karcinomy ovárií, prsu, čípku, slinivky, žaludku a glioblastomy. Ligace PD-1 molekuly na povrchu T buněk způsobuje jejich inaktivaci, eventuálně i smrt. Proto „zaslepení“ PD-1 receptoru, případně jeho ligandů terapeutickými monoklonálními protilátkami vede k obnově T buněčné aktivity namířené proti nádoru. Terapeuticky účinná je nejenom protilátka proti PD-1, ale podobně působí i protilátka proti jednomu z jeho ligandů, anti- PD-L1 (Říhová B, Havel L, 2014; Alhaab HO et al., 2017).

Kontrolních bodů imunitní reakce je však mnohem více a jsou detekovatelné nejenom na T- buňkách, ale i na NK buňkách. V budoucnu budou nepochybně významnými cíly pro imunoterapii. Ve stavu vývoje jsou protilátky proti LAG3 (lymfocyty aktivujícímu genu 3), CD137, nebo TIM-3(mucin protein 3) (Andrews LP et al., 2017; Makkouk A et al., 2016; Du W et al., 2017).

1.3.3 Nová hodnotící kritéria imuno-onkologie

Kritéria odpovědi související s imunitou - Případný úspěch moderní imunoterapie nepochybně závisí i na správném hodnocení jejích výsledků. Způsob, kterým se podílí na likvidaci nádorů, je totiž zcela odlišný od klasických léčebných modalit, kterými je chirurgie, chemoterapie, radioterapie a hormonální terapie. Tam všude se používají standardní kritéria odpovědi, tzv. RC (response criteria), RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors), které pozitivně hodnotí prakticky jen okamžitý vliv na nádor, jeho zmenšení, nebo dokonce jeho úplné odstranění. V případě imunoterapie ale nejde o přímé a okamžité zničení nádorových buněk, ale o aktivaci imunitního systému pacienta, který teprve nádorové buňky zabije aktivovanými imunitními efektorovými mechanismy. Proto pozitivní reakce může být oddálená, může jí dokonce předcházet období dalšího růstu nádoru bez evidentního

bezprostředního léčebného účinku. Byly dokonce popsány i případy pacientů, kteří na protilátkovou léčbu reagovali až poté, co byla ukončena. Důvod je jednoduchý. K tomu, aby mohla aktivně zasáhnout specifická, adaptivní imunitní reakce, je třeba čas, a to nejméně několik dnů, spíše však několik týdnů, ve výjimečných případech i měsíců. Proto nová hodnotící kritéria odpovědi související s imunitou (**immune-related response criteria, irRC**) nevyklučují z pokračující terapie ani pacienty s dočasně progredující chorobou, protože hlavním kritériem je její dlouhotrvající stabilizace (disease-free state), popřípadě převedení na kontrolovanou chronickou formu (Říhová B, Havel L., 2014).

Celkově jsou irRC založeny na **třech hlavních principech** (Wolchok JD et al, 2009):

- 1)Nádorová zátěž: irRC snižují význam jednotlivé cílové léze ve prospěch celého "množství" onemocnění.
- 2)Potvrzení: jakákoli reakce, jiná než stabilní choroba (SD, stable disease), musí být potvrzena následným hodnocením nejméně **4 týdny** po první dokumentaci.
- 3)Nové léze: nemusí nutně představovat progredující chorobu (PD, progressive disease). Musí být zahrnuty do celé nádorové zátěže a jejich význam je podřízen následujícím **potvrzením**.

Klasická hodnotící kritéria RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) a nová imunologická kritéria odpovědi na léčbu irRC (immune-related response criteria) jsou porovnána v tabulce 1.

Tabulka 1: Převzato: Marrone KA, Brahmer JR. Using Immune Checkpoint Inhibitors in Lung Cancer. *Oncology (Williston Park)*. 2016 Aug;30(8):713-21.

Změny hranic tumoru dle konkrétní klasifikace- irRC versus RECIST		
Kritéria	irRC	RECIST verze 1.1
PD= (progressive disease)=progrese onem.	≥25% ↑oproti nejmenší hodnotě ve dvou po sobě jdoucích zobrazeních ≥4td po sobě	≥20% ↑ v součtu nejdelších rozměrů cílových lézí a absolutní ↑ ≥5 mm oproti nejmenšímu rozměru léze
SD=(stable disease)=stabilní onemocnění	50% ↓ oproti základní hodnotě nelze stanovit, ani 25% ↑ oproti nejmenší hodnotě	jak ↑, tak ↓ nepostačující pro PD nebo PR kritéria
PR=(partial response)= částečná odpověď	≥50% ↓oproti základní hodnotě ve dvou po sobě následujících pozorováních ≥4td po sobě	≥30% ↓ v součtu nejdelších rozměrů cílových lézí oproti bazální hodnotě součtu rozměrů
CR=(complete response)= úplná odpověď	Vymizení všech lézí ve dvou po sobě jdoucích vyšetřeních ≥4td po sobě	Vymizení všech lézí, na které je cílena terapie
Nová, měřitelná ložiska (≥ 5x5 mm)	Zavzatá do celkové hranice tumoru	Považována za PD
Nová, neměřitelná ložiska (<5 x 5 mm)	Nedefinují progresi, vylučují irRC	Záleží na základních hodnotách měření, mohou být považována za CR-PD v některých scénářích
"Non-index lesion"	Přispívají k definování irRC, je nutné jejich úplné vymizení	Považována za PD

*Jakákoli nádorová léze jiná než největší nádorová léze zaměřená na terapii.
irRC často vyžaduje potvrzení druhým následujícím hodnocením ≥ 4 týdny později
irCR= immune-related complete response=kompletní imunně navozená odpověď
RECIST= Response Evaluation Criteria In Solid Tumors= Kritéria pro hodnocení odpovědi u solidních nádorů

Pseudoprogrese představuje rizikovou situaci, protože může způsobit zastavení léčby. Je třeba zdůraznit, že mezi pacienty, kteří vykazují časnou pseudoprogresi, je mnoho těch, kteří budou později vykazovat významnou odpověď na léčbu (CR, complete response- kompletní remisi nebo PR, partial response- částečnou remisi) (Hodi FS et al., 2016).

Tři hypotézy se snaží vysvětlit "pseudoprogresi".(1) masivní infiltrace nádoru T lymfocyty po léčbě, (2) zvětšení zánětlivého nádorového prostředí, které může být indukováno (re)aktivovaným CTL proti nádorovým buňkám, což může vyvolat přechodné zvětšení nádorové hmoty, které vede k pseudoprogresi, (3) rychle rostoucí nádor, který může během intervalu mezi zahájením léčby a jejím biologickým účinkem zvýšit svou masu až na

jasnou progresí: v tomto případě bychom měli označovat efekt "přechodnou progresí" namísto "pseudoprogresí" (Wolchok JD et al, 2009).

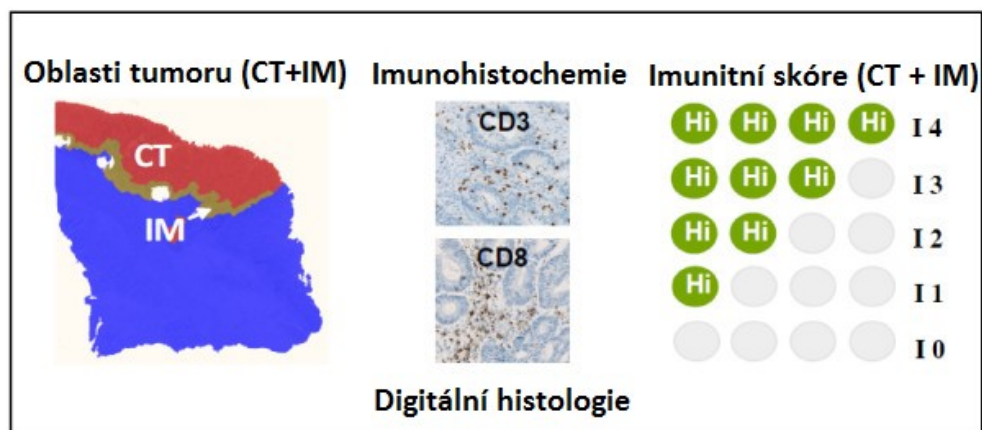
1.3.1 Imunitní klasifikace nádorů (Immunoscore)

Ruku v ruce spolu s potřebou nových hodnotících kritérií odpovědi na imunoterapii jde i potřeba nové klasifikace nádorů podle **reakce imunitního systému hostitele** na přítomnost nádoru. Současné klasifikace založené na TNM systému (tradiční nádorový staging AJCC / UICC-klasifikace TNM) hodnotí agresivitu onemocnění podle velikosti nádoru, postižení lymfatických uzlin a dle přítomnosti vzdálených metastáz (TNM systém). Podle těchto kategorií je odhadnuto stádium nádorového onemocnění a následně toto stádium nádorového onemocnění určuje algoritmus léčby. Nicméně je známo, že klinické výsledky se mohou významně lišit u pacientů ve stejném stádiu. Nádory pokročilého stupně mohou zůstat stabilní po dobu několika let, jsou známy i případy spontánní parciální či úplné regrese (jakkoliv jsou tyto případy vzácné) V kontrastu s těmito případy je výskyt relapsu, rychlé progresse nádorového růstu a smrt pacienta u 20-25 % TNM I/II stádia přes kompletní chirurgickou resekci, nepřítomnost nádorového postižení resekcčního okraje a nepřítomnost vzdálených metastáz (Mlecnik B et al., 2011). Přestože imunitní systém má klíčovou roli v progresi nádorového onemocnění, TNM systém nezohledňuje kvalitu imunitní obrany hostitelského organismu proti nádoru a hodnotí nádorové onemocnění jako autonomní proces nádorových buněk. Z těchto skutečností vyvstává potřeba zhodnotit význam protinádorové imunitní obrany a inkorporovat imunitní klasifikaci „immunoscore“ do stávajících klasifikačních systémů (TNM-I, TNM-Immune) k racionálnější stratifikaci pacientů, lepší predikci výsledků léčby, k vytipování pacientů profitujících ze systémové adjuvantní terapie či cílené imunoterapie. Podstatou této snahy je stanovení jednotlivých typů tumor-infiltrujících lymfocytů (tumor-infiltrating lymphocytes, TILs) v resekovaném nádoru a jejich význam pro prognózu pacienta. Pro reprodukovatelný a jednoduchý skórovací systém je nutné vytipovat TILs s nejvyšším prognostickým vlivem (prognostic impact, PI), tyto se ale mohou lišit podle typu nádoru a výsledná imunologická klasifikace může být nádorově specifická- to by znamenalo jiný skórovací systém pro kolorektální karcinom a jiný pro NSCLC, tomu již nasvědčují první výzkumy na tomto poli.

První mezinárodní pracovní skupina zabývající se otázkou inkorporace a validizace immunoscore byla vytvořena pro kolorektální karcinom a iniciovala vznik mezinárodních

prospektivních studií se sjednoceným skórovacím systémem, jež prezentoval Galon et al. Navrhl klasifikaci založenou na 2 buněčných typech (CD3/CD45RO, versus CD3/CD8 nebo CD8/CD45RO) a dvou oblastech buněčného infiltrátu (centrum tumoru- CT, versus invazivní okraj- invasive margin, IM) při hodnocení parafínových řezů v kombinaci s imunohistochemickým barvením. Následně nádory rozdělil do 4 klasifikačních skupin od immunoscore 0 (I0), kde byla velmi nízká denzita obou typů sledovaných buněk v obou oblastech nádoru, do immunoscore 4 (I4), kde byla naopak vysoká denzita obou typů buněk v centru i v invazivních okrajích nádoru (Galon et al., 2012).

Obrázek 1: Převzato z: Galon J et al. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. J Transl Med. 2012 Oct 3;10:205. doi: 10.1186/1479-5876-10-205.



Tento imunoscórovací přístup byl použit u dvou nezávislých kohort pacientů s kolorektálním karcinomem (n=602) nízkého stadia, bez uzlinových či vzdálených metastáz. U této skupiny není indikována adjuvantní protinádorová terapie po chirurgickém výkonu. Pouze 4,8 % pacientů s vysokým I4 mělo relaps do 5 let a 86,2 % pacientů žilo. Naopak 72 % pacientů s nízkým I0 nebo I1 do pěti let relabovalo a pouze 27,5 % přežilo 5 let. A právě tyto pacienti s immunoscore I0 nebo I1 by mohly potencionálně profitovat z adjuvantní terapie (Pages et al, 2009). Tyto výsledky naznačují, že nikoliv nádorový status, ale přítomnost imunitního infiltrátu (specifických paměťových a cytotoxických buněk) je klíčovým indikátorem pro rekurenci onemocnění, metastazování i pro prognózu a klinický výsledek onemocnění. Schopnost efektorových T buněk poznat nádorové antigeny, se kterými se dříve již setkaly, vede k ochranné odpovědi. Po primární expozici nádorovému antigenu jsou paměťové T

buňky diseminovány a udržovány po dlhouhá časová období v cirkulaci. Tato dlouhodobá protinádorová kapacita paměťových buněk pak vede k prevenci rekurence.

Pouze jedna retrospektivní studie pojednává o významu TILs ve vztahu k immunoscore u NSCLC . Jedná se o norskodánskou studii (n=797) hodnotící infiltraci tumoru stromálními CD8⁺ T lymfocyty, které považuje za nejslibnější kandidáty pro TNM-I u NSCLC a stanovuje prognostický význam CD8⁺ TILs (tumor-infiltrating lymphocytes) napříč patologickými stadii u pacientů s NSCLC I-IIIa. V parafinových řezech (TMAs, Tissue Microarrays) a v kombinaci s imunohistochemickým barvením stanovuje nízkou, střední a vysokou hustotu stromálních CD8⁺ lymfocytů (cut-off 25 % a 50 %). Hustota stromálních CD8⁺ TILs je nezávislým prognostickým faktorem pro celkové přežití (OS, overall survival), pro přežití specifické pro nemoc (DSS, disease specific survival) a pro dobu bez známek nemoci (DFS, disease free survival). Prognosticky vyšší význam mají CD8⁺ lymfocyty invazivních okrajů (IM), ale takto byly rozlišeny jen u dánské subpopulace této studie. Ukazuje se, že hustota CD8⁺ T lymfocytů je signifikantním prognostickým markerem v rámci každého patologického stádia (pStage). Nejmarkantnější rozdíl v prognóze je patrný u nádorů klinického stádia IIIa, kde 5ti roční DSS u pacientů s nízkou hustotou CD8⁺ lymfocytů je pouze 18 % oproti 68 % pacientům s vysokou hustotou CD8⁺ TILs v jejich nádoru (Donnem et al. 2015). Naopak celkové přežití (OS) je srovnatelné u stádia IA s nízkou hustotou stromálních CD8⁺ T lymfocytů v porovnání s pacienty stádia IIIa a vysokou denzitou (58 % versus 55 %) viz tabulka 2 (Donnem T. et al. 2016).

Tabulka 2. Převzato z: Donnem T et al. Strategies for clinical implementation of TNM-Immunoscore in resected nonsmall-cell lung cancer. Ann Oncol. 2016 Feb;27(2):225-32. doi: 10.1093/annonc/mdv560. Epub 2015 Nov 16.

TNM-I	Imunitní skóre (stromální CD8)			
	Nízké	Střední	Vysoké	
Stádium	IA	58	60	79
	IB	50	59	67
	IIA	39	45	49
	IIB	25	42	40
	IIIA	17	30	55
5 let přežití (OS=overall survival)				
< 40%				
40-59%				
60-80%				

Zájem o TILs jako o prognostický nástroj se zvyšuje, je ale nutné se přesunout od retrospektivních studií k prospektivním. U karcinomu plic jsou nejslibnějším kandidátem CD8+ TILs, dalšími kandidáty pro prospektivní studie jsou CD3, CD4 a CD45RO a je nutné stanovit jejich vliv na prognózu v rámci každého patologického stádia (pStage).

Existuje úzká spojitost mezi těmito markery (TILs) a novou cílenou imunoterapií, z toho vyplývá velký potenciál TNM-I jako prediktivního faktoru. Terapie cílená na CTLA-4 / PD1 / PD-L1 („Check-point inhibitory“) nutně potřebuje validní prediktivní markery. Imunohistochemicky prokázaná exprese PD-L1 se ukazuje být nadějným prediktorem odpovědi na PD1/PD-L1 inhibitory, ale pacienti s nízkou expresí PD-L1, mohou přesto vykazovat signifikantní odpověď na tuto léčbu. Zhodnocení TNM-I jako prediktivního nástroje v nastavení adjuvantní imunoterapie je vysoce zajímavé (Donnem et al, 2016).

1.4 *Nádorová imunologie karcinomu plic*

1.4.1 **Epidemiologie karcinomu plic a klinické souvislosti**

Karcinom plic je nejčastější příčinou úmrtí na maligní onemocnění s hodnotou pětiletého přežití 5% až 15%. V celosvětovém měřítku zůstává nejčastějším typem zhoubného bujení u mužů s nejvyšším výskytem v centrální a východní Evropě (53,5 na 100 000) (Ferlay J et al., 2012). S počtem nových případů rakoviny plic stoupajícím každý rok o 3% je kouření tabákových výrobků hlavním rizikovým faktorem odpovědným za bezmála 90% nově diagnostikovaných karcinomů. Souvislost mezi kouřením a rakovinou plic dokázána již v roce 1950 (Doll R, Hill AB, 1950) a od té doby je již role kouření v kancerogenezi dobře stanovená (Bozinovski et al., 2016). Cigaretový kouř obsahuje množství toxických složek (Carbone D, 1992), které mohou přímo aktivovat onkogeny nebo způsobit epigenetické změny genomu. Kouření dále přispívá k nádorem podněcovanému zánětu, snižuje mukociliární clearance, nebo brzdí imunitní systém (Hindman IJ, 2016). Většina případů karcinomů plic (80% -85%) jsou nemalobuněčné karcinomy (non-small cell lung cancer, NSCLC), který zahrnuje tři histologické podtypy: adenokarcinom (AC), spinocelulární karcinom (SCC), a velkobuněčný karcinom (5%). Poměr histologických podtypů NSCLC se měnil v průběhu let z původně převládajícího spinocelulárního karcinomu (který nyní tvoří přibližně 30% případů) na adenokarcinom, který je nyní nejpočetnější histologický podtyp (50% případů). Zbývajících 15% až 20% případů karcinomu plic jsou přičítány malobuněčnému karcinomu (small-cell lung cancer, SCLC). Odhaduje se, že 10% až 25% případů karcinomu plic se celosvětově vyskytuje u přísných nekuřáků (tj jednotlivců, kteří vykouřili méně než 100 cigaret za celý svůj život) (Couraud S et al, 2012). Karcinom plic se u nekuřáků vyskytuje především v podobě adenokarcinomu a vyskytuje se s vyšší frekvencí u žen v porovnání s muži (v Asii > v Severní Americe > v Evropě). Nicméně, mortalita je u žen a u mužů obdobná. SCLC je velmi vzácný u nekuřáků. Mezi důležité faktory určující vznik karcinomu plic u nekuřáků patří dědičné riziko, pasivní kouření, znečištění ovzduší, ionizující záření, předcházející plicní onemocnění, strava a hormonální změny (Couraud S et al. 2012; Yano et al, 2011).

1.4.2 Specifická humorální odpověď proti karcinomu plic

Obecně platí, že incidence a mortalita plicní rakoviny jsou nadále vysoké; proto je naléhavě nutné detekovat časná stádia onemocnění a monitorovat recidivy po protinádorové terapii. Sérologická detekce autoprotilátek proti nádorově specifickým (TSA) nebo s nádorem asociovaným antigenům (TAA) představuje jednoduchý nástroj nejen pro identifikaci prognostických markerů, ale také pro hodnocení imunitní odpovědi na terapii u pacientů s karcinomem (Kobold S et al, 2010). Nejčastěji jsou analyzované humorální odpovědi proti antigenům p53, MUC1, c-myc, NY-ESO-1, survivin, p62, Her2/neu and cyclin B1 (Reuschenbach M et al, 2009). V současnosti je však otevřena diskuse o klinické hodnotě těchto autoprotilátek u maligních onemocnění (Kobold S et al, 2010; Reuschenbach M et al, 2009). U karcinomu plic je jediný komerčně dostupný test na autoprotilátky, test skládající se ze sedmi antigenů (p53, NY-ESO-1, CAGE, GBU4-5, SOX2, HuD and MAGE-A4), který byl nedávno ověřen ve studii případů-kontrol (1613 pacientů) a může být použit jako doplňkový nástroj k CT antigenům (cancer testis antigens, CTA) k detekci časných stádií onemocnění. Nicméně, i když tento test dosahuje vynikající 90% specifity, jeho sensitivita zůstává stále relativně nízká (přibližně 41%) (Jett JR et al, 2014; Chapman CJ et al, 2012). Přes kontroverzní výsledky prognostického nebo diagnostického významu autoprotilátek, pochopení vlastností a důležitosti nádorově specifické humorální nebo buněčné imunitní odpovědi zůstává nezbytnou podmínkou pro rozvoj strategií k časné detekci a cílené terapii plicního karcinomu.

1.4.3 Současné možnosti imunoterapie u NSCLC

Současné pokroky v chápání funkcí imunitního systému a schopností nádorových buněk se účinkům imunitního systému vyhýbat vedly k vývoji nových léčebných strategií, které by mohly v budoucnu prokázat účinnost u nemalobuzněčného karcinomu plic. Zejména se jedná o inhibitory kontrolních systémů imunitních reakcí (inhibitory KBIR): anti-PD-1, anti-PD-L1 a anti-CTLA-4. Slibný vývoj rovněž probíhá na poli protinádorových vakcín.

1.4.3.1 Checkpoint inhibitory v léčbě NSCLC

Léčba níže uvedenými látkami má některé společné rysy. To, co činí z klinického pohledu tyto látky zcela unikátními, je jednak charakter léčebné odpovědi, jednak zcela nový, od klasických protinádorových léčiv absolutně odlišný profil nežádoucích účinků.

Zdá se, že u určitého procenta nemocných lze navodit i dlouhotrvající léčebnou odpověď, což je v kontextu dosavadních léčebných možností unikátní. Klasické metody hodnocení léčebné odpovědi zde neřídka selhávají a může docházet i k omylům v hodnocení odpovědi v neprospěch pacienta.

Nahromaděním imunitních buněk v nádoru může v časně fázi léčby dojít k paradoxnímu zvětšení nádoru, nebo i manifestaci metastáz, které doposud nebyly detekovatelné. S těmito pseudoprogresemi je potřeba počítat a při dobrém stavu pacienta by neměly být samy o sobě důvodem k ukončení léčby. Nová kritéria hodnocení léčebné odpovědi u imunoterapií byla již navržena- viz příslušná kapitola 1.3.3. a tabulka 1. Obecně se však zdá, že jakákoliv radiologická progresse v prvních měsících léčby by neměla být důvodem k ukončení léčby, pokud se stav nemocného klinicky zlepšuje. Dále je třeba počítat s tím, že k rozvinutí protinádorového účinku je zapotřebí delšího času než při použití chemoterapie (cca 6-8 týdnů). Toto je dáno dobou nutnou k aktivaci imunitního systému.

Profil toxicit je zásadně odlišný od toxicit, na které jsme zvyklí při léčbě cytostatiky. Stejně tak odlišné jsou i metody jejich zvládnání. Většina nežádoucích účinků vyplývá z autoimunitního poškození normálních tkání při navození aktivaci imunitního systému. Časté jsou dermatitidy, kolitidy, pneumonitidy, hypofyzitidy a thyroditidy, méně časté hepatitidy a nefritidy. Riziko těchto nežádoucích účinků spočívá v tom, že pokud nejsou rozpoznány a adekvátně léčeny, mohou končit i fatálně. Jejich léčba spočívá v časně aplikaci vysokých dávek kortikosteroidů či imunosupresiv (Říhová B, Havel L., 2014).

1.4.3.1.1 Anti PD-1 protilátky

Systém PD-1/PD-L1 představuje primární metodu imunologického úniku tumoru- upregulací systému dojde k navození tolerance vůči nádoru, čímž se vytvoří vhodné podmínky pro jeho následnou progresi (systém podrobněji popsán výše v kapitole 1.1.4.3). principem účinku anti-PD-1 protilátek je tedy inhibice inhibičního systému, což má za cíl posílit funkci chronicky vyčerpaných tumor-specifických T- buněk a obnovit buněčnou odpověď.

Nivolumab (BMS-936558, Bristol-Myers Squibb, Opdivo)

Jedná se o plně humánní IgG4 monoklonální protilátku cílenou na PD-1. Ve studii fáze I byl zkoušen u 296 těžce předlěčených pacientů, z toho 122 s NSCLC. Analýza účinnosti byla provedena u 76 nemocných. V kohortách 1 mg/kg, 3 mg/kg a 10 mg/kg nivolumabu á 2 týdny bylo dle RECIST (response evaluation criteria in solid tumors) zaznamenáno 6%, 32% a 18% léčebných odpovědí. Bylo hlášeno dvouleté přežití ve 24% (Topalian SL, 2012). Nivolumab jako první linie léčby byl testován ve fázi I klinické studie u 52 pacientů s pokročilým karcinomem ve IV stádiu (CheckMate 012) - byla potvrzena jeho bezpečnost, zaznamenáno celkově 24% léčebných odpovědí včetně 4 trvajících kompletních odpovědí, roční přežití dosáhlo 73%, přežití po 18 měsících činilo 57% (Gettinger S et al, 2016).

Jsou známy výsledky dvou klinických studií fáze III., kde byl nivolumab léčivem ve druhé linii po selhání platiny: První z nich hodnotí nivolumab versus docetaxel (klinická studie CA 209-017, CheckMate 017) u 272 pacientů s pokročilým a předlěčeným skvamózním NSCLC, celkové přežití 42% vs 24%, léčebná odpověď 20% vs 9%, tedy výrazně lepší s nivolumabem oproti docetaxelu, bez ohledu na úroveň exprese PD-L1. Riziko úmrtí bylo o 41% nižší s nivolumabem oproti docetaxelu. Nežádoucí účinky 3. a 4. stupně byly zaznamenány v 7% ve skupině nivolumabu oproti 55% ve skupině docetaxelu (Brahmer J et al., 2015). Tato komparativní studie byla časně zastavena nezávislým výborem monitorujícím data-nivolumab v ní demonstroval natolik vyšší celkové přežití oproti kontrolní skupině, že bylo dosaženo cíle studie a pacientům v kontrolní skupině (léčených docetaxelem) byla nabídnuta možnost dále pokračovat v léčbě nivolumabem.

Druhá studie porovnávala nivolumab versus docetaxel u neskvamózního karcinomu (klinická studie CA 209-057, CheckMate 057). V této studii bylo celkové přežití v jednom roce (51% vs 39%) a po 18 měsících (39% vs. 23%) ve prospěch nivolumabu, léčebná odpověď byla zaznamenána v 19% s nivolumabem oproti 12% s docetaxelem s nízkým rizikem závažných nežádoucích účinků u nivolumabu (10 %) oproti docetaxelu (54%) (Borghaei H et al, 2015)

V současnosti probíhá 8 studií fáze III (přehled v tabulce 3), za zmínku stojí studie, v níž je porovnáována účinnost nivolumabu v první linii u pacientů s pokročilým NSCLC všech histologických typů (klinická studie CheckMate 227), výsledky dosud nejsou známy.

V indikaci neresekabilní melanom je nivolumab registrován od 7/2014 v Japonsku pod obchodním názvem Opdivo, což je vůbec celosvětově první registrace anti-PD1 léčiva.

Pembrolizumab (MK-3475, MSD- Merck, Sharp & Dohme , Keytruda)

Jedná se o humanizovanou IgG4 monoklonální protilátku proti PD-1. Ve fázi I byl pembrolizumab zkoušen v dávce 10 mg/kg každé 3 týdny i.v. Léčebná odpověď byla zaznamenána v závislosti na hodnotících kritériích u 21-24% nemocných (Garon EB et al., 2013).

Fáze III klinické studie pro pembrolizumab v druhé linii léčby po selhání platiny u NSCLC v porovnání s docetaxelem (Keynote-010, n= 1034) potvrdila účinnost pembrolizumabu a prodloužení DSF i OS oproti docetaxelu ve větvi s 2 mg/kg pembrolizumabu i 10 mg/kg pembrolizumabu. V této studii byla prvně definována korelace mezi silou exprese PD-L1 v nádorové tkáni a účinností léčby. U pacientů s expresí PD-L1 u alespoň 50 % nádorových buněk bylo celkové přežití (OS) signifikantně delší u obou větví s pembrolizumabem (2g/kg a 10 g/kg) 14,9 a 17,9 měsíců oproti 8,2 měsícům ve větvi s docetaxelem. Závažné nežadoucí účinky se vyskytly u pembrolizumabu u 13% a 16% pacientů v závislosti na dávce oproti 35% u docetaxelu. V současné době probíhá studie fáze III, kde je podáván pembrolizumab v první linii léčby pro metastatický skvamozní NSCLC v kombinaci s platinou a paclitaxelem (Keynote-407), viz tabulka 3. Výsledky této studie nejsou známy. Pro léčbu pokročilého melanomu byl lék registrován v USA 9/2014 pod obchodním názvem Keytruda.

1.4.3.1.2 Anti PD-L1 protilátky

Fungují obdobně jako anti PD-1 mechanismem blokády interakce mezi PD-1 a PD-L1.

Atezolizumab (MPDL3280A, Genentech/Roche)

V časně fázi klinického hodnocení byla zaznamenána léčebná odpověď u 24% nemocných. Byla též zaznamenána korelace mezi expresí PD-L1 a léčebnou odpovědí. V současnosti probíhají u NSCLC 4 studie fáze III, viz tabulka 3.

Durvalumab (MEDI4736, MedImmune/AstraZeneca)

Proběhla úspěšná studie fáze I a v současné době probíhají 2 studie fáze III, viz tabulka 3.

1.4.3.1.3 Anti CTLA-4 protilátky

CTLA-4 je kontrolní systém, ovlivňující zejména časnou fázi aktivace T-lymfocytů. Je to negativně koregulační molekula lokalizovaná na T-lymfocytech. Princip účinku, tedy blokáda blokády s následnou aktivací T-lymfocytů, je obdobný jako u PD-1 systému.

Ipilimumab (Yervoy, BMS)

Je to plně humánní monoklonální protilátka inhibující CTLA-4. Ve studii fáze II bylo zkoušeno její časně či odložené podání ve vztahu k chemoterapii, přičemž odložené podání (až od 3. cyklu chemoterapie se prokázalo jako účinnější (12,2 měsíce vs. 8,3 měsíce vs. 8,3 měsíce při samostatné chemoterapii). V současné době se dokončuje jedna studie fáze III – kombinace chemoterapie a ipilimumabu u 4. stadia skvamozního karcinomu. Probíhá 6 studií fáze III, kde je ipilimumab podáván v kombinaci s nivolumabem.

Tremelimumab (MedImunne/AstraZeneca)

Jedná se o monoklonální protilátku proti CTLA-4 původně vyvinutou firmou Pfizer. Již před 8 lety byl zkoušen v udržovací léčbě NSCLC, ale vlivem nesprávně zvoleného dávkovacího schématu látka neprokázala účinnost. V současnosti probíhají kombinační studie s MEDI4736 (Durvalumab), ověřující koncept duální CTLA-4 a PD-L1 blokády, viz tabulka 3.

Tabulka 3: Checkpoint inhibitory v probíhajících studiích fáze III

ATEZOLIZUMAB (anti PD-L1)		
1.	A Study of Atezolizumab in Combination With Carboplatin + Paclitaxel or Carboplatin + Nab-paclitaxel Compared With Carboplatin + Nab-paclitaxel in Participants With Stage IV Squamous Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) [IMpower 131]	GO29437, NCI-2015-01198, 2014-003208-59, NCT02367794
2.	A Study of Atezolizumab (MPDL3280A) Compared With a Platinum Agent (Cisplatin or Carboplatin) + (Pemetrexed or Gemcitabine) in Participants With Stage IV Non-Squamous or Squamous Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) [IMpower110]	GO29431, NCI-2015-01580, 2014-003083-21, NCT02409342
3.	Study to Assess Safety and Efficacy of Atezolizumab (MPDL3280A) Compared to Best Supportive Care Following Chemotherapy in Patients With Lung Cancer [IMpower010]	GO29527, NCI-2015-01731, 2014-003205-15, NCT02486718
4.	A Study of Atezolizumab in Combination With Carboplatin or Cisplatin + Pemetrexed Compared With Carboplatin or Cisplatin + Pemetrexed in Participants Who Are Chemotherapy-Naive and Have Stage IV Non-Squamous Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) (IMpower 132)	GO29438, NCI-2016-00354, 2015-003605-42, NCT02657434
DURVALUMAB (anti PD-L1)		
1.	Lung-MAP: Biomarker-Targeted Second-Line Therapy in Treating Patients with Recurrent Stage IV Squamous Cell Lung Cancer	S1400, NCI-2014-00627, S1400A, S1400B, S1400C, S1400D, S1400E, S1400I, NCT02154490
2.	Double Blind Placebo Controlled Controlled Study of Adjuvant MEDI4736 In Completely Resected NSCLC	BR31, NCI-2015-01967, ACTRN12615000323527, IFCT1401, NCT02273375
TREMELIMUMAB (anti CTLA-4)		
1.	Phase III Open Label First Line Therapy Study of MEDI 4736 (Durvalumab) With or Without Tremelimumab Versus SOC in Non Small-Cell Lung Cancer (NSCLC). (MYSTIC)	NCT02453282
2.	Study of 1st Line Therapy Study of Durvalumab With Tremelimumab Versus SoC in Non Small-Cell Lung Cancer (NSCLC) (NEPTUNE). (NEPTUNE)	NCT02542293
4.	A Global Study to Assess the Effects of MEDI4736, Given as Monotherapy or in Combination With Tremelimumab Determined by PD-L1 Expression Versus Standard of Care in Patients With Locally Advanced or Metastatic Non Small Cell Lung Cancer (ARCTIC)	NCT02352948

1.4.3.2 Vakcíny v léčbě NSCLC

1.4.3.2.1 Klasické vakcíny u pacientů s NSCLC

Vakcíny většinou sestávají z části specificky cílené na nádorový antigen a adjuvans, které potencuje imunitní odpověď. Mohou být založené na jediném specifickém antigenu nebo odvozené z celých nádorových buněk. Některé studie vyžadují prediktivní stanovení např. určitého HLA typu a potvrzení přítomnosti nádorově specifického antigenu.

Melanocytární antigen-A3(MAGE-A3)

MAGE-A3 protein je normálně exprimován pouze na nádorových buňkách, nikoli na buňkách somatických. Vyskytuje se u 30-50 % karcinomů plic v závislosti na stádiu a histologickém typu a je spojován s horší prognózou (Sienel W et al., 2004). Publikovaná studie fáze II hodnotila účinek vakcíny u MAGE-A3 pozitivních pacientů v adjuvantním podání po radikálním chirurgickém zákroku (Vansteenkiste J et al., 2013). Primárním cílem studie bylo prodloužení doby bez známek nemoci (DFS, disease free survival). Pacienti byli randomizováni v poměru 2:1 (vakcína vs. placebo). Celkem bylo zařazeno 182 pacientů- 122 do ramene s vakcínou a 60 do ramene s placebem. Ve vakcinačním rameni došlo k recidivě u 35% nemocných, v rameni s placebo ve 43 %. Přestože výsledky DFS ani OS (celkové přežití, overall survival) nebyl statisticky signifikantní, stala se tato studie základem pro dosud největší studii provedenou u pacientů s NSCLC- MAGRIT. Jednalo se o studii fáze III, do které bylo zařazeno 2 312 MAGE-A3 pozitivních pacientů stadia IB-IIIa, kteří podstoupili radikální chirurgický zákrok. Adjuvantní chemoterapie byla povolena. Výsledky studie byly publikovány v roce 2016, cíle studie nebylo dosaženo, adjuvantní podání této vakcíny nevedlo k prodloužení DFS a další vývoj byl zasaťven (Vansteenkiste JF et al., 2016; Říhová B, Havel L., 2014).

Tacemotid (Stimuvax, L-BLP25)- liposomální anti-MUC1 vakcína

Mucin 1 je membránový glykoprotein exprimovaný různými typy nádorů (plíce, prs, slinivka, žaludek, tlusté střevo) (Ho SB et al, 1993). Hraje významnou úlohu mezi nádorovými a epiteliálními buňkami, je spojován s onkogenezí a chemorezistencí(Sangha R, Butts C, 2007). Tacemotid sestává z peptidu o 25 aminokyselinách v liposomálním adjuvans. Ve studii fáze II byl účinek vakcíny zkoumán u 171 nemocných stadia IIIB/IV. Studie neprokázala statisticky významné prodloužení celkového přežití, nicméně byl zjištěn jistý prospěch v přežití u pacientů stadia IIIB (Butts C et al, 2005). To se stalo teoretickým cílem

pro studii START. Do ní bylo zařazeno 1513 pacientů s neresekabilním NSCLC ve stádiu III, kteří neměli progresi po primární chemoradioterapii. Pacienti byli randomizováni 2:1 k adjuvantní léčbě L- BLP25 nebo k placebo. Medián celkového přežití byl 25,6 měsíce pro L-BLP25 a 22,3 měsíce pro placebo. Přestože primárního cíle- prodloužení OS- nebylo dosaženo, povzbuzujících výsledků bylo dosaženo ve skupině nemocných s konkomitantní chemoradioterapií (806 pacientů). Střední doba přežití byla 30,8 měsíce pro L-BLP25 a 20,6 měsíce pro placebo (Butts C et al, 2013). Vzhledem k posledním datům o účinnosti tacemotidu (negativní japonská studie) byl 12. 9. 2014 celý program vývoje tacemotidu zastaven (Říhová B, Havel L., 2014).

Belagenpumatucel- L (Lucanix)

TGFβ2 má důležité postavení při regulaci růstu a funkci normálních i nádorových buněk. Inhibuje NK- buňky a jeho koncentrace negativně koreluje s prognózou NSCLC. Belagenpumatucel-L je nevirová, geneticky modifikovaná allogenní vakcína s potenciálně imunostimulačním a protinádorovým účinkem. Vyrábí se ze čtyř buněčných linií NSCLC ošetřených zářením, s inkorporovaným antiplasmidem TGFβ2. Tím dojde k potlačení exprese TGFβ2 a k posílení imunitní odpovědi.

Ve studii fáze II pokročilého NSCLC byla zjištěna 15 % odpověď na vakcínu a po 4 měsících léčby nebyla zjištěna progrese nádoru u 59% nemocných (Nemunaitis J et al, 2006).

Ve studii fáze III (STOP) bylo zařazeno 832 nemocných s NSCLC ve stádiu IIIA/IV. Studie neprokázala prodloužení celkového přežití v konsolidační léčbě po první linii chemoterapie. Nicméně v subanalýze se prokázalo významně prodloužené celkové přežití nemocných s NSCLC ve stádiu IIIB/IV, kteří začali léčbu belagenpumatucelem do 12 týdnů po skončení chemoterapie. Prodloužené přežití bylo též zaznamenáno u nemocných s karcinomem jiným než adenokarcinomem (Říhová B, Havel L., 2014).

1.4.3.2.2 Vakcíny z dendritických buněk (DCVAC) u pacientů s NSCLC

Podstatou je separace pacientových dendritických buněk a jejich následná aktivace ex vivo pomocí nádorových antigenů. Aktivované buňky jsou zpětně aplikovány pacientovi.

V klinických studiích (Galluzzi L et al, 2014) bylo hodnoceno několik imunoterapeutických přístupů s různou úspěšností, včetně imunoterapie s dendritickými buňkami (DC) generovanými ex vivo, které byly stimulovány rekombinantními antigeny asociovanými s nádory (TAA) nebo syntetickými peptidy pocházejícími z TAA, celými

usmrcenými nádorovými buňkami, buněčnými lyzáty nebo TAA-kódující mRNA (Vacchelli E et al., 2013; Datta J et al., 2014). DC mají významnou roli při vyvolání a přizpůsobování imunitní odpovědi a ukázaly se jako klíčové při indukci protinádorové imunity (Datta J et al., 2014; Banchereau J et al., 2000). Od první klinické studie založené na dendritických buňkách v roce 1995 (Mukherji B et al., 1995) se vyvinula technika výroby DC vakcín ex vivo, která vedla k rozsáhlé výrobě odpovídající přísným požadavkům správné výrobní praxe (Good Manufacturing Practices - GMP). Úspěch protinádorové imunoterapie na bázi dendritických buněk byl dokumentován v roce 2010 schválením Sipuleucel-T (Provenge) agenturou FDA (Food and Drug Administration- FDA) pro léčbu pacientů s asymptomatickým nebo minimálně symptomatickým metastatickým karcinomem prostaty rezistentním na kastraci (Sheikh NA et al., 2013). Léčba aktivovanými dendritickými buňkami je nyní testována u několika druhů solidních nádorů včetně NSCLC ve fázi I-II klinické studie, jedná se o přípravek vyvinutý v české republice (Podrazil M, 2015).

Na rozdíl od jiných maligních onemocnění existuje jen málo údajů o imunoterapii karcinomu plic na bázi dendritických buněk v klinických studiích (Datta J. et al., 2014). Za posledních 10 let proběhlo několik klinických studií fáze I pro léčbu NSCLC pomocí DC vakcín vytvořených podle různých protokolů a stimulovaných peptidy odvozenými z TAA (Ueda Y et al, 2004; Perroud MW et al., 2011; Babatz J et al., 2006; Takahashi H et al., 2013), proteiny (Morse MA et al, 2005) nebo lyzáty nádorových buněk (Kontani K et al., 2003; Chang GC et al 2005; Engell-Noerregaard L et al, 2013). Překvapivě pouze jedna výzkumná skupina použila ozařované a UVB-ošetřené alogenní celé nádorové buňky k vytvoření DC-vakcíny proti plicnímu karcinomu (Hirschowitz EA et al, 2007, 2004 et 2011; Yannelli JR et al., 2005). Tyto studie dokázaly, že imunoterapie NSCLC založená na dendritických buňkách je bezpečná a dobře snášená a u některých pacientů byl pozorován klinický přínos. Dosud byly publikovány pouze dvě studie, které zdokumentovaly prodloužené celkové přežití pacientů s NSCLC (Takahashi H et al, 2013; Engell-Noerregaard L et al, 2013).

Úspěch imunoterapie malignit na bázi dendritických buněk závisí na rozsahu tumor-asociovaných antigenů (TAA), který je prezentován dendritickými buňkami a na kapacitě DC k produkci cytokinů jako je IL-12p70, a ke kostimulaci T buněk (Datta J. et al, 2014).

Bylo popsáno několik protinádorových chemoterapeutik a fyzikálních modalit indukujících imunogenní buněčnou smrt (ICD) nádorových buněk (Kroemer G et al., 2013; Adkins I et al, 2014). ICD u nádorových buněk je charakterizována indukcí stresové odpovědi endoplazmatického retikula, produkcí reaktivních kyslíkových radikálů a povrchovou expozicí / emisí molekul spojených s nebezpečím (danger- associated molecules), jako je

kalretikulin, proteiny tepelného šoku, HMGB1 nebo ATP (Kroemer G et al, 2013; Tesniere A et al., 2008; Krysko DV et al., 2012). Nádorové buňky podstupující ICD aktivují různé imunitní buňky včetně DC ke stimulaci protinádorové imunitní odpovědi (Kroemer G et al., 2013; Krysko DV et al., 2012). Bylo prokázáno, že aplikace vysokého hydrostatického tlaku (HHP) na buněčné linie karcinomu ovaria a karcinomu prostaty vyvolává ICD (Fučíková J et al., 2014). Lidské DC odvozené z monocytů a pulsované s nádorovými buňkami usmrcenými HHP zvýšily expresi molekul spojených s dozráváním a produkcí cytokinů, které vedly ke stimulaci CD8⁺ a CD4⁺ T buněk produkujících IFN- γ in vitro (Fučíková J et al., 2014). V současné studii popisujeme generování vakcíny proti NSCLC založené na dendritických buňkách s použitím imunogenních buněčných linií NSCLC H520 a H522, které jsou usmrceny HHP, jako zdroje TAA a tato data představují preklinické údaje pro probíhající klinickou studii fáze I / II NSCLC, která kombinuje aktivní buněčnou imunoterapii na bázi DC s chemoterapií a imunitními enhancery (NCT02470468).

2 Vymezení cílů práce, včetně stanovení hypotéz

Předcházející teoretická část shrnuje současné poznatky v oblasti nádorové biologie z hlediska komplexního pohledu na nádorové mikroprostředí, se zaměřením na imunitní systém, jeho humorální i celulární výkonné složky, a jeho úlohu v obraně proti nádorům. Problematika, kterou řešíme byla shrnuta do dvou tématických celků:

2.1 *Humorální protinádorová imunitní odpověď: frekvence specifických protilátek*

Cílem naší studie je určit frekvence specifických protinádorových protilátek NY-ESO-1, Her2/*neu* a MAGE-A4 v séru pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC) a zjistit zda tyto frekvence korelují s některou z klinicko-patologických charakteristik souboru pacientů.

Hypotézy:

- Frekvence protilátek NY-ESO-1, Her2/*neu* a MAGE-A4 jsou vyšší v séru pacientů oproti frekvencím u kontrolních pacientů.
- Frekvence protilátek NY-ESO-1, Her2/*neu* a MAGE-A4 v séru pacientů korelují s některou z klinicko-patologických charakteristik souboru pacientů s NSCLC: věk, pohlaví, histologický subtyp NSCLC, stupeň diferenciacie nádoru, stádium onemocnění, anamnéza kouření.
- Séropozitivita protilátek NY-ESO-1, Her2/*neu* a MAGE-A4 v séru pacientů s NSCLC se vyskytuje v přítomnosti nádorů s mRNA expresí odpovídajících antigenů.

2.2 *Celulární protinádorová imunitní odpověď: in vitro imungenicita a stabilita vakcíny z dendritických buněk*

Cílem studie je ověřit imonogenicitu a stabilitu vakcíny z dendritických buněk prezentující antigeny nádorových buněk NSCLC usmrcených hydrostatickým tlakem (DC-HHP vakcína proti karcinomu plic).

Hypotézy:

- Vysoký hydrostatický tlak navozuje v nádorových buňkách NSCLC imunogenní buněčnou smrt.
- DC-HHP vakcína proti karcinomu plic manifestuje zralý fenotyp, produkuje prozánětlivé cytokiny a zvyšuje chemotaktickou migraci

- DC-HHP vakcína proti karcinomu plic vykazuje vyšší maturaci a cytokinovou produkci v médiu obsahujícím sérum po následné LPS a CD40L stimulaci
- DC-HHP vakcína proti karcinomu plic stimuluje efektorové T lymfocyty
- DC-HHP vakcína proti karcinomu plic individualizovaná u konkrétních pacientů s NSCLC indukuje nádor specifické buněčné odpovědi

3 Popis použitých experimentálních metod, včetně statistických

3.1 *Metody ve studii specifické humorální protinádorové imunitní odpovědi*

3.1.1 Charakteristika souboru pacientů

V prvním období naší studie jsme získali periferní krev od 57 pacientů, kteří podstoupili operaci pro nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC) ve Fakultní nemocnici v Motole na III.chirurgické klinice v období od října 2009 do března 2012 (kohorta I). Všichni tito pacienti s NSCLC byli individuálně přiřazeni podle pohlaví, věku a historie kouření ke kontrolním pacientům bez maligního onemocnění v anamnéze. Vzorky periferní krve byly získány od 57 kontrolních pacientů podstupujících chirurgický zákrok pro benigní diagnózu v období mezi lednem 2012 a květnem 2013. Každý z kontrolních pacientů měl v předoperačním období snímek plic bez známek malignity. Dále jsme u všech NSCLC pacientů i u všech kontrolních provedli vyšetření panelu nádorových markerů (CEA, TPA, NSE, SCC, CYFRA 21-1). TPA marker byl stanoven metodou ELISA (enzym linked immunosorbent assay), CEA a SCC metodou CMIA (chemiluminiscence immunoanalysis), NSE a CYFRA 21-1 byly stanoveny metodou ECLIA (electrochemiluminiscence immunoanalysis). Rentgenové snímky plic spolu s výsledky onkomarkerů byly použity k odlišení skupiny pacientů s NSCLC a skupiny kontrolních pacientů bez maligního onemocnění.

Od 64 pacientů v kohortě II byly získány vzorky periferní krve, u části této kohorty (40 pacientů) i vzorky tumoru a nenádorové plicní tkáně. Tito pacienti podstoupili operační výkon pro nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC) na stejném pracovišti v období od října 2012 do března 2016. Kompletní sada vzorků pro analýzu NY-ESO-1, která obsahuje sérum, nádorovou a nenádorovou tkáň byla získána pouze od 40 pacientů v kohortě II.

Všechny vzorky krve a tkáně byly shromážděny s písemným souhlasem pacienta a studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Motol. Žádný z pacientů zařazených do studie nedostal neoadjuvantní chemoterapii před operací. Tyto klinicko-patologické charakteristiky obou kohort pacientů jsou shrnuty v tabulce 1.

3.1.2 qPCR analýza exprese antigenů NY-ESO-1, Her2/neu and MAGE-A4

Celková RNA byla izolována z buněčných lyzátů za použití RNeasy Mini Kit (Qiagene). RLT lyzační pufr (Qiagene) obsahoval 1% p-merkaptoethanolu a extrakce byla provedena v souladu s protokolem výrobce včetně kroku digesce DNA. Koncentrace a čistota RNA byla stanovena spektrofotometricky za použití Nanodrop 2000C (Fisher Thermo Scientific). Reverzní transkripce byla provedena z 1 ug celkové RNA s použitím soupravy pro syntézu cDNA iScript (BioRad). Sondy byly navrženy, syntetizovány a schváleny TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Německo (Kloudova et al., 2016). Exprese HER2 / neu, NY-ESO-1 a MAGE-A4 byla stanovena metodou qPCR systémem CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BioRad). Na každých 10 µl reakce připadá 5 µl KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix (Kapa Biosystems), 0.5 µM každého –kódujícího (forward) i nekódujícího (reverse) primeru (TIB Molbiol), 0.2 µM TaqMan sondy (TIB Molbiol), 1.5 µl vody bez DNázy and 2 µl 10x naředěné cDNA. Každá reakce byla provedena ve dvou duplikátech. Termický protokol reakce byla následující: 3 minuty při teplotě 95 ° C, následuje 45 cyklů amplifikace (95 ° C po dobu 15 s, 60 ° C po dobu 60 s). Tvorba produktu předpokládané délky byla potvrzena elektroforézou na agarosovém gelu. Hodnoty Cq byly stanoveny použitím softwaru CFX Manager (BioRad) a relativní exprese studovaných genů byly vypočítány pomocí Genex softwaru GenEx software (MultiD Analyses) s mezná hodnotou v 36. cyklu. Mezní hodnota pro pozitivní expresi byla nastavena jako hodnota exprese vyšší, než je průměr plus 2krát směrodatná odchylka exprese ve vzorcích z nenádorové plicní tkáně.

3.1.3 ELISA pro stanovení frekvence protilátek NY-ESO-1, Her2/neu a MAGE-A4

Přítomnost protilátek proti třem nádorovým antigenům HER2/*neu*, NY-ESO-1 and MAGE-A4 v séru pacientů s NSCLC a v séru kontrolních pacientů byla detekována metodou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Gnjatic S. et al., 2009; Long YY. et al., 2014; Stockert E. et al., 1998). Rekombinantní proteiny HER2/*neu*, NY-ESO-1 and MAGE-A4 (Origene) byly zředěny v uhličitanovém koutovacím pufru (Coating Buffer B, Invitrogen) na konečnou koncentraci 1 ug / ml a koutovány do 96-jamkové mikrotitrační destičky, která byla přes noc inkubována při teplotě 4 ° C. Destičky byly blokovány po dobu 1 hodiny

blokovacím puřrem (Assay Buffer, Invitrogen). Lidská séra zředená v poměru 1: 100 a 1: 200 s blokovacím puřrem (Assay Buffer, Invitrogen) byla inkubována v jamkách koutovaných antigenem po dobu 2 hodin. Destičky pak byly promyty blokovacím puřrem a inkubovány se sekundární HRP- konjugovanou protilátkou (kozí polyklonální protilátky proti lidskému IgG konjugované s křenovou peroxidázou- HRP pochází z angl. horseradish, Abcam) po dobu 1 hodiny. Destičky byly promyty blokovacím puřrem, byl přidán TMB substrát (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, Invitrogen) a inkubovány po dobu 20 minut. Oxidací substrátu peroxidázou konjugovanou na protilátce proti IgG vznikl modrý produkt, jehož koncentrace byla přímo úměrná koncentraci specifické protinádorové protilátky v jamce mikrotitrační destičky. Reakce byla zastavena přidáním stop roztoku (Invitrogen), přičemž modrý produkt mění barvu na žlutou s maximální absorbancí při 450 nm. Absorbance vzorků mikrotitrační destičky byla změřena spektrofotometrem s nastavením vlnové délky monochromatického světla 450 nm. Jako pozitivní kontrola funkčnosti testu byl na každou mikrotitrační destičku koutován protein Cytomegalovirus glykoprotein B, k němuž bylo přidáno sérum se známou pozitivitou anti-CMV protilátky. Jako negativní kontrola sloužila jamka bez proteinu i bez séra.

3.1.4 Hodnocení dat

Séra 57 pacientů s NSCLC a 57 kontrolních pacientů bez maligního onemocnění byla analyzována metodou ELISA na přítomnost NY-ESO-1, HER-2/neu a MAGE-A4 autoprotilátek. Nově rozmražená várka sér 57 kontrolních pacientů byla znovu analyzována na přítomnost NY-ESO-1 protilátek společně se 64 séry pacientů s NSCLC z kohorty II. Mezní hodnota (cut-off) pozitivní séroreakivity byla definována jako hodnota absorbance větší než průměr absorbance plus 2 směrodatné odchylky vzorků kontrolních pacientů. NSCLC pacienti a kontrolní pacienti byli rozděleni do tří skupin – skupina kuřáků, ex-kuřáků a nekuřáků. Tyto skupiny byly hodnoceny z hlediska séropozitivity. Ex-kuřáci byli definováni jako bývalí kuřáci s abstinencí od kouření minimálně 1 rok (Couraud S. et al., 2012). Pořadí vzorků pacientů s NSCLC a kontrolních pacientů bylo na mikrotitračních destičkách promícháno, tak aby byl skupinový efekt rozložen rovnoměrně napříč všemi vzorky.

3.1.5 Statistické metody

Statistické analýzy byly provedeny v programu StatSoft STATISTICA (verze 12). Pro porovnání kategorických proměnných byl použit Pearsonův Chi-kvadrát test. Pro porovnání dvou skupin pacientů rozdělených na základě seropozitivity byl použit dvouvýběrový T-test nebo jeho modifikace s odděleným odhadem rozptylů. Rozdíly byly považovány za statisticky významné, pokud byla hodnota $p < 0,05$. Hladiny relativní genové exprese byly stanoveny pomocí $\Delta\Delta Ct$. Exprese nádorových antigenů byla normalizována k hladině exprese β -aktinu.

3.2 *Metody ve studii specifické celulární protinádorové imunity*

3.2.1 NSCLC nádorové linie

Buněčné linie nemalobuněčného plicního karcinomu H520 (skvamózní karcinom), H522 a A549 (adenokarcinom) byly získány z „American Type Culture Collection” (Manassas, USA). H520 a H522 byly kultivovány v 37°C ve zvlhčené atmosféře obsahující 5% CO₂ v kompletním médiu RPMI-1640 (Gibco) doplněném o 10% tepelně inaktivované fetální bovinní sérum (PAA), 2 mM GlutaMAX I CTS (Gibco) a 100 U / ml penicilinu + 100 mg / ml streptomycinu (Gibco). Buňky A549 byly pěstovány v médiu F12 (Gibco) doplněném výše popsaným způsobem.

3.2.2 Příprava nádorových buněk usmrcených vysokým hydrostatickým tlakem

2×10^6 buněk nemalobuněčného karcinomu plic bylo usmrceno vysokým hydrostatickým tlakem (HHP) 250 MPa působícím po dobu 10 minut v zařízení vyrobeném na zakázku pro společnost Sotio (Resato International BV, Nizozemsko. Po ošetření HHP byly buňky dále inkubovány při 37 ° C po dobu 2 hodin. Buňky byly shromážděny odstředěním (1500 otáček za minutu, 5 minut), resuspendovány v 1 ml CryoStor™ CS-10 (BioLife Solution) a uchovávány při -80 ° C po dobu 24 hodin. HHP-usmrcené buňky byly před přidáním k dendritickým buňkám (DC) rozmrazeny a dvakrát promyty médiem bez séra X-VIVO 15 (doplněné rekombinantním transferinem, Lonza. Indukce buněčné smrti a expozice imunogenních molekul (HSP70, HSP90 a kalretikulinu) způsobená vysokým hydrostatickým tlakem byla stanovena průtokovou cytometrií před zamrznutím a po rozmrazení. 2×10^5 buněk na jamku bylo inkubováno s primárními protilátkami HSP70 (R & D Systems), HSP90 a Calreticulin (Enzo Life Sciences) po dobu 30 min. Po promytí PBS (Phosphate Buffered Saline, fosfátový pufr) byly buňky inkubovány s APC-konjugovanou anti-myší sekundární protilátkou (Jackson ImmunoResearch) po dobu 30 min. Následně byly buňky promyty PBS a barveny Annexinem V-PE (Exbio) po dobu 20 minut. Buňky byly promyty 1 x vazebným pufrem Annexin V (eBioscience) a pelety byly resuspendovány v pufru obsahujícím DAPI (0,5 ug / ml, Invitrogen). Vzorky byly analyzovány metodou LSRFortessa (BD Biosciences). Data byla vyhodnocena pomocí softwaru FlowJo (Tree Star).

3.2.3 Příprava DC-HHP vakcíny

Mononukleární buňky periferní krve (PBMC) byly získány z vrstvy „buffy coat“ zdravých dárců centrifugací Ficoll-Paque gradient (GE Healthcare). 75×10^6 PBMC / kultivační láhem v 10 ml GMP médiu bez séra X-VIVO 15 (doplňného transferinem, Lonza) byly nanoseny na 75 cm² kultivační láhve (Nunc), monocyty mohly adherovat ke dnu láhve po dobu 2 hodin při 37 ° C. Neadherentní frakce obsahující lymfocyty byla shromážděna a skladována krátkodobě při -80 ° C. Dendritické buňky (DC) odvozené z monocytů byly připravovány v X-VIVO 15 po dobu 4 dnů (Truxova I et al., 2014) v přítomnosti 500 IU / ml GM-CSF a 20 ng / ml IL-4 (obě od firmy Gentaur). Při přípravě DC-HHP vakcíny se naočkowały nezralé DC na 96-jamkovou destičku (Nunc) v počtu 2×10^5 nezralých DC / jamku a inkubovalo se směsí (1 aliquot H520: 1 aliquot H522) rozmražených a HHP usmrcených buněčných linií karcinomu plic po dobu 4 hodin, přičemž poměr DC ku nádorovým buňkám byl 5:1. Potom byl přidán poly (I: C) g(25 ug / ml, VacciGrade™ InvivoGen) na dalších 20 hodin.

3.2.4 Fenotyp a cytokinová produkce DC-HHP vakcíny

Dozrávání DC buněk po pulzaci nádorovými liniemi usmrcenými HHP a po stimulaci poly (I: C) byla hodnocena průtokovou cytometrií. DC fenotyp byl stanoven barvením pomocí CD80-FITC, CD86-PE, CD83-PE-Cy5.5 (Beckman Coulter), CCR7 (CD197) -APC-eFluor780 (eBioscience), CD11c-APC (Exbio) a HLA- PE-Cy7 (BD Biosciences) po dobu 20 min. Životaschopnost buněk byla detekována pomocí barvení DAPI. CD11c⁺DAPI negativní DC byly analyzovány pro střední intenzitu fluorescence (MFI) konkrétního markeru dozrávání. K určení produkce cytokinů DC-HHP vakcínou byly buněčné supernatanty odebrány 24 hodin po DC stimulaci a uchovávány při -80 ° C. IL-12p70, IL-10, IFN- α and TNF- α byly stanoveny pomocí testu Luminex (MILLIPLEX™ Human Cytokine / Chemokine Kit, Merck Millipore) (Luminex, USA).

3.2.5 Migrační a fagocytární kapacita DC-HHP vakcíny

Migrační kapacita DC-HHP vakcíny směrem k chemokinům CCL19 a CCL21 byla hodnocena 24 hodin po zrání za použití testů transwell (velikost pórů 5,0 μ m, Costar, Corning). Nižší komůrky transwellové destičky byly naplněny 200 μ l RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) obsahujícím 10% AB lidské sérum s /nebo bez chemokinů

CCL19 (50 ng / ml) a CCL21 (50 ng / ml). 3×10^5 DC v 70 μ l RPMI 1640 obsahujícím 10% AB lidského séra byl naočkován do horní komůrky transwellové destičky v duplikátech. Buňky byly inkubovány při 37 ° C po dobu 5 hodin. Poté byly transmigrované DC v dolních komorách odebrány, barveny protilátkou CD11c-APC (Exbio) a počítány pomocí průtokové cytometrie. Pro testy fagocytózy bylo 1×10^6 DC barveno 2,5 μ l / ml VybrantVR DiO cell labeling solution (Invitrogen) po dobu 20 minut při 37 ° C před pulzací s HHP-usmrcenými buněčnými liniemi. Obdobně 1×10^6 rozmražených buněk z linií plicního karcinomu usmrcených HHP bylo barveno 2,5 μ l / ml VybrantVR DiD cell labeling solution (Invitrogen) v médiu bez séra při teplotě 37 ° C po dobu 20 minut. Buňky byly promyty dvakrát, smíchány v poměru 1 DC / 5 nádorovým buňkám a inkubovány 4 hodiny při teplotě 37 ° C před tím, než byl k některým vzorkům přidán poly (I: C) na dalších 20 hodin. Buňky inkubované při 4 ° C sloužily jako negativní kontrola fagocytózy. Fagocytární schopnost DC byla hodnocena průtokovou cytometrií jako procento dvojité pozitivních (DiO + DiD +) buněk.

3.2.6 Stimulace DC-HHP vakcíny v médiu obsahujícím humánní sérum

2×10^5 jamku nezralých DC nebo DC pulzovaných s buněčnými liniemi karcinomu plic usmrcenými HHP a stimulovanými poly (I: C) bylo umístěno do média RPMI 1640 obsahujícího 10% lidského AB séra (Invitrogen) nebo stimulováno 1 μ g/ml LPS (*E.coli*, Sigma Aldrich) nebo se umístilo na vrstvu buněk A549 exprimujících CD40L po dobu dalších 24 hodin. Stabilní buňky A549 transfekované CD40L byly připraveny zředěním jednoho buněčného klonu z buněk rezistentních na hygromycin a transfekovaných pCMV / hygro-CD40L vektorem (Sino Biological Inc.). Netransfekované buňky A549 byly použity jako negativní kontrola stimulace. Zralost DC byla hodnocena, jak je popsáno výše, průtokovou cytometrií. Produkce IL-10 a IL-12p70 byla stanovena metodou ELISA (R & D System) podle pokynů výrobce.

3.2.7 Příprava DC-HHP vakcíny z PBMC pacientů s NSCLC

Dvě zkumavky periferní krve (VACUETTE® 9 ml K3 EDTA) byly získány od 8 pacientů s NSCLC, kteří podstoupili chirurgický výkon na III. chirurgické klinice 1. LF UK a FN Motol po podepsání informovaného souhlasu. PBMC byly izolovány centrifugací Ficoll-Paque gradient. Jedna polovina izolovaných PBMC byla skladována při -80 ° C pro

restimulaci T buněk. Monocyty ze zbývajících PBMC byly separovány pomocí izolační soupravy CD14 + (EasySep™, Human CD14 Positive Selection Kit) podle pokynů výrobce. 2.5×10^6 /jamku CD14 + buněk bylo naočkováno do 6 jamkové destičky (Nunclon) ve 4 ml média X-VIVO 15 doplněného o GM-CSF a IL-4, jak bylo popsáno výše. Čtvrtý den byly DC pulzovány směsí rozmražených HHP-usmrcených buněčných linií H520 a H522 v poměru 1:1 po dobu 4 hodin před přidáním poly(I: C) na dalších 20 hodin.

3.2.8 Indukce nádorově specifických T lymfocytů a CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg lymfocytů

2×10^5 /jamku nezralých DC, poly (I:C)-stimulovaných DC nebo DC pulzovaných s buňkami karcinomu plic usmrcenými HHP a stimulovanými poly (I:C) se smísili na 96 jamkové destičce s rozmraženými autologními lymfocyty získanými z PBMC zdravých dárců a pacientů s NSCLC v poměru 1 DC: 5 T buňkám. Buňky byly kultivovány po dobu 7 dnů v médiu RPMI-1640 obsahujícím 10% AB lidského séra (Invitrogen), 2 mM GlutaMAX I CTS (Gibco), 100 U/ml penicilinu, 100 mg/ml streptomycinu (Gibco), 1% neesenciálních aminokyselin (Gibco), 1 mM natriumpyruvátu (Gibco) a 50 uM β-merkptoethanolu (Gibco). V den 3 a 5 kultivace bylo přidáno 20 U/ml IL-2 (PeproTech). Pro pozitivní kontrolu stimulace CD8 + T buněk byly použity poly(I: C)-stimulované DC nabitě směsí antigenních peptidů MHC třídy I s omezeným překrýváním na CMV, EBV a chřipku (CEF; 1 ug / ml JPT Technologies). 7. den byly T lymfocyty restimulovány čerstvě připraveným a odpovídajícím vzorkem DC ve stejném poměru po dobu 1 hodiny před přidáním Brefeldinu A (BioLegend, 1000x). Po 3 hodinách byla stanovena frekvence buněk produkujících IFN-γ a proliferujících (Ki67⁺) CD8⁺ a CD4⁺ T buněk pomocí průtokové cytometrie. T buňky byly barveny protilátkami CD3-Alexa 700 (Exbio), CD4-PE-Cy7 (eBioscience) a protilátkami CD8-PE-Dy590 (Exbio) po dobu 30 min. Buňky byly potom fixovány pomocí fixačního pufru (Fixation Buffer,eBioscience), permeabilizovány (Permeabilization Buffer, eBioscience) a intracelulárně obarveny pomocí IFN-γ-FITC (BD Biosciences) and Ki67-PE (Biolegend) protilátkami po dobu 30 minut. V experimentech, které analyzovaly odpovědi T buněk pacientů s NSCLC, byly buňky extracelulárně barveny protilátkami CD3-PerCP-Cy5.5 (eBioscience), CD4-PE-Cy7 (ebioscience) a CD8-PE-Dy590 (Exbio) a intracelulárně protilátkami IFN-γ-FITC (BD Biosciences) and Ki67-Alexa 700 (BD Biosciences). Procento CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T regulačních buněk bylo stanoveno bez restimulace čerstvými DC průtokovou cytometrií

v 7. den. T buňky byly barveny protilátkami CD4-PE-Cy7 (eBioscience), protilátkami CD8-PE-Dy590 (Exbio) a CD25 -PerCP-Cy5.5 (BioLegend) po dobu 30 min. Buňky byly poté fixovány a permeabilizovány jak je popsáno výše a barveny intracelulárně FoxP3-Alexa Fluor 488 (eBiosciences) po dobu 30 minut.

3.2.9 Příprava buněk exprimujících na membráně MP1 a detekce MP1-specifických CD8⁺ T lymfocytů

Kratší verze genu M1 (M1v1 - 699 bp) byla získána PCR z plazmidu pCMV-H7N9-AH-13-M1 (Sino Biologicals Inc.) nesoucí kódující sekvenci (756 bp) pro plnou délku „matrix proteinu 1“ (MP1) z viru H7N9. Sekvence M1v1 byla vložena do plazmidu pcDNA-YFP (Invitrogen) za účelem získání pcDNA3-M1v1-YFP. Buňky A549 byly transfektovány 1 µg pcDNA3-M1v1-YFP (linearizované FspI restriční endonukleázou) za použití Lipofectamin RNAiMAX (Thermo Fisher scientific) v 0,5 ml média F12 bez séra a byly inkubovány přes noc při 37 °. Potom bylo buněčné médium nahrazeno médiem F12 obsahujícím sérum a doplněným o 300 µg /ml hygromycinu B (Sigma-Aldrich). Po 7 dnech byla detekována fluorescence YFP transfekovaných buněk průtokovou cytometrií. Pozitivní buňky byly zředěny na koncentraci 1-3 buňky/jamku na 96ti jamkové destičce a kultivovány za selekce hygromycinem B po dobu 3 týdnů. Přežívající klony vykazovaly 80% stabilní membránově-asociovanou expresi MP1, jak bylo analyzováno průtokovou cytometrií a metodou western blot. Autologní T buňky byly stimulovány HLA-A*201+nezralými DC, poly (I: C)- stimulovanými DC nebo DC- HHP- vakcínou gpřipravenou stimulací HHP- usmrcenými MP1-exprimujícími A549 nádorovými buňkami stimulovanými poly (I: C), jak bylo popsáno výše. Pro pozitivní kontrolu stimulace CD8⁺ T buněk byly použity DC inkubované s poly (I: C) a MP158-66 (GILGFVFTL) (10 µg / ml; MBL International). Po 8 dnech byly MP158-66 specifické CD8⁺ T buňky barveny pomocí MP158-66-HLA-A*201 Tetramer-PE (2 µl/vzorek, MBL International) po dobu 30 minut spolu s protilátkami CD3-

PerCP-Cy5.5 (eBioscience), CD4-PE-Cy7 (ebioscience) a CD8-Alexa Fluor 700 (Exbio) a analyzovány průtokovou cytometrií.

3.2.10 Detekce T buněk specifických pro nádorové antigeny u pacientů s NSCLC

PBMC od 36 pacientů s NSCLC, kteří podstoupili plicní resekci ve Fakultní nemocnici v Motole v roce 2014 - 2016 po podpisu informovaného souhlasu, vzorky byly izolovány a kryokonzervovány v kapalném dusíku. Pokusy byly prováděny se souhlasem etické komise. Buňky PBMC byly rozmrazeny a naočkovány v počtu 2×10^5 /jamku v 100 ul média obsahujícího AB sérum, jak je popsáno výše, byly inkubovány přes noc při 37°C. Pak byly přidány specifické nádorové antigenní pepmixy obsahující 33 ± 128 peptidů z proteinů MAGE-A3, MAGE-A4, hTERT, Survivinu a Mucinu-1 (JPT Peptide Technologies) dle doporučení výrobce v koncentraci 10 ug/ml a inkubovány po dobu 9 dnů. Směs antigenních peptidů převážně MHC I. třídy s omezeným překrýváním na CMV, EBV a chřipku [CEF] (PM-CEF-E, 2 ug / ml JPT Peptide Technologies) a hlavně peptidy MHC třídy II- omezené na hemagglutinin viru chřipky [HA] (PM-INFA-HA/Cal, 10 ug/ml JPT Peptide Technologies), byly užity jako pozitivní kontrola $CD8^+$ a $CD4^+$ T buněčné stimulace. 20 U/ml IL-2 (PeproTech) byl přidán ve dnech 4 a 7 kultivace. Buňky byly restimulovány peptidy 9. Den po dobu 2 hodin. Pak byl přidán Brefeldin A (BioLegend, 1000x) a buňky byly inkubovány přes noc. Produkce IFN- γ $CD8^+$ a $CD4^+$ T buňkami byla detekována průtokovou cytometrií jak popsáno výše s použitím protilátek CD3-AlexaFluor700, IFN-y-PE-Cy7, CD4-PerCP-Cy5.5, CD8aeFluor450 (BioLegend). Životaschopnost T buněk produkujících IFN- γ byla ověřena barvením LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Stain kit (405 nm excitation) (Invitrogen). Procento negativních kontrol (žádný antigen přidáný k PBMC) bylo odečteno ze vzorků stimulovaných antigenní peptidovou směsí.

3.2.11 qPCR analýza exprese antigenů

Celková RNA byla izolována z buněčných lyzátů pomocí RNeasy mini kit (Qiagene) v souladu s protokolem výrobce včetně kroku štěpení DNA. Čistota a koncentrace RNA byla

stanovena spektrofotometricky za použití Nanodrop 2000c (Fisher Thermo scientific). Reverzní transkripce byla provedena z 1 ug celkové RNA za použití iScript cDNA synthesis kit (BioRad) pomocí sond specifických pro MAGE-A3, MAGE-A4, hTERT, Survivin a Mucin-1 (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Německo). Exprese genů byla stanovena metodou qPCR na CFX96 Touch™ Real-Time PCR detekční systém (BioRad) v duplikacích. Každá 10 µl reakce obsahovala 5 µl KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix (Kapa Biosystems), 0,5 µM každého dopředného a reverzního primeru (TIB Molbiol), 0,2 uM TaqMan sondy (TIB Molbiol), 1,5 ul vody bez DNázy a 2 ul 10x zředěné cDNA. Reakční termální protokol byl následující: 3 minuty při 95°C následovaných 45 cykly amplifikace (95°C po dobu 15 s, 60°C po dobu 60 s). Tvorba PCR produktů očekávané délky byla potvrzena elektroforézou na agarovém gelu. Hodnoty Cq byly stanoveny pomocí softwaru CFX Manager (BioRad) a relativních exprese studovaných genů byly vypočítány pomocí softwaru GenEx (MultiD Analyses) s cut-off v 36 cyklu. Cut off pro kladnou hodnotu exprese byl nastaven na relativní hodnotu exprese vyšší než průměr plus 2 směrodatné odchylky ve srovnání s kontrolní nenádorovou tkání.

3.2.12 Statistické metody

Data byla analyzována pomocí dvouvýběrového t-testu, párového t-testu nebo neparametrického Mann-Whitney U testu v programu GraphPad PRISM 6. Rozdíly byly považovány za statisticky významné, pokud byla hodnota * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ nebo *** $p < 0,001$.

4 Přehled dosažených, náležitě dokumentovaných a adekvátně statisticky zhodnocených vlastních výsledků

4.1 *Výsledky ve studii specifické humorální protinádorové odpovědi*

4.1.1 **Klinicko-patologické charakteristiky souboru pacientů s NSCLC a jejich korelace s anamnézou kouření tabáku**

V tabulce 4 jsou shrnuty klinicko-patologické charakteristiky kohorty I (sérum, n = 57) a kohorty II (sérum, nádorové a nenádorové plivní tkáň, n = 64) pacientů s NSCLC a dále kontrolních pacientů bez anamnézy maligního onemocnění. Pacienti s NSCLC byli odlišeni od kontrol panelem nádorových markerů (CEA, TPA, NSE, SCC, CYFRA 21-1). Statisticky vyšší hladina CYFRA 21-1 ($p = 0,008$) byla zjištěna ve skupině NSCLC podle párového t-testu s odděleným odhadem rozptylu. Byla zjištěna průměrná hladina $4,69 \pm 4,87$ ng/ml u pacientů s NSCLC vs. průměrná hladina $1,86 \pm 1,33$ ng/ml u kontrolních pacientů. U ostatních nádorových markerů CEA, TPA, NSE a SCC nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl mezi pacienty NSCLC a kontrolami (Okamura K, 2013). Nebyl nalezen statisticky významný rozdíl dle věku a dle počtu let abstinence kouření u skupiny pacientů s NSCLC (n = 121) v porovnání s kontrolní skupinou (n = 57)(tabulka 4). Rozsah let abstinence kouření ve skupině bývalých kuřáků (n = 34) byl 2-40 let s mediánem 13,5 let. U nekuřáků v obou kohortách jsme však zjistili, že výrazně více žen 14/19 (73,7%) než mužů 5/19 (26,3%) (tabulka 5) má karcinom plic. Hlavním histologickým podtypem u nekuřáků byl adenokarcinom (94,7%) (tabulka 6).

Tabulka 4: Klinicko-patologické charakteristiky pacientů s NSCLC a kontrolních pacientů ve studii

	NSCLC		Kontroly	
	Počet pacientů v kohortě I/II	%	Počet	%
Počet pacientů celkem	57/64 Total 121	100/100	57	100
Věk				
Průměr	62/67		62	
Věkové rozpětí	30-79/42-87		30-79	
Stádium				
IA	13/10	22/16		
IB	11/15	19/23		
IIA	4/9	7/14		
IIB	8/7	14/11		
IIIA	15/18	26/28		
IIIB	3/1	5/2		
IV	3/4	7/6		
Histologický podtyp				
Skvamózní karcinom	21/29	37/45		
Adenocarcinom	30/35	53/55		
Ostatní	6/0	11/0		
Diferenciace				
Dobře (G1)	7/7	12/11		
Středně (G2)	21/33	37/52		
Špatně(G3)	20/16	35/25		
Nediferencovaný	3/0	5/0		
Nespecifikováno	6/8	11/12		
Smoking history				
Kuřák	30/35	53/55	29	51
Ex-kuřák	18/16	32/25	19	33
Nekuřák	9/10	16/16	9	16
Neznámo	0/3	0/4	0	0

Tabulka 5: Pohlaví a status kouření u NSCLC pacientů

NSCLC	Kuřák	Ex-kuřák	Nekuřák	Hladina významnosti	
Ženy					
Kohorta I	n=20	n=11 (55%)	n= 3 (15%)	n=6 (30%)	p=0.036
Kohorta II	n=27	n=15 (55,6%)	n=4 (14.8%)	n=8 (29.6%)	p= 0.02
Celkem	n=47	n=26 (55.3%)	n=7 (14.9%)	n=14 (29.8%)	p=0.0008
Muži					
Kohorta I	n=37	n=19 (51.4%)	n=15 (40.5%)	n=3 (8.1%)	73.7% (14/19) žen nekuřáček oproti 26.3% (5/19) mužů nekuřáků
Kohorta II	n=34	n=20 (58.8%)	n=12 (35.3%)	n= 2 (5.9%)	
Celkem	n=71	n=39 (54.9%)	n=27 (38%)	n=5 (7%)	

Tabulka 6: Histologie a status kouření u pacientů s NSCLC

NSCLC	Kuřák	Ex-kuřák	Nekuřák	Significance level	
Adenokarcinom					
Kohorta I	n=30	n=15/30 (50%)	n= 7/18 (23.3%)	n=8 /9(26.6%)	p=0.28
Kohorta II	n=32	n=16/35 (50%)	n=6/16 (18.8%)	n=10/10 (31.3%)	p= 0.004
Celkem	n=62	n=31/65 (50%)	n=13/34 (21%)	n=18/19 (29%)	p=0.005
Skvamózní karcinom					
Kohorta I	n=21	n=12/30 (57.1%)	n=8/18 (38.1%)	n=1/9 (4.8%)	Adenokarcinom se vyskytuje u 94.7% (18/19) nekuřáků
Kohorta II	n=29	n=19/35 (65.5%)	n=10/16 (34.5%)	n= 0/10 (0%)	
Celkem	n=50	n=31/65 (62%)	n=18/34 (36%)	n=1/19 (2%)	

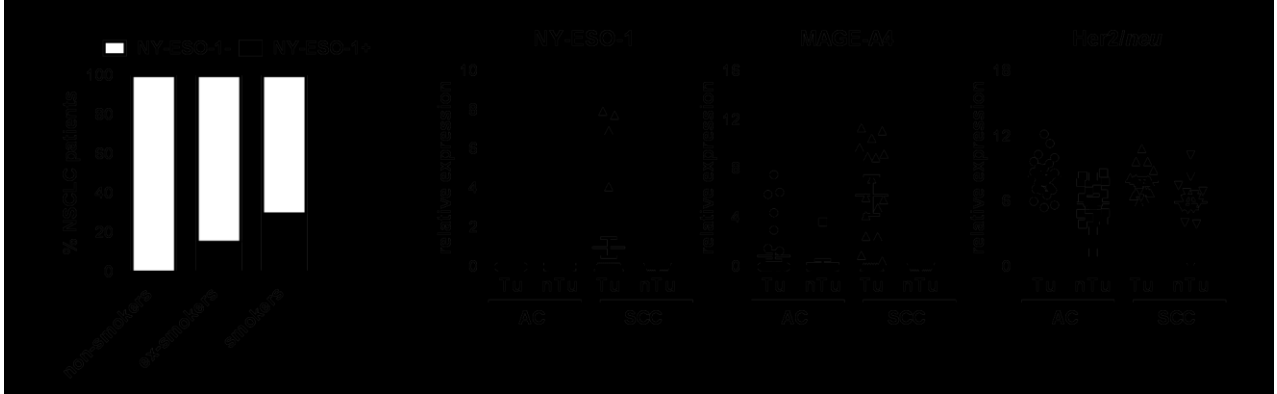
4.1.2 Frekvence protilátek NY-ESO-1, Her2/neu and MAGE-A4 u pacientů s NSCLC a kontrolních pacientů ve vztahu k anamnéze kouření tabáku

Nejprve jsme hodnotili frekvenci autoprotilátek proti NY-ESO-1, HER2/*neu* a MAGE-A4 u pacientů s NSCLC kohorty I (n = 57) a kontrolních vzorků (n = 57). Pouze protilátky proti NY-ESO-1, ale nikoliv proti HER2/*neu* a MAGE-A4 byly signifikantně zvýšeny u 26,3% (15/57) pacientů s NSCLC ve srovnání s 3,5% (2/57) u kontrolní skupiny (tabulka 7). Také jsme zjistili, že signifikantně vyšší seropozitivita NY-ESO-1 byla u pacientů s NSCLC a zároveň aktivních kuřáků (tabulka 7). Jelikož se jedná o první zprávu o prevalenci protilátek NY-ESO-1 u pacientů aktivních kuřáků s NSCLC, rozhodli jsme se potvrdit výsledky u pacientů s NSCLC v kohortě II (n = 64). NY-ESO-1 autoprotilátky byly signifikantně zvýšeny u 14% (9/64) pacientů s NSCLC z kohorty II ve srovnání s re-analizovanou 1,8% (1/57) kontrolní skupinou (tabulka 7). Celkem bylo 19,8% (24/121) pacientů s NSCLC pozitivní na protilátky NY-ESO-1. Vzhledem k nízkému počtu seropozitivních pacientů NY-ESO-1 (7 kuřáků, 2 ex-kuřáci, 0 nekuřáků) v kohortě II jsme nebyli schopni zjistit významnou korelaci s aktivní historií kouření. Statistické vyhodnocení seropozitivních kuřáků NY-ESO-1 z celkového počtu 121 pacientů s NSCLC (kohorta I + II) však potvrdilo, že přítomnost NY-ESO-1 autoprotilátek pozitivně koreluje s aktivní historií kouření u pacientů s NSCLC. Z 65 kuřáků s NSCLC bylo 27,7% (18/65) pacientů NY-ESO-1 pozitivních, na rozdíl od 17,6% (6/34) ex-kuřáků a 0% (0/19) nekuřáků (obrázek 2A). Nezjistili jsme žádný významný rozdíl dle „pack years“ (1 pack year= 20 cigaret za den po dobu jednoho roku) mezi NY-ESO-1 séropozitivními kuřáky $31 \pm 17,7\%$ (7/64) a NY-ESO-1 negativními kuřáky $31,5 \pm 14,5\%$ (28/64). Neprokázali jsme korelaci mezi seropozitivitou NY-ESO-1, pohlavím nebo stádiem onemocnění u pacientů s NSCLC, ani korelaci mezi séropozitivitou a histologickým typem (AC versus SCC). Je zajímavé, že i přes malý počet pacientů s jinými histologickými diagnózami (3 pacienti s velobuněčným karcinomem a 3 pacienti s anaplastickým karcinomem v kohortě I), tato skupina pacientů významně přispěla k tvorbě NY-ESO-1 hprotilátek (5/6).

Tabulka 7: Seropozitivita autoprotilátek proti NY-ESO-1, HER2/*neu* and MAGE-A4

Skupina NSCLC pacientů		NSCLC	Kontroly	Hladina významnosti	
NY-ESO-1 +					
Kohorta I	n=57	n=15/57 (26.3%)	n=2/57 (3.5%)	p=0.00063	
Kohorta II	n=64	n=9/64 (14%)	n=1/57 (1.8%)	p=0.009	
Celkem	n=121	n=24/121 (19.8%)	n=3/114 (2.6%)	p= 0.00084	
HER 2/ <i>neu</i> +					
Kohorta I	n = 57	n=3/57 (5.3%)	n=2 /57(3.5%)	p=0.647	
MAGE-A4 +					
Kohorta I	n = 57	n=5/57 (8.8%)	n=2/57 (3.5%)	p=0.242	
Skupina NSCLC pacientů		Kuřák	Ex-kuřák	Nekuřák	Hladina významnosti
NY-ESO-1 +					
Kohorta I	n=57	n=11/30 (36.7%)	n=4/18 (22.2%)	n=0/9 (0%)	p=0.027
Kohorta II	n=64	n= 7/35 (20%)	n=2/16 (12.5%)	n=0/10 (0%)	p=0.27
Celkem	n=121	n= 18/65 (27.7%)	n= 6/34(17.6%)	n=0/19 (0%)	p=0.028
HER2/ <i>neu</i> +					
Kohorta I	n = 57	n=1/30 (3.3%)	n=2/18 (11.1%)	n=0/9 (0%)	p=0.518
MAGE-A4 +					
Kohorta I	n = 57	n=3/30 (10%)	n=2/18 (11.1%)	n=0/9 (0%)	p=0.780

Obrázek 2: A) Rozdíl ve frekvenci NY-ESO-1 autoprotilátek mezi skupinou 121 pacientů s NSCLC a kontrolami vzhledem k historii kouření B) Relativní exprese HER2/*neu*, NY-ESO-1 a MAGE-A4 antigenů v nádoru a nenádorové tkáni u NSCLC pacientů detekované pomocí qPCR. Tu = nádor; nTu = nenádorová tkáň.



4.1.3 Exprese NY-ESO-1, Her2/*neu* and MAGE-A4 antigenů v nádorové tkáni ve vztahu k anamnéze kouření, histologickému typu nádoru a pohlaví pacientů

Dále jsme analyzovali expresi antigenů NY-ESO-1, HER2/*neu* a MAGE-A4 pomocí qPCR v nádorových a ne-nádorových tkáních od pacientů s NSCLC (obrázek 2B). Byla zjištěna statisticky významně vyšší exprese NY-ESO-1 u 6,3% (4/64) a MAGE-A4 u 35,1% (20/57) u pacientů se SCC oproti pacientům s AC (tabulka 8). Pouze exprese MAGE-A4 byla silně asociována s historií kouření a s mužským pohlavím (45,5% mužů oproti 19,2% žen) (tabulka 8). Všechny NY-ESO-1 pozitivní nádory ($n = 4$) byly od pacientů mužského pohlaví. Nicméně, kouření nebylo považováno za matoucí faktor, i když mezi ženami bylo více nekuřáků. HER2/*neu* antigen byl exprimován u 11,9% (5/42) pacientů s NSCLC ve srovnání s nenádorovými tkáněmi a nekoreloval s žádným jiným testovaným klinicko-patologickým parametrem (tabulka 8). Nezaznamenali jsme žádné významné rozdíly mezi expresí antigenů a stupněm diferenciacie nádoru nebo stadiem onemocnění.

Tabulka 8: HER2/*neu*, NY-ESO-1 and MAGE-A4 mRNA exprese u NSCLC nádorů a jejich korelace s historií kouření, histologií a pohlavím

Skupina NSCLC pacientů		Kuřák	Ex-kuřák	Nekuřák	Hladina významnosti
NY-ESO-1 +	n=4	n=2/25 (8%)	n=1/20 (5%)	n=0/11 (0%)	p=0.61
Her2/ <i>neu</i> +	n=5	n=3/21 (14.3%)	n=1/11 (9%)	n=0/8 (0%)	p=0.51
MAGE-A4 +	n=20	n=9/26 (34.6%)	n=8/18(44.4%)	n=0/9 (0%)	p=0.06
		Adenokarcinom	Skvamózní karcinom		Hladina významnosti
NY-ESO-1 +	n=4	n=0/36 (0%)	n=4/26 (15.4%)		p=0.015
Her2/ <i>neu</i> +	n=5	n=4/25 (16%)	n=1/17 (5.9%)		p=0.32
MAGE-A4 +	n=20	n=5/36 (13.9%)	n=15/23 (65.2%)		p=0.00005
		Muži	Ženy		Hladina významnosti
NY-ESO-1 +	n=4	n=4/35 (11.4%)	n=0/29 (0%)		p=0.07
Her2/ <i>neu</i> +	n=5	n=3/22 (13.6%)	n=2/20 (10%)		p=0.71
MAGE-A4 +	n=20	n=15/33 (45.5%)	n=5/24 (20.8%)		p=0.03

4.1.4 Vztah mezi mRNA expresí NY-ESO-1 a pozitivitou NY-ESO-1 protilátek v séru pacientů s NSCLC

Zjistili jsme, že 9/64 pacientů vykazovalo vysoké titry anti-NY-ESO-1 autoproti látek, bohužel u 4 z těchto 9 séropozitivních pacientů jsme nemohly analyzovat expresi NY-ESO-1 mRNA, protože u nich chyběly vzorky nádorové tkáně. Pouze 2 z 5 zbývajících séropozitivních pacientů vykazovali expresi NY-ESO-1 mRNA v primárních nádorech. Navíc byla u dalších 2 pacientů detekována exprese NY-ESO-1 mRNA pomocí RT-PCR. Avšak titry protilátek proti NY-ESO-1 byly těsně pod mezní hodnotou ELISA positivity. V souhrnu jsme zjistili pozitivní korelaci mezi expresí NY-ESO-1 mRNA a přítomností NY-ESO-1 autoproti látek u 5% (2/40) pacientů paralelně analyzovaných na přítomnost NY-ESO-1 autoproti látek v séru a NY-ESO-1 exprese mRNA v nádorech.

4.2 *Výsledky ve studii specifické celulární protinádorové odpovědi*

4.2.1 **Imunogenní buněčná smrt nádorových linií karcinomu plic indukovaná vysokým hydrostatickým tlakem**

Již dříve jsme prokázali, že HHP indukuje imunitní buněčnou smrt (ICD) v buněčných liniích karcinomu ovaria a prostaty i primárních nádorových buněk (Fučíková et al., 2014)). Pro generování imunogenních buněk byly buněčné linie nemalobuněčných plicních nádorů H520 a H522 ošetřeny HHP 250 MPa po dobu 10 minut. Následně byly buňky inkubovány 2 hodiny při 37 ° C a poté uloženy při -80 ° C po dobu 24 hodin. Životaschopnost buněk byla stanovena barvením pomocí AnnexinV a DAPI před zmrazením (2h) a po rozmrazení (2h + 24h) průtokovou cytometrií. Obr. 3A (Příloha 1) ukazuje HHP indukovanou buněčnou smrt u téměř 100% buněk H520 a H522 už 2 hodiny po léčbě. Expozice imunogenních molekul HSP70, HSP90 a kalretikulinu byla stanovena průtokovou cytometrií (obr. 3B). Ošetření HHP indukovalo expozici HSP70, HSP90 a kalretikulinu v obou buněčných liniích ve srovnání s nádorovými buňkami, které nebyly vystaveny působení HHP. Nebyl prokázán významný rozdíl v exponování těchto molekul mezi buňkami analyzovanými 2 hodiny po ošetření HHP nebo rozmraženými buňkami. To naznačuje, že buňky karcinomu plic, usmrcené HHP si uchovávají exponované imunogenní molekuly a mohou být vhodné pro generování vakcíny po krátkodobé kryoprezervaci. Bylo prokázáno, že buněčné linie karcinomu ovaria a prostaty, které podstoupily HHP-indukovanou ICD indukují DC zrání (Fučíková et al., 2014)). Nezralé DC odvozené z monocytů byly připraveny adherencí v bez-sérovém médiu X-VIVO 15 obsahujícím IL-4 a GM-CSF podle krátkodobého protokolu (Truxová et al., 2014) po dobu 4 dnů. DC byly pulzovány směsí rozmrazených HHP-usmrcených H520 a H522 (1:1) a exprese molekul spojených s maturováním CD80, CD83, HLA-DR a CD86 byla stanovena po 24 hodinách průtokovou cytometrií, došlo k výraznému zvýšení exprese CD80, CD83, HLA-DR a CD86 [HHP] ve srovnání s neošetřenými nezralými DC [iDC]. Tyto výsledky potvrdily, že HHP indukuje ICD v buněčných liniích karcinomu plic, takto usmrcené buňky pak indukují DC zrání po svém pohlcení.

4.2.2 **DC-HHP vakcína manifestuje zralý fenotyp, produkuje prozánětlivé cytokiny a zvyšuje chemotaktickou migraci**

Pro přípravu DC-HHP vakcíny byl poly (I: C) přidán k DC 4 hodiny po pulzaci rozmraženými HHP-usmrcenými buňkami karcinomu plic. Fenotyp DC-HHP vakcíny, její

fagocytární kapacita a chemotaktická migrace byla hodnocena průtokovou cytometrií po dalších 20 hodinách. Podobně byla produkce prozánětlivých cytokinů měřena v supernatantu buněčné kultury testem Luminex. Jak je znázorněno na obr. 4A (Příloha 2) DC-HHP vakcína [HHP+poly(I:C)] vykazuje signifikantně vyšší expresi CD80, CD83, HLA-DR a CD86 než kontrolní iDC a DC stimulované pouze poly (I: C). Obr. 4B ukazuje, že po 24 hodinách 80% DC fagocytovalo rozmražené buňky karcinomu plic usmrcených HHP při 37 ° C ve srovnání s kontrolními DC inkubovanými s buňkami karcinomu plic usmrcenými HHP při 4 ° C. Přidání poly (I: C) však snížilo fagocytární kapacitu DC o 10% (obr. 4B). Mírně snížená fagocytóza po přidání poly (I: C) neovlivnila schopnost DC produkovat prozánětlivé cytokiny jako IL-12p70, IFN- α a TNF- α (obr. 4C) nebo stimulovat chemotaktickou migraci a zvyšovat expresi CCR7 (obr. 4D). Produkce IL-10 DC-HHP vakcínou byla nízká a dokonce významně poklesla ve srovnání s hladinami IL-10 produkovanými DC ošetřenými pouze poly (I: C)(obrázek 4C). Tyto výsledky naznačují, že DC-HHP vakcína, připravená v médiu bez séra, může být plně schopna stimulovat odpovědi T buněk, jak dokládá účinná fagocytóza buněk karcinomu plic usmrcených HHP, zvýšená produkce maturačních a prozánětlivých cytokinů a chemotaktická migrace.

4.2.3 DC-HHP vakcína vykazuje vyšší maturaci a cytokinovou produkci v mediu obsahujícím sérum po následné LPS a CD40L stimulaci

Pro další posouzení plasticity a aktivity DC-HHP vakcíny v podmínkách přítomnosti séra a po dodatečné stimulaci byly iDC a DC pulzované buňkami usmrcenými HHP a poly (I: C) po dobu 24 hodin [24h] přeneseny do RPMI 1640 obsahující 10% lidského AB séra na dalších 24 hodin [48h]. Buňky byly ponechány neošetřené nebo byly ošetřeny LPS nebo umístěny na vrstvu buněk A459 transfekovaných CD40L. Expresí CD80, CD83, HLA-DR a CD86 byla stanovena průtokovou cytometrií. Produkce IL-10 a IL-12p70 byla stanovena metodou ELISA. Jak je znázorněno na obr. 5A (Příloha 3), přenos DC-HHP vakcíny do podmínek s přítomností séra vedl ke zvýšení exprese všech molekul spojených s maturací během dalších 24 hodin. S výjimkou CD80 stimulace LPS dále nezvýšila expresi CD83, CD86 a HLA-DR nad sérové hladiny. LPS však stimuloval další zvýšení IL-12p70 a také produkci IL-10 (obrázek 5A). Obdobně stimulace DC-HHP vakcíny pomocí CD40L vedla ke zvýšení exprese CD80 a CD83, ale ne CD86 a HLA-DR ve srovnání s DC-HHP vakcínou stimulovanou non-transfekovanými buňkami A549 (obrázek 3B). Stimulace DC-HHP

vakcíny pomocí CD40L vedla k malému, ale významnému zvýšení produkce IL-12p70 a k žádné produkci IL-10. Kontrolní iDC stimulované pomocí LPS a CD40L významně zvýšily expresi molekul spojených s maturací, nicméně pouze LPS indukovala produkci IL-12p70 a IL-10 těmito iDC. Tyto výsledky ukazují funkční plasticitu DC-HHP vakcíny, která má kapacitu být dále stimulována a navyšovat svůj stimulační potenciál.

4.2.4 DC-HHP vakcína stimuluje antigen-specifické CD8⁺ T lymfocyty a zvyšuje počet CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg lymfocytů

Dále zkoumáme, zda DC-HHP vakcína stimuluje CD8⁺ a CD4⁺ T buňky produkující IFN- γ . Po 24 hodinách iDC, DC pulzované s nádorovými buňkami usmrcenými HHP a s poly(I: C) nebo DC stimulované pouze poly(I: C) byly kultivovány s T-lymfocyty v poměru 1:5 po dobu 7 dnů. Proliferace T lymfocytů a produkce IFN- γ byla měřena průtokovou cytometrií po restimulaci s odpovídajícím čerstvě připravenými DC. Jak je znázorněno na obr. 6A (Příloha 4), DC-HHP vakcína stimulovala produkci IFN- γ CD8⁺ a CD4⁺ T buňkami ve srovnání s iDC. Avšak CD8⁺ a CD4⁺ T buňky produkující IFN- γ byly také stimulovány DC ošetřenými pouze poly(I: C). Vysoké procento CD8⁺ T buněk produkujících IFN- γ bylo detekováno po stimulaci s poly(I: C)-stimulovanými DC naplněnými směsí antigenních peptidů CMV, EBV a chřipky [CEF + poly(I: C)], tyto buňky byly užity jako pozitivní kontrola (obr. 6A). Proliferace CD8⁺ T buněk, stanovená expresí Ki67, byla rovněž srovnatelná mezi DC-HHP vakcínou a DC ošetřenými pouze poly(I: C) (obrázek 6B). Zjistili jsme však významně vyšší proliferaci CD4⁺ T buněk indukovanou DC-HHP vakcínou. Tyto výsledky naznačují, že DC-HHP vakcína stimuluje T buňky a může specificky indukovat proliferaci CD4⁺ T lymfocytů. Dále jsme se zabývali počtem CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T regulačních buněk indukovaných DC-HHP vakcínou po 7 dnech. Obr. 6C ukazuje, že počet CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T regulačních buněk indukovaných DC-HHP vakcínou je značně nižší ve srovnání s iDC a DC pulzovaných s nádorovými buňkami usmrcenými HHP. Poly(I:C) stimulace samotná snižuje počet CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T regulačních buněk, avšak počet CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T regulačních buněk byl stále lehce vyšší než počet Treg indukovaných DC-HHP vakcínou (obrázek 6C).

4.2.5 DC-HHP vakcína připravená z monocytů pacientů s NSCLC indukuje nádor specifické CD8⁺ a CD4⁺ T lymfocyty

Tyto výsledky naznačují, že DC-HHP vakcína stimuluje T buňky. Nicméně není zřejmé, zda indukované T buňky rozpoznávají antigeny, které pocházejí z buněk karcinomu plic usmrcených HHP. Pro otestování této skutečnosti jsme vytvořili model antigenního systému zahrnujícího buněčnou linii A549, která exprimuje krátkou verzi matrix proteinu 1 (MP1) chřipkového viru. Autologní T buňky byly stimulovány a HLA-A*201+ iDC, DC stimulovanými pouze poly(I: C) nebo DC naplněnými buňkami A549 usmrcenými HHP, rozmraženými a exprimujícími MP1 stimulace s poly(I: C) probíhala 8 dní (obrázek 7A, příloha 5)). Počet MP158-66-specifických CD8⁺ T buněk byl detekován barvením MP158-66-HLA-A*201 Tetramer Staining průtokovou cytometrií. Jak je znázorněno na obr. 4C DC-HHP vakcína stimulovala expanzi M158-66-specifických CD8⁺ T buněk oproti iDC nebo DC ošetřených poly(I: C), což dokazuje, že proteinové antigeny z buněk plicního karcinomu usmrcených HHP jsou zpracovávány a prezentovány dendritickými buňkami T lymfocytům.

Nakonec jsme ověřili výsledky naší DC-HHP vakcíny připravené z periferní krve pacientů s NSCLC. DC byly připraveny v médiu bez séra z CD14⁺ izolovaných monocytů. Autologní T lymfocyty byly stimulovány a restimulovány čerstvými DC konkrétního pacientem, jak je popsáno výše. Jak je znázorněno na obr. 7B, DC-HHP vakcína vytvořená z PBMC pacientů s NSCLC stimulovala signifikantně vyšší množství CD8⁺ a CD4⁺ T buněk produkujících IFN- γ než DC stimulované pouze poly(I:C) nebo iDC. Podobně byla detekována vyšší proliferace CD8⁺ a CD4⁺ T buněk po stimulaci DC-HHP vakcínou (obr. 7C). Tyto výsledky ukázaly, že DC-HHP vakcína *in vitro* stimuluje T-buňky specifické pro nádorové antigeny, produkující IFN- γ a přítomné v krvi pacienta s NSCLC.

Abychom prokázali, že u NSCLC pacientů jsou přítomné nádorově specifické CD8⁺ a CD4⁺ T buněčné odpovědi na nádorové antigeny exprimované specificky v nádorových liniích karcinomu plic H522 a H520, stanovily jsme expresi MAGE-A3, MAGE-A4, hTERT, Survivinu, a Mucinu-1, které jsou dobře charakterizované antigeny stanovované metodou qPCR u karcinomu plic. Různý stupeň exprese všech antigenů, kromě MAGE-A3 v H522, byl detekován v obou nádorových liniích (obr. 7D). Přítomnost CD8⁺ a CD4⁺ T buněčných odpověďispecifických pro tyto antigeny byla analyzována stimulací PBMC od 36 NSCLC pacientů s odpovídající směsí antigenních peptidů. Jeden reprezentativní dárcce odpovídající na MAGE-A4 pepmixovou stimulaci je ukázán na obrázku 7E. U 36 pacientů s NSCLC jsme detekovali CD8⁺ a CD4⁺ T buňky produkující IFN- γ a odpovídající na všechny testované

antigeny (obr. 7F), což podporuje naše jištění, že naše DC-HHP vakcína je plně kompetentní indukovat protinádorové T buněčné odpovědi u pacientů s NSCLC.

5 Diskuze metodických postupů a výsledků, včetně srovnání s literaturou

5.1 Diskuse specifické protinádorové humorální odpovědi

V této studii jsme porovnávali frekvence protilátek NY-ESO-1, Her2/*neu* a MAGE-A4 a antigení expresi v nádorech pacientů s NSCLC a u kontrolních pacientů s ohledem na historii kouření. Navíc byly frekvence těchto protilátek a úroveň exprese antigenů korelovány s histologickým podtypem, pohlavím, stupněm diferenciací a stádiem onemocnění.

Zjistili jsme statisticky významně vyšší frekvence protilátek NY-ESO-1, ale už ne protilátek HER2/*neu* a MAGE-A4 u pacientů s NSCLC oproti pacientům z kontrolní skupiny bez nádorového onemocnění. Zjistili jsme, že frekvence specifických protilátek proti NY-ESO-1 (19,8%, n = 24) zjištěné v naší studii u 121 pacientů s NSCLC byly srovnatelné s frekvencemi 20% a 23% pro NY-ESO-1 publikovanými v předchozích dvou studiích u pacientů s karcinomem plic (Chapman et al, 2008; Tureci et al., 2006). Zjistili jsme NY-ESO-1 mRNA expresi u 6% (4/64), Her2/*neu* u 11,9% (5/42) a MAGE-A4 u 35% (20/57) pacientů s NSCLC . Publikované frekvence pro tyto antigeny u NSCLC jsou obdobného rozmezí od 2% do 32% u NY-ESO-1(Tajima et al, 2003; Gure et al, 2005; Konishi et al, 2004; Kim et al., 2012; Yoshida et al, 2006; Grunwald t al., 2006), od 13% do 35% u MAGE-A4 (Tajima et al, 2003; Gure et al, 2005; Kim et al., 2012; Yoshida et al, 2006) a od 3% do 10% u Her2/*neu* (Takenaka et al., 2011; Mar et al., 2015). Pozitivní korelace mezi NY-ESO-1 mRNA expresí v nádorech a přítomností NY-ESO-1 autoprotiátek byla zjištěna pouze u 5% (2/40) pacientů, kde byly provedeny paralelně sérové a nádorové analýzy. Nebyla zjištěna NY-ESO-1 mRNA exprese u zbývajících 3 NY- ESO-1 seropozitivních pacientů s dostupnými vzorky nádorové tkáně. Ukázalo se, že také u nádorů s obvykle vysokou expresí NY-ESO-1 jako je karcinom vaječníků nebo melanom, 5-15% pacientů nemá detekovatelnou úroveň exprese NY-ESO-1 v nádorových buňkách navzdory NY-ESO-1 séropozitivitě (Stockert et al, 1998; van Rhee et al., 2005; Gnjatic et al., 2006). Nicméně kvůli nízkému počtu seropozitivních vzorků analyzovaných v naší studii by bylo velmi spekulativní vyvozovat nějaké závěry.

Dříve bylo publikováno, že protilátky NY-ESO-1 jsou přítomny ve vyšších frekvencích u pacientů se SCC oproti pacientům s AC (Tureci et al., 2006), ale toto tvrzení jsme nemohli potvrdit. Stejná studie prokázala častější detekci autoprotiátek NY-ESO-1 u nediferencovaných nádorů (40%) v porovnání se SCC a AC (Tureci et al., 2006). V naší studii jsme skutečně pozorovali u malé skupiny pacientů s velkobuněčným karcinomem a anaplastickým karcinomem významný příspěvek k produkci protilátek NY-ESO-1 (5/6)

pacientů s NSCLC (celkem 15 NY-ESO-1 séropozitivních). Zda je NY-ESO-1 přednostně exprimován v jiných histologických subtypech NSCLC než je SCC a AC, nebo v nediferencovaných nádorech, je třeba stanovit u větší skupiny pacientů.

Korelace frekvence autoprotilátek a anamnézy kouření ukázala signifikantně vyšší frekvenci protilátek NY-ESO-1 u aktivních kuřáků oproti ex-kuřákům a nekuřákům u pacientů s NSCLC ve srovnání s kontrolní skupinou. Ve dvou studiích byla zjištěna významná asociace CT antigenů (cancer testis antigenů) s anamnézou kouření (Gure et al., 2005; Kim et al., 2012), ale tvorba protilátek NY-ESO-1, která by mohla být indukována kouřením, nebyla dosud popsána. Produkce autoprotilátek u kuřáků spolu s expresí antigenu v nádorech může naznačovat chronický zánětlivý stav vyvolaný kouřením u premaligních lézí, který potencuje vývoj nádorově specifických imunitních odpovědí. Tento náhled by mohl být podpořen naším pozorováním, že nekuřáci nevykazují ani protilátky, ani nádorově specifickou expresi antigenů NY-ESO-1, MAGE-A4 nebo HER2/*neu*. Kouření však bude pravděpodobně sloužit jako důležitý kofaktor spíše než primární induktor k dalším molekulárním změnám, které určují kancerogenezi NSCLC, protože ne u všech kuřáků se vyvine za jejich života karcinom plic. NY-ESO-1 gen je umístěn na chromozómu X společně s geny kódujícími některé jiné CT (cancer testis) antigeny (Esfandiary et al., 2015). Bylo prokázáno, že geny CT-X jsou regulovány demethylací kritických CpG zbytků v jejich promotorových oblastech. (De Smet et al., 1999) Expresie NY-ESO-1 může být upregulována pomocí demethylačních činidel, jako je decitabin (Konkankit et al., 2011). Bylo prokázáno, že chemické látky v cigaretovém kouři indukují epigenetické změny v DNA (Carbone D., 1992; Hyndman IJ, 2016) proto lze spekulovat, že obdobný mechanismus by mohl přispět ke koordinované expresi CT antigenů (Gure et al., 2005). MAGE-A4 může být koordinovaně exprimován spolu s NY-ESO-1, jelikož jsme našli jeho silnou korelaci s kouřením. MAGE-A4 byl exprimován v naší studii hlavně u mužů, což bylo dříve popsáno (Kim et al., 2012; Shigematsu et al., 2010). Vyšší exprese CT antigenů byla pozorována u SCC (Gure et al., 2005; Grunwald et al., 2006) a tento podtyp NSCLC byl téměř výlučně spojen s anamnézou kouření. V naší studii jsme zjistili, že 94,7% nekuřáků mělo AC, z toho 73,7% žen. To je v souladu s předchozími studiemi karcinomu plic u nekuřáků (Couraud et al., 2012). Kouření cigaret je převládajícím rizikovým faktorem nejen pro karcinom plic, ale i pro chronickou obstrukční plicní chorobu (COPD) (Bozinovski et al., 2016). V průmyslových zemích je kouření zodpovědné za 95% případů COPD (Barnes PJ, 2003) a zhruba 30% pacientů s COPD umírá pro karcinom plic (Anthonisen et al., 1994). Bohužel nemáme údaje o incidenci COPD mezi našimi pacienty, ale bylo by zajímavé určit, zda by přítomnost NY-ESO -1

autoprotilátek u pacientů s COPD měla prediktivní charakter pro rozvoj karcinomu plic. Biologická úloha NY-ESO-1 během karcinogeneze není známa (Gnjatic et al., 2006; Esfandiary et al., 2015), avšak bylo prokázáno, že interaguje s antigenem MAGE-C1 (Cho et al., 2006). Bylo prokázáno, že členové rodiny MAGE se podílí na regulaci apoptózy nebo progresu buněčného cyklu (Sang et al., 2011). Je třeba poznamenat, že protein MAGE-A4 by mohl sloužit jako nádorový supresor v počátečních stádiích kancerogeneze (Jang et al., 2001) zvýšením vnímavosti rakovinné buňky pro apoptotické podněty jakými jsou chemoterapeutika (Peikert et al., 2006). Je zajímavé, že exprese NY-ESO-1 a MAGE-A4 v nádorech korelovala spíše se špatnou prognózou u pacientů s NSCLC (Gure et al., 2005; Yoshida et al., 2006; Grah et al., 2008) přes imunogenicitu NY-ESO-1 a proapoptotickou roli MAGE-A4. Bylo prokázáno, že NY-ESO-1 je jedním z nejvíce imunogenních nádorových antigenů (Gnjatic et al., 2006; Esfandiary et al., 2015), protože průměrná frekvence autoprotilátek proti jednotlivým antigenům u neselektovaných nádorových pacientů zřídka přesahuje 15% (Reuschenbach et al., 2009). Vysoké frekvence protilátek NY-ESO-1 byly detekovány také u mnoha dalších druhů karcinomů spolu s NY-ESO-1-specifickými CD8⁺ a CD4⁺ T buňkami (Groeper et al., 2007). Vysoká frekvence humorálních a buněčně zprostředkovaných odpovědí poskytla zdůvodnění použití NY-ESO-1 jako cíle pro protinádorové vakcíny (Gnjatic et al., 2006; Esfandiary et al., 2015).

5.2 *Diskuse specifické protinádorové celulární odpovědi*

Aktivní buněčná imunoterapie založená na DC představuje velké pole imunoterapeutických přístupů k léčbě malignit, nicméně její použití je poměrně omezené v imunoterapii plicního karcinomu. V naší studii jsme prokázali, že DC- HHP vakcína proti karcinomu plic, připravená v médiu bez séra kompatibilním s GMP (Good Manufacturing Practice) s imunogenními buněčnými liniemi plicního karcinomu usmrcenými HHP a stimulovaná poly(I:C) vykazuje funkční plasticitu a schopnost stimulovat nádorově specifické a IFN- γ produkující CD8⁺ a CD4⁺ T buňky pacientů s NSCLC.

Ukázali jsme, že HHP indukuje ICD v buněčných liniích karcinomu plic a exponované imunogenní molekuly, jako je kalretikulin, HSP70 a HSP90, zůstávají zachovány po krátkodobé kryoprezervaci. HHP-usmrcené buňky karcinomu plic sestávaly z alogenních komerčně dostupných buněčných linií adenokarcinomu a skvamózního karcinomu plic. Tyto buněčné linie pokrývající 80% histologických subtypů NSCLC byly použity jako zdroj široké škály TAA, u kterých bylo prokázáno, že jsou odlišně exprimovány u pacientů s NSCLC (Gure et al., 2005; Grunwald et al., 2006; Karanikas et al., 2008) a překrývají se u několika buněčných linií karcinomu plic (Tajima et al., 2003). Ačkoli se prokázalo, že vakcíny na bázi DC, pulzované s peptidy odvozenými z TAA, indukují imunitní odpověď u pacientů s NSCLC (Ueda et al., 2004; Perroud et al., 2011; Babatz et al., 2006; Takahashi et al., 2013), širší dostupnost TAA poskytovaná HHP-usmrcenými buněčnými liniemi může indukovat imunitní odpovědi u vyššího počtu pacientů. Další výhodou alogenních buněčných linií je možnost kultivovat je ve velkém množství na rozdíl od autologního nádorového materiálu, který může být obtížně dosažitelný v dostatečném množství v důsledku časté inoperability pozdních stadií onemocnění u pacientů s NSCLC. Je zajímavé, že pouze jedna výzkumná skupina užívala ozářené a UVB usmrcené buňky alogenní buněčné linie 1650 adenokarcinomu pro přípravu DC vakcíny ve fázi I klinické studie (Hirschowitz et al., 2004 et 2007 et 2011; Yannelli et al., 2005). Imunitní odpovědi byly pozorovány u 6 z 11 imunizovaných pacientů, což bylo zjištěno pomocí testu IFN- γ ELISPOT (Hirschowitz et al., 2011). To ukazuje, že usmrcené alogenní buněčné linie jsou bezpečné a vhodné pro aktivní imunoterapii karcinomu plic na bázi DC.

Fagocytóza rozmražených imunogenních HHP-usmrcených buněk karcinomu plic dendritickými buňkami odvozenými z lidských monocytů indukovala jejich zrání, což dále potvrdilo imunogenicitu buněk usmrcených HHP. Aby se zajistilo úplné dozrávání DC-HHP vakcíny, byl jako maturační činidlo použit poly(I:C) v GMP kvalitě. Dříve jsme zjistili, že DC

dozrávající v přítomnosti poly(I:C) vykazují nejlepší stimulační kapacitu pro T buňky *in vitro* (Fučíková et al., 2011). DC-HHP vakcína také exprimovala vyšší hladiny molekul souvisejících s dozráváním na DC stimulovaných pouze poly(I:C), což naznačuje synergický stimulační účinek fagocytovaných imunogenních buněk zabíjených HHP a poly(I:C). Mírné snížení fagocytární kapacity DC po přidání poly(I:C) lze vysvětlit indukcí zrání DC, které je doprovázeno snížením pohlcování antigenů a zvýšenou endocytickou aktivitou, protože současně DC zvyšují zpracování antigenů a jejich prezentaci (Banchereau et al., 2000; West et al., 2004). Zvýšení chemotaktické migrace a produkce prozánětlivých cytokinů bylo na druhé straně srovnatelné mezi poly(I:C)-stimulovanými dendritickými buňkami a DC-HHP vakcínou. To naznačuje, že imunogenicita buněk usmrcených HHP nepřispěla k produkci cytokinů ani k chemotaktické migraci indukované poly(I:C). Nízká produkce IL-10 a vysoká produkce IL-12p70, TNF- α a IFN- α potvrzují Th1 polarizační vlastnosti u DC stimulovaných poly(I:C).

Také jsme prokázali, že DC-HHP vakcína proti karcinomu plic vykazuje funkční plasticitu po přenosu do séra v podmínkách, které simulují přenos vakcíny do vnitřního prostředí pacientů s NSCLC. DC-HHP vakcína nebyla funkčně vyčerpána prvními maturačními stimuly s poly(I:C) a DC zvýšily expresi molekul spojených s dozráváním a produkci IL-12p70 jako odpověď na LPS a CD40L stimulaci (Banchereau et al., 2000; Macagno et al., 2007; Abdi et al., 2012). LPS představují silný maturační signál, který se pravděpodobně neobjeví u pacientů s NSCLC, pokud nedojde k bakteriální infekci. Na druhou stranu stimulace CD40L představuje fyziologickou signalizaci, se kterou se DC-HHP vakcína může setkat na povrchu jiných imunitních buněk, jako jsou B a T buňky po podání pacientům s NSCLC. Ligace CD40-CD40L poskytuje nezbytné konstimulační signály pro B a T buňky, je důležitá pro indukci cytotoxických CD8⁺ T lymfocytů a také zajišťuje dlouhodobé přežití DC (Macagno et al., 2007; Cella et al., 1996; Ma et al., 2009). V souladu s našimi údaji bylo dříve uvedeno, že lidské DC dozrávající s poly(I:C) si zachovávají svou schopnost produkovat IL-12p70 po další stimulaci CD40L (Rouas et al., 2004). Navíc ligace CD40L zvyšuje křížovou prezentaci DC (Delamarre et al., 2003). Naše data proto naznačují, že DC-HHP vakcína proti karcinomu plic může získat další stimulační aktivitu *in vivo* po podání pacientům s NSCLC.

Nejdůležitější je, že DC-HHP vakcína stimuluje proliferaci a produkci IFN- γ CD8⁺ a CD4⁺ T buňkami a snižuje počet CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T regulačních buněk *in vitro*. Stimulační kapacita T buněk DC-HHP vakcíny připravené ze zdravých dárců byla nicméně srovnatelná se stimulační kapacitou DC stimulovaných pouze poly(I:C), což ukazuje, že byly

indukovány T buňky, které nebyly specifické pro TAA odvozené z HHP-usmrcených nádorových buněk. Stimulace TAA-specifických T-lymfocytů je technicky náročná kvůli jejich velmi nízké frekvenci v krvi, proto jsme vytvořili umělý antigenní systém založený na imunodominantním epitopu CD8⁺ T buněk z MP1 proteinu chřipky. Použitím buněk A549 exprimujících MP1, jsme dokázali u zdravých dárců HLA-A*201⁺, že proteinový antigen odvozený z HHP-usmrcených buněk plicního karcinomu je skutečně zpracován a prezentován dendritickými buňkami autologním CD8⁺ T buňkám. Navíc při užití DC-HHP vakcíny připravené z monocytů pacientů s NSCLC jsme pozorovali zvýšení proliferace a produkci IFN- γ CD8⁺ a CD4⁺ T buňkami v porovnání s T buňkami stimulovanými pouze pacientovými DC ošetřenými pouze poly(I:C). To naznačuje, že vakcínou byly stimulovány TAA-specifické T buňky. Úloha CD8⁺ T buněk v protinádorové imunitě je dobře známa, avšak v současné době není jasné, zda CD4⁺ T buňky indukované CD-HHP vakcínou proti karcinomu plic mohou zprostředkovat určitý protinádorový účinek (Perez-Diez et al., 2007). Pozorovali jsme produkci IFN- γ a proliferaci CD4⁺ T buněk od pacientů s NSCLC a proto je lákavé spekulovat, že tyto T buňky mohou hrát roli při formování protinádorových odpovědí po imunoterapii DC-HHP vakcínou proti karcinomu plic.

6 Závěry a zhodnocení cílů a hypotéz práce

6.1 Závěry týkající se specifické protinádorové humorální odpovědi

V souhrnu jsme zde poprvé ukázali, že autoprotilátky proti CT antigenu NY-ESO-1 korelují s historií kouření u pacientů s NSCLC, což naznačuje, že chronický zánět spojený s kouřením může indukovat vývoj NY-ESO-1 specifických imunitních odpovědí. Pozorovali jsme také, že nádorově-asociovaná exprese MAGE-A4 koreluje s historií kouření, což by mohlo pokazovat na roli MAGE-A4 v počátečních stádiích vývoje NSCLC. Vzhledem k tomu, že jak nádorově asociovaná exprese NY-ESO-1 tak MAGE-A4 byla v inverzní korelaci s přežíváním v pokročilých stádiích onemocnění (Gure et al., 2005; Yoshida et al., 2006; Grah et al., 2008), klinický a imunoterapeutický význam našich nálezů zůstává otevřen dalšímu výzkumu.

6.2 Závěry týkající se specifické protinádorové celulární odpovědi

V souhrnu jsme ukázali, že DC-HHP vakcína proti karcinomu plic, která je připravena v GMP kompatibilním médiu bez séra, je imunologicky aktivní a vykazuje funkční plasticitu vůči imunostimulačnímu T_H1 polarizujícímu fenotypu in vitro. Tyto výsledky představují důležité preklinické údaje pro probíhající fázi I/II klinické studie, která kombinuje aktivní imunoterapii založenou na DC (DCVAC/LuCa) s chemoterapií a imunostimulačními látkami. (NCT02470468).

7 Souhrn

Maligní nádorová onemocnění se stávají v současné době ekvivalentem velkých infekčních epidemií minulosti. Infekční onemocnění nyní již díky moderní léčbě a také profylaktickému očkování globálně nepředstavují takovou hrozbu, jako tomu bylo v časech dávno minulých, naopak maligní onemocnění se stávají stále významnější příčinou morbidit a mortality. V roce 2010 zemřelo na maligní onemocnění více než 7 milionů lidí na celém světě. Čtvrtina všech úmrtí v Americe a kolem 15 % na světě je přičítáno rakovině, u některých nádorů rakovina předstihne onemocnění srdce a stane se nejběžnější příčinou smrti (Mukherjee S., 2011).

V současné onkologii zažívá imunoterapie velkou renezanci a je na vzestupu. Snažíme se o vymýcení choroby u jejích kořenů, tam kde vznikla chybou v imunitním dohledu. Snažíme se obrátit vlastní imunitní systém pacienta proti nádorovému bujení. Nové slibné poznatky v rovině experimentální, ale i klinické již přinášejí své ovoce.

Karcinom plic je celosvětově vedoucí příčinou úmrtí pro maligní onemocnění. V naší práci jsme zkoumali imunitní děje u nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC). První ze dvou studií byla zaměřena na humorální složku specifické protinádorové odpovědi a prospektivně analyzovala sérové frekvence protinádorových protilátek NY-ESO-1, Her2/*neu* and MAGE-A4 u 121 pacientů s NSCLC. V této studii jsme poprvé prokázali, že kouření tabáku významně ovlivňuje specifickou humorální imunitní odpověď, frekvence NY-ESO-1 protilátek je signifikantně vyšší v séru kuřáků a ex-kuřáků. Druhá ze dvou studií byla více zaměřena na celulární složku specifické protinádorové odpovědi a testovala vakcínu připravenou z dendritických buněk prezentujících antigeny buněk karcinomu plic, usmrcených vysokým hydrostatickým tlakem (DC-HHP vakcína). DC-HHP vakcína manifestovala zralý fenotyp, produkovala prozánětlivé cytokiny, zvyšovala chemotaktickou migraci, indukovala nádor specifické CD8⁺ a CD4⁺ T lymfocyty. Vysoký hydrostatický tlak (HHP) indukuje v nádorových buňkách imunogenní smrt, tento typ buněčné smrti je stěžejní pro navození účinné protinádorové imunitní odpovědi.

Naše poznatky jsou pouze malou součástí velké vědecké mozaiky a my velmi doufáme, že by mohly přispět k dosažení vytouženého cíle, kterým je vymýcení rakoviny, stejně tak, jak se tomu v minulosti stalo u některých infekčních onemocnění.

Summary

Malignancies can be currently compared to major infectious epidemics of the past. Nowadays due to a modern treatment as well as prophylactic vaccination infectious diseases are not a threat globally as it has been the case in the past. Malignant diseases have increasingly become an important cause of morbidity and mortality. In 2010, malignant disease was a cause of death of more than 7 million people worldwide a quarter of all deaths in America and around 15% worldwide are attributed to cancer. In some cases cancer overcomes the number of deaths related to heart diseases putting it as the most common cause of death (Mukherjee S., 2011).

In current oncology, immunotherapy is on the rise. Immunotherapy aims to eradicate malignant diseases at its roots caused by an inefficient immune surveillance and reverse the patient's immune system against tumor growth. New promising immunotherapeutic approaches in the experimental and clinical field already showing its success, however still limited.

Pulmonary carcinoma represents a leading cause of death worldwide for malignancies. In our work we investigated immune events in non-small cell lung carcinoma (NSCLC). The first of two studies focused on the humoral component of the specific anticancer response and prospectively analyzed the serum frequencies of the NY-ESO-1, Her2/*neu* and MAGE-A4 anti-tumor antibodies in 121 patients with NSCLC. In this study, we first demonstrated that smoking tobacco significantly affects specific humoral immune response; the NY-ESO-1 antibody frequency is significantly higher in the serum of smokers and ex-smokers. The second of the two studies was more focused on the cellular component of the specific antitumor response investigating the activity of the dendritic cell-based vaccine to present antigens of lung cancer cells killed by high hydrostatic pressure (DC-HHP vaccine) to T cells. The DC-HHP vaccine manifested a mature phenotype, produced pro-inflammatory cytokines, increased chemotactic migration, induced tumor-specific CD8⁺ and CD4⁺ T-lymphocytes. High hydrostatic pressure (HHP) induces immunogenic death in tumor cells; this type of cell death is crucial to induce effective anti-tumor immune responses.

Although our data represent only a small piece of a large scientific mosaic of knowledge, we are confident they could contribute to knowledge necessary to fight malignant diseases in a similar way that led to the eradication of some infectious diseases in the past.

8 Seznam použité literatury

1. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am J Med Sci.* 1893;105:487
2. Burnet FM. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J.* 1957 Apr 6;1(5022):779-86.
3. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002 Nov;3(11):991-8.
4. Zamai L, Ponti C, Mirandola P, Gobbi G, Papa S, Galeotti L, Cocco L, Vitale M. NK cells and cancer. *J Immunol.* 2007 Apr 1;178(7):4011-6.
5. Bottino C, Moretta L, Pende D, Vitale M, Moretta A. Learning how to discriminate between friends and enemies, a lesson from Natural Killer cells. *Mol Immunol.* 2004 Jul;41(6-7):569-75.
6. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Söderström K, D'Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH, Lanier LL, McMichael AJ. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature.* 1998 Feb 19;391(6669):795-9.
7. Moretta L, Bottino C, Pende D, Vitale M, Mingari MC, Moretta A. Different checkpoints in human NK-cell activation. *Trends Immunol.* 2004 Dec;25(12):670-6.
8. Murray PJ, Wynn TA. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J Leukoc Biol.* 2011 Apr;89(4):557-63. doi: 10.1189/jlb.0710409. Epub 2011 Jan 19.
9. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:323-50.
10. Rahat MA, Hemmerlein B. Macrophage-tumor cell interactions regulate the function of nitric oxide. *Front Physiol.* 2013 Jun 18;4:144. doi: 10.3389/fphys.2013.00144. eCollection 2013.
11. Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev.* 2008 Apr;222:155-61. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00607.x.
12. Allavena P, Mantovani A. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *Clin Exp Immunol.* 2012 Feb;167(2):195-205. doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04515.x.
13. Donnem T, Hald SM, Paulsen EE, Richardsen E, Al-Saad S, Kilvaer TK, Brustugun OT, Helland A, Lund-Iversen M, Poehl M, Olsen KE, Ditzel HJ, Hansen O, Al-Shibli K, Kiselev Y, Sandanger TM, Andersen S, Pezzella F, Bremnes RM, Busund LT. Stromal CD8+ T-cell Density—A Promising Supplement to TNM Staging in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2015 Jun 1;21(11):2635-43. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1905. Epub 2015 Feb 13.
14. Donnem T, Kilvaer TK, Andersen S, Richardsen E, Paulsen EE, Hald SM, Al-Saad S, Brustugun OT, Helland A, Lund-Iversen M, Solberg S, Gronberg BH, Wahl SG, Helgeland L, Fløtten O, Pohl M, Al-Shibli K, Sandanger TM, Pezzella F, Busund LT, Bremnes RM. Strategies for clinical implementation of TNM-Immunoscore in resected nonsmall-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2016 Feb;27(2):225-32. doi: 10.1093/annonc/mdv560. Epub 2015 Nov 16.
15. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 2012 Jul 13;12(8):557-69. doi: 10.1038/nri3254.
16. Petersen TR, Dickgreber N, Hermans IF. Tumor antigen presentation by dendritic cells. *Crit Rev Immunol.* 2010;30(4):345-86.

17. Germain RN. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell*. 1994 Jan 28;76(2):287-99.
18. Hivroz C, Chemin K, Turret M, Crosstalk between T lymphocytes and dendritic cells. Bohineust A. *Crit Rev Immunol*. 2012;32(2):139-55.
19. Bernard A, Lamy And L, Alberti I. The two-signal model of T-cell activation after 30 years. *Transplantation*. 2002 Jan 15;73(1 Suppl):S31-5.
20. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*. 2013 Apr;13(4):227-42. doi: 10.1038/nri3405. Epub 2013 Mar 8.
21. Thibult ML, Mamessier E, Gertner-Dardenne J, Pastor S, Just-Landi S, Xerri L, Chetaille B, Olive D. PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. *Int Immunol*. 2013 Feb;25(2):129-37. doi: 10.1093/intimm/dxs098. Epub 2012 Oct 18.
22. Ballbach M, Dannert A, Singh A, Siegmund DM, Handgretinger R, Piali L, Rieber N, Hartl D. Expression of checkpoint molecules on myeloid-derived suppressor cells. *Immunol Lett*. 2017 Dec;192:1-6. doi: 10.1016/j.imlet.2017.10.001. Epub 2017 Oct 4.
23. Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol*. 2006 Jan;126(1):32-41.
24. Zavadová E. – Říhová B. Imunitní reakce jako spolutvůrce úspěšné protinádorové terapie. In *Onkologická imunologie* . 1. vyd. Praha: Mladá Fronta a.s., 2015. Kapitola 1, s. 15-21.
25. Kobold S, Luetkens T, Cao Y, Bokemeyer C, Atanackovic D. Prognostic and diagnostic value of spontaneous tumor-related antibodies. *Clin Dev Immunol*. 2010;2010:721531
26. Hořejší V. Antitumor Weapons of the Immune System. *Klin Onkol* 2015; 28(Suppl 4): 15-22. DOI: 10.14735/amko20154S15.
27. Weiner LM, Murray JC, Shuptrine CW. Antibody-based immunotherapy of cancer. *Cell*. 2012 Mar 16;148(6):1081-4. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.034.
28. Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005 Aug;5(8):615-25.
29. Gutierrez C, Schiff R. HER2: biology, detection, and clinical implications. *Arch Pathol Lab Med*. 2011 Jan;135(1):55-62. doi: 10.1043/2010-0454-RAR.1.
30. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:51-72. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-100008. Epub 2012 Nov 12.
31. Dudek AM, Garg AD, Krysko DV, De Ruyscher D, Agostinis P. Inducers of immunogenic cancer cell death. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013 Aug;24(4):319-33. doi: 10.1016/j.cytogfr.2013.01.005. Epub 2013 Feb 5.
32. Garg AD, Nowis D, Golab J, Vandenabeele P, Krysko DV, Agostinis P. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jan;1805(1):53-71. doi: 10.1016/j.bbcan.2009.08.003. Epub 2009 Aug 28.
33. Garg AD, Dudek AM, Agostinis P. Cancer immunogenicity, danger signals, and DAMPs: what, when, and how? *Biofactors*. 2013 Jul-Aug;39(4):355-67. doi: 10.1002/biof.1125. Epub 2013 Jul 31.
34. Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, Tesniere A, Bjorklund AC, Chapman DC, Durchschlag M, Joza N, Pierron G, van Endert P, Yuan J, Zitvogel L, Madeo F, Williams DB, Kroemer G. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J*. 2009 Mar 4;28(5):578-90. doi: 10.1038/emboj.2009.1. Epub 2009 Jan 22.
35. 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 Jun 1;109(11):4839-45. Epub 2007 Feb 13.
36. Garg AD, Krysko DV, Verfaillie T, Kaczmarek A, Ferreira GB, Marysael T, Rubio N, Firczuk M, Mathieu C, Roebroek AJ, Annaert W, Golab J, de Witte P, Vandenameele P, Agostinis P. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *EMBO J*. 2012 Mar 7;31(5):1062-79. doi: 10.1038/emboj.2011.497. Epub 2012 Jan 17.
 37. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Criollo A, Ortiz C, Lidereau R, Mariette C, Chaput N, Mira JP, Delaloge S, André F, Tursz T, Kroemer G, Zitvogel L. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol Rev*. 2007 Dec;220:47-59.
 38. Krysko DV, Vandenameele P. From regulation of dying cell engulfment to development of anti-cancer therapy. *Cell Death Differ*. 2008 Jan;15(1):29-38. Epub 2007 Nov 16.
 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 Res*. 2011 Jul 15;71(14):4821-33. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0950. Epub 2011 May 20.
 40. 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. *Int J Cancer*. 2014 Sep 1;135(5):1165-77. doi: 10.1002/ijc.28766. Epub 2014 Feb 20.
 41. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenameele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2012 Dec;12(12):860-75. doi: 10.1038/nrc3380. Epub 2012 Nov 15.
 42. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, Métivier D, Larochette N, van Endert P, Ciccocanti F, Piacentini M, Zitvogel L, Kroemer G. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med*. 2007 Jan;13(1):54-61. Epub 2006 Dec 24.
 43. Fučíková J, Bartůňková J, Špíšek R. The Concept of Immunogenic Cell Death in Antitumor Immunity. *Klin Onkol*. 2015;28 Suppl 4:4S48-55.
 44. Mockler MB, Conroy MJ, Lysaght J. Targeting T cell immunometabolism for cancer immunotherapy; understanding the impact of the tumor microenvironment. *Front Oncol*. 2014 May 16;4:107. doi: 10.3389/fonc.2014.00107. eCollection 2014.
 45. Alsaab HO, Sau S, Alzhirani R, Tatiparti K, Bhise K, Kashaw SK, Iyer AK. PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front Pharmacol*. 2017 Aug 23;8:561. doi: 10.3389/fphar.2017.00561. eCollection 2017.
 46. Andrews LP, Marciscano AE, Drake CG, Vignali DA. LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target. *Immunol Rev*. 2017 Mar;276(1):80-96. doi: 10.1111/imr.12519.
 47. Makkouk A, Chester C, Kohrt HE. Rationale for anti-CD137 cancer immunotherapy. *Eur J Cancer*. 2016 Feb;54:112-119. doi: 10.1016/j.ejca.2015.09.026. Epub 2016 Jan 2.
 48. Du W, Yang M, Turner A, Xu C, Ferris RL, Huang J, Kane LP, Lu B. TIM-3 as a Target for Cancer Immunotherapy and Mechanisms of Action. *Int J Mol Sci*. 2017 Mar 16;18(3). pii: E645. doi: 10.3390/ijms18030645.
 49. Říhová B, Šťastný M. History of Immuno-therapy - from Coley Toxins to Checkpoints of the Immune Reaction. *Klin Onkol*. 2015;28 Suppl 4:4S8-14.

50. Kuper H, Adami HO, Boffetta P. Tobacco use, cancer causation and public health impact. *J Intern Med.* 2002 Jun;251(6):455-66.
51. Stewart SL, Cardinez CJ, Richardson LC, Norman L, Kaufmann R, Pechacek TF, Thompson TD, Weir HK, Sabatino SA; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for cancers associated with tobacco use--United States, 1999-2004. *MMWR Surveill Summ.* 2008 Sep 5;57(8):1-33.
52. Jha P, Ranson MK, Nguyen SN, Yach D. Estimates of global and regional smoking prevalence in 1995, by age and sex. *Am J Public Health.* 2002 Jun;92(6):1002-6.
53. Alberg AJ, Brock MV, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: looking to the future. *J Clin Oncol.* 2005 May 10;23(14):3175-85.
54. Ng SP, Silverstone AE, Lai ZW, Zelikoff JT. Effects of prenatal exposure to cigarette smoke on offspring tumor susceptibility and associated immune mechanisms. *Toxicol Sci.* 2006 Jan;89(1):135-44. Epub 2005 Oct 5.
55. Ji H, Houghton AM, Mariani TJ, Perera S, Kim CB, Padera R, Tonon G, McNamara K, Marconcini LA, Hezel A, El-Bardeesy N, Bronson RT, Sugarbaker D, Maser RS, Shapiro SD, Wong KK. K-ras activation generates an inflammatory response in lung tumors. *Oncogene.* 2006 Mar 30;25(14):2105-12.
56. Woodruff PG, Koth LL, Yang YH, Rodriguez MW, Favoreto S, Dolganov GM, Paquet AC, Erle DJ. A distinctive alveolar macrophage activation state induced by cigarette smoking. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 Dec 1;172(11):1383-92. Epub 2005 Sep 15.
57. Smith CJ, Hansch C. The relative toxicity of compounds in mainstream cigarette smoke condensate. *Food Chem Toxicol.* 2000 Jul;38(7):637-46.
58. Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier LL. NK cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2005 Feb;17(1):29-35.
59. Swann JB, Coquet JM, Smyth MJ, Godfrey DI. CD1-restricted T cells and tumor immunity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2007;314:293-323.
60. Tollerud DJ, Clark JW, Brown LM, Neuland CY, Mann DL, Pankiw-Trost LK, Blattner WA, Hoover RN. Association of cigarette smoking with decreased numbers of circulating natural killer cells. *Am Rev Respir Dis.* 1989 Jan;139(1):194-8.
61. Mian MF, Lauzon NM, Stämpfli MR, Mossman KL, Ashkar AA. Impairment of human NK cell cytotoxic activity and cytokine release by cigarette smoke. *J Leukoc Biol.* 2008 Mar;83(3):774-84. Epub 2007 Nov 30.
62. Ng AK, Travis LB. Subsequent malignant neoplasms in cancer survivors. *Cancer J.* 2008 Nov-Dec;14(6):429-34. doi: 10.1097/PPO.0b013e31818d8779.
63. Adkins I, Fucikova J, Garg AD, Agostinis P, Špišek R. Physical modalities inducing immunogenic tumor cell death for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2014;3(12):e968434. doi:10.4161/21624011.2014.968434.
64. Choudhry H, Helmi N, Abdulaal WH, Zeyadi M, Zamzami MA, Wu W, Mahmoud MM, Warsi MK, Rasool M, Jamal MS. Prospects of IL-2 in Cancer Immunotherapy. *Biomed Res Int.* 2018 May 6;2018:9056173. doi: 10.1155/2018/9056173. eCollection 2018.
65. Vantuchová Y, Nežádoucí účinky imunoterapie interferonem alfa, *Dermatol. praxi* 2010; 4(3): 142–143
66. Garg AD, Coulie PG, Van den Eynde BJ, Agostinis P. Integrating Next-Generation Dendritic Cell Vaccines into the Current Cancer Immunotherapy Landscape. *Trends Immunol.* 2017 Aug;38(8):577-593. doi: 10.1016/j.it.2017.05.006. Epub 2017 Jun 10.
67. Wolchok JD, Hoos A, O'Day S, Weber JS, Hamid O, Lebbé C, Maio M, Binder M, Bohnsack O, Nichol G, Humphrey R, Hodi FS. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clin*

- Cancer Res. 2009 Dec 1;15(23):7412-20. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1624. Epub 2009 Nov 24.
68. Marrone KA, Brahmer JR. Using Immune Checkpoint Inhibitors in Lung Cancer. *Oncology (Williston Park)*. 2016 Aug;30(8):713-21.
 69. Hodi FS, Hwu WJ, Kefford R, Weber JS, Daud A, Hamid O, Patnaik A, Ribas A, Robert C, Gangadhar TC, Joshua AM, Hersey P, Dronca R, Joseph R, Hille D, Xue D, Li XN, Kang SP, Ebbinghaus S, Perrone A, Wolchok JD. Evaluation of Immune-Related Response Criteria and RECIST v1.1 in Patients With Advanced Melanoma Treated With Pembrolizumab. *J Clin Oncol*. 2016 May 1;34(13):1510-7. doi: 10.1200/JCO.2015.64.0391. Epub 2016 Mar 7.
 70. Mlecnik B, Bindea G, Pages F, Galon J: Tumor immunosurveillance in human cancers. *Cancer Metastasis Rev* 2011, 30:5–12.
 71. Galon J, Pagès F, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, Lugli A, Zlobec I, Berger A, Bifulco C, Botti G, Tatangelo F, Britten CM, Kreiter S, Chouchane L, Delrio P, Arndt H, Asslaber M, Maio M, Masucci GV, Mihm M, Vidal-Vanaclocha F, Allison JP, Gnjjatic S, Hakansson L, Huber C, Singh-Jasuja H, Ottensmeier C, Zwierzina H, Laghi L, Grizzi F, Ohashi PS, Shaw PA, Clarke BA, Wouters BG, Kawakami Y, Hazama S, Okuno K, Wang E, O'Donnell-Tormey J, Lagorce C, Pawelec G, Nishimura MI, Hawkins R, Lapointe R, Lundqvist A, Khleif SN, Ogino S, Gibbs P, Waring P, Sato N, Torigoe T, Itoh K, Patel PS, Shukla SN, Palmqvist R, Nagtegaal ID, Wang Y, D'Arrigo C, Kopetz S, Sinicrope FA, Trinchieri G, Gajewski TF, Ascierto PA, Fox BA. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med*. 2012 Oct 3;10:205. doi: 10.1186/1479-5876-10-205.
 72. Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, Lagorce C, Wind P, Marliot F, Bruneval P, et al: In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin, Oncol* 2009, 27:5944–5951
 73. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*.2015;136:E359–E386.
 74. Doll R, Hill AB. Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. *BMJ*. 1950;2:739–748.
 75. Bozinovski S, Vlahos R, Anthony D, et al. COPD and squamous cell lung cancer: aberrant inflammation and immunity is the common link. *Br J Pharmacol*. 2016;173:635–648.
 76. Carbone D. Smoking and cancer. *Am J Med*. 1992;93:13S–17S.
 77. Hyndman IJ. Review: the contribution of both nature and nurture to carcinogenesis and progression in solid tumours. *Cancer Microenviron*. 2016;9:63– 69.
 78. Couraud S, Zalcman G, Milleron B, Morin F, Souquet PJ. Lung cancer in never smokers--a review. *European journal of cancer* 2012; 48:1299-311.
 79. Yano T, Haro A, Shikada Y, Maruyama R, Maehara Y. Non-small cell lung cancer in never smokers as a representative 'non-smoking-associated lung cancer': epidemiology and clinical features. *Int J Clin Oncol*. 2011;16:287–293.
 80. Reuschenbach M, von Knebel Doeberitz M, Wentzensen N. A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens. *Cancer Immunol Immunother*. 2009;58:1535–1544
 81. Jett JR, Peek LJ, Fredericks L, Jewell W, Pingleton WW, Robertson JF. Audit of the autoantibody test, EarlyCDT(R)-lung, in 1600 patients: an evaluation of its performance in routine clinical practice. *Lung Cancer*.2014;83:51–55.

82. Chapman CJ, Healey GF, Murray A, et al. EarlyCDT(R)- Lung test: improved clinical utility through additional autoantibody assays. *Tumour Biol.* 2012;33:1319–1326.
83. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, Horn L, Drake CG, Pardoll DM, Chen L, Sharfman WH, Anders RA, Taube JM, McMiller TL, Xu H, Korman AJ, Jure-Kunkel M, Agrawal S, McDonald D, Kollia GD, Gupta A, Wigginton JM, Sznol M. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med.* 2012 Jun 28;366(26):2443-54. doi: 10.1056/NEJMoa1200690. Epub 2012 Jun 2.
84. Gettinger S, Rizvi NA, Chow LQ, Borghaei H, Brahmer J, Ready N, Gerber DE, Shepherd FA, Antonia S, Goldman JW, Juergens RA, Laurie SA, Nathan FE, Shen Y, Harbison CT, Hellmann MD. Nivolumab Monotherapy for First-Line Treatment of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2016 Sep 1;34(25):2980-7. doi: 10.1200/JCO.2016.66.9929. Epub 2016 Jun 27.
85. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, Antonia S, Pluzanski A, Vokes EE, Holgado E, Waterhouse D, Ready N, Gainor J, Arén Frontera O, Havel L, Steins M, Garassino MC, Aerts JG, Domine M, Paz-Ares L, Reck M, Baudelet C, Harbison CT, Lestini B, Spigel DR. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015 Jul 9;373(2):123-35. doi: 10.1056/NEJMoa1504627. Epub 2015 May 31.
86. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, Chow LQ, Vokes EE, Felip E, Holgado E, Barlesi F, Kohlhäufel M, Arrieta O, Burgio MA, Fayette J, Lena H, Poddubskaya E, Gerber DE, Gettinger SN, Rudin CM, Rizvi N, Crinò L, Blumenschein GR Jr, Antonia SJ, Dorange C, Harbison CT, Graf Finckenstein F, Brahmer JR. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015 Oct 22;373(17):1627-39. doi: 10.1056/NEJMoa1507643. Epub 2015 Sep 27.
87. Edward B. Garon, Natasha B. Leighl, Naiyer A. Rizvi, George R. Blumenschein, Ani Sarkis Balmanoukian, Joseph Paul Eder, Jonathan Wade Goldman, Rina Hui, Jean-Charles Soria, Tara C. Gangadhar, Jong-Mu Sun, Amita Patnaik, Matthew A. Gubens, Gregory M. Lubiniecki, Jin Zhang, Michelle Niewood, Kenneth Emancipator, Marisa Dolled-Filhart, Mary Elizabeth Hanson, Leena Gandhi. Safety and clinical activity of MK-3475 in previously treated patients (pts) with non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 32:5s, 2014 (suppl; abstr 8020)
88. Sienel W, Varwerk C, Linder A, Kaiser D, Teschner M, Delire M, Stamatis G, Passlick B. Melanoma associated antigen (MAGE)-A3 expression in Stages I and II non-small cell lung cancer: results of a multi-center study. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2004 Jan;25(1):131-4.
89. Vansteenkiste J, Zielinski M, Linder A, Dahabreh J, Gonzalez EE, Malinowski W, Lopez-Brea M, Vanakesa T, Jassem J, Kalofonos H, Perdeus J, Bonnet R, Basko J, Janilionis R, Passlick B, Treasure T, Gillet M, Lehmann FF, Bricard VG. Adjuvant MAGE-A3 immunotherapy in resected non-small-cell lung cancer: phase II randomized study results. *J Clin Oncol.* 2013 Jul 1;31(19):2396-403. doi: 10.1200/JCO.2012.43.7103. Epub 2013 May 28.
90. Vansteenkiste JF, Cho BC, Vanakesa T, De Pas T, Zielinski M, Kim MS, Jassem J, Yoshimura M, Dahabreh J, Nakayama H, Havel L, Kondo H, Mitsudomi T, Zarogoulidis K, Gladkov OA, Udud K, Tada H, Hoffman H, Bugge A, Taylor P, Gonzalez EE, Liao ML, He J, Pujol JL, Louahed J, Debois M, Bricard V, Debruyne C, Therasse P, Altorki N. Efficacy of the MAGE-A3 cancer immunotherapeutic as

- adjuvant therapy in patients with resected MAGE-A3-positive non-small-cell lung cancer (MAGRIT): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2016 Jun;17(6):822-35. doi: 10.1016/S1470-2045(16)00099-1. Epub 2016 Apr 27.
91. Ho SB, Niehans GA, Lyftogt C, Yan PS, Cherwitz DL, Gum ET, Dahiya R, Kim YS. Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.* 1993 Feb 1;53(3):641-51.
 92. Sangha R, Butts C. L-BLP25: a peptide vaccine strategy in non small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2007 Aug 1;13(15 Pt 2):s4652-4.
 93. Butts C, Murray N, Maksymiuk A, Goss G, Marshall E, Soulières D, Cormier Y, Ellis P, Price A, Sawhney R, Davis M, Mansi J, Smith C, Vergidis D, Ellis P, MacNeil M, Palmer M. Randomized phase IIB trial of BLP25 liposome vaccine in stage IIIB and IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2005 Sep 20;23(27):6674-81.
 94. Charles Andrew Butts, Mark A. Socinski, Paul Mitchell, Nick Thatcher, Libor Havel, Maciej Jerzy Krzakowski, Sergiusz Nawrocki, Tudor-Eliade Ciuleanu, Lionel Bosquée, Jose Manuel Trigo Perez, Alexander I. Spira, Lise Tremblay, Jan Nyman, Rodryg Ramlau, Christoph Helwig, Martin H. Falk, Frances A. Shepherd. START: A phase III study of L-BLP25 cancer immunotherapy for unresectable stage III non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 31, 2013 (suppl; abstr 7500)
 95. Nemunaitis J, Dillman RO, Schwarzenberger PO, Senzer N, Cunningham C, Cutler J, Tong A, Kumar P, Pappen B, Hamilton C, DeVol E, Maples PB, Liu L, Chamberlin T, Shawler DL, Fakhrai H. Phase II study of belagenpumatucel-L, a transforming growth factor beta-2 antisense gene-modified allogeneic tumor cell vaccine in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2006 Oct 10;24(29):4721-30. Epub 2006 Sep 11.
 96. Galluzzi L, Vacchelli E, Bravo-San Pedro JM, Buque A, Senovilla L, Baracco EE, et al. Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget.* 2014 Dec 30;5(24):12472-508. PubMed PMID: 25537519. Pubmed Central PMCID: 4350348.
 97. 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 Oct 1;2(10):e25771. PubMed PMID: 24286020. Pubmed Central PMCID: 3841205.
 98. Datta J, Terhune JH, Lowenfeld L, Cintolo JA, Xu S, Roses RE, et al. Optimizing dendritic cell-based approaches for cancer immunotherapy. *The Yale journal of biology and medicine.* 2014 Dec;87(4):491-518. PubMed PMID: 25506283. Pubmed Central PMCID: 4257036.
 99. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology.* 2000;18:767-811. PubMed PMID: 10837075.
 100. Mukherji B, Chakraborty NG, Yamasaki S, Okino T, Yamase H, Sporn JR, et al. Induction of antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1995 Aug 15;92(17):8078-82. PubMed PMID: 7644541. Pubmed Central PMCID: 41290.
 101. 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 Jan;62(1):137-47. PubMed PMID: 22865266. Pubmed Central PMCID: 3541926.
 102. Podrazil M, Horvath R, Becht E, Rozkova D, Bilkova P, Sochorova K, Hromadkova H, Kayserova J, Vavrova K, Lastovicka J, Vrabцова P, Kubackova K,

- Gasova Z, Jarolim L, Babjuk M, Spisek R, Bartunkova J, Fucikova 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 Jul 20;6(20):18192-205.
103. Ueda Y, Itoh T, Nukaya I, Kawashima I, Okugawa K, Yano Y, et al. Dendritic cell-based immunotherapy of cancer with carcinoembryonic antigen-derived, HLA-A24-restricted CTL epitope: Clinical outcomes of 18 patients with metastatic gastrointestinal or lung adenocarcinomas. *International journal of oncology*. 2004 Apr;24(4):909-17. PubMed PMID: 15010829.
 104. Perroud MW, Jr., Honma HN, Barbeiro AS, Gilli SC, Almeida MT, Vassallo J, et al. Mature autologous dendritic cell vaccines in advanced non-small cell lung cancer: a phase I pilot study. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2011;30:65. PubMed PMID: 21682877. Pubmed Central PMCID: 3135553.
 105. Babatz J, Rollig C, Lobel B, Folprecht G, Haack M, Gunther H, et al. Induction of cellular immune responses against carcinoembryonic antigen in patients with metastatic tumors after vaccination with altered peptide ligand-loaded dendritic cells. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2006 Mar;55(3):268-76. PubMed PMID: 16034561.
 106. Takahashi H, Okamoto M, Shimodaira S, Tsujitani S, Nagaya M, Ishidao T, et al. Impact of dendritic cell vaccines pulsed with Wilms' tumour-1 peptide antigen on the survival of patients with advanced non-small cell lung cancers. *European journal of cancer*. 2013 Mar;49(4):852-9. PubMed PMID: 23245331.
 107. Morse MA, Clay TM, Hobeika AC, Osada T, Khan S, Chui S, et al. Phase I study of immunization with dendritic cells modified with fowlpox encoding carcinoembryonic antigen and costimulatory molecules. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005 Apr 15;11(8):3017-24. PubMed PMID: 15837756.
 108. Kontani K, Taguchi O, Ozaki Y, Hanaoka J, Sawai S, Inoue S, et al. Dendritic cell vaccine immunotherapy of cancer targeting MUC1 mucin. *International journal of molecular medicine*. 2003 Oct;12(4):493-502. PubMed PMID: 12964025.
 109. Chang GC, Lan HC, Juang SH, Wu YC, Lee HC, Hung YM, et al. A pilot clinical trial of vaccination with dendritic cells pulsed with autologous tumor cells derived from malignant pleural effusion in patients with late-stage lung carcinoma. *Cancer*. 2005 Feb 15;103(4):763-71. PubMed PMID: 15637694.
 110. Engell-Noerregaard L, Hendel HW, Johannesen HH, Alslev L, Svane IM. FDG PET scans as evaluation of clinical response to dendritic cell vaccination in patients with malignant melanoma. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2013 Jan;62(1):17-25. PubMed PMID: 22722450.
 111. Hirschowitz EA, Foody T, Kryscio R, Dickson L, Sturgill J, Yannelli J. Autologous dendritic cell vaccines for non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004 Jul 15;22(14):2808-15. PubMed PMID: 15254048.
 112. Hirschowitz EA, Foody T, Hidalgo GE, Yannelli JR. Immunization of NSCLC patients with antigen-pulsed immature autologous dendritic cells. *Lung cancer*. 2007 Sep;57(3):365-72. PubMed PMID: 17509725. Pubmed Central PMCID: 2063443.
 113. Hirschowitz EA, Mullins A, Prajapati D, Baeker T, Kloecker G, Foody T, et al. Pilot study of 1650-G: a simplified cellular vaccine for lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2011 Jan;6(1):169-73. PubMed PMID: 21150468.

114. Yannelli JR, Sturgill J, Foody T, Hirschowitz E. The large scale generation of dendritic cells for the immunization of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung cancer*. 2005 Mar;47(3):337-50. PubMed PMID: 15713517.
115. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annual review of immunology*. 2013;31:51-72. PubMed PMID: 23157435.
116. Adkins I, Fucikova J, Garg AD, Agostinis P, Spisek R. Physical modalities inducing immunogenic tumor cell death for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2014 Dec;3(12):e968434. PubMed PMID: 25964865. Pubmed Central PMCID: 4352954.
117. Tesniere A, Panaretakis T, Kepp O, Apetoh L, Ghiringhelli F, Zitvogel L, et al. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell death and differentiation*. 2008 Jan;15(1):3-12. PubMed PMID: 18007663.
118. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature reviews Cancer*. 2012 Dec;12(12):860-75. PubMed PMID: 23151605.
119. Fucikova J, Moserova I, Truxova I, Hermanova I, Vancurova I, Partlova S, et al. High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2014 Sep 1;135(5):1165-77. PubMed PMID: 24500981.
120. Kloudova K., Hromadkova H., Partlova S., Brtnicky T., Rob L., Bartunkova J., Hensler M., Halaska M.J., Spisek R., Fialova A. Expression of tumor antigen on primary ovarian cancer cells compared to established ovarian cancer cell lines. *Oncotarget* 2016 7(29) 46121-26.
121. Gnjatic S, Old LJ, Chen YT. Autoantibodies against cancer antigens. *Methods in molecular biology* 2009; 520:11-9.
122. Long YY, Wang Y, Huang QR, Zheng GS, Jiao SC. Measurement of serum antibodies against NY-ESO-1 by ELISA: A guide for the treatment of specific immunotherapy for patients with advanced colorectal cancer. *Experimental and therapeutic medicine* 2014; 8:1279-84.
123. Stockert E, Jager E, Chen YT, Scanlan MJ, Gout I, Karbach J, et al. A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *The Journal of experimental medicine* 1998; 187:1349-54.
124. Truxova I, Pokorna K, Kloudova K, Partlova S, Spisek R, Fucikova J. Day 3 Poly (I:C)-activated dendritic cells generated in CellGro for use in cancer immunotherapy trials are fully comparable to standard Day 5 DCs. *Immunology letters*. 2014 Jul;160(1):39-49. PubMed PMID: 24726860
125. Okamura K, Takayama K, Izumi M, Harada T, Furuyama K, Nakanishi Y. Diagnostic value of CEA and CYFRA 21-1 tumor markers in primary lung cancer. *Lung cancer* 2013; 80:45-9
126. Fucikova J, Moserova I, Truxova I, Hermanova I, Vancurova I, Partlova S, et al. High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2014 Sep 1;135(5):1165-77. PubMed PMID: 24500981.
127. Truxova I, Pokorna K, Kloudova K, Partlova S, Spisek R, Fucikova J. Day 3 Poly (I:C)-activated dendritic cells generated in CellGro for use in cancer immunotherapy trials are fully comparable to standard Day 5 DCs. *Immunology letters*. 2014 Jul;160(1):39-49. PubMed PMID: 24726860.
128. Chapman CJ, Murray A, McElveen JE, Sahin U, Luxemburger U, Tureci O, et al. Autoantibodies in lung cancer: possibilities for early detection and subsequent cure. *Thorax* 2008; 63:228-33.

129. Tureci O, Mack U, Luxemburger U, Heinen H, Krummenauer F, Sester M, et al. Humoral immune responses of lung cancer patients against tumor antigen NY-ESO-1. *Cancer letters* 2006; 236:64-71.
130. Tajima K, Obata Y, Tamaki H, Yoshida M, Chen YT, Scanlan MJ, et al. Expression of cancer/testis (CT) antigens in lung cancer. *Lung cancer* 2003; 42:23-33.
131. Gure AO, Chua R, Williamson B, Gonen M, Ferrera CA, Gnjatic S, et al. Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2005; 11:8055-62.
132. Konishi J, Toyooka S, Aoe M, Omura Y, Washio K, Tsukuda K, et al. The relationship between NY-ESO-1 mRNA expression and clinicopathological features in non-small cell lung cancer. *Oncology reports* 2004; 11:1063-7.
133. Kim YD, Park HR, Song MH, Shin DH, Lee CH, Lee MK, et al. Pattern of cancer/testis antigen expression in lung cancer patients. *International journal of molecular medicine* 2012; 29:656-62.
134. Yoshida N, Abe H, Ohkuri T, Wakita D, Sato M, Noguchi D, et al. Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens and T cell infiltration in non-small cell lung carcinoma and their prognostic significance. *International journal of oncology* 2006; 28:1089-98.
135. Grunwald C, Koslowski M, Arsiray T, Dhaene K, Praet M, Victor A, et al. Expression of multiple epigenetically regulated cancer/germline genes in nonsmall cell lung cancer. *International journal of cancer* 2006; 118:2522-8.
136. Takenaka M, Hanagiri T, Shinohara S, Kuwata T, Chikaishi Y, Oka S, et al. The prognostic significance of HER2 overexpression in non-small cell lung cancer. *Anticancer research* 2011; 31:4631-6.
137. Mar N, Vredenburgh JJ, Wasser JS. Targeting HER2 in the treatment of non-small cell lung cancer. *Lung cancer* 2015; 87:220-5.
138. van Rhee F, Szmania SM, Zhan F, Gupta SK, Pomtree M, Lin P, et al. NY-ESO-1 is highly expressed in poor-prognosis multiple myeloma and induces spontaneous humoral and cellular immune responses. *Blood* 2005; 105:3939-44.
139. Gnjatic S, Nishikawa H, Jungbluth AA, Gure AO, Ritter G, Jager E, et al. NY-ESO-1: review of an immunogenic tumor antigen. *Advances in cancer research* 2006; 95:1-30.
140. Esfandiary A, Ghafouri-Fard S. New York esophageal squamous cell carcinoma-1 and cancer immunotherapy. *Immunotherapy* 2015; 7:411-39.
141. De Smet C, Lurquin C, Lethe B, Martelange V, Boon T. DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Molecular and cellular biology* 1999; 19:7327-35.
142. Konkankit VV, Kim W, Koya RC, Eskin A, Dam MA, Nelson S, et al. Decitabine immunosensitizes human gliomas to NY-ESO-1 specific T lymphocyte targeting through the Fas/Fas ligand pathway. *Journal of translational medicine* 2011; 9:192.
143. Shigematsu Y, Hanagiri T, Shiota H, Kuroda K, Baba T, Mizukami M, et al. Clinical significance of cancer/testis antigens expression in patients with non-small cell lung cancer. *Lung cancer* 2010; 68:105-10.
144. Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease * 12: New treatments for COPD. *Thorax* 2003; 58:803-8.
145. Anthonisen NR, Connett JE, Kiley JP, Altose MD, Bailey WC, Buist AS, et al. Effects of smoking intervention and the use of an inhaled anticholinergic

- bronchodilator on the rate of decline of FEV1. The Lung Health Study. *Jama* 1994; 272:1497-505.
146. Cho HJ, Caballero OL, Gnjatic S, Andrade VC, Colleoni GW, Vettore AL, et al. Physical interaction of two cancer-testis antigens, MAGE-C1 (CT7) and NY-ESO-1 (CT6). *Cancer immunity* 2006; 6:12.
 147. Sang M, Lian Y, Zhou X, Shan B. MAGE-A family: attractive targets for cancer immunotherapy. *Vaccine* 2011; 29:8496-500.
 148. Jang SJ, Soria JC, Wang L, Hassan KA, Morice RC, Walsh GL, et al. Activation of melanoma antigen tumor antigens occurs early in lung carcinogenesis. *Cancer research* 2001; 61:7959-63.
 149. Peikert T, Specks U, Farver C, Erzurum SC, Comhair SA. Melanoma antigen A4 is expressed in non-small cell lung cancers and promotes apoptosis. *Cancer research* 2006; 66:4693-700.
 150. Grah J, Samija M, Juretic A, Sarcevic B, Sobat H. Immunohistochemical expression of cancer/testis antigens (MAGE-A3/4, NY-ESO-1) in non-small cell lung cancer: the relationship with clinical-pathological features. *Collegium antropologicum* 2008; 32:731-6.
 151. Groeper C, Gambazzi F, Zajac P, Bubendorf L, Adamina M, Rosenthal R, et al. Cancer/testis antigen expression and specific cytotoxic T lymphocyte responses in non small cell lung cancer. *International journal of cancer* 2007; 120:337-43
 152. Karanikas V, Tsochas S, Boukas K, Kerenidi T, Nakou M, Dahabreh J, et al. Co-expression patterns of tumor-associated antigen genes by non-small cell lung carcinomas: implications for immunotherapy. *Cancer biology & therapy*. 2008 Mar;7(3):345-52. PubMed PMID: 18094614.
 153. 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. PubMed PMID: 22208910. Pubmed Central PMCID: 3259090.
 154. West MA, Wallin RP, Matthews SP, Svensson HG, Zaru R, Ljunggren HG, et al. Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science*. 2004 Aug 20;305(5687):1153-7. PubMed PMID: 15326355.
 155. Macagno A, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation. *Trends in immunology*. 2007 May;28(5):227-33. PubMed PMID: 17403614.
 156. Abdi K, Singh NJ, Matzinger P. Lipopolysaccharide-activated dendritic cells: "exhausted" or alert and waiting? *Journal of immunology*. 2012 Jun 15;188(12):5981-9. PubMed PMID: 22561154. Pubmed Central PMCID: 3370068.
 157. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *The Journal of experimental medicine*. 1996 Aug 1;184(2):747-52. PubMed PMID: 8760829. Pubmed Central PMCID: 2192696.
 158. Ma DY, Clark EA. The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Seminars in immunology*. 2009 Oct;21(5):265-72. PubMed PMID: 19524453. Pubmed Central PMCID: 2749083.
 159. Rouas R, Lewalle P, El Ouriaghli F, Nowak B, Duvillier H, Martiat P. Poly(I:C) used for human dendritic cell maturation preserves their ability to secondarily secrete bioactive IL-12. *International immunology*. 2004 May;16(5):767-73. PubMed PMID: 15096480.

160. Delamarre L, Holcombe H, Mellman I. Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation. *The Journal of experimental medicine*. 2003 Jul 7;198(1):111-22. PubMed PMID: 12835477. Pubmed Central PMCID: 2196081
161. Perez-Diez A, Joncker NT, Choi K, Chan WF, Anderson CC, Lantz O, et al. CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. *Blood*. 2007 Jun 15;109(12):5346-54. PubMed PMID: 17327412. Pubmed Central PMCID: 1890845.
162. Mukherjee S., Vládkyně všech nemocí, příběh rakoviny. Brno 2015, Masarykova Univerzita, ISBN 978-80-210-7761-4, str.11

9 Seznam příloh

1. Příloha 1: Obrázek 3
2. Příloha 2: Obrázek 4
3. Příloha 3: Obrázek 5
4. Příloha 4: Obrázek 6
5. Příloha 5: Obrázek 7
6. Příloha 6: Publikace Myšíková D, Adkins I, Naďa H, Palata O, Šimonek J, Pozniak J, Kolařík J, Skallová-Fialová A, Špišek R, Lischke R. ***Case-control study: Smoking history affects the production of tumor antigen specific antibodies NY-ESO-1 in patients with lung cancer in comparison with cancer disease free group.*** *J Thorac Oncol*. 2017 Feb;12(2):249-257
7. Příloha 7: Publikace Hradilova N, Sadilkova L, Palata O, Mysikova D, Mrazkova H, Lischke R, Spisek R, Adkins I. ***Generation of dendritic cell-based vaccine using high hydrostatic pressure for non-small cell lung cancer immunotherapy.*** *PLoS One*. 2017 Feb 10;12(2):e0171539
8. Příloha 8: Autoreferát