

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Barbora Muffová

Využití inhibitorů indolamin 2,3-dioxygenázy 1 v nádorové imunoterapii

Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 inhibitors in cancer immunotherapy

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Ingrid Poláková, Ph.D.

Praha, 2020

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Ingrid Polákové, Ph.D. za její čas, ochotu, rady a pozitivní přístup během vedení mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala své rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu mého studia bezmezně podporují.

Prohlášení

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

V Praze, 2.6.2020

Podpis:

Barbora Muffová

Abstrakt

Malé množství enzymu indolamin 2,3-dioxygenázy (IDO 1) je exprimováno ve většině tkáních savčího organismu. Zvýšená produkce enzymu je detekována u mnoha nádorových onemocnění. IDO 1 se účastní prvního kroku kynureninové dráhy, kde katalyzuje přeměnu tryptofanu (Trp) na N-formylkynurenin, který je dále metabolizován na kynurenin (Kyn). V rámci studia a léčby IDO 1⁺ nádorů může být poměr mezi kynureninem a tryptofanem (kyn/trp) využíván jako prognostický marker, který demonstruje míru aktivity enzymu IDO 1 v nádoru. Cílem nádorové imunoterapie založené na inhibici IDO 1 je zvrátit nebo alespoň zmírnit pronádorový efekt tohoto enzymu, tedy zamezit inhibici efektorových NK a T-buněk, tvorbě regulačních T-lymfocytů nebo využití s nádorem asociovaných makrofágů (TAM). Inhibitory IDO 1 byly zkoumány v rámci monoterapie i v kombinaci s inhibitory cytotoxického s T-lymfocyty asociovaného antigenu 4 (CTLA-4) či proteinu programované buněčné smrti 1 (PD-1). V poslední době se pozornost upírá k tvorbě takových inhibitorů, které by byly schopny inhibovat nejen aktivitu IDO 1, ale zároveň aktivitu dalších tryptofan katalyzujících proteinů, indolamin 2,3-dioxygenáza 2 (IDO 2) nebo tryptofan 2,3-dioxygenázy (TDO). Nádorová imunoterapie založená na inhibici IDO 1 může být kombinována také s chemoterapií.

Klíčová slova: IDO 1, inhibitory, nádorová imunoterapie

Abstract

The indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO 1) enzyme is expressed in small amounts in most of the mammalian tissues, and its production is detected also in various types of tumours. IDO 1 catalyses the very first step of the kynurenine pathway, the tryptophan conversion to N-formylkynurenine, which is further metabolized to kynurenine (Kyn). The kynurenine/ tryptophan ratio (kyn/trp) may be used as a prognostic marker in research and treatment of IDO 1⁺ tumours. The kyn/trp demonstrates the activity of IDO 1 in tumours. The goal of cancer immunotherapy based on IDO 1 inhibition is to reverse or reduce the protumour effects of IDO 1, such as avoiding NK and T cells inhibition and activation of regulatory T cells or association with tumour-associated macrophages (TAM). IDO 1 inhibitors have been examined alone in monotherapy or together with cytotoxic T-lymphocytes antigen 4 (CTLA-4) inhibitors and programmed cell death protein 1 (PD-1) inhibitors in combined therapy. Recently, several studies are dedicated to invent inhibitors, which are able to inhibit the activity of other trp-catalysing enzymes, the indoleamine 2,3-dioxygenase 2 (IDO 2) and tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO), together with the IDO 1 activity. Cancer immunotherapy based on IDO 1 inhibition may be combined also with chemotherapy.

Key words: IDO 1, inhibitors, cancer immunotherapy

Seznam použitých zkratek

<i>A</i>	<i>Alanine</i>	<i>Alanin</i>
<i>AhR</i>	<i>Aryl hydrocarbon receptor</i>	<i>Aryl hydrokarbonový receptor</i>
<i>APC</i>	<i>Antigen-presenting cells</i>	<i>Antigen prezentující buňky</i>
<i>AQP4</i>	<i>Aquaporine 4</i>	<i>Akvaporin 4</i>
<i>Bin1</i>	<i>Bridging integrator-1</i>	<i>Překlenovací integrátor 1</i>
<i>BMDC</i>	<i>Bone marrow-derived dendritic cells</i>	<i>Dendritické buňky odvozené od kostní dřevě</i>
<i>CNS</i>	<i>Central nervous system</i>	<i>Centrální nervový systém</i>
<i>COX-2</i>	<i>Cyclooxygenase 2</i>	<i>Cyklooxygenáza 2</i>
<i>COX-2/PGE2 pathway</i>	<i>Cyclooxygenase 2/ Prostaglandin E2 pathway</i>	<i>Dráha cyklooxygenáza 2/ prostaglandin E2</i>
<i>CRP</i>	<i>C-reactive protein</i>	<i>C reaktivní protein</i>
<i>CTLA-4</i>	<i>Cytotoxic T-lymphocytes antigen 4</i>	<i>Cytotoxický s T-lymfocyty asociovaný antigen 4</i>
<i>Cyp1a1</i>	<i>Cytochrome P450 1a1 gene</i>	<i>Gen cytochrom P450 1a1</i>
<i>D-1MT</i>	<i>1-methyl-D- tryptophan</i>	<i>1-metyl-D-tryptofan</i>
<i>DC</i>	<i>Dendritic cells</i>	<i>Dendritické buňky</i>
<i>Dox</i>	<i>Doxorubicin</i>	<i>Doxorubicin</i>
<i>eIF2</i>	<i>Eukaryotic initiation factor 2</i>	<i>Eukaryotický iniciační faktor 2</i>
<i>FoxP3</i>	<i>Forkhead box P3 transcription factor</i>	<i>Transkripční faktor „Forkhead box P3“</i>
<i>GAS</i>	<i>Gamma-interferon-activation sites</i>	<i>Interferonem γ aktivovaná místa</i>
<i>GCN2</i>	<i>General control nonderepressible 2 protein kinase</i>	<i>Protein kináza „General control nonderepressible 2“</i>
<i>hRT</i>	<i>Hypofractionated radiotherapy</i>	<i>Hypofrakcionovaná radioterapie</i>
<i>IDO 1</i>	<i>Indoleamin 2,3-dioxygenase 1</i>	<i>Indolamin 2,3-dioxygenáza 1</i>
<i>IDO 2</i>	<i>Indoleamin 2,3-dioxygenase 2</i>	<i>Indolamin 2,3-dioxygenáza 2</i>
<i>IFN α</i>	<i>Interferon α</i>	<i>Interferon α</i>
<i>IFN γ</i>	<i>Interferon γ</i>	<i>Interferon γ</i>
<i>INDOL1</i>	<i>Indolamine 2,3 dioxygenase– like protein</i>	<i>Protein podobný indolamin 2,3-dioxygenáze</i>
<i>irRC</i>	<i>Immune-related response criteria</i>	<i>Kritéria imunitní související odezvy</i>
<i>ISRE</i>	<i>Interferon-stimulated response elements</i>	<i>Elementy odpovídající na stimulaci interferonem</i>
<i>JAK/STAT</i>	<i>Janus kinase/ Signal Transducers and Activators of Transcription</i>	<i>Janusova kináza/ Převaděče signálu a aktivátory transkripce</i>
<i>Kyn</i>	<i>Kynurenine</i>	<i>Kynurenin</i>
<i>LNA modified ASOs</i>	<i>Locked nucleic acid modified antisense oligonucleotides</i>	<i>Antisense oligonukleotidy modifikované uzamčenou nukleovou kyselinou</i>
<i>LN</i>	<i>Lymph nodes</i>	<i>Lymfatické uzliny</i>
<i>LPS</i>	<i>Lipopolysaccharide</i>	<i>Lipopolysacharid</i>
<i>MAP</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>	<i>Mitogenem aktivovaná protein kináza</i>
<i>MDSC</i>	<i>Myeloid-derived supressor cells</i>	<i>Myeloidní supresorové buňky</i>
<i>MHC I</i>	<i>Major histocompatibility complex I</i>	<i>Hlavní histokompatibilní komplex I</i>
<i>mRNA</i>	<i>Messenger ribonucleic acid</i>	<i>Mediátorová ribonukleová kyselina</i>
<i>mTOR</i>	<i>Mammalian target of rapamycin</i>	<i>Savčí cíl rapamycinu</i>
<i>mTORC1</i>	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1</i>	<i>Savčí cíl rapamycinu komplex 1</i>
<i>mTORC2</i>	<i>Mammalian target of rapamycin complex 2</i>	<i>Savčí cíl rapamycinu komplex 2</i>
<i>NAD⁺</i>	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>	<i>Nikotinamidadenindinukleotid</i>
<i>NK</i>	<i>Natural killer cell</i>	<i>Přirozený zabíječ</i>

<i>PD-1</i>	<i>Programmed cell death protein 1</i>	<i>Protein programované buněčné smrti 1</i>
<i>pDC</i>	<i>Plasmacytoid dendritic cells</i>	<i>Plasmacytoidní dendritické buňky</i>
<i>PD-L1</i>	<i>Programmed cell death ligand 1</i>	<i>Ligand 1 proteinu programované buněčné smrti</i>
<i>PGE2</i>	<i>Prostaglandin E2</i>	<i>Prostaglandin E2</i>
<i>POEG-b-PVBIND</i>	<i>Poly (oligo (ethylene glycol) methacrylate)-b-PVB-Indoximod</i>	<i>Poly (oligo (ethylen glykol) methakrylát)-b-PVB-Indoximod</i>
<i>RECIST</i>	<i>Response evaluation criteria in solid tumours</i>	<i>Hodnotící kritéria reakce v solidních nádorech</i>
<i>RT-PCR</i>	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>	<i>Polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí</i>
<i>siRNA</i>	<i>Small interfering ribonucleic acid</i>	<i>Malá interferující ribonukleová kyselina</i>
<i>TAM</i>	<i>Tumour-associated macrophages</i>	<i>S tumorem asociované makrofágy</i>
<i>TDLN</i>	<i>Tumour-draining lymph nodes</i>	<i>Spádové lymfatické uzliny nádoru</i>
<i>TDO</i>	<i>Tryptophan 2,3-dioxygenase</i>	<i>Tryptofan 2,3- dioxygenáza</i>
<i>TGF β</i>	<i>Tumour growth factor β</i>	<i>Růstový faktor nádoru β</i>
<i>Th1</i>	<i>T helper lymphocytes 1</i>	<i>Pomocné T-lymfocyty 1</i>
<i>Th17</i>	<i>T helper lymphocytes 17</i>	<i>Pomocné T-lymfocyty 17</i>
<i>Th2</i>	<i>T helper lymphocytes 2</i>	<i>Pomocné T-lymfocyty 2</i>
<i>TIL</i>	<i>Tumour-infiltrating lymphocytes</i>	<i>Lymfocyty infiltrující nádory</i>
<i>TLR9</i>	<i>Toll-like receptor 9</i>	<i>Receptor podobný genu Toll 9</i>
<i>TNF α</i>	<i>Tumour necrosis factor α</i>	<i>Faktor nádorové nekrózy α</i>
<i>TRC</i>	<i>Tumour-repopulating cells</i>	<i>Repopulační buňky nádoru</i>
<i>Treg</i>	<i>Regulatory T lymphocytes</i>	<i>Regulační T-lymfocyty</i>
<i>Trp</i>	<i>Tryptophan</i>	<i>Tryptofan</i>
<i>WB</i>	<i>Western blot</i>	<i>Western blot/ Imunoblot</i>
<i>YSK12-MEND</i>	<i>YSK12- multi-functionl envelope-type nanodevice</i>	<i>YSK12-multifunkční obalené nanočástice</i>

OBSAH

1	Úvod.....	1
2	Indolamin 2,3-dioxygenáza 1.....	2
2.1	Struktura IDO 1.....	2
2.2	Funkce IDO 1.....	3
2.2.1	Mechanismy a látky ovlivňující produkci IDO 1.....	7
2.2.2	Tryptofan 2,3- dioxygenáza a indolamin 2,3- dioxygenáza 2.....	8
3	IDO 1 a nádor.....	10
3.1	Exprese IDO 1 v nádorech.....	10
3.1.1	Role IDO 1 v imunitní editaci.....	12
3.2	IDO 1 jako možný prognostický marker.....	14
4	Inhibitory IDO 1.....	15
4.1	Způsoby inhibice IDO 1.....	15
4.2	Inhibitory v nádorové imunoterapii.....	17
4.2.1	IDO 1 inhibitory v rámci monoterapie.....	17
4.2.2	IDO 1 inhibitory v kombinované imunoterapii.....	21
4.2.2.1	Epacadostat v kombinaci s inhibitory PD-1 a CTLA-4.....	22
4.2.2.2	Indoximod v kombinaci se sipuleucel-T terapií a inhibitory PD-1 a CTLA-4... ..	23
4.3	Inhibitory nové generace.....	24
4.4	IDO 1 peptidová vakcína.....	25
4.5	Kombinace inhibice IDO 1 s chemoterapií.....	26
5	Závěr.....	28
6	Seznam literatury.....	29

1 ÚVOD

Indolamin 2,3- dioxygenáza (IDO 1) je jeden ze tří enzymů, jež katalyzují přeměnu tryptofanu na N-formylkynurenin v rámci prvního kroku kynureninové dráhy. Za fyziologických podmínek je IDO 1 v malém množství přítomen téměř ve všech tkáních těla, je konstitutivně produkovan dendritickými buňkami nebo makrofágy a je součástí přirozené obranyschopnosti organismu proti mikrobům či virům.

Produkcí IDO 1 se vyznačují i nádory, jež k jeho produkci využívají buněk organismu nebo svých vlastních. IDO 1 produkovaný nádorem působí na imunitní systém imunosupresivně. Ve větším množství snáze inhibuje aktivitu T-buněk a podporuje diferenciaci CD4⁺ buněk do Treg formy. Případně ovlivňuje polarizaci makrofágů do M2 formy, která podporuje například angiogenezi v nádoru. Jako ukazatel aktivity IDO 1 a zároveň jako prognostický marker může být využíván poměr mezi množstvím kynureninu a tryptofanu (kyn/trp). Zvýšená koncentrace IDO 1 v nádoru obvykle koresponduje s horší prognózou onemocnění, výskytem metastáz a se zkrácením doby přežití. Jeho přítomnost ve zvýšeném množství byla prokázána například v rakovině endometria, melanomu či rakovině plic. Vzhledem k nepříznivému vlivu nádory produkovaného IDO 1 na organismus, je značné úsilí věnováno studiu zamezení jeho aktivity či účinku. V nádorové imunoterapii je k tomuto využíváno inhibitorů IDO 1.

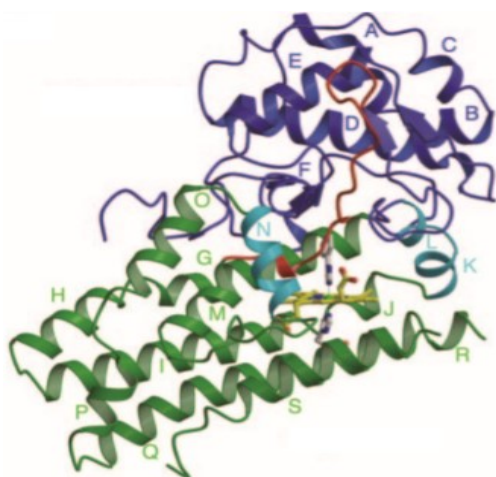
Hlavním cílem této práce je blíže představit různé možnosti inhibice enzymu IDO 1, popsat inhibitory tohoto enzymu a přiblížit jejich účinek při imunoterapeutické léčbě nádorových onemocnění. Práce si také dává za cíl seznámit čtenáře s možnostmi kombinace imunoterapie založené na inhibici IDO 1 s dalšími terapeutickými přístupy.

2 INDOLAMIN 2,3-DIOXYGENÁZA 1

IDO 1 je cytosolický (Kudo and Boyd, 2000), monomerní protein, který je sbalen do dvou domén, mezi něž je navázána molekula hemu (Sugimoto *et al.*, 2006). Enzym se účastní metabolismu tryptofanu v rámci kynureninové dráhy, kde katalyzuje její první krok, a sice přeměnu tryptofanu na N-formylkynurenin (Takikawa *et al.*, 1986). Svou aktivitou pomáhá nastolit toleranci mateřského imunitního systému vůči plodu (Munn *et al.*, 1998), potlačuje aktivitu T-buněk, čímž přispívá k rezistenci vůči nádorům a autoimunitním či alergickým reakcím (Munn *et al.*, 2005; Grohmann *et al.*, 2007).

2.1 Struktura IDO 1

Enzym IDO 1 je kódován jediným genem o 10 exonech (Kadoya *et al.*, 1992), který je u savců lokalizován na 8. chromozomu (Burkin *et al.*, 1993). IDO 1 nacházející se u lidí (hIDO) je tvořen 403 aminokyselinami a dosahuje hmotnosti 45 kDa (Dai and Gupta, 1990; Austin *et al.*, 2013). Myší enzym (mIdo) se velikostně od svého lidského ortologu příliš neliší, je tvořen 407 aminokyselinami, dosahuje velikosti 45,6 kDa. Mezi sekvencemi aminokyselin enzymů je prokázána ~ 60% homologie (Akemi *et al.*, 1991). IDO 1 je monomerní protein, který je sbalen do dvou různě velkých domén (Obrázek 1).



Obrázek 1: Sekundární struktura IDO 1. Na obrázku jsou zvýrazněny domény, velká doména zeleně, malá modře. Jsou spojeny červeně zvýrazněnou smyčkou. Mezi doménami je žlutě zvýrazněn navázaný hem, azurově zvýrazněný je propojovací helix (převzato z Sugimoto *et al.*, 2006).

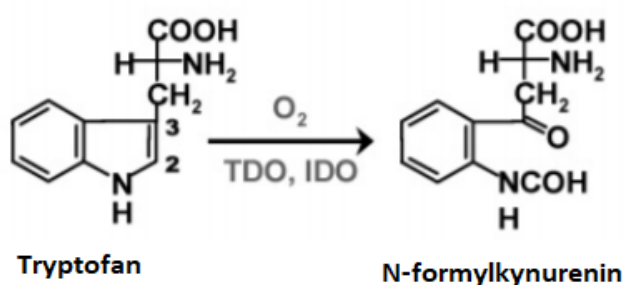
Velká doména je tvořena 13 α -helixy a dále dvěma 3_{10} helixy, malá doména šesti α -helixy, třemi 3_{10} helixy a dvěma β -listy. Spojení domén se mimo jiné účastní hydrofobní interakce, vodíkové můstky mezi zbytky aminokyselin a solné můstky. Společně se domény podílí na tvorbě kapsy, do které se váže hem. Tato kapsa je rozdělena na proximální a distální části.

Proximální část je tvořena pouze helixy velké domény, na tvorbě distální části se podílí obě domény a spojovací smyčka, která spojuje malou a velkou doménu enzymu (na obrázku červeně). Smyčka společně s malou doménou IDO 1 nad jedním z koordinačních míst hemu kavitu překrývá. Vzhledem ke skutečnosti, že se na tuto distální stranu kapsy váže O_2 , se předpokládá, že je její struktura zodpovědná za dioxygenázovou aktivitu enzymu (viz *Funkce IDO 1*; Sugimoto *et al.*, 2006).

2.2 Funkce IDO 1

IDO 1 v organismu zastává různé role a funkce, účastní se jak imunoprotektivních tak imunosupresivních mechanismů. Tato část se věnuje především těm mechanismům, které přispívají k adekvátní reakci organismu na vnější stimuly.

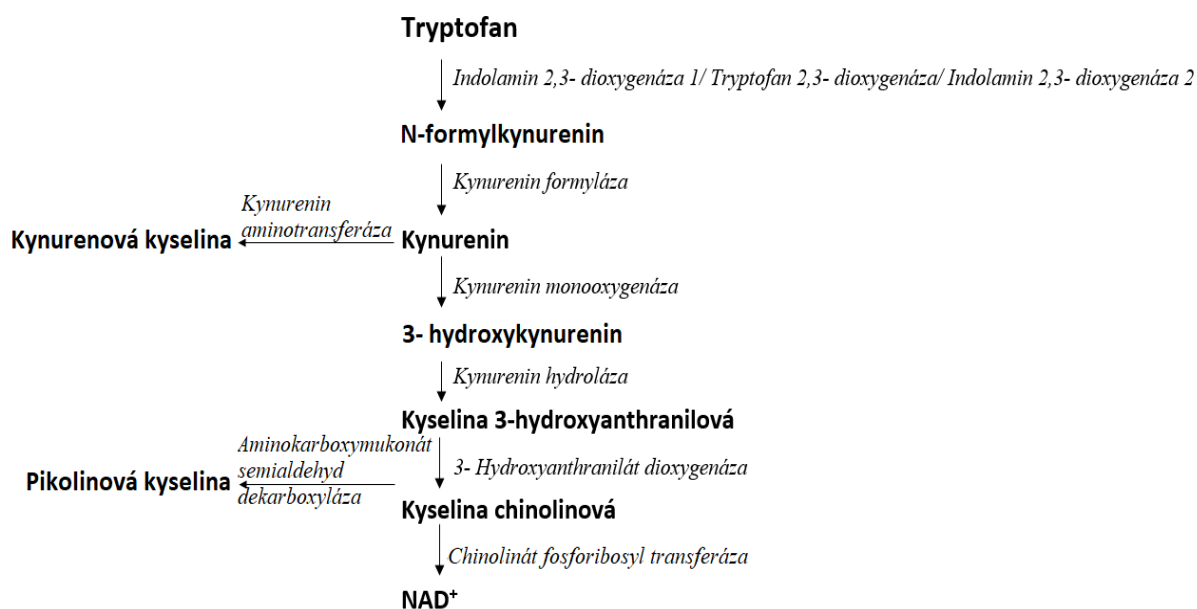
IDO 1 patří do skupiny enzymů oxydoreduktáz, přesněji dioxygenáz. Tyto enzymy do substrátu vkládají oba atomy molekuly O_2 (shrnutí v Nozaki, 1979), čímž způsobují strukturální změny daného substrátu. Kyslík je IDO 1 inkorporován do dvojné vazby mezi C_2 a C_3 tryptofanu, tím je vazba rozrušena a je vytvořen první produkt kynureninové dráhy, N-formylkynurenin (Obrázek 2; Batabyal and Yeh, 2007; Takikawa *et al.*, 1988). V rámci kynureninové dráhy (Obrázek 3) dochází k několika dalším reakcím, které vedou k tvorbě konečného produktu nikotinamidadeninukleotidu (NAD^+ ; Grant *et al.*, 1999), jenž je dále využíván v metabolických procesech organismu.



Obrázek 2: Schéma inkorporace kyslíku do indolového kruhu tryptofanu. TDO= Tryptofan 2,3-dioxygenáza; IDO= Indolamin 2,3-dioxygenáza (převzato a upraveno podle Batabyal and Yeh, 2007).

Tryptofan je jedna z esenciálních biogenních aminokyselin, kterou si organismus neumí sám vytvářet a je tedy nutné, aby byla přijímána potravou (Ashley and Anderson, 1975). V rámci metabolických drah je tryptofan měněn a jeho metabolity jsou dále využívány při syntéze dalších molekul, mezi něž patří například serotonin (Deguchi *et al.*, 1973) nebo melatonin (Hajak *et al.*, 1991). Nicméně nejvíce této aminokyseliny je metabolizováno právě v rámci kynureninové dráhy, v metabolity souhrnně nazývanými kynureniny

(shrnutí v Schwarcz *et al.*, 2013). Mezi fyziologicky významné kynureniny patří například pikolinová kyselina, která se podílí na kontrole buněčného růstu (Fernandez-Pol *et al.*, 1977). Dále se účastní imunitních odpovědí, vyznačuje se svou protinádorovou (Ruffmann *et al.*, 1987) nebo antimikrobiální aktivitou (Fortnagel and Freese, 1968). Kyseliny 3-hydroxyantranilová a chinolinová jsou schopny potlačit aktivitu imunitního systému. Příkladem v *in vitro* podmínkách je indukovaná apoptóza myších thymocytů a pomocných T-lymfocytů 1 (Th1; Fallarino *et al.*, 2002). Významným metabolitem kynureninové dráhy je také samotný kynurenin, který v případě vazby na aryl hydrokarbonový receptor (AhR) T-lymfocytů, indukuje jejich diferenciaci ve FoxP3⁺ regulační T-lymfocyty (Treg; Mezrich *et al.*, 2010).



Obrázek 3: Schéma kynureninové dráhy. NAD⁺= Nikotinamidadenin dinukleotid (převzato a upraveno podle Chen and Guillemin, 2009).

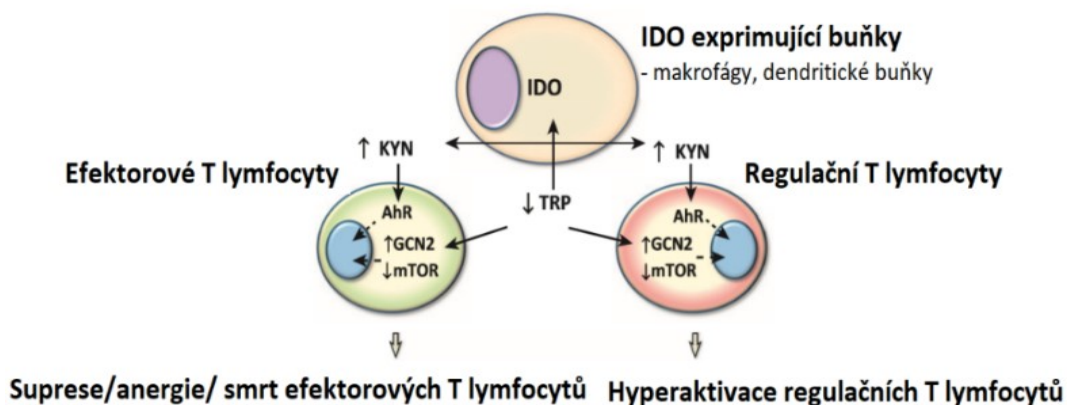
Za optimálních fyziologických podmínek je malé množství IDO 1 konstitutivně exprimováno dendritickými buňkami (DC; Orabona *et al.*, 2006) či makrofágy (Munn *et al.*, 1999) v mukózních tkáních např. v děloze, slezině (Yamazaki *et al.*, 1985) nebo střevě (Ferdinande *et al.*, 2008). Je součástí přirozené ochrany těla vůči virům (Yoshida *et al.*, 1979) či mikroorganismům. V případě, že je organismus vystaven zánětlivým stimulům, mezi něž mimo jiné patří mikrobiální lipopolysacharidy (Yoshida and Hayaishi, 1978) nebo viry a virové proteiny (Adams *et al.*, 2004; Bodaghi *et al.*, 1999), je, především díky zvýšené hladině interferonu γ (IFN γ), zvýšena i hladina exprimovaného enzymu IDO 1 (Orabona *et al.*, 2006; viz Mechanismy a látky ovlivňující produkci IDO 1). Ten může být během zánětu exprimován

nejen běžnými buňkami, jež ho produkují za fyziologických podmínek, ale například také kožními fibroblasty (Varga *et al.*, 1995).

Mezi významné role proteinu IDO 1 patří schopnost ovlivňovat T-buňky imunitního systému organismu, respektive zastavit jejich proliferaci. Lymfocyty jsou na nízkou hladinu tryptofanu schopny odpovědět zastavením buněčného růstu v G1 fázi buněčného cyklu (Munn *et al.*, 1999). Aby k tomu došlo, je pro enzym často nutné, aby jeho účinky byly moderovány. Těto moderace se účastní například protein kináza GCN2 (z ang. *General control nonderepressible*), která reaguje na sníženou hladinu aminokyselin v organismu, v tomto případě tryptofanu. Fosforyluje savčí transkripční faktor eIF2, což může vést k dalším signálním drahám a spuštění biosyntézy aminokyselin (Wek *et al.*, 1995; Sundrud *et al.*, 2009). Mimo to je spuštěna tvorba molekul a transkripčních faktorů, které zastavují růst CD8⁺ cytotoxických T-buněk a způsobí jejich znečitlivění vůči cizorodým, potenciálně nebezpečným stimulům (Munn *et al.*, 2005), což je způsobeno právě aktivitou IDO 1 a především úbytkem tryptofanu. Deplece tryptofanu také způsobuje, že se z CD4⁺ buněk preferenčně tvoří Treg (Sharma *et al.*, 2007) a že je naopak potlačena diferenciaci prozánětlivých Th17 buněk (Sundrud *et al.*, 2009). Úbytek tryptofanu tedy vede k upřednostnění tvorby Treg, které mají schopnost usměrnit zánětlivou reakci a případně zabránit patologickým stavům spojených s nepřiměřenou imunitní reakcí organismu (de Araújo *et al.*, 2017). Suprese proliferace T-lymfocytů je pozorována například během těhotenství, kdy díky utlumení CD8⁺ T-lymfocytů dochází k přijetí plodu matkou. Na podobném principu funguje i přijetí transplantátu od cizího dárce (Munn *et al.*, 1998; Guillonneau *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009) nebo tak dochází k zamezení vzniku alergií (Grohmann *et al.*, 2007).

Dále je na úbytek aminokyselin v organismu citlivá kinázová dráha mTOR (z ang. *Mammalian target of rapamycin*), jejíž signalizace je zprostředkovávána dvěma komplexy, mTORC1 a mTORC2 (Loewith *et al.*, 2002). Za optimálních podmínek zabezpečuje diferenciaci pomocných lymfocytů z CD4⁺ T-buněk. Diferenciaci Th1 a Th17 buněk je regulována komplexem mTORC1, za diferenciaci Th2 buněk odpovídá mTORC2 komplex. Ve chvíli, kdy v organismu dojde k poklesu množství tryptofanu, je aktivita inhibována a mTOR deficientní CD4⁺ lymfocyty se diferencují ve FoxP3⁺ Treg (Delgoffe *et al.*, 2009, 2011; Metz *et al.*, 2012; Obrázek 4). Ztráta aktivity mTOR kinázy ovlivňuje také CD8⁺ lymfocyty, které se nejsou v případě poklesu mTORC1 signálů schopny diferenciovat v efektorové buňky.

V případě inhibice signálů mTORC2 CD8⁺ lymfocyty schopnost diferenciace neztrácí, ale preferenčně se vyvíjejí v paměťové buňky, čímž se zvyšuje síla odpovědi po opětovném vystavení stimulu (Pollizzi *et al.*, 2015).



Obrázek 4: IDO 1 zprostředkovaná metabolická kontrola odpovědi efektorových a regulačních T-lymfocytů. IDO= Indolamin 2,3- dioxygenáza; Kyn= Kynurenin; Trp= tryptofan; AhR= Aryl hydrokarbonový receptor; GCN2= General control nonderepressible 2; mTOR= savčí cíl rapamycinu (převzato a upraveno podle Munn and Mellor, 2013).

Významný je i vliv ligandem aktivovaného transkripčního faktoru AhR (viz Obrázek 4), jež byl původně popsán jako receptor pro xenotoxiny. Nyní už je známo, že je tento receptor aktivován nejen zmíněnými xenotoxiny, ale také kynureninem, který je jeho přirozeným endogenním ligandem (Mezrich *et al.*, 2010). Afinita ligandů a délka signalizace rozhoduje o vlivu AhR na populace T-lymfocytů (shrnuto v Munn and Mellor, 2013). V případě, že se kynurenin váže na AhR T-lymfocytů, dochází k diferenciaci těchto buněk ve FoxP3⁺ Treg. Takto AhR výrazně přispívá k nastolení tolerance imunitního systému. Vazbou kynureninu na receptor je také potlačena reakce imunitního systému organismu vůči rostoucím tumorům (Mezrich *et al.*, 2010; Opitz *et al.*, 2011). Dále je kynurenin svou vazbou na AhR schopný zabezpečit protizánětlivý, tolerantní charakter DC (Nguyen *et al.*, 2010). V IDO 1 pozitivním nádorovém mikroprostředí jsou vazbou kynureninů na AhR inhibovány T-buňky s vysokou mírou exprese tohoto receptoru. Je bráněno jejich proliferaci a zároveň s tím je zvýšená jejich apoptóza (Ninomiya *et al.*, 2016). IFN γ produkovaný cytotoxickými lymfocyty infiltrující nádory (TIL), způsobuje nadprodukcí kynureninu repopulačními buňkami nádoru (TRC), ten se váže na AhR sousedních CD8⁺ T-buněk a aktivuje ho. Následnou signalizací AhR dochází ke zvýšení produkce proteinu programované buněčné smrti 1 (PD-1; Liu *et al.*, 2018).

Faktem zůstává, že jsou IDO 1 a jeho schopnost modulovat imunitní odpovědi využívány i nádorovými buňkami, kterým je tak umožněno uniknout imunitním mechanismům organismu. IDO 1 sice svým účinkem v kynureninové dráze brání proliferaci T-buněk, to ale neplatí o transformovaných, nádorových buňkách, které enzym konstitutivně produkují (viz Expres IDO 1 v nádorech). Ačkoli jsou v *in vitro* podmínkách zbrzděny v růstu, není zastavena jejich proliferace (Uyttenhove *et al.*, 2003).

2.2.1 Mechanismy a látky ovlivňující produkci IDO 1

Tato podkapitola je krátkým seznámením s látkami a mechanismy, které ovlivňují produkci IDO 1.

IFN γ je prozánětlivý cytokin produkovaný zejména T-lymfocyty a NK buňkami, dále i makrofágy a DC a je hlavním induktorem IDO 1 (Carlin *et al.*, 1989; Orabona *et al.*, 2006; Takikawa *et al.*, 1999). Transkripce genu *IDO 1*, v jehož promotoru se nachází IFN γ aktivovaná místa (GAS) a elementy odpovídající na stimulaci interferonem (ISRE), je zprostředkována signalizací JAK/STAT dráhy (z ang. *Janus kinase/ Signal Transducers and Activators of Transcription*). Aktivita IDO 1 v buňkách ovlivněných IFN γ může být zesílena faktorem nádorové nekrózy α (TNF α). Ačkoli tento faktor sám osobě není schopen promotoru genu *IDO 1* aktivovat, zesiluje aktivitu toho promotoru, který je vystaven signalizaci IFN γ (Du *et al.*, 2000; Robinson *et al.*, 2005, 2003).

Signalizace IFN γ využívá i CTLA-4, tedy cytotoxický s T-lymfocyty asociovaný antigen 4. Může být exprimován CD4⁺ (Kingsley *et al.*, 2002) i CD8⁺ (Pedicord *et al.*, 2011) T-lymfocyty, konstitutivně je tvořen Treg. Naváže-li se CTLA-4 na B7 ligandy, tzn. CD80 a CD86, je snížena transkripce IL-2, omezena proliferace T-buněk a také je zkrácena doba kontaktu T-buněk s antigen prezentujícími buňkami (APC; Krummel and Allison, 1996). Svou vazbou na B7 ligandy dendritických buněk CTLA-4 indukuje za pomoci signalizace IFN γ expresi IDO 1. CTLA-4 má zásadní vliv na nastolení periferní tolerance, což bývá využíváno i řadou nádorů (Grohmann *et al.*, 2002; Leach *et al.*, 1996).

IDO 1 je ovlivněn také signalizací interferonu α (IFN α), jehož aktivitou dochází ke zvyšování aktivity enzymu. Úbytek tryptofanu a zvýšení koncentrace kynureninů, především pak kynureninové kyseliny, jsou v důsledku signalizace IFN α spojeny se zvýšeným výskytem onemocnění psychického rázu (Wichers *et al.*, 2005). Signalizace IFN α je vyvolávána například

ligandy TLR9, CpG sekvencemi virů či bakterií. Tímto způsobem je IDO 1 exprimován CD19⁺ DC sleziny, které jsou schopny svou aktivitou zapříčinit IDO 1 dependentní supresi T-buněk (Mellor *et al.*, 2005).

Další signalizační molekulou, která reguluje expresi IDO 1, je růstový faktor nádoru TGF β , jež je exprimovaný makrofágy a DC. TGF β produkovaný CD8⁺ DC sleziny v těchto buňkách udržuje stálou hladinu IDO 1, čímž zabezpečuje jejich nepřetržitou tolerogenní povahu. Pakliže je tento faktor exogenně dodán CD8⁻ imunogenním DC, TGF β aktivuje transkripci genu pro IDO 1, který katalyzuje metabolismus tryptofanu, čímž je zajištěno, že se tyto původně imunogenní dendritické buňky přemění na tolerogenní (Belladonna *et al.*, 2008; Perruche *et al.*, 2008).

Jak už bylo zmíněno, funkce IDO 1 jsou využívány také nádory. Jedním z případů, kdy je nádorovými buňkami enzym konstitutivně exprimován, je i dráha cyklooxygenáza 2/prostaglandin E2 (COX-2/PGE2). Tato dráha je aktivována ve chvíli, kde je stimulována MAP kináza (z ang. *Mitogen-activated protein kinase*), která způsobuje konstitutivní expresi COX-2, následuje produkce imunosupresivního cytokinu PGE2, který aktivuje signalizaci protein kinázy C a fosfatidylinositol-3 kinázy. Díky signalizaci těchto kináz a účasti dalších faktorů, např. β -kateninu, dochází k transkripci genu pro IDO 1. Působením PGE2 dochází také k supresi T-buněk (Miyamoto *et al.*, 1976; Hla and Neilson, 1992; Lee *et al.*, 2009; Hennequart *et al.*, 2017).

2.2.2 Tryptofan 2,3-dioxygenáza a indolamin 2,3-dioxygenáza 2

Dalšími enzymy, které se stejně jako IDO 1 podílí na přeměně tryptofanu na N-formylkynurenin, jsou tryptofan 2,3-dioxygenáza (TDO) a indolamin 2,3-dioxygenáza 2 (IDO 2). Všechny zmíněné proteiny patří do skupiny dioxygenáz a katalyzují první limitující krok kynureninové dráhy (Brady *et al.*, 1973; Ball *et al.*, 2007; Batabyal and Yeh, 2007). Tato podkapitola je převážně věnována komparaci TDO a IDO 2 s IDO 1.

TDO je tetramerní protein (Schutz and Feigelson, 1972), který se na rozdíl od IDO 1, jehož výskyt byl doposud prokázán jen v tkáních savců, nachází také u bakterií (Forouhar *et al.*, 2007) a hmyzu např. *Drosophila melanogaster* (Walker *et al.*, 1986). Tkáňová specifita IDO 1 je velmi rozmanitá a tvoří se téměř ve všech tkáních těla, TDO se exprimuje především v játrech, což je zároveň jediná tkáň, kde nebyla prokázána produkce zmíněného IDO 1

(Batabyal and Yeh, 2007). Dalším rozdílem těchto dvou enzymů jsou podmínky, během kterých jsou exprimovány. Zatímco IDO 1 je produkován v odpověď na signalizaci interferonů a je úzce spojen s mechanismy vrozené části imunity a odpověďmi organismu na patologické podmínky (Orabona *et al.*, 2006), exprese TDO je závislá především na dostupnosti a přítomnosti L-tryptofanu (Schimke *et al.*, 1965). Na rozdíl od IDO 1, není TDO schopen vázat D-tryptofan (Forouhar *et al.*, 2007). Množství enzymu je ovlivňováno glukokortikoidními hormony (Schutz *et al.*, 1975). Mezi další rozdíl, který zřejmě odráží i výše zmíněnou specifitu enzymů, patří vazba molekuly kyslíku. Zatímco IDO 1 váže O_2 nezávisle na přítomnosti L-tryptofanu, TDO se bez jeho přítomnosti ve vazbě s kyslíkem neobejde (Ishimura *et al.*, 1970, Taniguchi *et al.*, 1979). Navzdory tomu, že TDO s IDO 1 sdílí jen malou sekvenční homologii, mají proteiny určité strukturní podobnosti, mezi něž patří například to, že klíčové aminokyselinové zbytky v aktivním místě proteinu jsou stejné a že se do něj tryptofan pravděpodobně váže podobným způsobem jako u IDO 1 (Forouhar *et al.*, 2007).

Třetím enzymem účastnícím se kynureninové dráhy, je indolamin 2,3-dioxygenáza 2 (IDO 2), označovaný také jako INDOL1 (z ang. *Indoleamine 2,3-dioxygenase like-protein*; Ball *et al.*, 2007), případně proto-IDO (Yuasa *et al.*, 2007). IDO 1 a IDO 2 sdílí relativně vysokou míru homologie aminokyselin, jejich geny sídlí na stejném chromosomu (Yuasa *et al.*, 2007). Ačkoliv se IDO 2 vyznačuje stejnou enzymovou aktivitou, podobnou strukturou i schopností metabolizovat téměř totožnou škálu metabolitů jako IDO 1 (Ball *et al.*, 2007), enzymová kinetika těchto dvou proteinů se liší. Hodnota K_m IDO 2 je mnohem vyšší než u IDO 1, a proto pro dosažení stejné rychlosti enzymové reakce je nutná přítomnost většího množství IDO 2 než za stejných podmínek IDO 1 (Meininger *et al.*, 2011). Bylo prokázáno, že tvorba IDO 2 probíhá v bičíku spermií, ledvinách, děloze atd. Stejně jako IDO 1 i IDO 2 přispívá k regulaci imunitních odpovědí, na signalizaci IFN γ však tak silně nereaguje (Ball *et al.*, 2007).

3 IDO 1 A NÁDOR

IDO 1 je exprimován nejen jako odpověď na virové či mikrobiální agens, ale jeho zvýšená koncentrace byla prokázána i u některých nádorových onemocnění např. rakoviny prsu, plic či slinivky, dále také ve spádových uzlinách nádoru (Yoshida and Hayaishi, 1978; Yoshida *et al.*, 1979; Munn, 2002). Některé nádory využívají IDO 1 k ochraně svého mikroprostředí a nerušenému růstu (Uyttenhove *et al.*, 2003). Aktivita enzymu IDO 1 je často využívána jako prognostický marker onkologických onemocnění a je vyjadřována zejména poměrem kynureninu ku tryptofanu (kyn/trp; Suzuki *et al.*, 2010). V řadě nádorových onemocněních vysoká aktivita IDO 1 koresponduje se špatnou prognózou vývoje onemocnění.

3.1 Exprese IDO 1 v nádorech

Nádory pro expresi enzymu a využití jeho regulačních funkcí využívají buď svých vlastních buněk, které IDO 1 přímo exprimují, nebo rekrutují buňky hostitelského organismu (Uyttenhove *et al.*, 2003; Munn *et al.*, 2004). Většina dohledatelných literárních zdrojů nerozlišuje mezi IDO 1 a IDO 2, nebo s IDO 2 vůbec nepočítá. V této kapitole je tedy všeobecně používána zkratka IDO 1.

Tumory jsou schopny odolat imunitním reakcím a potlačují odmítnutí imunitním systémem. Čím vyšší hladina IDO 1 je exprimována, tím snadněji nádor uniká mechanismům imunitního systému hostitele. To vyplývá ze samotné podstaty funkce tohoto enzymu, čím více tryptofanu je degradováno, tím je inhibováno více T-lymfocytů, potažmo na nich závislých imunitních reakcí. Naopak ty tumory, v nichž je hladina exprese IDO 1 nízká, jsou snadno imunitním systémem rozpoznány a zlikvidovány. Buňky mnoha nádorových linií, např. rakoviny děložního čípku, prostaty či slinivky, konstitutivně exprimují mRNA genu *IDO 1* a produkují funkčně aktivní enzym bez signalizace IFN γ (Uyttenhove *et al.*, 2003). Kolektiv Brandacher *et al.*, zabývající se studiem rakoviny tlustého střeva a konečníku, toto zdánlivě vyvrací, když tvrdí, že k indukci exprese IDO 1 je nutná signalizace IFN γ . Nicméně různá míra exprese v jimi zkoumaných nádorových vzorcích naznačuje, že v nádoru existují určité podskupiny buněk, jejichž schopnost exprimovat IDO 1 se od zbytku značně liší (Brandacher, 2006). Je tedy možné, že k produkci tohoto enzymu skutečně signalizaci IFN γ nevyžadují.

Významnými buňkami, které pozitivním způsobem ovlivňují prognózu nádorového onemocnění, jsou TIL, které pronikají do ostrůvků nádorových buněk v mikroprostředí

tumoru. Jejich přítomnost je spojena se zvýšenou expresí IFN γ a IL- 2. Nádory infiltrované CD3⁺ T-lymfocyty jsou spojeny s vyšším procentem přeživších jedinců (Clemente *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2003). I proti tomuto mechanismu se mohou nádory bránit. Studie Brandacher *et al.* prokázala, že množství TIL inverzním způsobem koreluje s množstvím exprimovaného IDO 1, tedy že jsou vysoké hladiny IDO 1 spojené s rapidním úbytkem TIL v nádoru. Dle závěrů této studie vysoká exprese IDO 1 nádorovými buňkami a lokální úbytek tryptofanu tedy umožňuje některým nádorovým podskupinám uniknout imunitnímu systému (Brandacher, 2006). Dle studie Spranger *et al.* jsou některá nádorová onemocnění schopna využít i TIL ve svůj prospěch. Zvýšené množství infiltrovaných CD8⁺ T-lymfocytů v melanomu pozitivně koreluje s IFN γ indukovanými hladinami IDO 1 dále PD-L1 a Treg (Spranger *et al.*, 2013).

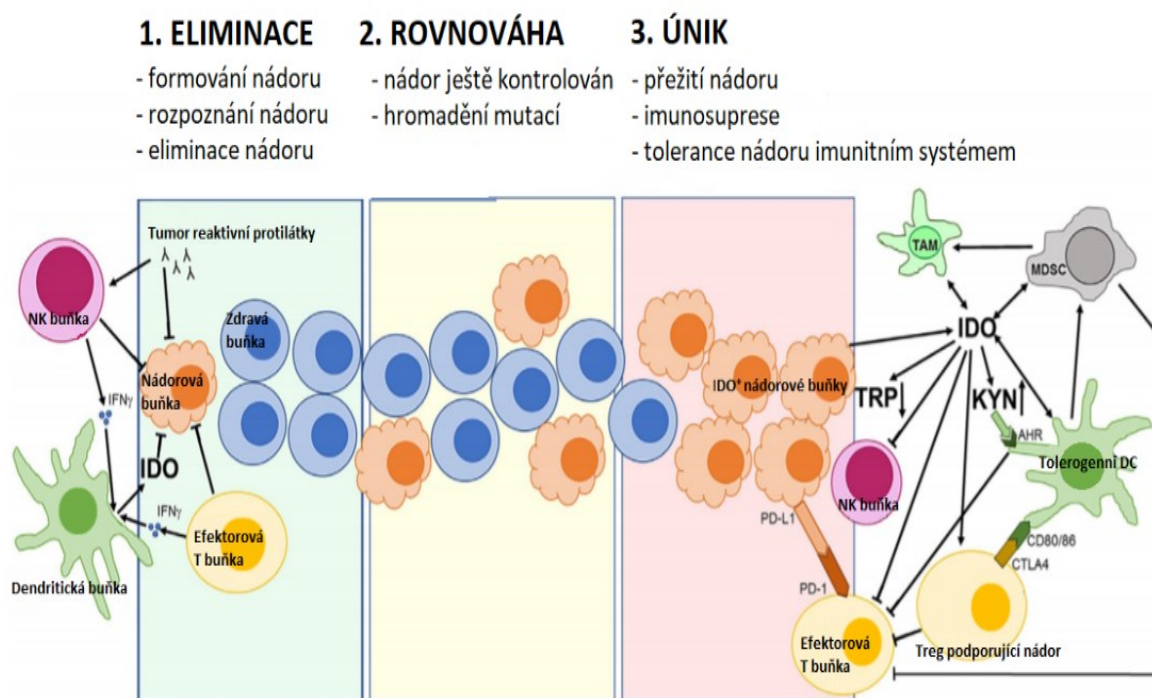
Dalšími významnými buňkami, jejichž aktivitu jsou nádory schopny přetvořit a využít ve svůj prospěch, jsou s tumorem asociované makrofágy (TAM). Makrofágy mohou být na základě působení různých cytokinů polarizovány na protinádorovou M1 formu, která je součástí Th1 imunitní odpovědi, a M2 formu, která svým působením přispívá k rozvoji nádorových onemocnění (shrnutí v Yang and Zhang, 2017). Většina makrofágů asociovaných s nádorem je polarizována do M2 formy, diferencují se v přítomnosti Th2 cytokinů IL-4 a IL-13 (Gao *et al.*, 2015) nebo TGF β (Guo *et al.*, 2016) a je pro ně charakteristická produkce IL-10 (Verreck *et al.*, 2004). Tato forma TAM stimuluje angiogenezi v nádorovém mikroprostředí (Jetten *et al.*, 2014), podporuje invazi a vznik metastáz (Chen *et al.*, 2011) a inhibuje protinádorovou odpověď T-lymfocytů (Lepique *et al.*, 2009). IDO 1 je schopen tuto polarizaci makrofágů ovlivňovat, což bylo potvrzeno i studií Wang *et al.*, kde byly využity TPH-1 buněčné linie, běžně využívané pro diferenciaci makrofágů. Po vystavení diferenciovaných TPH-1 signalizaci IFN γ se hladina IDO 1 zvýšila zejména u M1 polarizovaných makrofágů. Když ale byl IDO 1 do diferenciovaných TPH-1 dodán plazmidem, došlo v těchto buňkách k zvýšení M2 markerů a k poklesu markerů pro M1. Poté, co byl omezen přísun enzymu do diferenciovaných THP-1, došlo ke snížení markerů pro M2 a zvýšení M1 markerů, což naznačuje, že exprese IDO 1 indukuje polarizaci makrofágů preferenčně do M2 podoby (Wang *et al.*, 2014).

Nádory jsou také schopny využít jednu z podskupin hostitelských APC, plasmacytoidní DC (pDC), které konstitutivně exprimují množství IDO 1 dostatečné k imunosupresi. Plasmacytoidní DC zahrnují největší část imunosuprimujících mechanismů ve spádových

lymfatických uzlinách (TDLN) nádoru. Ačkoli v TDLN u myší tvoří pDC jen malou část z celkového počtu buněk, ~ 0,5 %, dokáží v *in vitro* podmínkách potlačit odpovědi T-buněk na antigeny, které tyto specifické DC samy prezentovaly. Zároveň jsou schopny potlačit odpovědi lymfocytů i na antigeny prezentované jinými APC, které se běžně nepodílí na imunosupresi. Dále se zdá, že v *in vivo* podmínkách jsou schopny způsobit anergii všech T-buněk, které se nachází v IDO 1 zprostředkovaném imunosupresivním prostředí. Nebyla prokázána současná přítomnost IDO 1⁺ buněk v TDLN a zároveň LN v rámci jednoho jedince. Když byly tyto buňky do LN přeneseny, spustila se po několika dnech lokální antigen specifická anergie. Vzdálené T-buňky si zachovaly svou reaktivitu (Munn *et al.*, 2004; Zou *et al.*, 2001). Lze tedy předpokládat, že i lokální anergie je dostatečná proto, aby nebyl nádor napaden a odstraněn imunitními mechanismy hostitele. Dále byly ve studii Munn *et. al* objeveny speciální pDC vyznačující se produkcí markeru B buněk, CD19. V *in vitro* podmínkách bylo dokonce prokázáno, že CD19⁺ pre-B lymfocyty mohou dát vzniknout CD19⁺pDC. Tyto buňky v TDLN taktéž konstitutivně exprimují IDO 1 (Munn *et al.*, 2004).

3.1.1 Role IDO 1 v imunitní editaci

Imunitní editaci tvoří tři fáze: eliminace, rovnováha a únik. Eliminační fáze sestává z několika kroků, během nichž dochází k rozpoznání rostoucího nádoru buňkami imunitního systému a následným reakcím. Imunitní systém využívá v rámci boje s nádory například proapoptotických či antiproliferativních mechanismů, čímž dochází k destrukci části tumoru. Jestliže je imunitní systém dostatečně silný, eradikuje již v této fázi všechny nádorové buňky. V opačném případě následuje fáze dynamické rovnováhy, kde imunitní systém vyvíjí na zbylé nádorové buňky vysoký selekční tlak, kterému buňky buď podlehnou nebo se mu přizpůsobí a vytvoří nové fenotypy, které jim umožní uniknout imunitnímu systému. Tato nová populace nádorových buněk se vyznačuje nižší imunogenicitou. Následuje fáze, v níž nádorové buňky unikají imunitnímu systému. Jsou schopny omezit protinádorovou imunitní odpověď pomocí imunosupresivních cytokinů, například TGF β , nebo mechanismy založenými na imunosupresivní aktivitě Treg. Je několik způsobů, kterými se tumor brání imunitnímu systému: znečitlivění vůči IFN γ (Kaplan *et al.*, 1998), ztráta schopnosti prezentace antigenů, defekty v PD-1 dráze nebo exprese proti-apoptotických signálů. Až v 90% dochází ke ztrátě hlavního histokompatibilního komplexu 1 (MHC I; shrnuto v Dunn *et al.*, 2004; Obrázek 5).



Obrázek 5: Schéma imunitní editace. NK= Přirozený zabíječ; IFN γ = Interferon γ ; IDO= Indolamin 2,3-dioxygenáza; Kyn:= Kynurenin; Trp= Tryptofan; TAM= Makrofág asociovaný s nádorem; MDSC= Myeloidní supresorová buňka; PD-1= Protein programované buněčné smrti 1 ; PD-L1= Ligand 1 programované buněčné smrti 1; AhR= Aryl hydrokarbonový receptor; CTLA4= Cytotoxický s T-lymfocyty asociovaný antigen 4 (převzato a upraveno podle Hornýák *et al.*, 2018).

Svou roli v imunitní editaci hraje také IDO 1, jehož množství i funkce se ve fázích různí. Eliminační fáze je z hlediska IDO 1 typická nejen jeho nízkou expresí, ale také protinádorovou aktivitou. V této fázi je enzym exprimovaný DC, jejichž aktivace je stimulována IFN γ , který je sekretován NK a efektorovými T-buňkami. V důsledku deplece tryptofanu je nádor vyhladověn, čímž je zamezeno jeho dalšímu růstu a vývoji. K výrazné změně dochází až během únikové fáze, kdy se hladina exprese IDO 1 rapidně zvyšuje (shrnuto v Hornýák *et al.*, 2018). Enzym je v této fázi produkovaný nádorovými buňkami (Uyttenhove *et al.*, 2003) a tolerogenními buňkami imunitního systému, včetně TAM (Gao *et al.*, 2015) nebo myeloidních supresorových buněk (MDSC; Li *et al.*, 2018). Aktivitou enzymu dochází k expanzi Treg, které se společně s MDSC účastní tvorby imunosupresivní sítě, podílí se na potlačení protinádorových reakcí, zejména inhibicí efektorových T a NK buněk, a přispívají k toleranci nádoru imunitním systémem (Frumento *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2018). Nádorové buňky mohou imunitnímu systému odolávat také díky ztrátě tumor supresorového genu *Bin1* (z ang. *Bridging integrator-1*), který je negativním regulátorem IDO 1. Ve chvíli, kdy dojde ke ztrátě tohoto genu, je zvýšena

IFN γ indukovaná exprese IDO 1 a v imunokompetentním organismu dojde k signifikantnímu zvětšení nádoru (Muller *et al.*, 2005).

3.2 IDO 1 jako možný prognostický marker

Dlouhodobě zvýšená koncentrace poměru kyn/trp, a tedy i aktivita IDO 1, bývá v nádorech obecně spojována se špatnou prognózou a kratší dobou přežití (Okamoto, 2005; Weinlich *et al.*, 2007; Rosenberg *et al.*, 2018). Zvýšená aktivita enzymu často koreluje také s vyšším výskytem metastáz, s mohutnější progresí nádorového onemocnění nebo s pokročilými stádii (Brandacher, 2006; Ino *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2010). Dále může být spojena s poklesem TIL (Brandacher, 2006). U pacientů s nádorovými onemocněními, mezi nimiž byly zkoumány vzorky melanomu (Weinlich *et al.*, 2007) nebo nádoru plic (Suzuki *et al.*, 2010), bylo samostatně analyzováno také množství kynureninu a tryptofanu. V rámci studií byl prokázán signifikantní pokles koncentrace tryptofanu, naopak koncentrace kynureninu neprošla výraznou změnou (Schroecksnadel *et al.*, 2005; Weinlich *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2010). Souhrnně lze říci, že v rámci studia vlivu enzymu IDO 1 na nádorové mikroprostředí a prognózu onemocnění může být jako relevantní prognostický marker využit nejen poměr množství kynureninu ku tryptofanu, ale také samostatná koncentrace tryptofanu.

Dle studie Ino *et al.*, jež je zaměřena na rakovinu endometria, tedy děložní sliznice, je vysoká míra exprese enzymu spojena nejen s již zmíněnými aspekty, ale také s hloubkou invaze do myometria, tedy do svalové části dělohy (Ino *et al.*, 2006). Výsledky studie skupiny Schroecksnadel *et al.* také ukázaly, že míra exprese IDO 1 v tumorech ovarií byla signifikantně nižší u pacientek, které procházely relapsem (Schroecksnadel *et al.*, 2005).

Studie z roku 2019 zabývající se nádorovým onemocněním plic poukázala na zvýšenou expresi IDO 1 u bývalých kuřáků (Mandarano *et al.*, 2019).

4 INHIBITORY IDO 1

S přibývajícím důkazy o vlivu IDO 1 na progresi nádorových onemocnění a negativní korelací mezi jeho expresí a prognózou nádorových onemocnění se pozornost studií obrací na jeho inhibici. Inhibicí IDO 1 je omezen růst tumoru, množství CD4⁺ i CD8⁺ TIL je zvýšeno a naopak je značně zredukováno množství tumor infiltrovaných CD4⁺FoxP3⁺ regulačních T-lymfocytů (Holmgaard *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014; Holmgaard *et al.*, 2015). Inhibicí IDO 1 je také potlačena nádorem indukovaná apoptóza T-buněk (Zheng *et al.*, 2006). V rámci potlačení či zmírnění účinku IDO 1 nesmí být opomenuta ani možnost využití samotného L- tryptofanu (Liu *et al.*, 2010; Metz *et al.*, 2012).

4.1 Způsoby inhibice IDO 1

RNA interference

Jednou z možností inhibice exprese IDO 1 je využití malé interferující RNA (siRNA) v rámci procesu RNA interference. Ve studii Zheng *et al.* byl do nádorových buněk B16F10 melanomu vnesen plazmid s IDO 1-siRNA a následně polymerázovou řetězovou reakcí spojenou s reverzní transkripcí (RT-PCR) a western blot (WB) analýzami bylo detekováno utlumení genu *IDO 1* a signifikantní pokles proteinu IDO 1. Umlčením IDO 1 pomocí interference je dosaženo zpomalení progresu nádoru, je snížena míra tumorem zprostředkované apoptózy a inhibice proliferace T-buněk a je dosaženo obnovy jejich množství v *in vivo* podmínkách (Zheng *et al.*, 2006). RNA interferencí může být narušen také dormantní stav TRC (Liu *et al.*, 2017). RNA interference může být využita také v imunoterapii založené na DC. Vysoce účinným transportním systémem lipidových nanočástic YSK12-MEND (YSK12-multifunkční obalené nanočástice; Warashina *et al.*, 2016) je do BMDC (dendritické buňky odvozené od kostní dřeně) transportováno malé množství siRNA, které je dostačující k supresi IDO 1. Výsledky studie Endo *et. al* na myších modelech ukazují, že BMDC, ve kterých je enzym IDO 1 takto inhibován, zvyšují protinádorový účinek této na DC založené terapie imunogenních nádorů (Endo *et al.*, 2019).

Metylace DNA

Na spinocelulárním karcinomu hlavy a krku bylo prokázáno, že exprese IDO 1 může být regulována také epigeneticky a sice DNA metylací. V případě, kdy je metylována oblast přiléhající k promotoru nebo samotný promotor genu, dochází k poklesu exprese mRNA

IDO 1. Je-li metylace v jiné oblasti genu, je exprese tohoto enzymu naopak zvýšena. Lokalizace metylace také ovlivňuje infiltraci různých buněk do nádoru (Sailer *et al.*, 2019).

Ovlivnění vazby hemu na enzym

Jiným způsobem inhibice je ovlivnění vazby hemu na enzym. IDO 1 existuje v aktivní holo-formě, ve které už je navázaný hem, a inaktivní apo-formě, která je prozatím bez hemu. Formy holo-IDO 1 a apo-IDO 1 jsou v neustálé rovnováze (Littlejohn *et al.*, 2003). Existují minimálně dva způsoby, kterými inhibitory vazbu hemu ovlivňují. Inhibitor GSK5628 soutěží s hemem, kofaktorem apo-IDO 1, o stejnou vazbu do aktivního místa enzymu. Ve chvíli, kdy se do tohoto místa inhibitor naváže, zůstává hem volný, nedojde k tvorbě aktivního komplexu a tím je zamezeno expresi proteinu IDO 1 (Ortiz-Meoz *et al.*, 2018). Jiným způsobem pracuje Epcadostat, který s hemem o vazbu v IDO 1 nesoutěží. Naopak inhibitor hem v holo-IDO 1 stabilizuje a koordinací železa IDO 1 ovlivňuje (Lewis-Ballester *et al.*, 2017).

Obnova aktivity mTOR kinázy

Některé inhibitory neovlivňují přímo molekulu IDO 1 ale její účinek, například obnovují aktivitu mTOR kinázy (viz IDO 1 inhibitory v rámci monoterapie; Metz *et al.*, 2012).

Blokace cyklooxygenázy 2

Dalším důležitým mechanismem v supresi IDO 1 aktivity je blokace COX-2, jejíž signalizace může vést ke konstitutivní expresi IDO 1 v nádorech necitlivých vůči imunoterapii. Inhibicí COX-2 dochází k potlačení exprese IDO 1, díky čemuž dochází k signifikantnímu úbytku Foxp3⁺ Treg, ke zmírnění růstu nádoru a potlačení tvorby metastáz. Zastavením konstitutivní exprese IDO 1, která brání infiltraci T-buněk do nádoru, se tyto původně vůči imunoterapiím necitlivé nádory stávají nádory k imunoterapii citlivé (Lee *et al.*, 2009; Hennequart *et al.*, 2017). Mezi inhibitory COX-2 patří například Celecoxib (Lee *et al.*, 2009).

Využití antisense nukleotidů modifikovaných uzamčenou nukleovou kyselinou

Studii Klar *et al.* byla navržena možnost využití antisense nukleotidů modifikovaných uzamčenou nukleovou kyselinou (LNA modifikované ASO), které blokují aktivitu enzymu IDO 1 nebo TDO. ASO jsou připravovány podle lidské mRNA IDO 1 nebo TDO. Jejich použitím v *in vitro* podmínkách dochází k signifikantnímu úbytku tvorby těchto proteinů, tedy k zamezení degradace tryptofanu a byla pozorována zvýšená míra proliferace u T-buněk. V kombinaci s IDO 1 inhibitorem Epcadostatem byl pozorován synergní účinek na redukcii

tvorby kynureninu nádorovými buňkami. Podle této studie je vysoká míra účinnosti suprese aktivity IDO 1 způsobena tím, že LNA modifikované ASO zamezí expresi velkého množství IDO 1 molekul a aktivita zbylých molekul je inhibována Epacadostatem (Klar *et al.*, 2020).

4.2 Inhibitory v nádorové imunoterapii

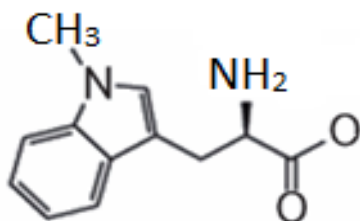
Nádorová imunoterapie je unikátním nástrojem při léčbě nádorových onemocnění, který využívá mechanismů imunitního systému k obnově, nastolení nebo zesílení protinádorové imunitní reakce. Složky imunitního systému jsou také využívány při cíleném směřování léčiv přímo do nádoru. V rámci nádorové imunoterapie existují dva hlavní přístupy, a sice imunoterapie pomocí protilátek a imunoterapie založená na mechanismech zprostředkovaných buňkami imunitního systému. V rámci imunoterapie založené na protilátkách je využíváno monoklonálních protilátek, bispecifických protilátek nebo protilátek proti kontrolním bodům imunitní reakce. Imunoterapie založená na buňkami zprostředkovaných mechanismech využívá například onkolytických virů, adoptivní T-buněčné terapie nebo aktivní imunizace nádorovými antigeny, kam patří i DNA nebo peptidové vakcíny (shrnutí v Hořejší, Bartůňková *et al.* 2017).

4.2.1 IDO 1 inhibitory v rámci monoterapie

Indoximod

Jedním z nejdéle studovaných inhibitorů je Indoximod (Obrázek 6; 1-metyl-D-tryptofan; D-1MT), u kterého byl již v roce 2001 prokázán inhibiční účinek na tryptofanový transportér (Kudo and Boyd, 2001). D-1MT je schopen účinně napodobit tryptofan ve vazbě na mTOR kinázu. Jak je zmíněno v 2. kapitole, mTOR kináza přijímá signály o množství tryptofanu v organismu a na základě nich plní svou fyziologickou funkci. Působením IDO 1, který tryptofan metabolizuje na kynureniny, je aktivita mTOR blokována. D-1MT není typickým inhibitorem, nebrání aktivitě IDO 1, ale díky své tryptofanu velmi podobné struktuře je schopen tryptofan nahradit, poslat signál blokované kináze mTOR, která se na základě těchto signálů znovu aktivuje a je obnovena její fyziologická role (Metz *et al.*, 2012). Ošetření nádorových buněk Indoximodem způsobuje zmírnění růstu nádoru, mírní autofagii způsobenou deprivací mTOR signálů a je obnovena proliferace T-buněk (Friberg *et al.*, 2002; Metz *et al.*, 2012). Na závěr je třeba zmínit, že ačkoli D-1MT neblokuje aktivitu IDO 1, je schopen inhibovat aktivitu IDO 2. Prozatím nebyl objeven důvod, který by tento efekt vysvětloval,

nicméně studie Metz *et al.* jako potenciální vysvětlení navrhla přítomnost dvou jednonukleotidových polymorfismů v lidském genu kódujícím IDO 2, které ovlivňují aktivitu IDO 2, a předpokládá, že by mohly ovlivňovat i to, jak IDO 2 reaguje na inhibitory. D-1MT preferenčně cílí proti IDO 2 (Metz *et al.*, 2007).



Obrázek 6: Struktura Indoximodu (převzato z Prendergast *et al.*, 2017).

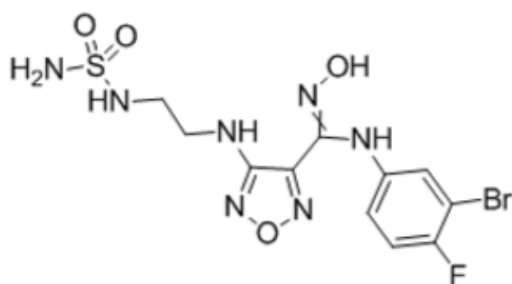
Účinek D-1MT na funkci mTOR je nezpochybnitelný, nicméně výsledky studie Opitz *et al.* překvapivě ukázaly, že v nádorových buňkách SKOV3 ošetřených tímto inhibítorem nedošlo k nahrazení enzymatické aktivity IDO 1 jak bylo očekáváno, naopak D-1MT indukoval transkripci mRNA IDO 1 a následnou expresi proteinu. V rozporu se znalostmi o inhibítoru docházelo k vyšší produkci kynureninu nádorovými buňkami a byla stále potlačována proliferace T-buněk, které byly inkubovány v jedné kultuře s nádorovými buňkami (Opitz *et al.*, 2011b). Na základě studie Vogel *et al.*, která prokázala roli signalizace AhR v expresi IDO 1 (Vogel *et al.*, 2008), byla kolektivem Moyer *et al.* nastíněna možnost stimulace aktivity IDO 1 Indoximodem. Studie prokázala, že inhibitor D-1MT je agonistou AhR a že tedy stimuluje signalizaci tohoto receptoru tak, aby byla podpořena transkripce genu IDO 1 (Moyer *et al.*, 2017). Další studií bylo podrobněji popsáno, že D-1MT stimuluje transkripci genu cytochromu P450 (*Cyp1a1*) pro AhR (Lewis *et al.*, 2017).

V rámci studie Soliman *et al.* byla studována zejména bezpečnost Indoximodu ve fázi I klinických testů. Výsledky ukázaly, že je jako inhibitor bezpečný a na organismus nemá toxický vliv, také nedochází k toxickému poškození jater. U některých pacientů, kteří již v minulosti prošli imunoterapií založené na inhibici kontrolních bodů imunitní reakce, byl ale indukován zánět hypofýzy. Tento inhibitor neovlivnil množství kynureninu v organismu, což jen potvrzuje, že neinhibuje aktivitu IDO 1. Ukázalo se, že ošetřením Indoximodem dochází ke zvýšení autoprotilátek vůči nádorovým antigenům a zvýšení C-reaktivního proteinu (CRP), zánětlivého markeru. V rámci této klinické studie došlo u 5 ze 48 pacientů ke stabilizaci onemocnění na delší dobu než 6 měsíců (Soliman *et al.*, 2016).

Epacadostat

Druhým z nejvíce využívaných inhibitorů IDO 1 je Epacadostat (INCB024360), ovlivňující aktivitu enzymu IDO 1 nikoli jeho expresi. Tento inhibitor vykazuje vysokou specifitu, neovlivňuje aktivitu ostatních tryptofan katalyzujících proteinů. Ošetřením nádorových buněk Epacadostatem dochází ke stabilizaci onemocnění, k prokazatelnému úbytku kynureninu, ke snížení kyn/trp koncentrace a k obnově proliferace NK a T-buněk. Dále bylo v preklinických studiích prokázáno, že inhibicí IDO 1 pomocí Epacadostatu, dochází k zvýšené aktivitě TIL a k zvýšení odpovědi lymfocytů, v obou případech je také zvýšena specifická sekrece IFN γ . Je redukováno množství Treg. Pro výzkumné studie je také výhodou, že je schopen inhibovat aktivitu IDO 1 v rámci různých buněčných typů, včetně HeLa, DC nebo TPH-1 s téměř stejnou účinností, což dokazuje, že tento inhibitor pracuje nezávisle na buněčném typu. Velkým kladem tohoto inhibitoru je, že je pacienty dobře tolerován (Koblish *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010; Beatty *et al.*, 2017).

Epacadostat (Obrázek 7) koordinuje vazbu železa v hemu přes atom kyslíku v hydroxiamidové skupině v jeho struktuře, čímž stabilizuje hem v kapse IDO 1. Koordinační vazba mezi hemem proteinu IDO 1 a inhibitorem je stabilizována vodíkovou vazbou s alaninem (A264) v jedné ze smyček IDO 1. Stabilita této vazby je podpořena také intramolekulárními vodíkovými vazbami uvnitř inhibitoru. Brom s fluorem se dostávají do N'-terminální domény proteinu, čímž umožňují vazbu fluoru se sírou, která také přispívá ke stabilizaci vazby proteinu s inhibitorem (Bauer *et al.*, 2016; Lewis-Ballester *et al.*, 2017; Ortiz-Meoz *et al.*, 2018). Stejně jako 1MT i Epacadostat funguje jako agonista AhR. Nicméně jeho aktivace Epacadostatem je relativně slabá a nebyla prokázána ve všech případech (Moyer *et al.*, 2017).



Obrázek 7: Struktura Epacadostatu (převzato z Ortiz-Meoz *et al.*, 2018).

Klinickou studií NCT01195311 byl prokázán pozitivní efekt Epacadostatu ve fázi I v rámci monoterapie. Léčbě bylo podrobeno 52 pacientů s různými zhoubnými nádory. U všech pacientů došlo po ošetření Epacadostatem k signifikantnímu poklesu kyn/trp, tedy ke snížení

aktivity IDO 1. Zároveň došlo k normalizaci hladiny kynureninu v plazmě. Inhibitor byl pacienty poměrně dobře tolerován a nebyl pozorován toxický účinek, ačkoli se u pacientů projevily jak mírnější vedlejší účinky v podobě např. zácpy, nevolnosti či ztráty chuti k jídlu, tak vážnější vedlejší účinky včetně hypokalemie a bolesti břicha. Po 56 dnech léčby Epacadostatem při orálním podávání ≥ 300 mg dvakrát denně došlo u 15 pacientů ke stabilizaci onemocnění, které 7 pacientům vydrželo ≥ 112 dní. Studie naznačuje, že by i v rámci monoterapie mohl být Epacadostat účinným inhibitem (Beatty *et al.*, 2013). Na základě těchto slibných výsledků se přešlo k dalším fázím klinických studií.

Ve fázi II klinických testů byla ve studii NCT01685255 zkoumána účinnost Epacadostatu v monoterapii rakoviny vaječnicků. Tato studie ale nepřinesla žádné výsledky, 10 z celkového počtu 22 pacientek přerušilo léčbu kvůli progresi onemocnění a dalších 6 žen kvůli vedlejším účinkům, které neumožňovaly další léčbu. Studie byla pozastavena sponzorující institucí (Krishteleit *et al.*, 2017). Daleko lepších výsledků dosáhla studie NCT01822691, taktéž zkoumající účinek inhibitoru ve fázi II klinických testů, která u 15 pacientů studovala účinek Epacadostatu na myelodysplastický syndrom. Epacadostat byl pacienty relativně dobře tolerován a neprojevily se žádné závažné vedlejší účinky. Oproti stavu před léčbou došlo k signifikantnímu 42 % úbytku kyn/trp, dále k 2,2 % úbytku Treg a 1,9 % MDSC. U 12 z 15 pacientů, tedy u 80 %, došlo ke stabilizaci onemocnění. U zbylých 20 % pacientů došlo naopak k dalšímu rozvoji (Komrokji *et al.*, 2019).

Navoximod

Mimo těchto nejvíce a nejdéle zkoumaných inhibitorů se objevují i novější. V poslední době se pozornost studií upírá k Navoximodu (NLG-919; GDC-0919), který je nekompetitivním inhibitem L-tryptofanu a který se přímo váže na Fe^{2+} hemu (Kumar *et al.*, 2019). I tento inhibitor snižuje množství kynureninu a podporuje obnovu proliferace T-buněk (Nayak-Kapoor *et al.*, 2018). Výhodou tohoto inhibitoru je, že není téměř metabolizován krysími ani lidskými mikrozomy, po 90 minutách inkubace je v organismu ještě 85 % nemetabolizovaného inhibitoru. I v rámci monoterapie se jeví jako účinný inhibitor, jeho vlivem dochází ke zmenšování nádorů a prodloužení doby přežití. V kombinaci s chemoterapií zvyšuje její účinnost. Také se zdá, že jen velmi slabě nebo vůbec neaktivuje AhR (Kumar *et al.*, 2019).

V rámci studie NCT02048709 klinických testů fáze I bylo zjištěno, že je pacienty Navoximod při dávkování do 800 mg dvakrát denně také poměrně dobře tolerován. Mírné vedlejší účinky

byly pozorovány u ≥ 20 % pacientů. Vážnější vedlejší účinky byly pozorovány u 14 z 22, tedy u 64 % pacientů, ale jen 9 % bylo spojeno s podáním Navoximodu. U jednoho pacienta došlo k hemoragii v trávicím traktu. Největším úspěchem Navoximodu v rámci této studie byl signifikantní pokles kynureninu, a to o 25-30 %, a dosažení stabilizace onemocnění u 8 pacientů. Zároveň ale došlo také k další progresi u 10 pacientů (Nayak-Kapoor *et al.*, 2018).

PF-06840003

Dalším inhibitorem je PF-06840003, který inhibuje katalytickou aktivitu IDO 1 enzymu. Je tvořen dvěma enantiomery, aktivním PF-06840002, který inhibuje katalytickou aktivitu proteinu, a inaktivním PF-06840001. Aktivní enantiomer je v inhibici dokonce účinnější než využívaný racemát, nicméně kvůli jeho snadnému přecházení v inaktivní formu není sám o sobě využíván. Inhibitor je selektivní a inhibuje IFN γ indukovanou produkci kynureninu jak v nádorových HeLa tak THP-1 buňkách. Použitím tohoto inhibitoru je dosaženo nejen inhibice IDO 1 a suprese produkce kynureninu, ale je také obnovena proliferace T-buněk, je potlačen růst nádoru. V kombinaci s anti- PD-L1 protilátkami je zvýšeno množství IFN γ indukovaných TIL (Gomes *et al.*, 2018). Dle výsledků studie Crosignani *et al.* molekula prokazatelně vykazovala účinnou penetraci centrálního nervového systému (CNS) krysy, což vedlo k otázce, zda by stejně účinně vstupoval i do CNS člověka (Crosignani *et al.*, 2017). Tato otázka byla zodpovězena o rok později ve studii NCT02764151, kdy se ukázalo, že tento inhibitor stejně snadno penetruje CNS člověka, což přislíbujee účinnou léčbu mozkových metastáz a glioblastomu (Gomes *et al.*, 2018).

4.2.2 IDO 1 inhibitory v kombinované imunoterapii

V rámci nádorové imunoterapie jsou inhibitory IDO 1 kombinovány s inhibitory jiných kontrolních bodů imunitní reakce, např s PD-1 a CTLA-4.

PD-1

PD-1 je transmembránový receptor (Zak *et al.*, 2015), který je exprimován na aktivovaných CD8⁺ a CD4⁺ T lymfocytech (D'Souza *et al.*, 2007), B lymfocytech (Agata *et al.*, 1996) i DC (Lim *et al.*, 2016). Studií Ahmadzadeh *et al.* byl podán důkaz o tom, že PD-1 je exprimován také TIL, dokonce se ukázalo, že množství PD-1 v nádoru je vyšší než v periferní krvi nebo tkáních. Exprese PD-1 na TIL souvisí s vyčerpáním těchto buněk a s narušením jejich efektorové funkce, což znamená, že PD-1 zeslabuje TIL vyvolat účinnou protinádorovou imunitní reakci. Tento jev

také nabízí uspokojivé vysvětlení, proč nádor roste i v přítomnosti reaktivních TIL ve stroma nádoru (Ahmadzadeh *et al.*, 2009). Jako inhibitor PD-1 je často používán Pembrolizumab (Robert *et al.*, 2015) nebo Nivolumab (Perez *et al.*, 2017).

CTLA-4

CTLA-4 je stejně jako CD28 exprimován CD4⁺ i CD8⁺ T-buňkami a váže B7 ligandy na APC. Narozdíl od CD28 vazba CTLA-4 na ligand ale brání aktivaci T-buněk (Krummel and Allison, 1995). Naváže-li se CTLA-4 na B7 ligand je snížena transkripce IL-2, snižuje se proliferace T-lymfocytů a je také zkrácena doba jejich kontaktu s APC (Krummel and Allison, 1996). Blokadí CTLA-4 je zesílena protinádorová T-buněčná odpověď a indukována regrese nádorového onemocnění (Leach *et al.*, 1996; van Elsas *et al.*, 1999). Jedním z nejvýznamnějších inhibitorů CTLA-4 je Ipilimumab (Ramagopal *et al.*, 2017).

4.2.2.1 Epacadostat v kombinaci s inhibitory PD-1 a CTLA-4

Kombinace Epacadostatu s Pembrolizumabem

Po slibných výsledcích studie ECHO-202/KEYNOTE-037 (NCT02178722), která prokázala, že ve fázi I a II klinických testů je kombinace Epacadostatu s Pembrolizumabem pacienty dobře tolerována a také to, že Epacadostat zvyšuje účinnost léčby Pembrolizumabem (Smith *et al.*, 2017), se s velkým očekáváním přešlo i k fázi III klinických testů. V rámci dvojité slepé studie ECHO-301/KEYNOTE-252 (NCT02752074), která studovala vliv této kombinace inhibitorů na nevyoperovatelný či metastazující melanom, nicméně nebyl prokázán zesilující efekt Epacadostatu na Pembrolizumab (Long *et al.*, 2019). Na základě i tohoto neúspěchu Epacadostatu, do kterého byly vkládány značné naděje, se studium přesouvá k tvorbě nových inhibitorů (viz Inhibitory nové generace).

Kombinace Epacadostatu s Nivolumabem

V rámci probíhající studie NCT02327078 ve fázi II klinických testů je studován účinek kombinace Epacadostatu s Nivolumabem na pokročilý melanom. Kombinace je dobře tolerována a má slibný protinádorový potenciál. Žádné vedlejší účinky nejsou prozatím spojeny se smrtí (Daud *et al.*, 2018).

Kombinace Epacadostatu s Ipilimumabem

V rámci klinických testů fáze I studie NCT01604889 byla zkoumána účinnost kombinace Epacadostatu s Ipilimumabem u pacientů s pokročilým vysoce agresivním kožním nádorem

melanomem. Míra odpovědi organismu na inhibitory Epacadostat a Ipilimumab byla hodnocena na základě dvou typů kritérií: I. irRC (z ang. *Immune-related response criteria*) a II. RECIST (z ang. *Response evaluation criteria in solid tumours*). Do studie bylo zahrnuto celkem 50 pacientů, 11, kteří již dříve prošli imunoterapeutickou léčbou, 39, kteří ji dříve nepodstoupili. Kromě dobré snášenlivosti pacientů vůči této kombinaci inhibitorů, studie ukázala, že na léčbu nereagují právě ti lidé, kteří již dříve prošli imunoterapeutickou léčbou. Nicméně dle irRC bylo u 36 % takovýchto pacientů (4 z 11) onemocnění stabilizováno, podle RECIST došlo ke stabilizaci u 27 % pacientů (3 z 11). Pacienti bez předešlé zkušenosti s imunoterapií na léčbu reagovali lépe. Podle irRC došlo ke stabilizaci onemocnění u 64 % pacientů, tedy u 25 z celkového počtu 39 pacientů. Podle RECIST ke stabilizaci došlo u 49 % pacientů (19 z 39). Kombinace těchto dvou inhibitorů prokázala slibnou klinickou aktivitu u pacientů s metastazujícími melanomy nebo s takovými nádory, které nelze odoperovat (Gibney *et al.*, 2019).

4.2.2.2 Indoximod v kombinaci se Sipuleucel-T terapií a inhibitory PD-1 a CTLA-4

Indoximod a Sipuleucel-T terapie

V rámci studie NCT01560923 je zkoumán vliv Indoximodu na vývoj rakoviny prostaty, která nemůže být léčena odstraněním metastáze, po Sipuleucel-T terapii. Dle dosavadních výsledků studie, je tato kombinace pacienty dobře tolerována, ačkoli se u 2 z celkového počtu 22 pacientů projeví vážné vedlejší účinky v podobě neprůchodnosti močových cest a bolesti v boku. Mírné vedlejší účinky, včetně zácpy a nevolnosti, se projeví u 20 pacientů. Podávání Indoximodu pacientům po terapii Sipuleucel-T zvýšilo dobu přežití bez progresu nádoru na 10,3 měsíce. V rámci studie byl také zkoumán vliv placebo léčiva po Sipuleucel-T terapii. S jeho podáním byla doba přežití bez progresu 4,1 měsíce. Úmrtnost při ošetření pacientů Indoximodem po terapii Sipuleucel-T je 22,73%, při užití placebo léčiva dosahuje úmrtnost 25% (Jha *et al.*, 2017).

Indoximod v kombinaci s radioterapií a blokádou PD-1

Studie Watanabe *et al.* přinesla na přelomu loňského roku zajímavou možností léčby některých nádorových onemocnění, kdy byla na myších modelech zkoumána účinnost kombinace hypofrakcionované radioterapie (hRT), Indoximodu a anti-PD-1 protilátky. Trojitá kombinace v porovnání s kombinacemi hRT s anti-PD-1 nebo anti-PD-1 s Indoximodem zajistila

rychlou a výraznou regresi velkých agresivních myších nádorů. Vystavením nádoru této léčbě došlo k úbytku IDO 1 exprimujících MDSC, což vedlo ke zvýšení tryptofanu v krevním séru. Treg nebyly redukovány. Navzdory pozitivním výsledkům v nárůstu množství CD8+ T a NK a k rychlé redukci nádoru, byl vždy po maximálně 3 týdnech pozorován relaps všech nádorů. Tento efekt byl pravděpodobně zapříčiněn zejména vyčerpáním TIL. U malých nádorů byly výsledky lepší, ale k vyléčení došlo pouze u 2 z 8 myší. Výzkumný kolektiv se domnívá, že tento způsob léčby by mohl být využit alespoň jako předchozí krok pro redukci nádorů před chirurgickým zákrokem (Watanabe *et al.*, 2020).

Kombinace Indoximodu s Pembrolizumabem

V rámci klinické studie NCT02073123 ve fázi II bylo užitím dobře tolerované kombinace inhibitorů Indoximodu a Pembrolizumabu proti pokročilému melanomu dosaženo objektivní léčebné odpovědi u 55,7 %, tedy 39 ze 70 pacientů, u 18,6 % bylo dosaženo celkové odpovědi. Dle výsledků, které ukazují, že u samotného Pembrolizumabu byla objektivní léčebná odpověď dosažena jen u 33 % pacientů, je tedy patrné, že Indoximod účinně zvyšuje účinnost terapie založené na inhibici PD-1. Tato studie také zkoumala účinek kombinace Indoximodu s Nivolumabem a Ipilimumabem, medián doby přežití bez progresu za užití všech těchto inhibitorů v kombinaci s Indoximodem byl určen na 12,4 měsíce (Zakharia *et al.*, 2018).

4.3 Inhibitory nové generace

Vývoji selektivních inhibitorů IDO 1 byla věnována velká pozornost, nicméně v klinických studiích nesplnily očekávání. Jedním z vysvětlení může být, že blokací IDO 1 jsou aktivovány jiné tryptofan katalyzující enzymy, TDO nebo IDO 2, které obnovují aktivity, které byly potlačeny inhibicí IDO 1 (Winters *et al.*, 2019). U inhibitorů analogických k tryptofanu by nedostatečnou účinnost mohl vysvětlovat fakt, že ani samotný L-tryptofan nemá k IDO 1 velkou afinitu, a že tedy strukturně podobný inhibitor také nebude schopen s IDO 1 vytvořit silnou vazbu (shrnutí v Röhrig *et al.*, 2015). Dále by účinnost inhibice mohla být ovlivněna tím, zda se železo v hemu vyskytuje ve formě Fe²⁺ či Fe³⁺, výběrem kapsy, do které se inhibitor váže nebo tím, jestli ovlivňuje vazbu tryptofanu nebo kyslíku a případně i způsobem této inhibice (Röhrig *et al.*, 2019). Proto se pozornost při vývoji inhibitorů postupně přesouvá k syntéze duálních inhibitorů nebo takových, které by byly schopny inhibovat aktivitu všech tryptofan katalyzujících enzymů, tzv. pan inhibitorů (Winters *et al.*, 2019; Cui *et al.*, 2020).

Studii Du *et al.* bylo prokázáno, že ke zhoubnosti lidských gliomů mozku, tedy k migraci nádorových buněk a jejich invazi, velkou měrou přispívá kynurenin vznikající působením IDO 1 i TDO. Kynurenin aktivuje expresi AhR. Signalizační dráha IDO1/TDO-Kyn-AhR reguluje expresi akvaporinu 4 (AQP4) v gliomových buňkách, který přispívá k jejich pohyblivosti. Výsledky této studie tedy ukazují, že IDO 1 nebo TDO přes IDO 1/TDO-Kyn-AhR-AQP4 dráhu přispívají k tvorbě metastáz gliomů. Duální inhibitor RY103 omezuje expresi jak IDO 1 tak TDO v gliomových buňkách, čímž je zamezeno vzniku kynureninu, tím pádem i expresi AhR a zároveň je omezena exprese AQP4. Je sníženo množství kyn/trp, kynureninu a je prodloužená doba přežití (Du *et al.*, 2020). Studie Cui *et al.* na přelomu loňského roku přednesla možnost využití derivátů indol-2-karboxylové kyseliny jako dalších možných duálních inhibitorů IDO 1 a TDO (Cui *et al.*, 2020).

Studii Winters *et al.* bylo představeno celkem 26 potenciálních inhibitorů odvozených od diaryl hydroxylaminů. Kromě selektivních IDO 1 nebo TDO inhibitorů kolektiv představil také duální inhibitory IDO 1 a TDO, dokonce i IDO 1 a IDO 2. Hlavním přínosem jsou ale dozajista pan inhibitory (Winters *et al.*, 2019). Více prozkoumaným pan inhibitorem je F04, jehož schopnost ovlivňovat aktivitu všech třech tryptofan katalyzujících proteinů byla představena skupinou Feng *et al.* Tato skupina také poukázala na to, že F04 ovlivňuje enzymy s různou intenzitou, IDO 1 inhibuje silně, IDO 2 a TDO se střední účinností. Na myších modelech bylo prokázáno, že inhibitor F04 má prokazatelně protinádorový účinek. Potlačuje tvorbu plicních metastáz, účinně snižuje množství kynureninu v plazmě i v nádorovém mikroprostředí a zvyšuje infiltraci T-buněk do nádorů a jejich akumulaci. Obnovuje také protinádorovou imunitní reakci (Feng *et al.*, 2019).

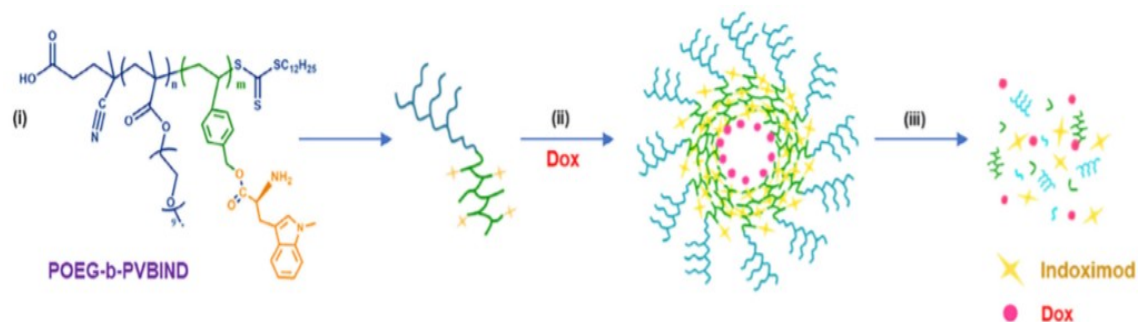
4.4 IDO 1 peptidová vakcína

V rámci nádorové terapie založené na IDO 1 inhibici jsou využívány také IDO 1 peptidové vakcíny. Ošetřením vzorku lidského nádoru v *in vitro* podmínkách takovouto vakcínou dochází k tvorbě CD8⁺ IDO 1 specifických T-buněk, které jsou schopny ničit IDO 1 exprimující nádory. Dále dochází k redukci Treg, ke zvýšení počtu IL-17 produkujících CD4⁺ T-buněk a ke stabilizaci koncentrace kyn/trp. Kostimulace T-buněk s peptidem IDO 1 zvyšuje reaktivitu T-buněk proti nádorovým, ale i virovým antigenům (Sørensen *et al.*, 2011).

U 15 pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic ve stádiu III a IV byl zkoumán vliv IDO 1 peptidové vakcíny jako podpůrné léčby po chemoterapii. Výsledky této studie prokázaly, že tento typ vakcinace signifikantně snižuje množství Treg a že nemá na nemocné toxický vliv. U 8 pacientů byla pozorována dlouhodobá stabilizace onemocnění na $\geq 8,5$ měsíce, u 7 pacientů byla pozorována dlouhodobá stabilizace onemocnění zároveň s částečnou imunitní odpovědí na léčbu (Iversen et al., 2014). Vliv vakcíny na pacienty byl dále sledován a skupina Kjeldsen *et al.* přinesla po několika letech rozšiřující informace. Dle výsledků i po 5 letech léčby byla vakcína stále přeživšími pacienty dobře tolerována. Vzataženo ke květnu 2018 přežili 3 z původních 15 pacientů, nicméně 1 z těchto pacientů byl po 11 měsících léčby vakcínou z důvodu progresu onemocnění ze studie vyškrtnut. Dvěma zbývajícím pacientům bylo za celou dobu studie podáno 56 dávek vakcíny (Kjeldsen et al., 2018).

4.5 Kombinace inhibice IDO 1 s chemoterapií

Inhibitory IDO 1 mohou být kombinovány také s chemoterapeutiky. Jedním příkladem za všechny je kombinace Indoximodu s Doxorubicinem (Dox). Skupinou Wan *et al.* byla představena možnost využití komplexu POEG-b-PVBIND/Dox micel (z ang. *Poly (oligo (ethylene glycol) methacrylate)-b-PVB-Indoximod/Doxorubicin*; Obrázek 8).



Obrázek 8: Enkapsulace a uvolňování Indoximodu a Doxorubicinu z POEG-b-PVBIND/Doxorubicinových micel. (i) Struktura POEG-b-PVBIND, Indoximod oranžově; (ii) Tvorba Indoximodových micel s naloženým Doxorubicinem; (iii) Rozvolnění POEG-b-PVBIND/Doxorubicinových micel v nádorovém mikroprostředí. Dox= Doxorubicin; POEG-b-PVBIND= Poly (oligo (ethylene glycol) methacrylate)-b-PVB-Indoximod (převzato z Wan *et al.*, 2019).

Indoximod je v tomto komplexu vázán kovalentními vazbami k nosiči POEG-b-PVB, Dox je hydrofobními interakcemi vázán v hydrofobním středu micely. Protože jsou hydrofobní interakce relativně slabé, je Dox z tohoto komplexu snadno a rychle uvolňován. Uvolňuje se dříve než Indoximod a zprostředkovává první krok protinádorové imunitní odpovědi tím, že zesiluje prezentaci nádorových antigenů. To vede k jejich snadnějšímu

rozeznávání a k zvýšení eliminace nádorových buněk imunitním systémem. Naopak Indoximod je vázán k nosiči relativně pevně a jeho uvolňování je pozvolné. Omezením supresivního charakteru nádorového mikroprostředí přispívá Indoximod k udržení nebo zesílení imunitních reakcí, které byly nastartovány Dox (Wan *et al.*, 2019).

5 ZÁVĚR

Nádorová onemocnění jsou jedním z velmi rozšířených civilizačních onemocnění, jež souží lidskou populaci. K jejich rozvoji přispívá také enzym IDO 1, který omezuje proliferaci a aktivitu efektorových NK a T-buněk, zvyšuje množství Treg, které potlačují imunitní reakce, nebo kontroluje polarizaci makrofágů do pronádorové M2 formy. Těmito mechanismy enzym IDO 1 přispívá k nastolení tolerance imunitního systému vůči nádoru, který je tak schopen uniknout složkám imunitního dohledu. Proto, aby bylo takovéto možnosti úniku zamezeno, je v rámci mnoha studií věnována pozornost inhibici enzymu IDO 1.

Jak je nastíněno touto bakalářskou prací, existuje několik způsobů, kterými lze zamezit účinku tohoto enzymu. Vedle klasických přístupů k inhibici IDO 1, mezi které patří metylace DNA nebo využití procesu RNA interference, byla představena také možnost využití LNA modifikovaných ASOs. Tyto v *in vitro* studiích prokázaly zdatnou schopnost snížit množství IDO 1 a představují tak jeden ze směrů, kterým by se preklinické i klinické studie mohly dále ubírat.

Meritem této bakalářské práce bylo využití inhibitorů IDO 1 v nádorové imunoterapii, ať už jako jediných účinných látek v rámci monoterapie, v kombinaci s inhibitory dalších kontrolních bodů imunitní reakce nebo v kombinaci s chemoterapeutiky. V preklinických i klinických testech je zkoumána účinnost jak selektivních inhibitorů IDO 1, které striktně ovlivňují aktivitu pouze tohoto tryptofan katalyzujícího proteinu, tak duálních či pan inhibitorů, které ovlivňují aktivitu zároveň dvou či lépe všech třech tryptofan katalyzujících proteinů. Tvorbě pan inhibitorů je věnována pozornost zejména proto, aby se zamezilo aktivaci dalšího tryptofan katalyzujícího proteinu po inhibici předešlého, čímž by v některých nádorech mohlo dojít k obnovení aktivity, jež byla podáním selektivního inhibitoru zablokována.

Dosavadní výsledky studií selektivních IDO 1 inhibitorů ať už v monoterapii či v kombinaci s inhibitory PD-1 nebo CTLA-4 nejsou tak převratné, jak by bylo žádoucí. Za zvážení dozajista stojí možnost terapie, do které by byly zapojeny inhibitory obou zmíněných kontrolních bodů imunitní reakce najednou, nebo kombinace inhibitorů PD-1 a CTLA-4 s pan inhibitory IDO 1. Další studie a testy si zaslouží také kombinace nádorové imunoterapie s chemoterapií.

6 SEZNAM LITERATURY

Přehledové články a publikace označeny *

- Adams, O., Besken, K., Oberdorfer, C., MacKenzie, C.R., Takikawa, O., and Daubener, W. (2004). Role of Indoleamine-2,3-Dioxygenase in Alpha/Beta and Gamma Interferon-Mediated Antiviral Effects against Herpes Simplex Virus Infections. *Journal of Virology* 78, 2632–2636.
- Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubat, T., Yagita, H., and Honjo, T. (1996). Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* 8, 765–772.
- Ahmadzadeh, M., Johnson, L.A., Heemskerk, B., Wunderlich, J.R., Dudley, M.E., White, D.E., and Rosenberg, S.A. (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 114, 1537–1544.
- Akemi, H.-O., Osamu, T., and Ryotaro, Y. (1991). Cloning and expression of a cDNA encoding mouse indoleamine 2,3-dioxygenase. *Gene* 105, 221–227.
- de Araújo, E.F., Feriotti, C., Galdino, N.A. de L., Preite, N.W., Calich, V.L.G., and Loures, F.V. (2017). The IDO–AhR Axis Controls Th17/Treg Immunity in a Pulmonary Model of Fungal Infection. *Front. Immunol.* 8 880.
- Ashley, D.V.M., and Anderson, G.H. (1975). Correlation between the Plasma Tryptophan to Neutral Amino Acid Ratio and Protein Intake in the Self-selecting Weanling Rat. *The Journal of Nutrition* 105, 1412–1421.
- Austin, C.J.D., Kosim-Satyaputra, P., Smith, J.R., Willows, R.D., and Jamie, J.F. (2013). Mutation of cysteine residues alters the heme-binding pocket of indoleamine 2,3-dioxygenase-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 436, 595–600.
- Ball, H.J., Sanchez-Perez, A., Weiser, S., Austin, C.J.D., Astelbauer, F., Miu, J., McQuillan, J.A., Stocker, R., Jermini, L.S., and Hunt, N.H. (2007). Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. *Gene* 396, 203–213.
- Batabyal, D., and Yeh, S.-R. (2007). Human Tryptophan Dioxygenase: A Comparison to Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 15690–15701.
- Bauer, M.R., Jones, R.N., Baud, M.G.J., Wilcken, R., Boeckler, F.M., Fersht, A.R., Joerger, A.C., and Spencer, J. (2016). Harnessing Fluorine–Sulfur Contacts and Multipolar Interactions for the Design of p53 Mutant Y220C Rescue Drugs. *ACS Chem. Biol.* 11, 2265–2274.
- Beatty, G.L., O’Dwyer, P.J., Clark, J., Shi, J.G., Newton, R.C., Schaub, R., Maleski, J., Leopold, L., and Gajewski, T. (2013). Phase I study of the safety, pharmacokinetics (PK), and pharmacodynamics (PD) of the oral inhibitor of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO1) INCB024360 in patients (pts) with advanced malignancies. *JCO* 31, 3025–3025.
- Beatty, G.L., O’Dwyer, P.J., Clark, J., Shi, J.G., Bowman, K.J., Scherle, P.A., Newton, R.C., Schaub, R., Maleski, J., Leopold, L., et al. (2017). First-in-Human Phase I Study of the Oral Inhibitor of Indoleamine 2,3-Dioxygenase-1 Epcadostat (INCB024360) in Patients with Advanced Solid Malignancies. *Clin Cancer Res* 23, 3269–3276.
- Belladonna, M.L., Volpi, C., Bianchi, R., Vacca, C., Orabona, C., Pallotta, M.T., Boon, L., Gizzi, S., Fioretti, M.C., Grohmann, U., et al. (2008). Cutting Edge: Autocrine TGF- β Sustains Default Tolerogenesis by IDO-Competent Dendritic Cells. *J Immunol* 181, 5194–5198.
- Bodaghi, B., Goureau, O., Zipeto, D., Laurent, L., Virelizier, J.-L., and Michelson, S. (1999). Role of IFN- γ -Induced Indoleamine 2,3 Dioxygenase and Inducible Nitric Oxide Synthase in the Replication of Human Cytomegalovirus in Retinal Pigment Epithelial Cells. *The Journal of Immunology* 162, 957–964.

Brady, F.O., Feigelson, P., and Rajagopalan, K.V. (1973). Studies of the copper and heme cofactors of pseudomonad l-tryptophan-2,3-dioxygenase by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 157, 63–72.

Brandacher, G. (2006). Prognostic Value of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression in Colorectal Cancer: Effect on Tumor-Infiltrating T Cells. *Clinical Cancer Research* 12, 1144–1151.

Burkin, D.J., Kimbro, K.S., Barr, B.L., Jones, C., Taylor, M.W., and Gupta, S.L. (1993). Localization of Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) Gene to the Pericentromeric Region of Human Chromosome 8. *Genomics* 17, 262–263.

Carlin, JOSEPH M., et al. (1987). Biologic-response-modifier-induced indoleamine 2, 3-dioxygenase activity in human peripheral blood mononuclear cell cultures." *The Journal of Immunology* 139, 2414-2418.

Carlin, J.M., Borden, E.C., Sondel, P.M., and Byrne, G.I. (1989). Interferon-Induced Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity in Human Mononuclear Phagocytes. *J Leukoc Biol* 45, 29–34.

*Chen, Y., and Guillemin, G.J. (2009a). Kynurenine Pathway Metabolites in Humans: Disease and Healthy States. *International Journal of Tryptophan Research* 2, 1-19.

Chen, J., Yao, Y., Gong, C., Yu, F., Su, S., Chen, J., Liu, B., Deng, H., Wang, F., Lin, L., et al. (2011). CCL18 from Tumor-Associated Macrophages Promotes Breast Cancer Metastasis via PITPNM3. *Cancer Cell* 19, 541–555.

Chen, J.-Y., Li, C.-F., Kuo, C.-C., Tsai, K.K., Hou, M.-F., and Hung, W.-C. (2014). Cancer/stroma interplay via cyclooxygenase-2 and indoleamine 2,3-dioxygenase promotes breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 16, 410.

Clemente, C.G., Mihm, M.C., Bufalino, R., Zurrida, S., Collini, P., and Cascinelli, N. (1996). Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 77, 1303–1310.

Crosignani, S., Bingham, P., Botteman, P., Cannelle, H., Cauwenberghs, S., Cordonnier, M., Dalvie, D., Deroose, F., Feng, J.L., Gomes, B., et al. (2017). Discovery of a Novel and Selective Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO-1) Inhibitor 3-(5-Fluoro-1 *H* -indol-3-yl)pyrrolidine-2,5-dione (EOS200271/PF-06840003) and Its Characterization as a Potential Clinical Candidate. *J. Med. Chem.* 60, 9617–9629.

Cui, G., Lai, F., Wang, X., Chen, X., and Xu, B. (2020). Design, synthesis and biological evaluation of indole-2-carboxylic acid derivatives as IDO1/TDO dual inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 188, 111985.

Dai, W., and Gupta, S.L. (1990). Molecular cloning, sequencing and expression of human interferon- γ -inducible indoleamine 2,3-dioxygenase cDNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 168, 1–8.

Daud, A., Saleh, M.N., Hu, J., Bleeker, J.S., Riese, M.J., Meier, R., Zhou, L., Serbest, G., and Lewis, K.D. (2018). Epcadostat plus nivolumab for advanced melanoma: Updated phase 2 results of the ECHO-204 study. *JCO* 36, 9511–9511.

Deguchi, T., Sinha, A.K., and Barchas, J.D. (1973). BIOSYNTHESIS OF SEROTONIN IN RAPHE NUCLEI OF RAT BRAIN: EFFECT OF p-CHLOROPHENYLALANINE1. *Journal of Neurochemistry* 20, 1329–1336.

Delgoffe, G.M., Kole, T.P., Zheng, Y., Zarek, P.E., Matthews, K.L., Xiao, B., Worley, P.F., Kozma, S.C., and Powell, J.D. (2009). The mTOR Kinase Differentially Regulates Effector and Regulatory T Cell Lineage Commitment. *Immunity* 30, 832–844.

- Delgoffe, G.M., Pollizzi, K.N., Waickman, A.T., Heikamp, E., Meyers, D.J., Horton, M.R., Xiao, B., Worley, P.F., and Powell, J.D. (2011). The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nat Immunol* *12*, 295–303.
- D'Souza, M., Fontenot, A.P., Mack, D.G., Lozupone, C., Dillon, S., Meditz, A., Wilson, C.C., Connick, E., and Palmer, B.E. (2007). Programmed Death 1 Expression on HIV-Specific CD4+ T Cells Is Driven by Viral Replication and Associated with T Cell Dysfunction. *The Journal of Immunology* *179*, 1979–1987.
- Du, L., Xing, Z., Tao, B., Li, T., Yang, D., Li, W., Zheng, Y., Kuang, C., and Yang, Q. (2020). Both IDO1 and TDO contribute to the malignancy of gliomas via the Kyn–AhR–AQP4 signaling pathway. *Signal Transduction and Targeted Therapy* *5*, 1–13.
- Du, M.X., Sotero-Esteve, W.D., and Taylor, M.W. (2000). Analysis of Transcription Factors Regulating Induction of Indoleamine 2,3-Dioxygenase by IFN- *gamma*. *Journal of Interferon & Cytokine Research* *20*, 133–142.
- *Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* *22*, 329–360.
- van Elsas, A., Hurwitz, A.A., and Allison, J.P. (1999). Combination Immunotherapy of B16 Melanoma Using Anti-Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4 (Ctla-4) and Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor (Gm-Csf)-Producing Vaccines Induces Rejection of Subcutaneous and Metastatic Tumors Accompanied by Autoimmune Depigmentation. *Journal of Experimental Medicine* *190*, 355–366.
- Endo, R., Nakamura, T., Kawakami, K., Sato, Y., and Harashima, H. (2019). The silencing of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) in dendritic cells by siRNA-loaded lipid nanoparticles enhances cell-based cancer immunotherapy. *Scientific Reports* *9*, 1–11.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Vacca, C., Bianchi, R., Orabona, C., Spreca, A., Fioretti, M.C., and Puccetti, P. (2002). T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ* *9*, 1069–1077.
- Feng, X., Shen, P., Wang, Y., Li, Z., and Bian, J. (2019). Synthesis and in vivo antitumor evaluation of an orally active potent phosphoramidate derivative targeting IDO1/IDO2/TDO. *Biochemical Pharmacology* *168*, 214–223.
- Ferdinande, L., Demetter, P., Perez-Novo, C., Waeytens, A., Taildeman, J., Rottiers, I., Rottiers, P., De Vos, M., and Cuvelier, C.A. (2008). Inflamed Intestinal Mucosa Features a Specific Epithelial Expression Pattern of Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Int J Immunopathol Pharmacol* *21*, 289–295.
- Fernandez-Pol, J.A., Bono, V.H., and Johnson, G.S. (1977). Control of growth by picolinic acid: Differential response of normal and transformed cells. *PNAS* *74*, 2889–2893.
- Forouhar, F., Anderson, J.L.R., Mowat, C.G., Vorobiev, S.M., Hussain, A., Abashidze, M., Bruckmann, C., Thackray, S.J., Seetharaman, J., Tucker, T., et al. (2007). Molecular insights into substrate recognition and catalysis by tryptophan 2,3-dioxygenase. *PNAS* *104*, 473–478.
- Fortnagel, P., and Freese, E. (1968). Inhibition of Aconitase by Chelation of Transition Metals Causing Inhibition of Sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* *243*, 5289–5295.
- Friberg, M., Jennings, R., Alsarraj, M., Dessureault, S., Cantor, A., Extermann, M., Mellor, A.L., Munn, D.H., and Antonia, S.J. (2002). Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection. *International Journal of Cancer* *101*, 151–155.
- Frumento, G., Rotondo, R., Tonetti, M., Damonte, G., Benatti, U., and Ferrara, G.B. (2002). Tryptophan-derived Catabolites Are Responsible for Inhibition of T and Natural Killer Cell Proliferation Induced by Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *J Exp Med* *196*, 459–468.

Gao, S., Zhou, J., Liu, N., Wang, L., Gao, Q., Wu, Y., Zhao, Q., Liu, P., Wang, S., Liu, Y., et al. (2015). Curcumin induces M2 macrophage polarization by secretion IL-4 and/or IL-13. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 85, 131–139.

Gibney, G.T., Hamid, O., Lutzky, J., Olszanski, A.J., Mitchell, T.C., Gajewski, T.F., Chmielowski, B., HaNK, B.A., Zhao, Y., Newton, R.C., et al. (2019). Phase 1/2 study of epacadostat in combination with ipilimumab in patients with unresectable or metastatic melanoma. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 7, 80.

Gomes, B., Driessens, G., Bartlett, D., Cai, D., Cauwenberghs, S., Crosignani, S., Dalvie, D., Denies, S., Dillon, C.P., Fantin, V.R., et al. (2018). Characterization of the Selective Indoleamine 2,3-Dioxygenase-1 (IDO1) Catalytic Inhibitor EOS200271/PF-06840003 Supports IDO1 as a Critical Resistance Mechanism to PD-(L)1 Blockade Therapy. *Mol Cancer Ther* 17, 2530–2542.

Grant, R.S., Passey, R., Matanovic, G., Smythe, G., and Kapoor, V. (1999). Evidence for Increased de Novo Synthesis of NAD in Immune-Activated RAW264.7 Macrophages: A Self-Protective Mechanism? *Archives of Biochemistry and Biophysics* 372, 1–7.

Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Fioretti, M.C., et al. (2002). CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 3, 1097–1101.

Grohmann, U., Volpi, C., Fallarino, F., Bozza, S., Bianchi, R., Vacca, C., Orabona, C., Belladonna, M.L., Ayroldi, E., Nocentini, G., et al. (2007). Reverse signaling through GITR ligand enables dexamethasone to activate IDO in allergy. *Nat Med* 13, 579–586.

Guillonneau, C., Hill, M., Hubert, F.-X., Chiffolleau, E., Hervé, C., Li, X.-L., Heslan, M., Usal, C., Tesson, L., Ménoret, S., et al. (2007). CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8⁺CD45RC^{low} T cells, IFN- γ , and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 117, 1096–1106.

Guo, X., Xue, H., Shao, Q., Wang, J., Guo, X., Chen, X., Zhang, J., Xu, S., Li, T., Zhang, P., et al. (2016). Hypoxia promotes glioma-associated macrophage infiltration via periostin and subsequent M2 polarization by upregulating TGF- β and M-CSFR. *Oncotarget* 7, 80521–80542.

Hajak, G., Huether, G., Blanke, J., Blömer, M., Freyer, C., Poeggeler, B., Reimer, A., Rodenbeck, A., Schulz-Varzegi, M., and Rütger, E. (1991). The Influence of Intravenous L-Tryptophan on Plasma Melatonin and Sleep in Men. *Pharmacopsychiatry* 24, 17–20.

Hennequart, M., Pilotte, L., Cane, S., Hoffmann, D., Stroobant, V., Plaen, E.D., and Eynde, B.J.V. den (2017). Constitutive IDO1 Expression in Human Tumors Is Driven by Cyclooxygenase-2 and Mediates Intrinsic Immune Resistance. *Cancer Immunol Res* 5, 695–709.

Hla, T., and Neilson, K. (1992). Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 7384–7388.

Holmgaard, R.B., Zamarin, D., Munn, D.H., Wolchok, J.D., and Allison, J.P. (2013). Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical resistance mechanism in antitumor T cell immunotherapy targeting CTLA-4. *J Exp Med* 210, 1389–1402.

Holmgaard, R.B., Zamarin, D., Li, Y., Gasmi, B., Munn, D.H., Allison, J.P., Merghoub, T., and Wolchok, J.D. (2015). Tumor-Expressed IDO Recruits and Activates MDSC in a Treg-Dependent Manner. *Cell Reports* 13, 412–424.

*Hornýák, L., Dobos, N., Koncz, G., Karányi, Z., Páll, D., Szabó, Z., Halmos, G., and Székvölgyi, L. (2018). The Role of Indoleamine-2,3-Dioxygenase in Cancer Development, Diagnostics, and Therapy. *Front. Immunol.* 9, 151.

*HOŘEJŠÍ, V., BARTŮŇKOVÁ, J., BRDIČKA, T., & ŠPÍŠEK, R. (2017). *Základy imunologie*. 6. aktualizované vydání.

Ino, K., Yoshida, N., Kajiyama, H., Shibata, K., Yamamoto, E., Kidokoro, K., Takahashi, N., Terauchi, M., Nawa, A., Nomura, S., et al. (2006). Indoleamine 2,3-dioxygenase is a novel prognostic indicator for endometrial cancer. *British Journal of Cancer* *95*, 1555–1561.

Ishimura, Y., Nozaki, M., Hayaishi, O., Nakamura, T., Tamura, M., and Yamazaki, I. (1970). The Oxygenated Form of L-Tryptophan 2,3-Dioxygenase as Reaction Intermediate. *J. Biol. Chem.* *245*, 3593–3602.

Iversen, T.Z., Engell-Noerregaard, L., Ellebaek, E., Andersen, R., Larsen, S.K., Bjoern, J., Zeyher, C., Gouttefangeas, C., Thomsen, B.M., Holm, B., et al. (2014). Long-lasting Disease Stabilization in the Absence of Toxicity in Metastatic Lung Cancer Patients Vaccinated with an Epitope Derived from Indoleamine 2,3 Dioxygenase. *Clinical Cancer Research* *20*, 221–232.

Jetten, N., Verbruggen, S., Gijbels, M.J., Post, M.J., De Winther, M.P.J., and Donners, M.M.P.C. (2014). Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis* *17*, 109–118.

Jha, G.G., Gupta, S., Tagawa, S.T., Koopmeiners, J.S., Vivek, S., Dudek, A.Z., Cooley, S.A., Blazar, B.R., and Miller, J.S. (2017). A phase II randomized, double-blind study of sipuleucel-T followed by IDO pathway inhibitor, indoximod, or placebo in the treatment of patients with metastatic castration resistant prostate cancer (mCRPC). *JCO* *35*, 3066–3066.

Kadoya, A., Tone, S., Maeda, H., Minatogawa, Y., and Kido, R. (1992). Gene structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *189*, 530–536.

Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1998). Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *95*, 7556–7561.

Kingsley, C.I., Karim, M., Bushell, A.R., and Wood, K.J. (2002). CD25⁺ CD4⁺ Regulatory T Cells Prevent Graft Rejection: CTLA-4- and IL-10-Dependent Immune Regulation of Alloresponses. *J Immunol* *168*, 1080–1086.

Kjeldsen, J.W., Iversen, T.Z., Engell-Noerregaard, L., Mellempgaard, A., Andersen, M.H., and Svane, I.M. (2018). Durable Clinical Responses and Long-Term Follow-Up of Stage III–IV Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC) Patients Treated With IDO Peptide Vaccine in a Phase I Study—A Brief Research Report. *Front. Immunol.* *9*, 2145.

Klar, R., Michel, S., Schell, M., Hinterwimmer, L., Zippelius, A., and Jaschinski, F. (2020). A highly efficient modality to block the degradation of tryptophan for cancer immunotherapy: locked nucleic acid-modified antisense oligonucleotides to inhibit human indoleamine 2,3-dioxygenase 1/tryptophan 2,3-dioxygenase expression. *Cancer Immunol Immunother* *69*, 57–67.

Koblish, H.K., Hansbury, M.J., Bowman, K.J., Yang, G., Neilan, C.L., Haley, P.J., Burn, T.C., Waeltz, P., Sparks, R.B., Yue, E.W., et al. (2010). Hydroxyamide Inhibitors of Indoleamine-2,3-dioxygenase Potently Suppress Systemic Tryptophan Catabolism and the Growth of IDO-Expressing Tumors. *Molecular Cancer Therapeutics* *9*, 489–498.

Komrokji, R.S., Wei, S., Mailloux, A.W., Zhang, L., Padron, E., Sallman, D., Lancet, J.E., Tinsley, S., Nardelli, L.A., Pinilla-Ibarz, J., et al. (2019). A Phase II Study to Determine the Safety and Efficacy of the Oral Inhibitor of Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) Enzyme INCB024360 in Patients with Myelodysplastic Syndromes. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* *19*, 157–161.

- Kristeleit, R., Davidenko, I., Shirinkin, V., El-Khouly, F., Bondarenko, I., Goodheart, M.J., Gorbunova, V., Penning, C.A., Shi, J.G., Liu, X., et al. (2017). A randomised, open-label, phase 2 study of the IDO1 inhibitor epacadostat (INCB024360) versus tamoxifen as therapy for biochemically recurrent (CA-125 relapse)-only epithelial ovarian cancer, primary peritoneal carcinoma, or fallopian tube cancer. *Gynecologic Oncology* *146*, 484–490.
- Krummel, M.F., and Allison, J.P. (1995). CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* *182*, 459–465.
- Krummel, M.F., and Allison, J.P. (1996). CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *The Journal of Experimental Medicine* *183*, 2533–2540.
- Kudo, Y., and Boyd, C. a. R. (2001). The role of l-tryptophan transport in l-tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase in human placental explants. *The Journal of Physiology* *531*, 417–423.
- Kudo, Y., and Boyd, C.A.R. (2000). Human placental indoleamine 2,3-dioxygenase: cellular localization and characterization of an enzyme preventing fetal rejection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* *1500*, 119–124.
- Kumar, S., Waldo, J.P., Jaipuri, F.A., Marcinowicz, A., Van Allen, C., Adams, J., Kesharwani, T., Zhang, X., Metz, R., Oh, A.J., et al. (2019). Discovery of Clinical Candidate (1*R*,4*r*)-4-((*R*)-2-((*S*)-6-Fluoro-5*H*-imidazo[5,1-*a*]isoindol-5-yl)-1-hydroxyethyl)cyclohexan-1-ol (Navoximod), a Potent and Selective Inhibitor of Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1. *J. Med. Chem.* *62*, 6705–6733.
- Leach, D.R., Krummel, M.F., and Allison, J.P. (1996). Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science* *271*, 1734–1736.
- Lee, S.Y., Choi, H.K., Lee, K.J., Jung, J.Y., Hur, G.Y., Jung, K.H., Kim, J.H., Shin, C., Shim, J.J., In, K.H., et al. (2009). The Immune Tolerance of Cancer is Mediated by IDO That is Inhibited by COX-2 Inhibitors Through Regulatory T Cells. *Journal of Immunotherapy* *32*, 22–28.
- Lepique, A.P., Daghasanli, K.R.P., Cuccovia, I.M., and Villa, L.L. (2009). HPV16 Tumor Associated Macrophages Suppress Antitumor T Cell Responses. *Clin Cancer Res* *15*, 4391–4400.
- Lewis, H.C., Chinnadurai, R., Bosinger, S.E., and Galipeau, J. (2017). The IDO inhibitor 1-methyl tryptophan activates the aryl hydrocarbon receptor response in mesenchymal stromal cells. *Oncotarget* *8*, 91914–91927.
- Lewis-Ballester, A., Pham, K.N., Batabyal, D., Karkashon, S., Bonanno, J.B., Poulos, T.L., and Yeh, S.-R. (2017). Structural insights into substrate and inhibitor binding sites in human indoleamine 2,3-dioxygenase 1. *Nat Commun* *8*, 1693.
- Li, F., Zhao, Y., Wei, L., Li, S., and Liu, J. (2018). Tumor-infiltrating Treg, MDSC, and IDO expression associated with outcomes of neoadjuvant chemotherapy of breast cancer. *Cancer Biology & Therapy* *19*, 695–705.
- Lim, T.S., Chew, V., Sieow, J.L., Goh, S., Yeong, J.P.-S., Soon, A.L., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2016). PD-1 expression on dendritic cells suppresses CD8⁺ T cell function and antitumor immunity. *OncoImmunology* *5*, e1085146.
- Littlejohn, T.K., Takikawa, O., Truscott, R.J.W., and Walker, M.J. (2003). Asp274 and His346 Are Essential for Heme Binding and Catalytic Function of Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *J. Biol. Chem.* *278*, 29525–29531.
- Liu, H., Liu, L., Liu, K., Bizargity, P., Hancock, W.W., and Visner, G.A. (2009). Reduced Cytotoxic Function of Effector CD8⁺ T Cells Is Responsible for Indoleamine 2,3-Dioxygenase-Dependent Immune Suppression. *J Immunol* *183*, 1022–1031.

- Liu, X., Shin, N., Koblisch, H.K., Yang, G., Wang, Q., Wang, K., Leffet, L., Hansbury, M.J., Thomas, B., Rupar, M., et al. (2010). Selective inhibition of IDO1 effectively regulates mediators of antitumor immunity. *Blood* *115*, 3520–3530.
- Liu, Y., Liang, X., Yin, X., Lv, J., Tang, K., Ma, J., Ji, T., Zhang, H., Dong, W., Jin, X., et al. (2017). Blockade of IDO-kynurenine-AhR metabolic circuitry abrogates IFN- γ -induced immunologic dormancy of tumor-repopulating cells. *Nat Commun* *8*, 15207.
- Liu, Y., Liang, X., Dong, W., Fang, Y., Lv, J., Zhang, T., Fiskesund, R., Xie, J., Liu, J., Yin, X., et al. (2018). Tumor-Repopulating Cells Induce PD-1 Expression in CD8⁺ T Cells by Transferring Kynurenine and AhR Activation. *Cancer Cell* *33*, 480-494.e7.
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J.L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., and Hall, M.N. (2002). Two TOR Complexes, Only One of which Is Rapamycin Sensitive, Have Distinct Roles in Cell Growth Control. *Molecular Cell* *10*, 457–468.
- Long, G.V., Dummer, R., Hamid, O., Gajewski, T.F., Caglevic, C., Dalle, S., Arance, A., Carlino, M.S., Grob, J.-J., Kim, T.M., et al. (2019). Epcadostat plus pembrolizumab versus placebo plus pembrolizumab in patients with unresectable or metastatic melanoma (ECHO-301/KEYNOTE-252): a phase 3, randomised, double-blind study. *The Lancet Oncology* *20*, 1083–1097.
- Mandarano, M., Bellezza, G., Belladonna, M.L., Van den Eynde, B.J., Chiari, R., Vannucci, J., Mondanelli, G., Ludovini, V., Ferri, I., Bianconi, F., et al. (2019). Assessment of TIL, IDO-1, and PD-L1 in resected non-small cell lung cancer: an immunohistochemical study with clinicopathological and prognostic implications. *Virchows Arch* *474*, 159–168.
- Meininger, D., Zalameda, L., Liu, Y., Stepan, L.P., Borges, L., McCarter, J.D., and Sutherland, C.L. (2011). Purification and kinetic characterization of human indoleamine 2,3-dioxygenases 1 and 2 (IDO1 and IDO2) and discovery of selective IDO1 inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* *1814*, 1947–1954.
- Mellor, A.L., Baban, B., Chandler, P.R., Manlapat, A., Kahler, D.J., and Munn, D.H. (2005). Cutting Edge: CpG Oligonucleotides Induce Splenic CD19⁺ Dendritic Cells to Acquire Potent Indoleamine 2,3-Dioxygenase-Dependent T Cell Regulatory Functions via IFN Type 1 Signaling. *J Immunol* *175*, 5601–5605.
- Metz, R., DuHadaway, J.B., Kamasani, U., Laury-Kleintop, L., Muller, A.J., and Prendergast, G.C. (2007). Novel Tryptophan Catabolic Enzyme IDO2 Is the Preferred Biochemical Target of the Antitumor Indoleamine 2,3-Dioxygenase Inhibitory Compound d-1-Methyl-Tryptophan. *Cancer Res* *67*, 7082–7087.
- Metz, R., Rust, S., DuHadaway, J.B., Mautino, M.R., Munn, D.H., Vahanian, N.N., Link, C.J., and Prendergast, G.C. (2012). IDO inhibits a tryptophan sufficiency signal that stimulates mTOR: A novel IDO effector pathway targeted by D-1-methyl-tryptophan. *OncImmunology* *1*, 1460–1468.
- Mezrich, J.D., Fechner, J.H., Zhang, X., Johnson, B.P., Burlingham, W.J., and Bradfield, C.A. (2010). An Interaction between Kynurenine and the Aryl Hydrocarbon Receptor Can Generate Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* *185*, 3190–3198.
- Miyamoto, T., Ogino, N., Yamamoto, S., and Hayaishi, O. (1976). Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *J. Biol. Chem.* *251*, 2629–2636.
- Moyer, B.J., Rojas, I.Y., Murray, I.A., Lee, S., Hazlett, H.F., Perdew, G.H., and Tomlinson, C.R. (2017). Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitors activate the aryl hydrocarbon receptor. *Toxicology and Applied Pharmacology* *323*, 74–80.
- Muller, A.J., DuHadaway, J.B., Donover, P.S., Sutanto-Ward, E., and Prendergast, G.C. (2005). Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat Med* *11*, 312–319.

Munn, D.H. (2002). Potential Regulatory Function of Human Dendritic Cells Expressing Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Science* 297, 1867–1870.

*Munn, D.H., and Mellor, A.L. (2013). Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends in Immunology* 34, 137–143.

Munn, D.H., Zhou, M., Attwood, J.T., Bondarev, I., Conway, S.J., Marshall, B., Brown, C., and Mellor, A.L. (1998). Prevention of Allogeneic Fetal Rejection by Tryptophan Catabolism. *Science* 281, 1191–1193.

Munn, D.H., Shafizadeh, E., Attwood, J.T., Bondarev, I., Pashine, A., and Mellor, A.L. (1999). Inhibition of T Cell Proliferation by Macrophage Tryptophan Catabolism. *J Exp Med* 189, 1363–1372.

Munn, D.H., Sharma, M.D., Hou, D., Baban, B., Lee, J.R., Antonia, S.J., Messina, J.L., Chandler, P., Koni, P.A., and Mellor, A.L. (2004). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest* 114, 280–290.

Munn, D.H., Sharma, M.D., Baban, B., Harding, H.P., Zhang, Y., Ron, D., and Mellor, A.L. (2005). GCN2 Kinase in T Cells Mediates Proliferative Arrest and Anergy Induction in Response to Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Immunity* 22, 633–642.

Nayak-Kapoor, A., Hao, Z., Sadek, R., Dobbins, R., Marshall, L., Vahanian, N.N., Jay Ramsey, W., Kennedy, E., Mautino, M.R., Link, C.J., et al. (2018). Phase Ia study of the indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitor navoximod (GDC-0919) in patients with recurrent advanced solid tumors. *J. Immunotherapy Cancer* 6, 61.

Nguyen, N.T., Kimura, A., Nakahama, T., Chinen, I., Masuda, K., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y., and Kishimoto, T. (2010). Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 19961–19966.

Ninomiya, S., Nakamura, N., Kitagawa, J., Hara, T., Shimizu, M., and Tsurumi, H. (2016). The Roles of Aryl Hydrocarbon Receptor in T Cells at IDO-Positive Tumor Microenvironment. *Blood* 128, 3693–3693.

*Nozaki, M. (1979). Oxygenases and dioxygenases. In *Biochemistry*, (Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag), 145–186.

Okamoto, A. (2005). Indoleamine 2,3-Dioxygenase Serves as a Marker of Poor Prognosis in Gene Expression Profiles of Serous Ovarian Cancer Cells. *Clinical Cancer Research* 11, 6030–6039.

Opitz, C.A., Litzenburger, U.M., Sahm, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., Schumacher, T., Jestaedt, L., Schrenk, D., Weller, M., et al. (2011a). An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 478, 197–203.

Opitz, C.A., Litzenburger, U.M., Opitz, U., Sahm, F., Ochs, K., Lutz, C., Wick, W., and Platten, M. (2011b). The Indoleamine-2,3-Dioxygenase (IDO) Inhibitor 1-Methyl-D-tryptophan Upregulates IDO1 in Human Cancer Cells. *PLoS ONE* 6, e19823.

Orabona, C., Puccetti, P., Vacca, C., Biccato, S., Luchini, A., Fallarino, F., Bianchi, R., Velardi, E., Ferruccio, K., Velardi, A., et al. (2006). Toward the identification of a tolerogenic signature in IDO-competent dendritic cells. *Blood* 107, 2846–2854.

Ortiz-Meoz, R., Wang, L., Matico, R., Rutkowska, A., Rosa, M.D. la, Bedard, S., Midgett, R., Strohmmer, K., Thomson, D., Zhang, C., et al. (2018). Characterization of novel inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase by targeting its apo form. *BioRxiv* 324947.

Pedicord, V.A., Montalvo, W., Leiner, I.M., and Allison, J.P. (2011). Single dose of anti-CTLA-4 enhances CD8⁺ T-cell memory formation, function, and maintenance. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 266–271.

Perez, R.P., Riese, M.J., Lewis, K.D., Saleh, M.N., Daud, A., Berlin, J., Lee, J.J., Mukhopadhyay, S., Zhou, L., Serbest, G., et al. (2017). Epcadostat plus nivolumab in patients with advanced solid tumors: Preliminary phase I/II results of ECHO-204. *JCO* 35, 3003–3003.

Perruche, S., Zhang, P., Liu, Y., Saas, P., Bluestone, J.A., and Chen, W. (2008). CD3-specific antibody-induced immune tolerance involves transforming growth factor- β from phagocytes digesting apoptotic T cells. *Nat Med* 14, 528–535.

Pollizzi, K.N., Patel, C.H., Sun, I.-H., Oh, M.-H., Waickman, A.T., Wen, J., Delgoffe, G.M., and Powell, J.D. (2015). mTORC1 and mTORC2 selectively regulate CD8⁺ T cell differentiation. *J Clin Invest* 125, 2090–2108.

*Prendergast, G.C., Malachowski, W.P., DuHadaway, J.B., and Muller, A.J. (2017). Discovery of IDO1 Inhibitors: From Bench to Bedside. *Cancer Res* 77, 6795–6811.

Ruffmann R, Schlick R, Chirigos MA, Budzynsky W, Varesio L. (1987) Antiproliferative activity of picolinic acid due to macrophage activation. *Drugs Under Experimental and Clinical Research* 13, 607-614.

Ramagopal, U.A., Liu, W., Garrett-Thomson, S.C., Bonanno, J.B., Yan, Q., Srinivasan, M., Wong, S.C., Bell, A., Mankikar, S., Rangan, V.S., et al. (2017). Structural basis for cancer immunotherapy by the first-in-class checkpoint inhibitor ipilimumab. *Proc Natl Acad Sci USA* 114, E4223–E4232.

Robert, C., Schachter, J., Long, G.V., Arance, A., Grob, J.J., Mortier, L., Daud, A., Carlino, M.S., McNeil, C., Lotem, M., et al. (2015). Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 372, 2521–2532.

Robinson, C.M., Shirey, K.A., and Carlin, J.M. (2003). Synergistic Transcriptional Activation of Indoleamine Dioxygenase by IFN- γ and Tumor Necrosis Factor- α . *Journal of Interferon & Cytokine Research* 23, 413–421.

Robinson, C.M., Hale, P.T., and Carlin, J.M. (2005). The Role of IFN- γ and TNF- α -Responsive Regulatory Elements in the Synergistic Induction of Indoleamine Dioxygenase. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 25, 20–30.

*Röhrig, U.F., Majjigapu, S.R., Vogel, P., Zoete, V., and Michielin, O. (2015). Challenges in the Discovery of Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) Inhibitors. *J. Med. Chem.* 58, 9421–9437.

Röhrig, U.F., Reynaud, A., Majjigapu, S.R., Vogel, P., Pojer, F., and Zoete, V. (2019). Inhibition Mechanisms of Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO1). *J. Med. Chem.* 62, 8784–8795.

Rosenberg, A.J., Wainwright, D.A., Rademaker, A., Galvez, C., Genet, M., Zhai, L., Lauing, K.L., Mulcahy, M.F., Hayes, J.P., Odell, D.D., et al. (2018). Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 and overall survival of patients diagnosed with esophageal cancer. *Oncotarget* 9, 23482–23493.

Sailer, V., Sailer, U., Bawden, E.G., Zarbl, R., Wiek, C., Vogt, T.J., Dietrich, J., Loick, S., Grünwald, I., Toma, M., et al. (2019). DNA methylation of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) in head and neck squamous cell carcinomas correlates with IDO1 expression, HPV status, patients' survival, immune cell infiltrates, mutational load, and interferon γ signature. *EBioMedicine* 48, 341–352.

Schimke, R.T., Sweeney, E.W., and Berlin, C.M. (1965). The Roles of Synthesis and Degradation in the Control of Rat Liver Tryptophan Pyrrolase. *J. Biol. Chem.* 240, 322–331.

Schroecksnadel, K., Winkler, C., Fuith, L.C., and Fuchs, D. (2005). Tryptophan degradation in patients with gynecological cancer correlates with immune activation. *Cancer Letters* 223, 323–329.

Schutz, G., and Feigelson, P. (1972). Purification and Properties of Rat Liver Tryptophan Oxygenase. *J. Biol. Chem.* 247, 5327–5332.

Schutz, G., Killewich, L., Chen, G., and Feigelson, P. (1975). Control of the mRNA for hepatic tryptophan oxygenase during hormonal and substrate induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72, 1017–1020.

*Schwarcz, R., Young, S.N., and Brown, R.R. (2013). *Kynurenine and Serotonin Pathways: Progress in Tryptophan Research* (Springer Science & Business Media).

Sharma, M.D., Baban, B., Chandler, P., Hou, D.-Y., Singh, N., Yagita, H., Azuma, M., Blazar, B.R., Mellor, A.L., and Munn, D.H. (2007). Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Treg via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 117, 2570–2582.

Smith, D.C., Gajewski, T., Hamid, O., Wasser, J.S., Olszanski, A.J., Patel, S.P., Mamtani, R., Schmidt, E.V., Zhao, Y., Maleski, J.E., et al. (2017). Epcadostat plus pembrolizumab in patients with advanced urothelial carcinoma: Preliminary phase I/II results of ECHO-202/KEYNOTE-037. *JCO* 35, 4503–4503.

Soliman, H.H., Minton, S.E., Han, H.S., Ismail-Khan, R., Neuger, A., Khambati, F., Noyes, D., Lush, R., Chiappori, A.A., Roberts, J.D., et al. (2016). A phase I study of indoximod in patients with advanced malignancies. *Oncotarget* 7, 22928–22938.

Sørensen, R.B., Hadrup, S.R., Svane, I.M., Hjortsø, M.C., thor Straten, P., and Andersen, M.H. (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase specific, cytotoxic T cells as immune regulators. *Blood* 117, 2200–2210.

Spranger, S., Spaapen, R.M., Zha, Y., Williams, J., Meng, Y., Ha, T.T., and Gajewski, T.F. (2013). Up-Regulation of PD-L1, IDO, and Treg in the Melanoma Tumor Microenvironment Is Driven by CD8+ T Cells. *Science Translational Medicine* 5, 200ra116.

Sugimoto, H., Oda, S. -i., Otsuki, T., Hino, T., Yoshida, T., and Shiro, Y. (2006). Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: Catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 2611–2616.

Sundrud, M.S., Koralov, S.B., Feuerer, M., Calado, D.P., Kozhaya, A.E., Rhule-Smith, A., Lefebvre, R.E., Unutmaz, D., Mazitschek, R., Waldner, H., et al. (2009). Halofuginone Inhibits TH17 Cell Differentiation by Activating the Amino Acid Starvation Response. *Science* 324, 1334–1338.

Suzuki, Y., Suda, T., Furuhashi, K., Suzuki, M., Fujie, M., Hahimoto, D., Nakamura, Y., Inui, N., Nakamura, H., and Chida, K. (2010). Increased serum kynurenine/tryptophan ratio correlates with disease progression in lung cancer. *Lung Cancer* 67, 361–365.

Taniguchi, Taketoshi, *et al.* (1979). Indoleamine 2, 3-dioxygenase. Kinetic studies on the binding of superoxide anion and molecular oxygen to enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 254, 3288-3294.

Takikawa, O., Yoshida, R., Kido, R., and Hayaishi, O. (1986). Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 261, 3648–3653.

Takikawa, O., Kuroiwa, T., Yamazaki, F., and Kido, R. (1988). Mechanism of interferon-gamma action. Characterization of indoleamine 2,3-dioxygenase in cultured human cells induced by interferon-gamma and evaluation of the enzyme-mediated tryptophan degradation in its anticellular activity. *J. Biol. Chem.* 263, 2041–2048.

Takikawa, O., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Yoshida, R., and Truscott, R.J.W. (1999). Interferon-Gamma-Dependent/Independent Expression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase. In *Tryptophan, Serotonin, and Melatonin: Basic Aspects and Applications*, G. Huether, W. Kochen, T.J. Simat, and H. Steinhart, eds. (Boston, MA: Springer US), 467, 553–557.

Uyttenhove, C., Pilotte, L., Théate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., and Van den Eynde, B.J. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 9, 1269–1274.

- Varga, J., Yufit, T., and Brown, R.R. (1995). Inhibition of collagenase and stromelysin gene expression by interferon-gamma in human dermal fibroblasts is mediated in part via induction of tryptophan degradation. *J Clin Invest*, *96*, 475-481
- Verreck, F.A.W., de Boer, T., Langenberg, D.M.L., Hoeve, M.A., Kramer, M., Vaisberg, E., Kastelein, R., Kolk, A., de Waal-Malefyt, R., and Ottenhoff, T.H.M. (2004). Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *101*, 4560–4565.
- Vogel, C.F.A., Goth, S.R., Dong, B., Pessah, I.N., and Matsumura, F. (2008). Aryl hydrocarbon receptor signaling mediates expression of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *375*, 331–335.
- Walker, A.R., Howells, A.J., and Tearle, R.G. (1986). Cloning and characterization of the vermilion gene of *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* *202*, 102–107.
- Wan, Z., Sun, J., Xu, J., Moharil, P., Chen, J., Xu, J., Zhu, J., Li, J., Huang, Y., Xu, P., et al. (2019). Dual functional immunostimulatory polymeric prodrug carrier with pendent indoximod for enhanced cancer immunochemotherapy. *Acta Biomaterialia* *90*, 300–313.
- Wang, X.-F., Wang, H.-S., Wang, H., Zhang, F., Wang, K.-F., Guo, Q., Zhang, G., Cai, S.-H., and Du, J. (2014). The role of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in immune tolerance: Focus on macrophage polarization of THP-1 cells. *Cellular Immunology* *289*, 42–48.
- Warashina, S., Nakamura, T., Sato, Y., Fujiwara, Y., Hyodo, M., Hatakeyama, H., and Harashima, H. (2016). A lipid nanoparticle for the efficient delivery of siRNA to dendritic cells. *Journal of Controlled Release* *225*, 183–191.
- Watanabe, T., Gaedicke, S., Guffart, E., Firat, E., and Niedermann, G. (2020). Adding Indoximod to Hypofractionated Radiotherapy with Anti-PD-1 Checkpoint Blockade Enhances Early NK and CD8⁺ T-Cell-Dependent Tumor Activity. *Clin Cancer Res* *26*, 945–956.
- Weinlich, G., Murr, C., Richardsen, L., Winkler, C., and Fuchs, D. (2007). Decreased Serum Tryptophan Concentration Predicts Poor Prognosis in Malignant Melanoma Patients. *Dermatology* *214*, 8–14.
- Wek, S.A., Zhu, S., and Wek, R.C. (1995). The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 alpha protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 4497–4506.
- Wichers, M.C., Koek, G.H., Robaey, G., Verkerk, R., Scharpé, S., and Maes, M. (2005). IDO and interferon- α -induced depressive symptoms: a shift in hypothesis from tryptophan depletion to neurotoxicity. *Molecular Psychiatry* *10*, 538–544.
- Winters, M., DuHadaway, J.B., Pham, K.N., Lewis-Ballester, A., Badir, S., Wai, J., Sheikh, E., Yeh, S.-R., Prendergast, G.C., Muller, A.J., et al. (2019). Diaryl hydroxylamines as pan or dual inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase-1, indoleamine 2,3-dioxygenase-2 and tryptophan dioxygenase. *European Journal of Medicinal Chemistry* *162*, 455–464.
- Yamazaki, F., Kuroiwa, T., Takikawa, O., and Kido, R. (1985). Human indolylamine 2,3-dioxygenase. Its tissue distribution, and characterization of the placental enzyme. *Biochemical Journal* *230*, 635–638.
- *Yang, L., and Zhang, Y. (2017). Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. *Journal of Hematology & Oncology* *10*, 58.
- Yoshida, R., and Hayaishi, O. (1978). Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by intraperitoneal injection of bacterial lipopolysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *75*, 3998–4000.

Yoshida, N., Ino, K., Ishida, Y., Kajiyama, H., Yamamoto, E., Shibata, K., Terauchi, M., Nawa, A., Akimoto, H., Takikawa, O., et al. (2008). Overexpression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Human Endometrial Carcinoma Cells Induces Rapid Tumor Growth in a Mouse Xenograft Model. *Clin Cancer Res* 14, 7251–7259.

Yoshida, R., Urade, Y., Tokuda, M., and Hayaishi, O. (1979). Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in mouse lung during virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76, 4084–4086.

Yu, J., Du, W., Yan, F., Wang, Y., Li, H., Cao, S., Yu, W., Shen, C., Liu, J., and Ren, X. (2013). Myeloid-Derived Suppressor Cells Suppress Antitumor Immune Responses through IDO Expression and Correlate with Lymph Node Metastasis in Patients with Breast Cancer. *J.I.* 190, 3783–3797.

Yuasa, H.J., Takubo, M., Takahashi, A., Hasegawa, T., Noma, H., and Suzuki, T. (2007). Evolution of Vertebrate Indoleamine 2,3-Dioxygenases. *J Mol Evol* 65, 705.

Zak, K.M., Kitel, R., Przetocka, S., Golik, P., Guzik, K., Musielak, B., Dömling, A., Dubin, G., and Holak, T.A. (2015). Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1. *Structure* 23, 2341–2348.

Zakharia, Y., Rixe, O., Ward, J.H., Drabick, J.J., Shaheen, M.F., Milhem, M.M., Munn, D., Kennedy, E.P., Vahanian, N.N., Link, C.J., et al. (2018). Phase 2 trial of the IDO pathway inhibitor indoximod plus checkpoint inhibition for the treatment of patients with advanced melanoma. *JCO* 36, 9512–9512.

Zhang, L., Conejo-Garcia, J.R., Katsaros, D., Gimotty, P.A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M.N., et al. (2003). Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 348, 203–213.

Zheng, X., Koropatnick, J., Li, M., Zhang, X., Ling, F., Ren, X., Hao, X., Sun, H., Vladau, C., Franek, J.A., et al. (2006). Reinstalling Antitumor Immunity by Inhibiting Tumor-Derived Immunosuppressive Molecule IDO through RNA Interference. *The Journal of Immunology* 177, 5639–5646.

Zou, W., Machelon, V., Coulomb-L'Hermin, A., Borvak, J., Nome, F., Isaeva, T., Wei, S., Krzysiek, R., Durand-Gasselin, I., Gordon, A., et al. (2001). Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 7, 1339–1346.

Internetový zdroj: <http://www.clinicaltrials.gov>