

Univerzita Karlova
2. lékařská fakulta

Doktorský studijní program: Imunologie



Ing. Pavla Táborská

T buněčná imunoterapie nádorových onemocnění

T cell immunotherapy of cancer

Disertační práce

Školitel: RNDr. Daniel Smrž, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

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

V Praze, 31.5.2021

Pavla Táborská

.....

Podpis autora

Identifikační záznam

TÁBORSKÁ, Pavla. *T buněčná imunoterapie nádorových onemocnění. [T cell immunotherapy of cancer]*. Praha, 2021. 70 s., 3 příl. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Ústav imunologie. Školitel Smrž, Daniel.

Poděkování

Děkuji především svému školiteli Danielu Smržovi za odborné vedení, cenné rady a veškerý čas, který mi během doktorského studia věnoval. Mé velké poděkování patří prof. Jiřině Bartůňkové za její odbornou podporu a pomoc.

Děkuji také mým kolegům Dmitrymu Stakheevovi, Zuzaně Střížové a Michalu Podrazilovi za vytvoření přátelského a podnětného prostředí při společném řešení projektů a podporu při studiu. Děkuji i ostatním kolegům z Ústavu imunologie, kteří mi byli nápomocní při mé práci.

Speciální díky také patří prof. Rolfu Kiesslingovi a Stině Wickström za příležitost pracovat s nimi v týmu a získávat nové zkušenosti během mé půlroční stáže na Karolinska Institutet.

V neposlední řadě patří moje poděkování mé rodině a mým blízkým za podporu a trpělivost během mého studia.

Abstrakt

Nádorová onemocnění se celosvětově řadí mezi nejčastější příčiny úmrtí. Pacienti v pozdních stádiích onemocnění v době diagnózy mají omezené možnosti úspěšné léčby. Klasické léčebné metody, jako je chirurgie, chemoterapie a radiační léčba mají pro pacienty v pozdních stádiích onemocnění omezený potenciál. Pasivní nádorová imunoterapie, zejména adoptivní buněčný transfer, se jeví jako nadějná léčebná modalita pro pacienty v pokročilých a refrakterních stádiích onemocnění. Předkládaná práce je zaměřena na vývoj T buněčné nádorové terapie karcinomu prostaty. Práce se zabývá 3 částmi přípravy T buněk pro imunoterapii: nabohacení, expanze a modulace. První část zkoumá nové způsoby nabohacení patientských lymfocytů o T buňky reaktivní na prostatické nádorově asociované antigeny. Druhá část ukazuje expanzi nabohacených antigen reaktivních T buněk. Poslední část prověřuje nové přístupy cytokinové a farmakologické modulace fenotypu expandovaných antigen reaktivních T buněk. Práce je shrnuta do 3 prvoautorských publikací, z nichž každá se zabývá jednotlivými částmi přípravy T buněk pro imunoterapii.

Klíčová slova

CD8⁺ T buňky, cytokinová deprivace, *ex vivo* expanze, GSK-3β-mTORC1/2 signální dráha, karcinom prostaty, nádorově asociované antigeny, personalizovaná T buněčná imunoterapie

Abstract

Cancer is the second leading cause of death worldwide. Patients diagnosed at the late stages of the disease have limited treatment options. Traditional treatment modalities such as surgery, chemotherapy and radiotherapy also have limited efficacy at the late stages of the disease. Passive cancer cellular immunotherapy, namely the adoptive cell transfer, is a promising treatment modality in patients with late and refractory forms of the disease. The objective of the presented work is the development of the T cell-based immunotherapy of prostate cancer. The work addresses 3 parts of the T cell preparation for immunotherapy: enrichment, expansion, and modulation. The first part of the study investigates new ways how to enrich the patients' lymphocytes with T cells reactive to tumor-associated antigens. The second part of the study establishes a protocol for the extensive expansion of the enriched cell cultures. The last part of the study examines new approaches for modulating the phenotype of the enriched and expanded antigen reactive T cells. The work was summarized in 3 primary-authored publications, each of which addressed the individual parts of the cell preparation for T cell-based immunotherapy.

Keywords

CD8⁺ T cells, cytokine starvation, *ex vivo* expansion, GSK-3 β -mTORC1/2 pathway, personalized T cell immunotherapy, prostate cancer, tumor-associated antigens

Seznam zkratek

ACT	adoptivní buněčný transfer (adoptive cell therapy)
ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (antibody dependent cellular cytotoxicity)
ADT	androgen deprivace terapie
Ag	antigen
APC	buňka prezentující antigen (antigen-presenting cell)
AR	androgenní receptor
ATP	adenosintrifosfát
BiTE	bispecifická protilátka (bispecific T cell engager)
BMDC	DC pocházející z kostní dřeně (bone marrow derived DC)
BRCA 1/2	geny spojené s výskytem karcinomu prsu a ovaria (breast cancer 1/2)
CAF	nádorově asociované fibroblasty (cancer associated fibroblasts)
CEA	karcinoembryonální antigen (carcinoembryonic antigen)
CAR	chimerní antigenní receptor (chimeric antigen receptor)
CD	diferenční skupina (cluster of differentiation)
CT	počítačová tomografie (computer tomography)
CTLA-4	cytotoxický T-lymphocytový antigen-4
DC	dendritická buňka (dendritic cell)
DDR	DNA damage response
DR5	death receptor 5
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru (epidermal growth factor receptor)
FAS	proapoptotický receptor
FASL	ligand pro FAS
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (granulocyte monocyte colony stimulating factor)
GD2	disialogangliosid 2
gp100	glycoprotein 100
GSK-3	glykogen syntáza kináza 3 (glycogen synthase kinase 3)
HIF	faktor indukovatelný hypoxií (hypoxia inducible factor)
HLA	hlavní komplex lidských histokompatibilních antigenů (human leukocyte antigen complex)
HSC	hematopoetická kmenová buňka (haematopoetic stem cell)
IL	interleukin
IFN	interferon
JAK	Janusova kináza
KRAS	protoonkogen (podle Kirsten RAt Sarcoma viru)
mAbs	monoklonální protilátky (monoclonal antibodies)
mCRPC	metastatický kastrát rezistentní PCa (metastatic castrate resistant PCa)
mOS	medián celkového přežití (median overall survival)
MAGE-A3/4	melanoma-associated antigen 3/4

MART-1	melanomový Ag rozpoznávaný T buňkami 1 (melanoma Ag recognized by T cells 1)
MDSC	myeloidní supresorové buňky (myeloid derived suppressor cells)
mTOR	mammalian target of rapamycin
NK	přírozený zabíječ (natural killer)
NY-ESO-1	New York esophageal squamous cell carcinoma-1 antigen
OS	celkové přežití (overall survival)
PAP	prostatická kyselá fosfatáza (prostatic acid phosphatase)
PARP	poly (ADP ribóza) polymeráza
PCa	karcinom prostaty (prostate cancer)
PD-1	protein programované buněčné smrti 1 (programmed cell death 1)
PD-L1/2	ligand programované buněčné smrti 1/2 (programmed cell death ligand 1/2)
Poly (I:C)	polyinozinová:polycytidylová kyselina (polyinosinic:polycytidylic acid)
PPV	personalizovaná peptidová vakcinace (personalized peptide vaccine)
PSA	prostatický specifický antigen (prostate specific antigen)
PSCA	antigen kmenových buněk prostaty (prostate stem cell antigen)
PSMA	prostatický specifický membránový antigen
RAS	protoonkogen
REP	rapid expansion protocol
R848	resiquimod
TAA	nádorově asociovaný antigen (tumor-associated antigen)
TAM	makrofágy asociované s nádory (tumor-associated macrophages)
TARP	TCR γ alternate reading frame protein
TCR	receptor lymfocytu T (T cell receptor)
TGF	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
TIGIT	imunitní checkpoint (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains)
TIL	lymfocyty infiltruující nádory (tumor-infiltrating lymphocytes)
Tim-3	imunitní checkpoint (T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3)
TME	nádorové mikroprostředí (tumor microenvironment)
TNF	faktor nekrotizující nádory (tumor necrosis factor)
TNM	klasifikace nádorů (tumor, nodes, metastases)
TRAILR	receptor apoptózu indukujícího ligandu podobného TNF (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor)
TSF	faktory sekretované nádory (tumor secreted factors)
TSE	exozomy sekretované nádory (tumor-secreted exosomes)
ÚZIS ČR	Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor (vascular endothelial growth factor)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation)

Obsah

1. Úvod	10
2. Nádorová onemocnění	11
2.1. Karcinom prostaty	12
2.1.1. Epidemiologie	12
2.1.2. Etiologie	12
2.1.3. Histologie	13
2.1.4. Stanovení diagnózy – vyšetřovací metody	13
2.1.5. Terapie	14
3. Imunoterapie nádorových onemocnění se zaměřením na karcinom prostaty.....	15
3.1. Pasivní imunoterapie	17
3.1.1. Adoptivní buněčný transfer	17
3.1.1.1. Tumor infiltrující lymfocyty	17
3.1.1.2. Geneticky modifikované T buňky.....	20
3.1.2. Monoklonální protilátky proti nádorovým antigenům.....	23
3.1.2.1. Protilátky konjugované s radionuklidy	24
3.1.2.2. Bispecifické protilátky	25
3.1.3. Imunostimulační cytokiny	26
3.2. Aktivní imunoterapie.....	26
3.2.1. Dendritické buňky.....	26
3.2.1.1. Alogenní dendritické buňky	27
3.2.1.2. Autologní dendritické buňky.....	27
3.2.2. Onkolytické viry	28
3.2.3. Virové vektory	29
3.2.4. Peptidické vakcíny	30
3.2.5. Inhibitory imunitních kontrolních bodů.....	30
3.2.5.1. PD-1 a PD-L1 inhibitory	30
3.2.5.2. CTLA-4 inhibitory	31
3.2.5.3. Kombinace PD-1 a CTLA-4 inhibitorů.....	32
3.2.5.4. Kombinace checkpoint inhibitorů s PARP inhibitory.....	32
3.2.6. Androgen deprivace terapie jako imunitní modulace u karcinomu prostaty.....	33
4. Nádorové mikroprostředí a nádorová rezistence	35
4.1. Složení nádorového mikroprostředí	36
4.1.1. Heterogenita nádoru.....	38
5. Cíle práce.....	40
6. Výsledky a diskuze.....	41
6.1. Personalizované <i>ex vivo</i> nabohacení antigen specifických T buněk	41
6.2. Expanze antigen specifických T buněk	44
6.3. Cytokinová a farmakologická modulace reaktivity expandovaných antigen specifických CD8+ T buněk	46
7. Souhrn.....	49
8. Seznam vlastních publikací	50
8.1. Publikace k disertační práci	50
8.2. Publikace s příbuzným tématem.....	50
9. Literatura	51
10. Seznam příložených publikací.....	70

1. Úvod

Imunitní odpověď proti nádorům se opírá o vzájemnou spolupráci adaptivní a vrozené imunity. Základními aspekty protinádorové imunity je imunitní dozor, detekce a destrukce nádorových buněk. Navzdory pečlivému imunitnímu dozoru některé nádorově změněné buňky uniknou imunitnímu systému. Vlivem aktivačních a inhibičních signálů nádorových buněk a nádorového mikroprostředí (TME, z angl. tumor microenvironment) dochází k polarizaci imunitních buněk (Wellenstein and de Visser, 2018). Výsledná rovnováha a infiltrace imunitních buněk do nádoru nebo jejich exkluze z nádoru jsou rozhodujícím prognostickým faktorem (Barnes and Amir, 2017).

2. Nádorová onemocnění

V posledních několika desetiletích došlo k velkému posunu v porozumění patogeneze maligního onemocnění. Je zřejmé, že maligní onemocnění vzniká vícenásobným mutagenním procesem, při kterém nádorové buňky získávají společné vlastnosti, jako jsou neomezený proliferační potenciál, soběstačnost růstových signálů a rezistence vůči antiproliferativním a růstovým podnětům.

Rakovinné buňky dosahují těchto vlastností z velké části reaktivací a modifikací mnoha existujících buněčných programů běžně používaných během vývoje. Tyto programy řídí koordinované procesy, jako jsou proliferace buněk, migrace, polarita, apoptóza a diferenciací během embryogeneze a tkáňové homeostázy. V souladu s darwinovskými principy se maligní onemocnění vyvíjí náhodnými mutacemi a epigenetickými změnami, které mění tyto cesty následované klonální selekcí buněk, které mohou přežít a proliferovat za okolností, které by za normálních okolností byly škodlivé (Luo et al., 2009).

Bylo zjištěno, že nádory nejsou čistě klonální poruchou, i když v některých případech se vyvíjejí z jediné (pre)maligní buňky (Beck and Blanpain, 2013; Dean, 2005; Visvader and Lindeman, 2008). Je známo, že nádory jsou tvořeny transformovanými buňkami a dále heterogenní netrtransformovanou složkou, jako jsou např. stromální, endoteliální a imunitní buňky. Od stromálních buněk nádorové buňky získávají podporu. V nádoru vznikají nové cévy, které zásobují nádorové buňky kyslíkem a živinami. Nádorové buňky se různými mechanismy vyhýbají imunitní detekci, a nakonec metastazují do dalších orgánů (Albini and Sporn, 2007; Hanahan and Weinberg, 2011; Holzel et al., 2013; Mueller and Fusenig, 2004). Tyto fenotypové znaky mohou být vyvolány mutacemi typu: získání funkce (gain-of-function), amplifikací, nadměrná exprese klíčových onkogenů, ztráta funkce (loss-of-function), delece, epigenetické utlumení (silencing) klíčových nádorových supresorů (Hahn and Weinberg, 2002). Bylo zjištěno, že metabolismus nádorových buněk není zcela odlišný od metabolismu normálních buněk (Galluzzi et al., 2013; Green et al., 2014; Wellen and Thompson, 2012). Ukázalo se, že přežívání transformovaných buněk může kriticky záviset na adaptivních reakcích, které jsou samy o sobě nenádorové, zakládající koncept nekonkogenní závislosti (Luo et al., 2009; Solimini et al., 2007).

2.1. Karcinom prostaty

2.1.1. Epidemiologie

Dle zdrojů GLOBOCAN 2018 je karcinom prostaty (PCa, z angl. prostate cancer) celosvětově druhým nejčastějším maligním onemocněním u mužů (po karcinomu plic) s incidencí 1 276 106 nových případů a mortalitou 358 989 případů v roce 2018 (Bray et al., 2018). Incidence PCa a mortalita významně souvisí s věkem, nejvyšší je u starších mužů (>65 let). U afroamerických mužů je incidence vyšší, mají agresivnější typ PCa a jejich úmrtnost na PCa je přibližně dvakrát vyšší ve srovnání s bělochy (Rawla, 2019; Rebbeck et al., 2013).

Dle zdrojů ÚZIS ČR je PCa, dg C61, nejčastější onkologickou diagnózou u mužů (s výjimkou dg. C44). V České republice bylo v roce 2018 nově diagnostikováno 7938 pacientů (151,8/100 000 mužů) s PCa a 1372 pacientů (26,2/100 000 mužů) na tento nádor zemřelo. Z epidemiologických dat je patrné, že jeho incidence se v posledních letech stále zvyšuje, ale mortalita se významně nemění. Strmý nárůst incidence PCa je v ČR pozorován od počátku 90. let. Vyšší výskyt PCa je spojován jednak se stárnutím populace, jednak s nárůstem rutinního preventivního vyšetřování hodnot prostatického specifického antigenu (PSA, z angl. prostate specific antigen) u starších mužů. Díky tomu jsou častěji odhalena i časná stadia karcinomu, klinicky dosud nemá, která by se za jiných okolností ještě nezjistila. Ve vyšším věku je mnoho dalších příčin morbidit, které mohou být potenciální příčinou smrti dříve, než se klinicky manifestuje PCa (Krejci et al., 2021).

2.1.2. Etiologie

Rodinná anamnéza a rasový původ jsou spojeny se zvýšeným výskytem PCa, což naznačuje genetickou predispozici (Hemminki, 2012; Jansson et al., 2012). Pouze malá část případů (okolo 9 %) vzniká jako dědičné onemocnění. Jestliže má onemocnění přímý příbuzný, riziko se minimálně zdvojnásobí. Při onemocnění dvou nebo více přímých příbuzných vzrůstá riziko 5–18x. Hereditární PCa je definovaný jako postižení 3 nebo více příbuzných nebo alespoň 2 příbuzných s časným nástupem onemocnění (před 55. rokem života) (Hemminki, 2012). Nejčastější patogenní mutace, spojována s onemocněním, je BRCA1 a BRCA2 (Liede et al., 2004). Ke snížení rizika vzniku PCa se nedoporučují žádná specifická preventivní nebo dietní opatření. Nicméně jako možný rizikový faktor je

zmiňována vysoká konzumace mléčných výrobků a procesovaného masa, nízká pohybová aktivita, nedostatek vitamínů (zejména vit. D) ve stravě a kouření (Key, 2014; Leitzmann and Rohrmann, 2012; Sinha et al., 2009).

2.1.3. Histologie

Adenokarcinom tvoří naprostou většinu maligních nádorů prostaty. Adenokarcinom prostaty vzniká z epitelálních buněk prostatických acinů (acinární karcinom) nebo vzácněji ve velkých periuretrálních prostatických vývodech (duktální karcinom). Mezi další vzácné typy PCa patří uroteliální karcinom, spinocelulární novotvary, bazocelulární karcinom a neuroendokrinní nádory (Humphrey et al., 2016).

Aby bylo možné hodnotit a porovnávat průběh onemocnění, výsledky léčby a stejně tak i prognózu pacientů, je nutný jednotný klasifikační systém. U adenokarcinomu prostaty se nejčastěji používá Gleasonovo skóre pro určování stupně histologické diferenciaci nádoru, a dále pak mezinárodní klasifikace TNM pro popis klinického stadia nádoru. Gleasonův gradingový systém hodnotí architektonické uspořádání nádorových ložisek. Podle stupně diferenciaci jsou nádory klasifikovány do pěti stupňů od G1 (dobře diferencovaný acinární karcinom) až po G5 (disociovaný karcinom). Vzhledem k tomu, že PCa často obsahuje minimálně dva typy různě diferencovaných okrsků buněk, stupeň nejvíce zastoupeného typu se uvede jako první, druhý nejvíce zastoupený jako druhý. Součet těchto dvou stupňů se označuje jako Gleasonovo skóre. Relativně příznivé skóre je v rozpětí 2–4, střední riziko 5–7 a vysoké riziko 8–10 (Humphrey et al., 2016).

2.1.4. Stanovení diagnózy – vyšetřovací metody

Základní diagnostika PCa se opírá o vyšetření per rectum a stanovení PSA. Při podezření na nádor následuje transrektální ultrasonografie s biopsií prostaty. Při nálezu karcinomu se doplňuje rentgenové vyšetření plic, CT břicha a pánve, a eventuálně scintigrafie skeletu. Vyšetření pánve magnetickou rezonancí se provádí většinou jen před plánovanou radioterapií PCa k detailnímu zhodnocení poměrů v pánvi. Novější metody pak zahrnují pozitronovou emisní tomografii s cholinem, fluoridem sodným nebo s ligandem prostatického specifického membránového antigenu (PSMA) značeným ^{68}Ga .

2.1.5. Terapie

Léčebný přístup závisí na klinickém stádiu onemocnění a zpravidla zahrnuje radikální prostatektomii nebo radiační terapii s následným průběžným sledováním hladiny sérového PSA. Dále se uplatňuje hormonální léčba, chemoterapie a imunoterapie (Litwin and Tan, 2017).

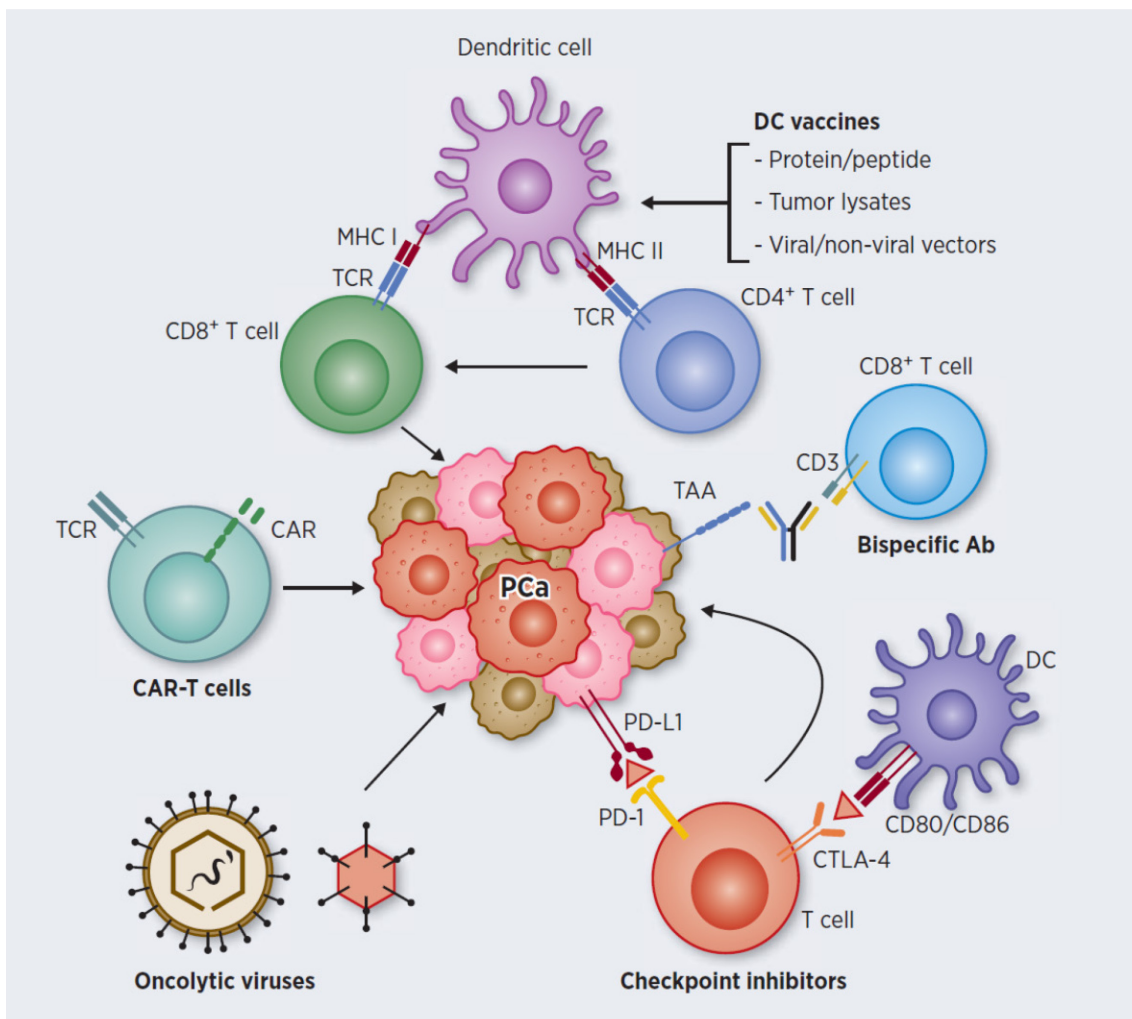
3. Imunoterapie nádorových onemocnění se zaměřením na karcinom prostaty

Využití imunitního systému pro léčbu solidních nádorů mělo v minulosti spíše neuspokojivé výsledky. V posledních desetiletích došlo k velkému nárůstu různých klinických studií týkajících se imunoterapie solidních nádorů. Zatímco chirurgie, radiační léčba a chemoterapie zůstala základem léčby mnoha solidních nádorů v počátečních stádiích, imunoterapie se stává součástí léčby a zvyšuje přežití pacientů. I když má imunoterapie slibné výsledky u mnoha solidních nádorů, u PCa je úspěšnost léčby stále relativně nízká. Personalizovaná imunoterapie zejména v kombinaci s checkpoint inhibitory a současně s konvenčními přístupy (cytotoxické látky, cílení na androgenní receptory) by mohla přinést zajímavé výsledky (Cha et al., 2020).

Z výsledků řady studií vyplývá, že zánět hraje v různých fázích růstu PCa významnou roli. Od počátku zánětu prostaty, který může vést k tumorigenezi a dalšímu vývoji onemocnění, hraje důležitou roli imunosuprese a rezistence (Gurel et al., 2014; Sfanos and De Marzo, 2012; Sfanos et al., 2013; Tewari et al., 2018). Vývoj a progresse PCa je vysoce spojena s chronickým zánětem způsobeným poškozením buněk a genomu prostatitidou (Cai et al., 2019). Chronický zánět v prostatě způsobuje remodelaci extracelulárního matrixu a přeměnu epitelu v mezenchym, který hraje klíčovou roli ve vývoji a progresi onemocnění (Cai et al., 2019). PCa je ve srovnání s jinými malignitami pomalu rostoucí onemocnění. To umožňuje PCa být ideálním kandidátem pro imunoterapii. Na základě analýzy nádorových antigenů jsou u pacientů s PCa zkoušeny různé imunoterapeutické přístupy (Obr. 1).

Nádorovou imunoterapii lze rozdělit na pasivní a aktivní na základě schopnosti aktivovat imunitní systém proti nádorovým buňkám (Lesterhuis et al., 2011). Do kategorie pasivní imunoterapie se řadí zejména T buněčná terapie (adoptivní buněčný transfer) a monoklonální protilátky, které přímo cílí na nádorové antigeny a mají protinádorovou aktivitu (Humphries, 2013; Maus et al., 2014; Strebhardt and Ullrich, 2008; Weiner, 2007). Naopak do aktivní imunoterapie patří hlavně protinádorové vakcíny a checkpoint inhibitory, které vykazují protinádorový účinek jen při zapojení imunitního systému pacienta (Melief and van der Burg, 2008; Palucka and Banchereau, 2013; Pardoll, 2012; Rice et al., 2008).

Další možné rozdělení imunoterapie, které se někdy používá, je na základě antigenní specifity. Do skupiny specifické imunoterapie lze zařadit protinádorové monoklonální protilátky. Jako nespecifické lze považovat imunostimulační cytokiny a checkpoint inhibitory (Dronca and Dong, 2015; Lipson et al., 2013; Pardoll, 2012; Westin et al., 2014; Zitvogel and Kroemer, 2012).



Obr. 1: Hlavní imunoterapeutické přístupy u karcinomu prostaty (Cha et al., 2020)

3.1. Pasivní imunoterapie

3.1.1. Adoptivní buněčný transfer

Adoptivní buněčný transfer (ACT, z angl. adoptive cell transfer) je typ buněčné protinádorové imunoterapie, která obvykle zahrnuje izolaci cirkulujících nebo tumor infiltrujících lymfocytů (TIL, z angl. tumor-infiltrating lymphocytes), poté jejich *ex vivo* úpravu a expanzi a jejich zpětnou aplikaci pacientovi. ACT se často provádí po lymfodepleční chemoterapii a v kombinaci s imunostimulačními cytokiny (Galluzzi et al., 2012; Humphries, 2013; Maus et al., 2014; Restifo et al., 2012; Vacchelli et al., 2013a).

3.1.1.1. Tumor infiltrující lymfocyty

TIL tvoří heterogenní populaci lymfocytů, složenou převážně z T buněk a NK buněk. TIL přirozeně migrují do nádoru a jsou potenciálně přítomny ve všech solidních nádorech. Jednou z prvních prací, která zmiňuje klinický přínos infiltrace lymfocytů, je kazuistika z roku 1972. Ta popisuje, že pacient s karcinomem žaludku bez předchozí léčby vykazoval totální regresi jaterních metastáz (Rosenberg et al., 1972). Vysoká infiltrace lymfocytů pozorovaná při resekované biopsii žaludku naznačila význam těchto TIL pro omezení růstu nádoru. Přítomnost TIL v nádorech byla následně asociována s příznivou prognózou u různých typů maligních onemocnění (Clemente et al., 1996; Galon et al., 2006; Loi et al., 2013; Sato et al., 2005).

TIL schopné rozpoznat nádorové antigeny mohou být izolovány z resekovaných nádorů. Objev T buněčného růstového faktoru interleukinu-2 (IL-2) (Smith, 1980) umožnil vývoj standardní metody pro rozsáhlou expanzi TIL izolovaných z nádorů pacientů *in vitro* (Rosenberg et al., 1988). Metoda expanze extrahovaných TIL byla zavedena Stevenem Rosenbergem a jeho kolegy a vedla k produkci dostatečného množství buněk pro ACT (Dudley et al., 2003). ACT založený na TIL zahrnuje nemyeloablativní lymfodepleci, infuzi velkého množství expandovaných TIL izolovaných z resekovaného nádoru a podání IL-2 po infuzi TIL. V tomto nastavení se ukázal ACT úspěšný zejména u refrakterního metastazujícího melanomu (Dudley et al., 2005).

Příprava TIL se skládá z několika kroků. Nejprve je vzorek resekovaného nádoru rozdělen na více fragmentů, které jsou jednotlivě kultivovány nebo enzymaticky dispergovány do jednobuněčné suspenze. Lymfocyty jsou expandovány v mediu s vysokou koncentrací IL-2

po dobu 2 až 4 týdnů. Ty většinou přerostou a vymytí nádorové buňky, což vede k čistým TIL kulturám. Pokud jsou k dispozici autologní nádorové buňky, mohou být jednotlivé TIL kultury selektovány na základě produkce $IFN\gamma$ a cytotoxicity (Dudley et al., 2003). Vybrané TIL kultury jsou další dva týdny expandovány (REP, z angl. rapid expansion protocol) v přítomnosti nadbytku ozářených alogenních buněk (feeder cells), anti-CD3 protilátky a vysoké koncentrace IL-2 (Andersen et al., 2018).

Potíže s přípravou autologní nádorové kultury a rozdílná diverzita cílových nádorů však přiměly mnoho institucí využívat všechny izolované TIL k další masivní expanzi a infuzi (Besser et al., 2009; Donia et al., 2012; Tran et al., 2008). Hlavní výhodou tohoto postupu je kratší kultivační doba a cenově efektivnější a méně náročnější příprava.

Před buněčnou infuzí jsou pacienti podrobeni přípravnému režimu, který běžně zahrnuje podávání cyklofosfamidu a fludarabinu, což způsobí u pacientů přechodnou lymfodepleci (Klebanoff et al., 2005). Bylo prokázáno, že lymfodeplece zvyšuje perzistenci podávaných TIL a zároveň výskyt a trvání klinických odpovědí po léčbě TIL (Dudley et al., 2002).

Účinnost této personalizované imunoterapie byla potvrzena několika nezávislými studiemi uvádějícími objektivní míru odpovědi u 40 až 50 % pacientů s metastazujícím melanomem, včetně kompletní regrese nádoru u 10 až 25 % léčených pacientů (Andersen et al., 2016; Besser et al., 2013; Dudley et al., 2013; Dudley et al., 2005; Goff et al., 2016; Itzhaki et al., 2011; Pilon-Thomas et al., 2012; Radvanyi et al., 2012). Efektivita adoptivní terapie TIL je patrná, pokud uvážíme, že před zavedením TIL terapie bylo pětileté přežití pacientů s metastazujícím melanomem jen 10 % (Garbe, 1993).

Terapie s TIL se používá především u metastazujícího melanomu v pozdním stadiu jako záchranná léčba po selhání standardní terapie u pacientů s vícečetnými metastázami. Kolektivní zkušenost různých nezávislých studií je taková, že podstatná část pozorovaných odpovědí je trvalá, zejména u pacientů, kteří dosáhli kompletní regrese nádoru, a že naprostá většina těchto pacientů zůstává mnoho let po léčbě bez onemocnění (Andersen et al., 2016; Besser et al., 2013; Itzhaki et al., 2011; Pilon-Thomas et al., 2012; Radvanyi et al., 2012; Rosenberg et al., 2011). Tato zjištění jasně prokazují klinickou účinnost a léčebný potenciál ACT založené na TIL.

Dřívější studie ukázaly, že předchozí podávání IL-2 a/nebo anti-CTLA-4 protilátek neovlivňuje odpověď na adoptivní TIL terapii (Besser et al., 2013; Goff et al., 2016).

Nedávno se ukázalo, že pacienti s progresí po anti-PD-1 imunoterapii mohou stále reagovat na infuzi TIL. Nádorově reaktivní T buňky těchto pacientů navíc silně infiltrují TME (Andersen et al., 2018). Tato zjištění naznačují, že mechanismy vedoucí k rezistenci na terapii checkpoint inhibitory se nepřekrývají s rezistencí na terapii založené na TIL.

Zatímco mortalita spojená s TIL terapií je podstatně nižší než u konvenční léčby pro relabující nebo refrakterní nádory, u TIL terapie byla pozorována významná toxicita. Tyto nežádoucí účinky byly zařazeny do 3. a 4. stupně toxicity (Common Terminology Criteria for Adverse Events) a primárně souvisejí s přípravným režimem, zejména s podáváním vysokých dávek IL-2 po transferu buněk (Besser et al., 2013; Pilon-Thomas et al., 2012; Rosenberg et al., 2011).

Z tohoto důvodu bylo testováno použití atenuovaného IL-2 režimu. Objektivní odpověď vykázalo 10 z 24 (42 %) pacientů, 3 (12 %) pacienti měli trvalou odpověď, což je srovnatelné s dřívějšími výsledky (Andersen et al., 2016). Ačkoli byly pozorovány toxické účinky spojené s IL-2, byly obecně zvládnutelné bez nutnosti podpory intenzivní péče. Vzhledem k vysokým nákladům a toxicitě je důležité zjistit prediktivní kritéria, aby bylo možné indikovat TIL terapii pouze těm pacientům, u nichž je přiměřená šance na dosažení klinického přínosu. Doposud byly publikovány různorodé výsledky týkající se použití nádorové mutační nálože a nálože nádorových neoepitopů jako prediktivních kritérií (Lauss et al., 2017).

V posledních letech několik studií ukázalo úspěšnost expanze TIL z dalších typů nádorů např. karcinomu plic, prsu, pankreatu, ledvin a močového měchýře (Andersen et al., 2018; Baldan et al., 2015; Ben-Avi et al., 2018; Hall et al., 2016; Lee et al., 2017; Poch et al., 2018; Turcotte et al., 2013). Izolace TIL byla popsána i u dalších solidních nádorů nebo jejich metastáz, a to u karcinomu vaječníků, děložního čípku, trávicí soustavy a sarkomu (Hilders et al., 1994; Nielsen et al., 2020; Turcotte et al., 2013; Webb et al., 2014; Yannelli et al., 1996).

PCa představuje nádor s relativně nízkou mutační náloží (Berger et al., 2011; Chalmers et al., 2017). Několik studií však ukázalo, že i nádory s nižší mutační náloží mohou být cíleny specifickými T buňkami proti neoantigenům pocházejících z mutace (Yarchoan et al., 2017). PCa je považován za tzv. „cold“ nádor, s jen malou infiltrací T buněk (Abrahams et al., 2002; De Velasco and Uemura, 2018; Goswami et al., 2016; Yungler et al., 2019). Navíc TME prostaty bylo popsáno jako imunosupresivní, infiltrované supresorovými

buňkami, jako jsou regulační T buňky a myeloidní supresorové buňky (Bryant et al., 2017; Strasner and Karin, 2015). Také stromální buňky pravděpodobně přispívají k dysfunkci T buněk (Feig et al., 2013).

Některé práce uvádí přítomnost TIL v prostatě (Ebelt et al., 2009; Flammiger et al., 2012; Ness et al., 2014; Solinas et al., 2017; Strasner and Karin, 2015), které byly nefunkční a neschopné stimulace (Ebelt et al., 2008; Ebelt et al., 2009; Hammerstrom et al., 2011). Nedávná publikace však ukázala, že izolované prostatické TIL lze expandovat a reaktivovat. Tyto TIL byly funkční a nádorově specifické (Yunger et al., 2019). Další studie potvrdila, že vysoká hustota CD8⁺ TIL v nádoru je asociována s lepším přežíváním u pacientů s lokalizovaným vysoce rizikovým PCa po radikální prostatektomii (Yang et al., 2021).

3.1.1.2. Geneticky modifikované T buňky

Druhý přístup přípravy nádorově specifických T buněk se opírá o genetickou modifikaci T buněk za účelem zlepšení nádorově specifické imunitní odpovědi. Toho je dosaženo transferem genetického materiálu kódujícího buď TCR nebo chimerický antigenní receptor (CAR, z angl. chimeric antigen receptor) cílící nádorové specifické antigeny. Vznikají kombinací antigen-vazebných částí molekuly protilátky s intracelulárními signálními doménami různých imunoreceptorů a kostimulačních molekul. CAR jsou navrženy tak, aby byly vysoce specifické a vysoce reaktivní. Zdrojové T buňky se získávají z periferní krve, obvykle po leukaferéze, jsou aktivovány, geneticky změněny, expandovány a vráceny zpět pacientovi. Pacient je často předem podroben přípravnému režimu podobnému režimu ACT založeného na TIL.

Metody běžně používané ke genetické modifikaci T buněk zahrnují použití transienční mRNA transfekce (Zhao et al., 2006), retrovirových vektorů (Clay et al., 1999), lentivirových vektorů (Tsuji et al., 2005), transpozonů (Peng et al., 2009) nebo homologní rekombinace po genové editaci (Eyquem et al., 2017).

TCR jsou přirozeně se vyskytující povrchové receptory na T buňkách, které rozpoznávají peptidové antigeny prezentované na povrchu buněk prostřednictvím hlavního histokompatibilního komplexu neboli HLA (z angl. human leukocyte antigen). Genetická modifikace TCR mění specifitu T buněk expresí nového páru TCR alfa a beta řetězců, který je specifický pro nádorový antigen. Za tímto účelem byly identifikovány TCR T

buněk, které dokáží rozpoznat exprimované nádorové antigeny, a tedy specificky napadnout nádorovou tkáň. Protože se však TCR váží na peptidové/HLA komplexy na buněčném povrchu nádorových buněk, mohou být nádorově specifické TCR použity pouze u populace pacientů, která má tuto specifickou HLA alelu.

Po izolaci a sekvenování nádorově specifického TCR může být TCR naklonován do retrovirových nebo lentivirových vektorů. T buňky z periferní krve pacientů jsou *ex vivo* transdukovány těmito vektory a pak následně expandovány a aplikovány infuzí pacientům.

Přírozeně se vyskytující nádorově specifické T buňky mají obecně nižší afinitu z důvodu vlivu centrální tolerance na T buněčný repertoár. Pokusy o překonání tohoto problému zahrnovaly genetickou modifikaci TCR (Robbins et al., 2008), generování myších TCR imunizací transgenních myší (Stanislawski et al., 2001) a izolaci TCR v *in vitro* alogenním nastavení indukci T buněk reagujících na cizí komplex HLA-peptid (de Witte et al., 2006), čímž se obešlo repertoárové omezení selekcí thymu.

V první studii s geneticky modifikovaným TCR byly T buňky pacientů s metastazujícím melanomem transdukovány TCR cíleným proti HLA-A*0201/MART-1 peptidu, který byl klonován z čisté TIL kultury izolované z resektovaného melanomu pacienta s HLA-*0201, který reagoval na léčbu TIL (Morgan et al., 2006). Trvalá odpověď byla pozorována u menší části pacientů bez významné toxicity a TCR modifikované T buňky přetrvávaly v krvi pacientů více než rok. Jiné studie následně prokázaly významnou regresí nádoru u pacientů, kterým byly aplikovány T buňky s geneticky modifikovanými TCR proti gp100 (u melanomu) (Johnson et al., 2009), NY-ESO-1 (u melanomu, synoviální sarkomu, mnohočetného myelomu) (Rapoport et al., 2015; Robbins et al., 2011), MAGE-A3 (u myelomu a melanomu) (Linette et al., 2013), MAGE-A4 (u karcinomu jícnu) (Kageyama et al., 2015) a CEA (u kolorektálního karcinomu) (Parkhurst et al., 2011). T buňky s geneticky modifikovaným TCR proti prostatickému antigenu TARP (z angl. TCR γ alternate reading frame protein) specificky zabíjely HLA-A2⁺ prostatické a prsní nádorové buňky (Hillerdal et al., 2012).

Zatímco TIL imunoterapie je obecně bezpečnější, u aplikace geneticky modifikovaných T buněk existují tato potenciální bezpečnostní rizika: „on-target off-tumor toxicita“ - T buňky rozpoznají kromě nádorové tkáně i normální tkáň díky expresi stejných antigenů (např. gp100 a MART-1 jsou exprimovány jak buňkami melanomu, tak normálními melanocyty), „off-target reaktivita“ - T buňky zkříženě reagují proti jinými peptidům, než

jsou cílové a „cytokine release syndrom“ - T buňky vyvolávají náhlý a dramatický nárůst zánětlivých cytokinů (Casucci et al., 2015; Rapoport et al., 2015).

CAR T buněčná terapie kombinuje výhody protilátkového rozpoznávání antigenu s cytotoxickými vlastnostmi a aktivačním potenciálem T buněk. Konstrukce CAR se opírá o identifikaci vhodné protilátky cílící na povrchovou molekulu nádorové buňky, která je předmětem zájmu. CAR rozpoznávání není závislé na zpracování nebo prezentaci peptidů molekulami HLA. Proto všechny povrchově exprimované cílové molekuly představují potenciální CAR epitop.

První generace CAR se skládá z antigen vazebné oblasti (jednořetězcový variabilní fragment protilátky (scFv)), založené na protilátce požadované specifity, fúzované s T buněčnými signálními doménami asociovanými s nativní TCR signální transdukcí. Tyto první CAR poskytují pouze aktivační signál 1 T buňkám a bylo prokázáno, že při opakované stimulaci antigeny vedou k CAR T buněčné anergii (Kershaw et al., 2006). Druhá generace CAR obsahuje další kostimulační doménu CD28 nebo 4-1BB, která po rozpoznání cílového antigenu poskytuje druhý aktivační signál. CAR T buňky nesoucí tyto CD28 nebo 4-1BB signální skupiny prokázaly v klinických studiích silnou protinádorovou aktivitu. Výsledky klinických odpovědí významně převyšují předchozí generaci (Brudno et al., 2018; Davila et al., 2014; Maude et al., 2018). Třetí generace CAR, která má začleněnou další kostimulační doménu, je nyní ve vývoji a očekává se od ní potenciace aktivity T buněk.

Největší úspěch léčby CAR T buňkami byl zaznamenán u hematologických malignit. Klinické studie prokázaly robustní účinnost a často trvalé odpovědi vyvolané CAR T buňkami cílícími na molekulu CD19, antigenu exprimovaného na povrchu normálních i maligních B buněk. CD19-specifické CAR T buňky byly úspěšně použity k léčbě pacientů s malignitami B buněk refrakterních k chemoterapii (Kalos et al., 2011; Porter et al., 2015; Turtle et al., 2017). Nejpůsobivější výsledky byly pozorovány u akutní lymfoblastické leukemie, kde byl výskyt kompletní odpovědi 70-90 % (Davila et al., 2014; Maude et al., 2018; Park et al., 2018).

CAR T buněčná terapie u solidních nádorů nepřinesla zatím výraznější úspěch. Mezi potenciální překážky patří především neefektivní infiltrace T buněk do nádoru, fyzická bariéra bránící infiltraci nádoru T buňkami, obtížnost selekce antigenu v důsledku vysoké heterogenity solidních nádorů, vysoké riziko toxicity v důsledku zvýšené exprese cílového

antigenu ve zdravých tkáních a silné imunosupresivní faktory, které způsobují nefunkčnost T buněk v TME (Srivastava and Riddell, 2018). Probíhající studie se pokoušejí překonat tyto překážky pomocí modifikovaných metod genetického transferu a léčebných protokolů, testují nový design CAR využívající další receptory a ligandy. Byly testovány nové cíle, jako je CEA pro kolorektální karcinomy, disialogangliosid GD2 pro neuroblastom a sarkom, PSMA u PCa a melanomu, EGFRvIII a IL13R α 2 pro glioblastom (Srivastava and Riddell, 2018). Nedávné studie (NCT02414269, NCT03159819) ukázaly slibné výsledky u léčby solidních nádorů, které cílily na buněčné povrchové antigeny mesothelin u maligního onemocnění pohrudnice (Adusumilli et al., 2014) a claudin u pacientů s pokročilým adenokarcinomem žaludku a pankreatu (Jiang et al., 2019).

Pro CAR T buněčnou terapii PCa byly zatím otestovány T buňky proti PSMA a CD28 jako kostimulátoru. Strategie cílící PSMA a CD28 oproti samotnému CD28 ukázala lepší protinádorové účinky *in vivo* (Ma et al., 2014). U myšího PCa modelu byla nedávno testována CAR T buněčná imunoterapie cílená na populaci nádorových kmenových buněk exprimující molekulu EpCaM. Výsledky naznačují slibnou účinnost (Codd et al., 2018). V současné době probíhají studie (NCT02744298, NCT03873805) testující CAR T buňky namířené proti antigenu kmenových buněk prostaty (PSCA, z angl. prostate stem cell antigen) u metastazujícího PCa.

3.1.2. Monoklonální protilátky proti nádorovým antigenům

Monoklonální protilátky (mAbs, z angl. monoclonal antibodies) cílící nádory jsou poměrně rozšířenou skupinou protinádorové imunoterapie (Vacchelli et al., 2013b). Ačkoli jsou mAbs zařazeny do pasivní imunoterapie, některé varianty mAbs aktivují imunitní systém a měly by být zahrnuty do aktivní imunoterapie. Tyto mAbs mají různé funkce. Specificky mění signální funkce receptorů exprimovaných na povrchu maligních buněk (Kaplan-Lefko et al., 2010; Ming Lim et al., 2013; Weiner et al., 2008). Neutralizují signály produkované maligními nebo stromálními buňkami nádoru (Ferrara et al., 2004; Michielsen et al., 2012). Selektivně rozpoznávají nádorové buňky na základě exprese nádorově asociovaných antigenů (TAA, z angl. tumor-associated antigens) (Cavallo et al., 2007; Coulie et al., 2014).

Monoklonální protilátky existují nejméně v pěti funkčně odlišných variantách. První typ jsou samotné mAb, které inhibují signální dráhy potřebné pro přežití nebo progresi

nádorových buněk. Příkladem je mAb cetuximab specifický pro receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR), který je schválen FDA pro léčbu karcinomu hlavy, krku a kolorektálního karcinomu (de La Motte Rouge et al., 2007; Ming Lim et al., 2013; Weiner et al., 2008). Druhý typ jsou mAbs, které aktivují receptory smrti exprimované na povrchu maligních buněk, jako je tigatuzumab (CS-1008) specifický pro superrodinu receptoru nádorového nekrotizujícího faktoru (DR5) (Forero-Torres et al., 2013; Kaplan-Lefko et al., 2010). Třetí typ jsou imunitní konjugáty, tj. TAA-specifické mAb spojené s toxiny nebo radionuklidy, jako je gemtuzumab ozogamicin, konjugát anti-CD33 s kalicheamicinem, který je schválen pro použití u pacientů s akutní myeloidní leukémií (Hughes, 2010; Leal et al., 2014). Čtvrtý typ mAb je TAA-specifický, který opsonizuje nádorové buňky, a tím aktivuje na protilátkách závislou buněčně zprostředkovanou cytotoxicitu (ADCC, z angl. antibody dependent cellular cytotoxicity) (Houot et al., 2012; Hubert and Amigorena, 2012; Kute et al., 2012; Weiner et al., 2010), na protilátkách závislou fagocytózu (Winiarska et al., 2011) a na komplementu závislou cytotoxicitu (Zipfel and Skerka, 2009). Do této skupiny patří anti-CD20 mAb rituximab, který je v současné době schválen k léčbě chronické lymfocytární leukémie a nehodgkinského lymfomu (Jones, 2013; Scott, 1998). Pátý typ, bispecifické protilátky (BiTE, z angl. bispecific T cell engager) jsou chimérické proteiny skládající se ze dvou jednořetězcových variabilních fragmentů z odlišných mAbs, z nichž jeden je specifický pro TAA a druhý pro povrchový antigen T buněk. Jedná se např. o blinatumomab (CD19/CD3 BiTE) který byl schválen pro léčbu akutní lymfoblastické leukemie s negativním filadelfským chromozomem (Hoffman and Gore, 2014; Topp et al., 2012; Walter, 2014). U BiTE EGFRvIII/CD3 protilátky byly pozorovány protinádorové účinky u invazivních typů nádoru mozku (Choi et al., 2013).

3.1.2.1. Protilátky konjugované s radionuklidy

Monoklonální protilátky konjugované s radionuklidy u PCa cílí především na antigen PSMA, který je vysoce exprimován na prostatických nádorových buňkách. Tato strategie má výhodu lokálního doručení radioaktivní látky, díky vysoké specifitě a internalizaci do prostatických nádorových buněk. Ve fázi II klinické studie byla testována anti-PSMA protilátka konjugovaná s lutetiem-177 (177Lu-J591). Pokles PSA byl prokázán u 60 % pacientů s metastatickým kastrát rezistentním PCa (mCRPC, z angl. metastatic castrate resistant PCa), kteří dostali jednorázovou dávku (Tagawa et al., 2013). Nedávná klinická studie s 177Lu-J591 ukázala slibnou terapeutickou účinnost u pacientů s mCRPC v kombinaci s vyšší kumulativní radioterapií (Tagawa et al., 2019). Poslední výsledky

aktuální studie s alternativním ligandem PSMA-617 konjugovaným s lutetiem udávají minimálně 50 % pokles PSA u pacientů s mCRPC (Vapiwala et al., 2019). Kromě terapeutického účelu jsou monoklonální anti-PSMA protilátky konjugované s radionuklidy využívány k diagnostickým účelům pro zobrazování a identifikaci metastáz u mCRPC (Cimadamore et al., 2018; Grubmuller et al., 2020; Vlachostergios et al., 2021).

Jako další vhodný terapeutický cíl se jeví PSCA, který je exprimován jak v nádoru prostaty, tak v jeho metastázách (Kessler et al., 2017).

3.1.2.2. Bispecifické protilátky

Bispecifické protilátky (BiTE), cílící na nádorové antigeny exprimované na PCa buňkách a zároveň na molekulu CD3 na T buňkách, se nedávno objevily jako slibný nový přístup v léčbě hormonálně refrakterního PCa. V tomto kontextu byly testovány různé kombinace bispecifických protilátek. Bispecifická Fab protilátka anti-PSMA a anti-CD3 prokázala vynikající účinnost a aktivitu *in vitro* a *in vivo* u xenograftových modelů (Hernandez-Hoyos et al., 2016; Kim et al., 2013; Patterson et al., 2017). Translace tohoto přístupu využitím bispecifických protilátek cílících CD3 a Her2 na nádorových buňkách v klinické studii fáze I prokázala povzbudivé výsledky s částečnou odpovědí i významným poklesem PSA a skóre bolesti u několika pacientů. Další analýzy prokázaly zvýšenou koncentraci IFN γ a Th1 cytokinů v séru responderů (Vaishampayan et al., 2015).

Tento přístup byl nedávno testován na vzorcích prostatické nádorové tkáně s použitím onkolytického adenoviru kombinujícího virolýzu nádorových buněk a účinek bispecifické protilátky cílící na CD3 molekulu na T buňkách a molekulu FAP na nádorově asociovaných fibroblastech. Tento přístup ukázal na možnost cílení na prostatické nádorové buňky a zároveň na nádorově asociované fibroblasty v rámci jednoho terapeutického přípravku (Freedman et al., 2018). Klinická studie fáze I (NCT01723475) testovala bispecifickou protilátku pasotuxizumab (cílící na PSMA a CD3) u mCRPC pacientů. V rámci studie byly aplikovány různé dávky přípravku. Byla prokázána bezpečnost přípravku. U dvou pacientů byla zjištěna dlouhodobá protinádorová odpověď, která byla závislá na dávce přípravku (Hummel et al., 2021).

3.1.3. Imunostimulační cytokiny

Cytokiny jsou rozpustné proteiny, které zprostředkovávají komunikaci mezi buňkami. Na základě objevu protinádorové aktivity několika prozánětlivých cytokinů na zvířecích modelech vedl klinický výzkum ke schválení rekombinantních cytokinů IFN α a IL-2 pro léčbu několika malignit, i když účinnost byla pouze malá (Dillman, 1994; Kirkwood, 2002).

Dále proběhly klinické studie s TNF α , IL-12, IL-15 a IL-21 a GM-CSF. Cytokiny však v monoterapii nesplnily dřívější očekávání, vzhledem k jejich nedostatečné koncentraci v nádoru, vysoké toxicitě a indukcii inhibičních molekul. Cytokiny jsou testovány v kombinaci s checkpoint inhibitory a monoklonálními protilátkami, aby zvýšily ADCC těchto protilátek, a ve formě fúzních proteinů (protilátka-cytokin) (van Horssen et al., 2006; Waldmann, 2018).

3.2. Aktivní imunoterapie

Aktivní imunoterapie stimuluje vlastní imunitní odpověď pacienta. Dochází k aktivaci imunitních buněk, především NK buněk a cytotoxických T buněk nebo produkci protilátek. Cílem tohoto přístupu je vyvolat adaptivní imunitní odpověď, zejména tvorbu dlouhodobých paměťových T buněk, které specificky cílí na nádorové antigeny.

3.2.1. Dendritické buňky

Dendritické buňky (DC, z angl. dendritic cells) jsou považovány za nejúčinnější antigen prezentující buňky (APC, z angl. antigen-presenting cells), takzvané profesionální APC, a spojovací článek mezi přirozenou a adaptivní imunitou. Předpokládá se, že DC vakcíny mají schopnost indukovat *in vivo* expanzi nádorově specifických T buněk (Carreno et al., 2015; Okada et al., 2011; Sheikh et al., 2013). DC jsou většinou připravovány z periferních monocytů nebo CD34⁺ buněk kultivací *in vitro* (Balan et al., 2014; Jeras et al., 2005; Nair et al., 2012). Nezralé DC jsou pak kultivovány společně s nádorovými antigeny (peptidy, mRNA, apoptotickými nádorovými buňkami, lyzáty) a maturovány. První klinická studie nádorové DC vakcíny byla provedena u B buněčného lymfomu a publikována v roce 1996 (Hsu et al., 1996). V posledních desetiletích bylo vývoji nádorových vakcín na bázi DC věnováno značné úsilí (Banchereau and Palucka, 2005; Palucka and Banchereau, 2013). Většina klinických studií však skončila zklamáním, zřejmě z důvodu zařazení pacientů ve

velmi pokročilých stádiích onemocnění s nádorem indukovanou imunosupresí a poškozeným imunitním systémem (Sprooten et al., 2019).

3.2.1.1. Alogenní dendritické buňky

Pro nádorovou terapii se využívají zejména autologní DC, v menší míře alogenní DC. Alogenní DC, i když nemají schopnost prezentovat antigeny, mohou díky rozdílným MHC působit jako silné adjuvans. Mohou nabohatit TME o Th1 zánětlivé cytokiny, sensitizovat nezralé autologní DC a následně aktivovat NK buňky a nádorově specifické CD8⁺ T buňky (Jin et al., 2014; Wallgren et al., 2005). Studie s alogenními DC (Intuvax) byla provedena na pacientech s metastatickým karcinomem ledvin. DC byly maturovány v přítomnosti R-848, Poly (I:C) a IFN γ . Pacientům byl přípravek aplikován intratumorální injekcí. Výsledky studie ukázaly, že injekce přípravku Intuvax je bezpečná a indukuje systémovou protinádorovou imunitní odpověď, která může prodloužit přežití u pacientů. Výhodou je použití předem zamrazených alogenních DC (Laurell et al., 2017).

3.2.1.2. Autologní dendritické buňky

Sipuleucel-T (Provenge) je aktivní buněčná terapie, která se používá pro léčbu asymptomatického nebo minimálně symptomatického mCRPC. Je to první protinádorová vakcína, která byla schválena FDA pro klinické použití. Je navržena tak, aby indukovala T buněčnou odpověď proti prostatické kyselé fosfatáze (PAP, z angl. prostatic acid phosphatase). Příprava zahrnuje nabohacení APC z leukaferézy a *ex vivo* aktivaci buněk pomocí rekombinantního fúzního proteinu PA2024 (obsahující PAP a GM-CSF) (Anassi and Ndefo, 2011; Plosker, 2011). Fáze III klinické studie (NCT00065442) u mCRPC ukázala, že Sipuleucel-T prodloužil celkové přežití (OS, z angl. overall survival) o 4,1 měsíců a snížil relativní riziko úmrtí o 22 % (Kantoff et al., 2010a). Tato studie ukázala, že vyšší benefit z léčby měli pacienti v časných stádiích onemocnění (Schellhammer et al., 2013; Silvestri et al., 2016). Ačkoli byly zahájeny klinické studie (NCT01420965, NCT01832870) sledující efekt kombinační léčby sipuleucelu-T s pidilizumabem (anti-PD-1) a cyklofosfamidem a v další studii s ipilimumabem (anti-CTLA-4), tyto studie byly z důvodů finanční náročnosti předčasně ukončeny (Scholz et al., 2017).

Buněčná terapie (DCVAC/PCa), vyvinutá na Ústavu imunologie 2. LF a FN v Motole, kombinuje autologní dendritické buňky se zabitou alogenní prostatickou buněčnou linií

LNcaP. DC jsou získávány z periferní krve pacientů pomocí leukaferozy, gradientovou separací PBMC a diferenciací adherentních buněk v přítomnosti IL-4 a GM-CSF. Nezralé DC jsou pulsovány zabitými LNcaP buňkami, maturovány *in vitro* pomocí TLR3 ligandu poly (I:C) a poté opakovaně aplikovány pacientům subkutánně. Otevřená, jednoramenná klinická studie fáze I/II hodnotila DCVAC/PCa v kombinaci se standardní dávkou docetaxelu a prednisonu u 25 mužů s mCRPC (Podrazil et al., 2015). Hlavní sledované parametry studie byly bezpečnost a imunitní odpověď. Výsledky studie ukázaly příznivý bezpečnostní profil bez anafylaktických a autoimunitních reakcí a prodloužení mOS o 6 až 7 měsíců ve srovnání s mOS, které u této populace předpovídají standardní nomogramy. Nejčastějšími nežádoucími účinky byly únava, bolest zad, průjem, zácpa, další gastrointestinální potíže, parestézie a mírné infekce. Všechny nežádoucí účinky související s vakcínou byly stupně 1 až 2. Zlepšení mOS bylo rovněž pozorováno u podskupin pacientů s nepříznivými prognostickými faktory (tj. zvýšená hladina PSA, alkalické fosfatázy a laktátdehydrogenázy, vyšší Gleasonovo skóre, přítomnost bolesti a rozsáhlejší postižení kostí). Podávání vakcíny bylo asociováno s významným zvýšením frekvence PSA-specifických CD8⁺ T buněk a snížením regulačních T buněk v periferní krvi. Nicméně však žádný z hodnocených imunologických parametrů významně nekoreloval s mOS (Podrazil et al., 2015).

Nedávno ukončená fáze III (VIABLE; NCT02111577), randomizovaná, dvojitě zaslepená, placebem kontrolovaná studie s paralelními skupinami, která hodnotila bezpečnost a účinnost docetaxelu/prednisonu v kombinaci s DCVAC/PCa nebo s placebem u přibližně 1200 pacientů s mCRPC, nesplnila primární end-point, kterým byl rozdíl v OS na celé populaci zařazených pacientů. V určitých podskupinách pacientů byl však zřejmý výrazný statisticky signifikantní benefit podávané imunoterapie (publikace v přípravě).

3.2.2. Onkolytické viry

Imunoterapie pomocí virů je poměrně slibnou metodou léčby nádorových onemocnění. Onkolytické viry selektivně napadají nádorové buňky, destrukují je a navozují imunitní odpověď proti viru i infikované buňce. Onkolytické viry zahrnují širokou škálu RNA a DNA virů, které jsou většinou geneticky modifikovány. Často obsahují imunomodulační transgeny (GM-CSF) a jsou kombinovány s jinými imunoterapiemi (Chiocca and Rabkin, 2014).

Onkolytický virus Talimogene Laherparepvec, známý jako T-vec, je modifikovaný herpes simplex virus se dvěma genetickými delecemi a s přidaným lidským genem pro GM-CSF. T-Vec byl testován ve studii fáze III u pacientů s melanomem, u kterých potlačil růst nádoru a prodloužil celkové přežití (Andtbacka et al., 2015). Jako první onkolytický virus byl schválen pro klinické použití (Pol et al., 2016).

Mezi další úspěšné onkolytické viry patří vaccinia virus JX-594 (pexastimogene devacirepvec) pro hepatocelulární karcinom, GM-CSF-exprimující adenovirus CG0070 u karcinomu močového měchýře a Reolysin (pelareorep), divoká varianta reoviru, u karcinomu hlavy a krku (Fukuhara et al., 2016).

Předklinické a klinické studie ukázaly, že PCa je vhodný cíl pro léčbu onkolytickými viry. Vnímavost PCa k infekci onkolytickým virem vzniká podobně jako u jiných druhů malignit na základě abnormalit v antivirových obranných drahách, včetně těch, které jsou připisovány narušenému tyrosin-proteinkinázovému JAK-signálnímu transduktoru a aktivátoru transkripční signalizace STAT (Danziger et al., 2016). U PCa byla provedena řada klinických studií využívající adenoviry, reoviry, HSV-1, virus vakcinie, virus planých neštovic a virus Sendai (Taguchi et al., 2017). Podobně jako u jiných typů nádorů byly onkolytické viry většinou dobře snášeny. U malého počtu pacientů se vyskytly mírné až středně závažné nežádoucí účinky. Ve většině klinických studií došlo u pacientů k poklesu hladiny PSA a destrukci nádorových buněk, což naznačuje možnou klinickou účinnost onkolytických virů u PCa (Fukuhara et al., 2016; Lee and Gujar, 2018; Taguchi et al., 2017).

3.2.3. Virové vektory

Další typ aktivní imunoterapie, která byla klinicky testována, je založená na použití virových vektorů. Vakcína PROSTVAC využívá rekombinantních virů vakcinie (PROSTVAC-V) a ptačích neštovic (fowlpox, PROSTVAC-F) s potenciální imunostimulační a protinádorovou aktivitou (Gulley et al., 2019). Oba viry kódují modifikované formy lidského PSA a současně tři stimulační molekuly (CD80, ICAM-1, LFA-3).

Navzdory pozitivním výsledkům u pacientů, kteří dostávali PROSTVAC-VF, což vedlo k prodloužení mediánu OS o 8,5 měsíce v klinické studii fáze II (Kantoff et al., 2010b), velká potvrzovací studie fáze III (PROSPECT: NCT01322490), kde bylo zařazeno 1200

asymptomatických pacientů s mCRPC buď do skupiny PROSTVAC-VF s GM-CSF nebo bez GM-CSF, nepotvrdila předchozí výsledky (Gulley et al., 2019). V současnosti probíhá klinická studie (NCT03315871) přípravku PROSTVAC zkoumající, zda kombinovaná terapie PROSTVAC s M7824 (monoklonální protilátka namířená proti PD-L1 a TGF β R II) a CV301 (rekombinantní vakcína Avipoxviru) má protinádorový účinek u PCa pacientů s biochemickým relapsem.

3.2.4. Peptidické vakcíny

Imunogenní peptidy derivované z nádorových antigenů byly testovány jako terapeutické vakcíny. Vzhledem k tomu, že T buňky rozpoznávají své cílové antigeny jako malé peptidové fragmenty prezentované molekulami MHC na povrchu buněk, byly tyto peptidové epitopy testovány jako protinádorové terapeutické vakcíny. Ačkoli byly vyvinuty a klinicky zkoumány různé přístupy, včetně vakcín na bázi peptidů, zdá se, že složitost a rozmanitost charakteristik nádorových buněk a repertoáru hostitelských imunitních buněk omezuje terapeutickou účinnost tohoto způsobu léčby. Vzhledem k rozmanitosti imunitních reakcí proti heterogenním nádorovým buňkám by racionálním přístupem k vývoji účinných protinádorových vakcín mohly být přizpůsobené výběry vakcinačních antigenů vhodné pro jednotlivé pacienty (Bezu et al., 2018).

3.2.5. Inhibitory imunitních kontrolních bodů

Jedním z důležitých mechanismů, kterým se nádorové buňky vyhýbají imunitnímu dohledu, je aktivace signálních drah imunitních kontrolních bodů (checkpointů), které potlačují protinádorovou odpověď tím, že navozují vyčerpání a anergii T buněk (Borghaei et al., 2015; Garon et al., 2015; Gibney et al., 2016; Hodi et al., 2010; Cheng et al., 2018; Larkin et al., 2015; Robert and Mateus, 2011).

Inhibitory imunitních kontrolních bodů, tzv. checkpoint inhibitory, jsou monoklonální protilátky, které zabraňují (blokují) aktivaci inhibičních signálních drah T buněk, a tím aktivují imunitní odpověď proti nádoru (Marin-Acevedo et al., 2018).

3.2.5.1. PD-1 a PD-L1 inhibitory

Jedním z těchto kontrolních bodů je povrchový buněčný receptor PD-1 (programmed cell death 1). Je exprimován zejména na aktivovaných T buňkách, B buňkách, NK buňkách,

aktivovaných monocytech a DC (Keir et al., 2008). Jeho nejdůležitější objasněná funkce je zejména pro T buňky. Přípravky, které blokují PD-1 (anti-PD-1 protilátky), jsou např. nivolumab (Opdivo) a pembrolizumab (Keytruda). Tato léčiva prokázala, že inhibují progresi některých typů solidních nádorů (Eggermont et al., 2018; Gandhi and Garassino, 2018; Marin-Acevedo et al., 2018; Varga et al., 2019). Jako první byly schváleny FDA pro léčbu melanomu, později i pro další typy nádorů.

Dosavadní studie s checkpoint inhibitory u PCa nebyly úspěšné, zkouší se další kombinace. V současné době probíhají u mCRPC dvě klinická testování fáze II (NCT02787005, NCT02312557) pembrolizumabu v kombinaci s enzalutamidem (antiandrogen). Průběžné výsledky těchto studií naznačily, že odpověď na pembrolizumab by mohla být trvalá a odhadované výsledky OS jsou povzbuzující (Antonarakis et al., 2020; Graff et al., 2020).

Receptor PD-1 má dva ligandy, proteiny PD-L1 a PD-L2, které exprimuje mnoho typů nádorových buněk (Yearley et al., 2017). Nejprve byly vyvinuty inhibiční protilátky proti PD-L1. Pro některé typy nádorů již byla anti-PD-L1 terapie schválena. V současné době se testuje u mCRPC. Klinická studie fáze I (NCT01772004) s avelumabem (Bavencio) ukázala prodloužení času zdvojení PSA pouze u 3 ze 17 pacientů (Fakhrejehani et al., 2017). Dále probíhá klinická studie fáze III (NCT03016312) kombinované terapie atezolizumabu (Tecentriq) s enzalutamidem.

Vzhledem k tomu, že buňky mohou exprimovat oba ligandy PD-L1 a PD-L2, zdá se být proto výhodnější imunoterapeutická strategie blokace PD-1 než cílení na samotné PD-1 ligandy (De Sousa Linhares et al., 2019).

3.2.5.2. CTLA-4 inhibitory

Další kontrolní bod je receptor CTLA-4 (z angl. cytotoxic T-lymphocyte antigen 4, CD152), který je exprimován na T buňkách. Jeho ligandy jsou molekuly CD80 a CD86, které jsou exprimované na APC. Po navázání CTLA-4 na ligandy dochází k inhibici T buněčné odpovědi. Receptor CTLA-4 je homologní s receptorem CD28. Oba receptory sdílí stejné ligandy, ale CTLA-4 se váže s vyšší afinitou (Rowshanravan et al., 2018).

Ipilimumab (Yervoy) je monoklonální protilátka, která blokuje molekulu CTLA-4 exprimovanou na povrchu cytotoxických T buněk (Hodi et al., 2010). Klinické použití této monoklonální protilátky bylo schváleno FDA jako protinádorová imunoterapie u melanomu (Hannani et al., 2015).

U metastatického PCa bylo při klinickém testování fáze III s monoterapií ipilimumabem zjištěno jen nepatrné zlepšení celkového přežití pacientů ve srovnání s ramenem placeba (Beer et al., 2017). Další klinické testování fáze III (NCT00861614) s ipilimumabem bylo provedeno na pacientech s mCRPC, u nichž došlo k progresi onemocnění po chemoterapii docetaxelem a podstoupili radioterapii namířenou na kostní metastázy (Kwon et al., 2014). Ačkoli podle prvotních analýz nebyl významný rozdíl v přežívání pacientů mezi skupinou s ipilimumabem a placebem (Kwon et al., 2014), dlouhodobé sledování pacientů ukázalo, že OS bylo po třetím až pátém roce dvakrát až třikrát vyšší u pacientů léčených ipilimumabem (Fizazi et al., 2020).

3.2.5.3. Kombinace PD-1 a CTLA-4 inhibitorů

Kombinační léčba ipilimumabu s nivolumabem byla úspěšná zejména u melanomu a byla již schválena pro klinické použití i u dalších malignit (Rotte, 2019). Probíhající klinická studie fáze II (CheckMate 650, NCT02985957) sleduje využití kombinované léčby ipilimumabu s nivolumabem u pacientů s mCRPC, u kterých se vyvinula rezistence na léčbu cílenou na androgenní receptory (AR) (Gao et al., 2017; Sharma et al., 2020). Nedávno zveřejněné předběžné výsledky uvádí, že kombinace těchto dvou inhibitorů vedla k odpovědi pouze u 25 % pacientů (Sharma et al., 2020). Kromě toho došlo u mnoha pacientů k přerušení léčby z důvodu progresu onemocnění a nežádoucích účinků.

Probíhá řada klinických studií s inhibitory PD-1 v kombinaci s jinými checkpoint inhibitory, imunoaktivátory nebo chemoterapií. Kombinovaná imunoterapie však nese riziko zvýšeného výskytu nežádoucích účinků (Iwai et al., 2017).

3.2.5.4. Kombinace checkpoint inhibitorů s PARP inhibitory

Proteiny PARP (poly (ADP ribóza) polymerázy) hrají významnou roli v opravě jednovláknových zlomů DNA mechanismem nahrazování jednotlivých bází (base excision repair). Inhibice PARP vede ke kumulaci jednovláknových zlomů DNA a následně, v důsledku kolapsu replikační vidlice, i k hromadění dvouvláknových zlomů DNA

(Rouleau et al., 2010). Tyto zlomy jsou opravovány jiným reparačním mechanismem, homologní rekombinací. Hlavními účastníky homologní rekombinace jsou geny BRCA1 a BRCA2 (Venkitaraman, 2014). Homologní rekombinace může být vyřazena v důsledku mutace genu BRCA1 a BRCA2. Muži s DDR (z angl. DNA damage response) genetickými alteracemi s větší pravděpodobností reagují na imunoterapii, protože jejich nádory mají vyšší mutační nálož a více neoantigenů (Mouw et al., 2017). Olaparib je inhibitor PARP, který byl jako první schválen pro léčbu ovariálního karcinomu. Preklinické výsledky ukázaly synergii kombinační terapie anti-CTLA-4 protilátek s PARP inhibitory u BRCA deficientních ovariálních nádorů (Higuchi et al., 2015). Kombinace anti-PD-1 protilátek s PARP inhibitory zvyšovala účinnost terapie i u pacientů bez genetické alterace BRCA genu (Wang et al., 2019).

Kombinace PARP inhibitoru olaparibu s PD-L1 inhibitorem durvalumabem (Imfinzi, Medimmune/AstraZeneca) byla testována u mužů s mCRPC (Karzai et al., 2018). Ze 17 hodnocených mužů odpovídalo 9 na léčbu. Přítomnost DDR genetické alterace byla spojena s vyšší odpovědí na léčbu.

3.2.6. Androgen deprivace jako imunitní modulace u karcinomu prostaty

Androgenní deprivace chirurgickou kastrací nebo antiandrogeny patří mezi základní terapie PCa. Bylo zjištěno, že po zahájení androgen deprivace (ADT) dochází ke krátkodobému zvýšení počtu naivních T buněk a Th-1 buněk a snížení počtu regulačních T buněk (Gamat and McNeel, 2017; Page et al., 2006). U zvířecích modelů byl pozorován zvýšený počet T buněk infiltrujících různé tkáně a polarizaci k Th1 imunitní odpovědi (Kissick et al., 2014). Ačkoli některé studie prokázaly imunostimulační přínos ADT v léčbě PCa, pacienti, kteří podstoupí standardní ADT, nakonec recidivují. To je pravděpodobně způsobeno krátkodobou Th-1 odpovědí, která nakonec nedokáže překonat inhibiční vliv nádoru a vede k polarizaci TIL směrem k imunosupresivním buňkám. Kombinace ADT s imunoterapií pro léčbu PCa se proto zdá být velmi přínosná.

Na druhou stranu se ukázalo, že ADT může působit imunosupresivně a vést ke snížené produkci IFN γ T buňkami a APC *in vivo* (Pu et al., 2016). Studie dále odhalila, že k imunosupresi vyvolané antagonisty AR dochází spíše během počáteční fáze primingu T buněk než v pozdějších fázích stimulace T buněk (Pu et al., 2016). To naznačuje, že při léčbě PCa je klíčové přesné načasování ADT v kombinaci s jinými imunoterapiemi pro

zabránění imunosupresivního účinku antagonistů AR. Následná studie kombinované terapie Prostavacu a nilutamidu (antiandrogenu) potvrdila, že pacienti, kteří dostávali nejdříve Prostavac a pak nilutamid, měli významně vyšší míru přežití v porovnání s pacienty, kteří dostávali tyto přípravky v obráceném pořadí (Madan et al., 2008). Imunoterapie předcházející antiandrogenní terapii může být tedy vhodnějším terapeutickým přístupem.

4. Nádorové mikroprostředí a nádorová rezistence

Nedostatečnou odpověď na imunoterapii solidních nádorů lze vysvětlit irreverzibilní nefunkčností CD8⁺ T buněk, nedostatkem antigenů a/nebo mutací ovlivňující prezentaci antigenu (Choi et al., 2019). CD8⁺ T buňky mohou také být vyloučeny z nádoru nebo v něm mohou být uvězněny v husté fibrotické extracelulární matrix produkované nádorově asociovanými fibroblasty (CAF, z angl. cancer associated fibroblasts). Kromě toho, aby se nádorové buňky vyhnuly adaptivnímu imunitnímu dohledu, mohou snížit expresi MHC až o 90 % a zvýšit expresi checkpoint ligandů, jako jsou PD-L1, PD-L2, TIGIT a TIM-3, a interleukinů (TGFβ), které navozují vyčerpání T buněk (Gajewski et al., 2013). Některé nádorové buňky mohou také snižovat nebo mutovat základní enzymy, jako jsou Janus kinázy (JAK1 a JAK2). Mutace JAK snižuje schopnost CD8⁺ T buněk rozpoznat nádorové buňky a jsou zapojeny do získané rezistence na PD-1/PD-L1 inhibitory (Wang and Wu, 2017).

Rezistence může korelovat se zvýšenou expresí VEGF (z angl. vascular endothelial growth factor), která ovlivňuje funkčnost CD8⁺ T buněk jak přímo, tak nepřímo potlačením maturace DC a přilákáním supresivních buněčných populací (Thommen and Schumacher, 2018).

Nádorová rezistence k terapii je často spojována s „cold“ nádorovým fenotypem (Trujillo et al., 2018). Klasifikace „hot“ a „cold“ nádorů závisí především na stupni infiltrace a lokalizaci infiltrujících CD8⁺ T buněk a na složení TME (Galon and Bruni, 2019). „Hot“ nádory se vyznačují vysokou infiltrací nevyčerpaných T buněk, zejména CD8⁺ T buněk, zatímco „cold“ nádory postrádají infiltraci T buněk nebo nedochází k jejich aktivaci (Galon and Bruni, 2019). V roce 2019 navrhli Galon a Bruni dvě nové kategorie nádorů: alterované imunosuprimované a alterované imunitně vyloučené nádory (Galon and Bruni, 2019). Alterované imunosuprimované nádory jsou charakterizovány řídkou infiltrací CD8⁺ T buněk, které se typicky nacházejí na okraji nádoru, a přítomností imunosupresivních buněk, jako jsou MDSC a regulační T buňky. V alterovaných imunitně vyloučených nádorech CD8⁺ T buňky chybí a v TME často převládá husté stroma a hypoxie znemožňující přežití imunitních buněk (Galon and Bruni, 2019).

Pacienti s „cold“ nádory, imunosuprimovanými a imunitně vyloučenými nádory mají menší prospěch z imunoterapie checkpoint inhibitory a mají horší prognózu než pacienti s „hot“ nádory, které obecně dobře reagují (Galon and Bruni, 2019; Lee and Ruppin, 2019).

Ve studii s různými nádory bylo zjištěno, že infiltrace CD8⁺ T buněk v nádoru je nejlepším prediktivním faktorem u anti-PD-1/PD-L1 terapie (Lee and Ruppin, 2019).

4.1. Složení nádorového mikroprostředí

Kromě infiltrace nádoru různými populacemi CD8⁺ T buněk má prognostický význam složení TME. Nádorem změněné imunitní buňky, stromální buňky, CAF, nádorově asociované makrofágy (TAM, z angl. tumor-associated macrophages), faktory sekretované nádory (TSF, z angl. tumor-secreted factors) a exozomy sekretované nádory (TSE, z angl. tumor-secreted exosomes) přispívají k vyčerpání CD8⁺ T buněk.

TSE jsou extracelulární váčky, které jsou vylučovány buňkami a které slouží k mezibuněčné komunikaci. Jsou tvořeny genetickým materiálem, proteiny a lipidy. TSE fungují jako důležití zprostředkovatelé komunikace mezi nádorovými a imunitními buňkami (Rajagopal and Harikumar, 2018). TSE ovlivňují tvorbu premetastatických nik v sekundárních orgánech, zprostředkovávají přeprogramování transkriptomu cílových buněk, a tím podporují invazivitu a tvorbu metastáz (Patel et al., 2018; Zeng et al., 2018). Bylo zjištěno, že mají schopnost měnit metabolismus DC, T buněk, makrofágů a NK buněk (Othman et al., 2019).

TSF zahrnují TNF, TGFβ a VEGF, které zvyšují expresi klíčových molekul (S100A8/9 (calprotectin), lysyl oxidázy, fibronectinu, metaloproteinázy) a atrahují různé buňky jako regulační buňky, mesenchymální kmenové buňky, makrofágy a neutrofile do TME. Mobilizují imunosupresivní BMDC (z angl. bone marrow derived DC) a konvertují stromální buňky na protumorální. Makrofágy a fibroblasty konvertují na TAM a CAF a ty se spolupodílí na vzniku „cold“ nádoru (Zhang et al., 2019).

TAM stimulují angiogenezi tím, že sekretují VEGF-A a podporují imunitní supresi produkcí TGFβ a IL-10. Podobně CAF mohou stimulovat angiogenezi a produkovat husté nádorové stroma. Přítomnost TAM a CAF v nádoru tedy ukazuje na podmínky nevhodné pro přežívání lymfocytů a je charakteristické pro „cold“ nádory. TAM a CAF se společně podílejí na nádorové progresi a jejich přítomnost je spojena s nižším přežitím (Monteran and Erez, 2019).

TAM a TME mediátory (např. exozomální PD-L1 a VEGF) inhibují extravazaci CD8⁺ T buněk z oběhového systému a stejně tak proliferaci a životaschopnost CD8⁺ T buněk v

nádoru. V modelech kolorektálního karcinomu a mezoteliomu deplece TAM obnovila infiltraci a migraci CD8⁺ buněk v nádoru a zlepšila účinnost anti-PD-1 imunoterapie (Peranzoni et al., 2018).

I když CD8⁺ T buňky proniknou bariérou fibrotického extracelulárního matrixu nádoru, musí zvýšit metabolickou aktivitu a zůstat aktivované. Pokud získají hyporeagující fenotyp, nelze je aktivovat stimulací (Speiser et al., 2016). Dále CD8⁺ T buňky musí aktivně vyhledávat nádorové buňky. Důležitý je přímý kontakt mezi T buňkami a nádorovými buňkami (Joyce and Fearon, 2015). Nedostatečný pohyb CD8⁺ T buněk uvnitř nádoru představuje závažný mechanismus rezistence. Množství a hustota fibrotické tkáně, která je běžná u mnoha karcinomů, je spojena s rezistencí vůči chemoterapii a s nižším přežitím (Kakarla et al., 2012).

CAF významně inhibují proliferaci a diferenciaci CD8⁺ T buněk tím, že inhibují produkci IL-2, který je nezbytný pro funkci CD8⁺ T buněk (Pinchuk et al., 2008). Navíc zvýšená exprese FAS/FASL a PD-1/PDL-2 na T buňkách a CAF způsobuje nefunkčnost a odumírání CD8⁺ T buněk. Tím CAF chrání nádorové buňky a zvyšují jejich životaschopnost (Lakins et al., 2018).

I když nádory s vysokou mutační zátěží a mikrosatelitní nestabilitou podporují infiltraci CD8⁺ T buněk, upregulace WNT/ β -cateninové signalizace koreluje s absencí infiltrace CD8⁺ T buněk (Xue et al., 2019). β -Catenin je rozhodující pro transkripci a proliferaci u mnoha typů lidských malignit. WNT/ β -cateninová signalizační dráha se podílí na regulaci drah NF- κ B a TGF β a snižuje expresi interferonového regulačního faktoru 3, transkripčního faktoru nezbytného pro diferenciaci a zrání imunitních buněk, a je proto nástrojem pro vyloučení CD8⁺ T buněk z TME (Luke et al., 2019).

V multi-omické analýze 1211 pacientů s kolorektálním karcinomem (několik podtypů) a pozitivními prediktivními biomarkery pro imunoterapii, WNT/ β -cateninové signalizační geny byly významně mutovány a upregulovány u všech podtypů kolorektálního karcinomu a přímo spojeny se selháním léčby (Grasso and Giannakis, 2018). Naproti tomu snížená exprese β -cateninu v buněčných liniích kolorektálního karcinomu vedla ke zvýšené produkci antitumorigenních interferonů a citlivosti k léčbě.

V TME většinou převládá nedostatek živin, abnormální vaskulatura, vysoký intersticiální tlak, hypoxie a kyselost. Prostředí je tedy vůči CD8⁺ T buňkám nepřátelské. Během

hypoxie vylučují savčí buňky faktor indukovatelný hypoxií (HIF, z angl. hypoxia inducible factor), který usnadňuje pokračující produkci ATP způsobem nezávislým na kyslíku. HIF také mobilizuje BMDC, stimuluje uvolňování TSF i TSE a zvyšuje produkci chemokinů a VEGF (Meng et al., 2019).

Hypoxie podporuje imunosupresi a indukuje epiteliální/mezenchymální přechod zvýšením exprese transkripčních represorů E kadherinu (Garnier et al., 2013; Rankin and Giaccia, 2016). V nádorových buňkách mají hypoxie a autofagie celou řadu komplikovaných a vzájemně si konkurujících rolí. Hypoxie může zpomalit rychlost odumírání buněk a poskytnout nádorovým buňkám příležitost přežít a udržet růst (Thorburn et al., 2014). U přežívajících buněk by se pak mohla vyvinout genomová nestabilita, což dále zvyšuje tumorigenezi při absenci buněčné smrti (Ichim et al., 2015). Vybíjejí se terapeutické postupy pro ovlivnění autofagie u malignit (Towers and Thorburn, 2016).

Autofagie může stimulovat zkříženou prezentaci nádorových antigenů, což podporuje skutečnost, že zlepšená imunitní odpověď nádoru a inhibice autofagie by mohly potenciálně interferovat s tímto procesem. Inhibice autofagie však může také zvýšit protinádorovou imunitní odpověď. Silná inhibice i silná indukce autofagie může vést ke smrti nádorových buněk (Mulcahy Levy and Thorburn, 2020).

Mnoho intervencí, které se v současné době používají u pacientů s malignitami, mění autofagii a zaměřuje se na to, jak maximalizovat potenciální přínos. Zajímavá je možnost využití autofagických inhibitorů u nádorů způsobených mutací/aktivací RAS, které představují více než 30 % nádorů (Dolgin, 2019).

4.1.1. Heterogenita nádoru

Nádor se skládá ze subpopulací nádorových buněk s odlišným fenotypovým a genotypovým profilem, definovaným jako heterogenita nádoru. Heterogenita nádoru umožňuje subpopulacím buněk prezentovat různé chování a odpovědi na protinádorovou imunoterapii. V nádoru existují různé typy mutovaných proteinů, např. KRAS a TP53 (Castle et al., 2019). Počet mutací u určitých nádorů lze použít jako nástroj k předvídání jejich odpovědi na imunoterapii, anti-PD-1/PD-L1 a anti-CTLA4 monoklonální protilátky (Castle et al., 2019). Nádory s vysokou mutační náloží vykazují vyšší míru odpovědi na checkpoint inhibitory (Castle et al., 2019). Studie na základě TCGA genomového atlasu

nádorů odhalila, že medián počtu mutovaných proteinů u PCa byl 35, zatímco u plicního adenokarcinomu a melanomu 197 a 276 (Castle et al., 2019).

Nedávné studie zjistily existenci velké heterogenity mutací u různých nádorových buněk ze stejného PCa nádoru (Lovf et al., 2019). Navíc existence klonální evoluce geneticky odlišných mutací v multifokálním PCa, a to i u mladších pacientů (Lu et al., 2020), naznačuje význam identifikace molekulárních signatur specifických pro pacienta pro návrh racionálních strategií imunoterapie. Komplexní povaha rakoviny s genomovou heterogenitou a imunosupresivním TME zdůrazňuje potřebu individualizované terapie, která může být přínosem pro klinické výsledky u mCRPC. Pro úspěšné vyléčení PCa je nezbytný kombinatorický přístup s individualizovanou medicínou. Genomika nádorů zaměřená na nově identifikované genové komponenty v TME by měla být součástí léčebného režimu.

5. Cíle práce

Cílem práce bylo vytvořit a optimalizovat metodiky k získání, kultivaci, expanzi a charakterizaci buněk použitelných pro adoptivní T buněčnou imunoterapii u pacientů s PCa.

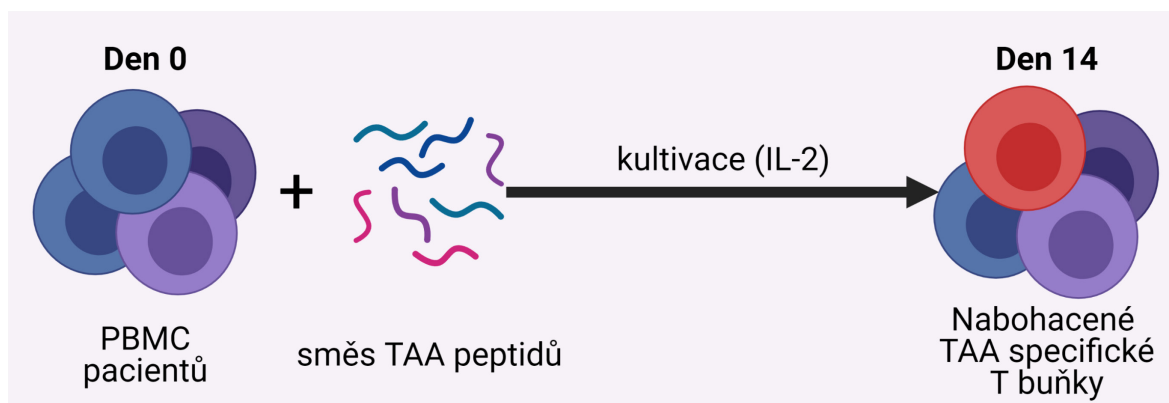
- využití neadherentní frakce PBMC PCa pacientů pro personalizované *in vitro* nabohacení antigen specifických T buněk
- expanze nabohacených antigen specifických T buněk
- cytokinová a farmakologická modulace reaktivity u modelu expandovaných antigen specifických CD8⁺ T buněk

6. Výsledky a diskuze

Výsledky této práce byly publikovány ve třech prvoautorských publikacích.

6.1. Personalizované *ex vivo* nabohacení antigen specifických T buněk

Personalized ex vivo multiple peptide enrichment and detection of T cells reactive to multiple tumor-associated antigens in prostate cancer patients



Obr. 2: Grafické znázornění nabohacení TAA specifických T buněk
(Vytvořeno pomocí BioRender.com)

PCa patří ke zhoubným nádorům, u kterých je T buněčná imunoterapie stále v raném stadiu klinického vývoje. Vzhledem k omezené dostupnosti nádorové tkáně od pacientů s PCa nemohou být TIL rutinně izolovány a *ex vivo* expandovány pro T buněčnou imunoterapii. Využití geneticky modifikovaných CAR T buněk rozeznávající TAA ve formě celého proteinu je rovněž omezeno. Klíčové TAA nejsou buď exprimovány na povrchu nádorových buněk, ale uvolňovány v solubilní formě (PSA, PAP) (Gordon et al., 2008), nebo jsou exprimovány na povrchu nádorových buněk, ale jejich exprese se objevuje i v jiných tkáních (PSMA) (Gordon et al., 2008). Jako slibný imunoterapeutický přístup se u PCa jeví personalizovaná peptidová vakcinace (PPV; z angl. personalized peptide vaccine). PPV spočívá v testování reaktivity T buněk pacienta na více známých PCa TAA. Pacienti jsou následně imunizováni peptidy odvozenými z těch PCa TAA, ke kterým byla u pacientů prokázána reaktivita T buněk (Kimura et al., 2017). Nedávné studie ukázaly, že PPV zlepšila přežití bez progresu u pacientů s PCa i v pozdních stádiích onemocnění (Noguchi et al., 2010). Současné přístupy personalizované T buněčné terapie se rovněž zaměřují na neoantigeny, které mohou vznikat mutací genů nádorových buněk. Jelikož ale PCa patří k nádorům s nízkou mutační náloží a s nižším množstvím

neoantigenů (Schumacher and Schreiber, 2015), jsou pro PPV namísto toho používány směsi peptidů odvozených od imunodominantních epitopů TAA (Noguchi et al., 2015).

V naší práci jsme se zaměřili na možnost využití peptidů odvozených z PCa TAA k *ex vivo* nabohacení lymfocytů PCa pacientů o TAA reaktivní T buňky, které by mohly být využity pro T buněčnou imunoterapii PCa (Obr.2). Za tímto účelem byla použita směs syntetických peptidů o délce 15 aminokyselin, které pokrývaly celou aminokyselinovou sekvenci vybraných TAA, a to s překryvem 11 aminokyselin mezi jednotlivými peptidy. Jako zdroj buněk byla použita neadherentní frakce mononukleárních buněk periferní krve (PBMC) PCa pacientů. Studie zahrnovala PCa pacienty jak v časném, tak i pokročilém stádiu onemocnění. První skupina zahrnovala pacienty s lokalizovaným biochemicky rekurentním PCa (BR, n = 14) a druhou skupinu tvořili pacienti s metastatickým hormon refrakterním PCa (HR, n = 12). Lymfocyty pacientů byly stimulovány směsí peptidů odvozených z 6 PCa TAA: PSA, PAP, NY-ESO-1, MAGE-A3 a MAGE-A4 (Hudolin et al., 2006). Stimulované lymfocyty byly buď přímo analyzovány na přítomnost TAA reaktivních T buněk (den 0) nebo byly kultivovány po dobu 14 dnů, aby došlo k nabohacení buněčné kultury o TAA reaktivní T buňky (den 14). Buněčná kultura byla po 14 dnech následně opět stimulována směsí daných peptidů a reaktivita kultivovaných T buněk vůči těmto peptidům analyzována.

Pro zjištění reaktivity T buněk vůči stimulujícím peptidům byla u stimulovaných T buněk cytometricky stanovována míra povrchové externalizace molekuly CD107a. Přítomnost externalizované molekuly CD107a sloužila jako marker degranulace a cytotoxické aktivity TAA reaktivních T buněk (Betts et al., 2003; Rubio et al., 2003). Reaktivita T buněk PCa pacientů na danou směs peptidů před kultivací (den 0) nebyla detekována. U nabohacené 14denní kultury však již byla detekována reaktivita CD8⁺ T buněk na tyto peptidy u 8 ze 14 pacientů s BR a 5 z 12 pacientů s HR PCa. Peptidy zprostředkované nabohacení o reaktivní T buňky bylo následně potvrzeno experimenty, u kterých 14denní kultivace buněk proběhla bez předchozí stimulace peptidy v den 0. U takto připravených 14denních buněčných kultur již reaktivní CD8⁺ T buňky nebyly, až na jednoho pacienta, detekovány. Výsledky studie ukázaly, že samotné lymfocyty u významné části PCa pacientů je možné *ex vivo* nabohatit pomocí peptidů derivovaných z vícero TAA o TAA reagující T buňky.

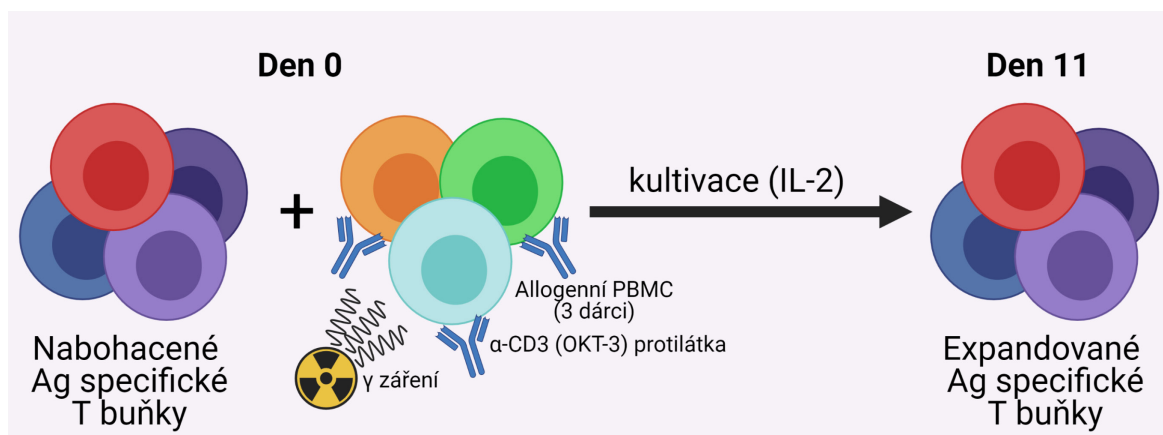
Prvním významným zjištěním studie bylo, že samotné nabohacení je možné provést pouze s lymfocytární (neadherentní) frakcí PBMC, která je zbavena většiny monocytů

(adherentních buněk). Právě u této buněčné frakce se předpokládá, že je bohatým zdrojem antigen prezentujících buněk (Hamilos, 1989). Výsledky naší studie však ukázaly, že u samotných lymfocytů (neadherentní frakce PBMC) muselo rovněž docházet k produktivní antigenní prezentaci, která za daného experimentálního nastavení byla dostačující pro úspěšné nabohacení buněčné kultury o antigen specifické T buňky. Produktivní antigenní prezentace mohla být zprostředkována například zbytkovým množstvím monocytů v buněčné kultuře nebo se na ní mohly podílet i jiné populace lymfocytů, jako jsou například $\gamma\delta$ T buňky, u kterých byla rovněž pozorována schopnost profesionální antigenní prezentace (Band et al., 1991).

Je nutné zmínit, že samotné nabohacení buněčné kultury nebylo spjato s její významnou expanzí. Využití pouze tohoto nabohacujícího postupu pro T buněčnou imunoterapii by proto vyžadovalo velké množství lymfocytů. Tato velká množství lymfocytů, neadherentní frakce PBMC, jsou však již nyní generována během leukaferézy, kterou PCa pacienti musí podstoupit za účelem aktivní buněčné imunoterapie na bázi DC (Fucikova et al., 2018; Podrazil et al., 2015). Tyto lymfocyty doposud nemají terapeutické využití. Studie naznačuje, že by tyto terapeuticky zatím nevyužívané lymfocyty PCa pacientů mohly být užity pro nabohacení o TAA reagující T buňky, a to v takovém množství, které by bylo již využitelné pro terapeutické účely. Toto terapeutické využití by navíc mohlo být akcentováno v případech, kdy by byl využíván leukaferetický produkt PCa pacientů, kteří již předtím podstoupili aktivní buněčnou imunoterapii na bázi DC. Předěšlé klinické studie totiž již prokázaly, že DC imunoterapie zvyšovala u PCa pacientů frekvenci TAA reagujících T buněk v periferní krvi (Fucikova et al., 2018; Podrazil et al., 2015). Kombinace DC a T buněčné terapie by se tudíž mohla jevit jako vhodná kombinace pro efektivní využití buněčného materiálu PCa pacientů pro léčebné účely.

6.2. Expanze antigen specifických T buněk

SARS-CoV-2 spike glycoprotein-reactive T cells can be readily expanded from COVID-19 vaccinated donors



Obr. 3: Grafické znázornění expanze nabohacených Ag specifických T buněk pomocí REP (Vytvořeno pomocí BioRender.com)

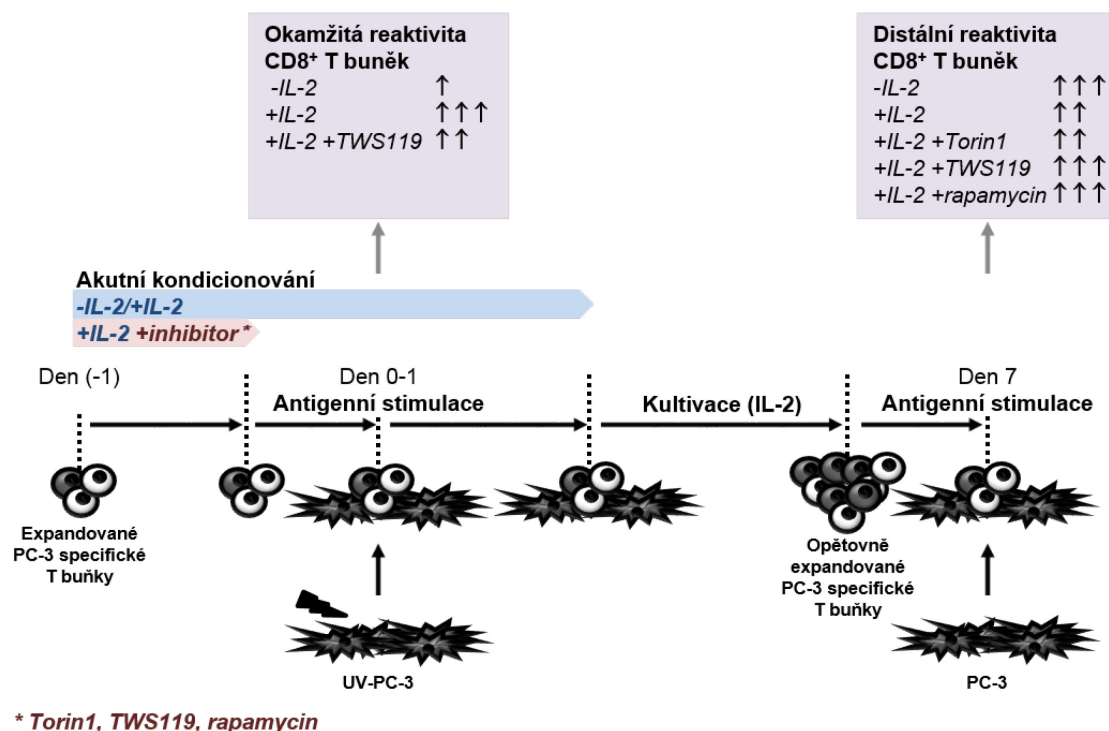
Významným prvkem přípravy buněk pro T buněčnou imunoterapii je kromě nabohacení buněčné kultury o antigen specifické T buňky také i expanze této kultury, a to, aniž by došlo k významnému snížení zastoupení již nabohacených antigen specifických T buněk v buněčné kultuře. Takto expandované *ex vivo* připravené antigen specifické T buňky mohou být následně využívány nejen pro nádorovou terapii, ale také pro virovou terapii nebo profylaxi po transplantacích hematopoetických kmenových buněk (HSC, z angl. haematopoetic stem cells), kde jsou virové infekce častou příčinou úmrtí (Kaeuferle et al., 2019; Riddell et al., 1992). Právě po transplantacích bývá obnovení virové imunity obvykle úspěšně dosaženo užitím *ex vivo* připravených virově specifických CD8⁺ T buněk připravených z HSC dárců (Kaeuferle et al., 2019; Riddell et al., 1992).

V další části studia jsme se proto zaměřili na expanzi buněčných kultur s nabohacenými antigen specifickými T buňkami. Cílem bylo zavedení takového způsobu expanze buněčné kultury, který by byl nejenom robustní a extenzivní, ale zároveň zachoval proporce nabohacených antigen specifických T buněk, a to alespoň na úrovni před expanzí. Pro účely studia byl užit robustní virový model založený na SARS-CoV-2 spike glykoproteinu jako cílujícím antigenu a na zdravých dárcích, kteří doposud neprodělali onemocnění COVID-19 a kteří byli očkováni dvěma dávkami mRNA vakcíny proti COVID-19 (Comirnaty, Pfizer/BioNTech). V první fázi studie jsme rekapitulovali schopnost námi zavedeného protokolu nabohatit buněčné kultury pomocí směsi peptidů o SARS-CoV-2

glykoprotein specifické T buňky. V této fázi se ukázalo, že mRNA vakcína u všech zdravých dárců indukovala nejenom humorální, ale buněčnou imunitu. Indukce této buněčné imunity podmínila následné *ex vivo* nabohacení buněčné kultury o peptid specifické T buňky. Hlavním krokem studie však byla extenzivní expanze nabohacených kultur (Obr.3). Zavedením modifikovaného protokolu REP (Dudley and Rosenberg, 2003), se podařilo nabohacené kultury expandovat v průměru téměř tisíc krát, a to již během 11 dnů kultivace. Zásadním zjištěním této expanze však bylo, že u takto masivně expandovaných kultur nejenom že nedošlo k poklesu zastoupení nabohacených SARS-CoV-2 glykoprotein specifických T buněk, ale v mnohém k jejich dalšímu významnému nárůstu. Tyto výsledky byly pro probíhající výzkum T buněčné imunoterapie zásadní, jelikož propojili technologické možnosti *ex vivo* nabohacení a expanzi antigen specifických T buněk. Výsledky této práce, a to především zavedený modifikovaný REP budou základním technologickým pilířem pro vývoj protokolů pro expanzi nádorově specifických T buněk, a to buď *ex vivo* nabohacených nebo i specificky izolovaných z tumorálního či peritumorálního prostředí.

6.3. Cytokinová a farmakologická modulace reaktivity expandovaných antigen specifických CD8⁺ T buněk

Acute conditioning of antigen-expanded CD8⁺ T cells via the GSK3beta-mTORC axis differentially dictates their immediate and distal responses after antigen rechallenge



Obr. 4: Grafické znázornění cytokinové a farmakologické modulace reaktivity expandovaných PC-3 specifických T buněk

Účinnost T buněčné imunoterapie je podmíněna nejenom antigenní specificitou a množstvím připravovaných T buněk, ale zároveň i jejich reaktivitou a schopností eliminovat nádorové buňky (Farhood et al., 2019). Klíčovou rolí při eliminaci nádorových buněk hrají CD8⁺ T buňky. Funkční fenotyp je u CD8⁺ T buněk modulován během jejich diferenciacce a expanze (Liu et al., 2020). Významnou rolí při nastavování fenotypu CD8⁺ T buněk hraje buněčná signalizace, jejíž tlumení či naopak potenciace může významně ovlivnit jejich vlastnosti (Zhang and Romero, 2018). Předmětem následující práce bylo studium vlivu modulace vybraných signálních drah na okamžitou a distální reaktivitu expandovaných a opětovně expandovaných antigen specifických CD8⁺ T buněk (Obr. 4).

Pro studium reaktivity antigen specifických CD8⁺ T buněk bylo nejprve nutné vyvinout systém, který by zajistil dostatečné množství těchto buněk a možnosti jejich studia během antigenní stimulace a následné proliferace. Za tímto účelem byl vyvinut nový studijní

model založený na použití alogenních DC a prostatické nádorové linie PC-3 (Bernstein et al., 2014; Gervais et al., 2009). Tento systém umožnil *ex vivo* připravit velké množství antigen specifických CD8⁺ T buněk s reverzibilní expresí Tim-3. U těchto buněk byl následně sledován vliv krátkodobé cytokinové a farmakologické modulace na jejich okamžitou reaktivitu a distální reaktivitu po opětovné expanzi. Reaktivita buněk byla hodnocena mírou produkce prozánětlivých cytokinů IFN γ a TNF α po jejich antigenní stimulaci.

Výsledky experimentů ukázaly, že antigen specifické CD8⁺ T buňky v přítomnosti cytokinu IL-2 vykazují znatelně vyšší efektorovou odpověď než po krátkodobé (18–24 hodin) deprivaci IL-2 před antigenní stimulací. Překvapivým zjištěním ale byl opačný vliv této deprivace na reaktivitu po následné expanzi (distální reaktivita). Buňky, které byly před stimulací krátkodobě (18–24 hodin) zbaveny cytokinu IL-2 před antigenní stimulací a které po této antigenní stimulaci následně proliferovaly po dobu 7 dnů v buněčné kultuře v přítomnosti IL-2, vykazovaly silnější efektorové funkce po antigenní stimulaci než buňky, u kterých IL-2 deprivace neproběhla. Tato data ukázala, že distální efektorové funkce antigen specifických CD8⁺ T buněk mohou být významně ovlivněny již krátkodobou modulací signálních drah před antigenní stimulací.

V dalších krocích jsme studovali vliv krátkodobé, farmakologicky zprostředkované modulace signálních drah souvisejících s IL-2 signalizací. V tomto pokusu jsme se zaměřili na GSK-3 β -mTORC1/2 signální dráhu (Benczik and Gaffen, 2004; Ross and Cantrell, 2018; Taylor et al., 2016). Užitím inhibitoru GSK-3 β , TWS119 (Ding et al., 2003; Stakheev et al., 2019), a mTORC1 signální dráhy, rapamycinu (Gibbons et al., 2009), jsme rekapitulovali vliv krátkodobé deprivace IL-2 na distální efektorové funkce antigen specifických CD8⁺ T buněk. Užitím inhibitoru mTORC1 a mTORC2 signální dráhy, Torinu1 (Jhanwar-Uniyal et al., 2019), tento vliv však pozorován nebyl. To ukázalo, že inhibovaná mTORC1, ale funkční mTORC2 signalizace, je nutná pro zvýšení distální efektorové funkce antigen specifických CD8⁺ T buněk.

Expandované antigen specifické CD8⁺ T buňky jsou důležité pro ochranu proti recidivě onemocnění. Po opětovném vystavení antigenu mohou tyto buňky rychle znovu expandovat a poskytnout ochranu proti onemocnění (Abdel-Hakeem et al., 2017). Mnoho studií ukázalo, že farmakologická modulace těchto buněk ovlivňuje i jejich efektorové funkce (Pollizzi et al., 2015). Naše studie ale navíc ukázala, že i krátkodobé

farmakologické ovlivnění může ovlivnit reaktivitu buněk, a to až mnohem později, až po následné expanzi buněk, tedy dlouho po daném ovlivnění. Toto nové zjištění může mít významný vliv na nové strategie ovlivňování efektorových funkcí CD8⁺ T buněk, jelikož otevírá možnosti využití farmakologických agens, jejichž dlouhodobé (chronické) působení má negativní vliv na životnost či další vlastnosti těchto buněk.

7. Souhrn

Prezentovaná disertační práce se zabývá 3 klíčovými kroky, které jsou nezbytné k technologickému zvládnutí úspěšného vývoje protokolů pro *ex vivo* přípravu T buněk pro adoptivní buněčnou imunoterapii – nabohacení, expanzi a modulaci. Ačkoli použité studijní modely pro vývoj těchto 3 jednotlivých kroků jsou odlišné, závěry studie naznačují, že by tyto kroky mohly být spojeny a použity pro přípravu T buněčné imunoterapie nádorových onemocnění, a to zejména PCa.

Summary

In the presented dissertation thesis, there are addressed 3 key steps necessary to technologically handle for successful development of protocols for the *ex vivo* preparation of T cells for adoptive cellular immunotherapy – enrichment, expansion, and modulation. Although the study models used for the investigation of these 3 individual steps are different, the findings of the studies indicate that these steps might be bundled together and used for the preparation of T cell immunotherapy of cancer, namely PCa.

8. Seznam vlastních publikací

8.1. Publikace k disertační práci

1. **Taborska, P.**, Stakheev, D., Strizova, Z., Vavrova, K., Podrazil, M., Bartunkova, J., and Smrz, D. (2017). Personalized ex vivo multiple peptide enrichment and detection of T cells reactive to multiple tumor-associated antigens in prostate cancer patients. *Medical oncology* 34, 173. (IF: 2.834)
2. **Taborska, P.**, Lastovicka, J., Stakheev, D., Strizova, Z., Bartunkova, J., and Smrz, D. (2021a). SARS-CoV-2 spike glycoprotein-reactive T cells can be readily expanded from COVID-19 vaccinated donors. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.05.27.446089> (preprint)
3. **Taborska, P.***, Stakheev, D.*, Svobodova, H., Strizova, Z., Bartunkova, J., and Smrz, D. (2020). Acute Conditioning of Antigen-Expanded CD8(+) T Cells via the GSK3beta-mTORC Axis Differentially Dictates Their Immediate and Distal Responses after Antigen Rechallenge. *Cancers* 12. (* co-first authors) (IF: 6.126)

8.2. Publikace s příbuzným tématem

1. **Taborska, P.**, Bartunkova, J., and Smrz, D. (2018). Simultaneous in vitro generation of human CD34(+)-derived dendritic cells and mast cells from non-mobilized peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol Methods* 458, 63-73. (IF: 1.901)
2. **Taborska, P.**, Stakheev, D., Bartunkova, J., and Smrz, D. (2021b). Thapsigargin-Stimulated LAD2 Human Mast Cell Line Is a Potent Cellular Adjuvant for the Maturation of Monocyte-Derived Dendritic Cells for Adoptive Cellular Immunotherapy. *International journal of molecular sciences* 22. (IF: 4.556)
3. **Taborska, P.**, Strizova, Z., Stakheev, D., Sojka, L., Bartunkova, J., and Smrz, D. (2021c). CD4(+) T Cells of Prostate Cancer Patients Have Decreased Immune Responses to Antigens Derived From SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Frontiers in immunology* 12, 629102. (IF: 5.058)
4. Stakheev, D., **Taborska, P.**, Strizova, Z., Podrazil, M., Bartunkova, J., and Smrz, D. (2019). The WNT/beta-catenin signaling inhibitor XAV939 enhances the elimination of LNCaP and PC-3 prostate cancer cells by prostate cancer patient lymphocytes in vitro. *Scientific reports* 9, 4761. (IF: 3.998)
5. Strizova, Z., **Taborska, P.**, Stakheev, D., Partlova, S., Havlova, K., Vesely, S., Bartunkova, J., and Smrz, D. (2019). NK and T cells with a cytotoxic/migratory phenotype accumulate in peritumoral tissue of patients with clear cell renal carcinoma. *Urologic oncology* 37, 503-509. (IF: 2.882)
6. Strizova, Z., Snajdauf, M., Stakheev, D., **Taborska, P.**, Vachtenheim, J., Jr., Biskup, J., Lischke, R., Bartunkova, J., and Smrz, D. (2020). The paratumoral immune cell signature reveals the potential for the implementation of immunotherapy in esophageal carcinoma patients. *Journal of cancer research and clinical oncology* 146, 1979-1992. (IF: 3.656)

9. Literatura

1. Abdel-Hakeem, M.S., Boisvert, M., Bruneau, J., Soudeyns, H., and Shoukry, N.H. (2017). Selective expansion of high functional avidity memory CD8 T cell clonotypes during hepatitis C virus reinfection and clearance. *PLoS pathogens* *13*, e1006191.
2. Abrahams, N.A., Ormsby, A.H., and Brainard, J. (2002). Validation of cytokeratin 5/6 as an effective substitute for keratin 903 in the differentiation of benign from malignant glands in prostate needle biopsies. *Histopathology* *41*, 35-41.
3. Adusumilli, P.S., Cherkassky, L., Villena-Vargas, J., Colovos, C., Servais, E., Plotkin, J., Jones, D.R., and Sadelain, M. (2014). Regional delivery of mesothelin-targeted CAR T cell therapy generates potent and long-lasting CD4-dependent tumor immunity. *Science translational medicine* *6*, 261ra151.
4. Albini, A., and Sporn, M.B. (2007). The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nature reviews Cancer* *7*, 139-147.
5. Anassi, E., and Ndefo, U.A. (2011). Sipuleucel-T (provenge) injection: the first immunotherapy agent (vaccine) for hormone-refractory prostate cancer. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management* *36*, 197-202.
6. Andersen, R., Donia, M., Ellebaek, E., Borch, T.H., Kongsted, P., Iversen, T.Z., Holmich, L.R., Hendel, H.W., Met, O., Andersen, M.H., *et al.* (2016). Long-Lasting Complete Responses in Patients with Metastatic Melanoma after Adoptive Cell Therapy with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and an Attenuated IL2 Regimen. *Clin Cancer Res* *22*, 3734-3745.
7. Andersen, R., Westergaard, M.C.W., Kjeldsen, J.W., Muller, A., Pedersen, N.W., Hadrup, S.R., Met, O., Seliger, B., Kromann-Andersen, B., Hasselager, T., *et al.* (2018). T-cell Responses in the Microenvironment of Primary Renal Cell Carcinoma-Implications for Adoptive Cell Therapy. *Cancer immunology research* *6*, 222-235.
8. Andtbacka, R.H., Kaufman, H.L., Collichio, F., Amatruda, T., Senzer, N., Chesney, J., Delman, K.A., Spitler, L.E., Puzanov, I., Agarwala, S.S., *et al.* (2015). Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *33*, 2780-2788.
9. Antonarakis, E.S., Piulats, J.M., Gross-Goupil, M., Goh, J., Ojamaa, K., Hoimes, C.J., Vaishampayan, U., Berger, R., Sezer, A., Alanko, T., *et al.* (2020). Pembrolizumab for Treatment-Refractory Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Multicohort, Open-Label Phase II KEYNOTE-199 Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *38*, 395-405.
10. Balan, S., Ollion, V., Colletti, N., Chelbi, R., Montanana-Sanchis, F., Liu, H., Vu Manh, T.P., Sanchez, C., Savoret, J., Perrot, I., *et al.* (2014). Human XCR1+ dendritic cells derived in vitro from CD34+ progenitors closely resemble blood dendritic cells, including their adjuvant responsiveness, contrary to monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* *193*, 1622-1635.
11. Baldan, V., Griffiths, R., Hawkins, R.E., and Gilham, D.E. (2015). Efficient and reproducible generation of tumour-infiltrating lymphocytes for renal cell carcinoma. *British journal of cancer* *112*, 1510-1518.
12. Band, H., Porcelli, S.A., Panchamoorthy, G., McLean, J., Morita, C.T., Ishikawa, S., Modlin, R.L., and Brenner, M.B. (1991). Antigens and antigen-presenting molecules for gamma delta T cells. *Current topics in microbiology and immunology* *173*, 229-234.
13. Banchereau, J., and Palucka, A.K. (2005). Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* *5*, 296-306.
14. Barnes, T.A., and Amir, E. (2017). HYPE or HOPE: the prognostic value of infiltrating immune cells in cancer. *British journal of cancer* *117*, 451-460.

15. Beck, B., and Blanpain, C. (2013). Unravelling cancer stem cell potential. *Nature reviews Cancer* *13*, 727-738.
16. Beer, T.M., Kwon, E.D., Drake, C.G., Fizazi, K., Logothetis, C., Gravis, G., Ganju, V., Polikoff, J., Saad, F., Humanski, P., *et al.* (2017). Randomized, Double-Blind, Phase III Trial of Ipilimumab Versus Placebo in Asymptomatic or Minimally Symptomatic Patients With Metastatic Chemotherapy-Naive Castration-Resistant Prostate Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *35*, 40-47.
17. Ben-Avi, R., Farhi, R., Ben-Nun, A., Gorodner, M., Greenberg, E., Markel, G., Schachter, J., Itzhaki, O., and Besser, M.J. (2018). Establishment of adoptive cell therapy with tumor infiltrating lymphocytes for non-small cell lung cancer patients. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* *67*, 1221-1230.
18. Benczik, M., and Gaffen, S.L. (2004). The interleukin (IL)-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes. *Immunological investigations* *33*, 109-142.
19. Berger, M.F., Lawrence, M.S., Demichelis, F., Drier, Y., Cibulskis, K., Sivachenko, A.Y., Sboner, A., Esgueva, R., Pflueger, D., Sougnez, C., *et al.* (2011). The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature* *470*, 214-220.
20. Bernstein, M.B., Garnett, C.T., Zhang, H., Velcich, A., Wattenberg, M.M., Gameiro, S.R., Kalnicki, S., Hodge, J.W., and Guha, C. (2014). Radiation-induced modulation of costimulatory and coinhibitory T-cell signaling molecules on human prostate carcinoma cells promotes productive antitumor immune interactions. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* *29*, 153-161.
21. Besser, M.J., Shapira-Frommer, R., Itzhaki, O., Treves, A.J., Zippel, D.B., Levy, D., Kubi, A., Shoshani, N., Zikich, D., Ohayon, Y., *et al.* (2013). Adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma: intent-to-treat analysis and efficacy after failure to prior immunotherapies. *Clin Cancer Res* *19*, 4792-4800.
22. Besser, M.J., Schallmach, E., Oved, K., Treves, A.J., Markel, G., Reiter, Y., and Schachter, J. (2009). Modifying interleukin-2 concentrations during culture improves function of T cells for adoptive immunotherapy. *Cytotherapy* *11*, 206-217.
23. Betts, M.R., Brenchley, J.M., Price, D.A., De Rosa, S.C., Douek, D.C., Roederer, M., and Koup, R.A. (2003). Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* *281*, 65-78.
24. Bezu, L., Kepp, O., Cerrato, G., Pol, J., Fucikova, J., Spisek, R., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2018). Trial watch: Peptide-based vaccines in anticancer therapy. *Oncoimmunology* *7*, e1511506.
25. Borghaei, H., Paz-Ares, L., Horn, L., Spigel, D.R., Steins, M., Ready, N.E., Chow, L.Q., Vokes, E.E., Felip, E., Holgado, E., *et al.* (2015). Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England journal of medicine* *373*, 1627-1639.
26. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* *68*, 394-424.
27. Brudno, J.N., Maric, I., Hartman, S.D., Rose, J.J., Wang, M., Lam, N., Stetler-Stevenson, M., Salem, D., Yuan, C., Pavletic, S., *et al.* (2018). T Cells Genetically Modified to Express an Anti-B-Cell Maturation Antigen Chimeric Antigen Receptor Cause Remissions of Poor-Prognosis Relapsed Multiple Myeloma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *36*, 2267-2280.
28. Bryant, G., Wang, L., and Mulholland, D.J. (2017). Overcoming Oncogenic Mediated Tumor Immunity in Prostate Cancer. *International journal of molecular sciences* *18*.

29. Cai, T., Santi, R., Tamanini, I., Galli, I.C., Perletti, G., Bjerklund Johansen, T.E., and Nesi, G. (2019). Current Knowledge of the Potential Links between Inflammation and Prostate Cancer. *International journal of molecular sciences* 20.
30. Carreno, B.M., Magrini, V., Becker-Hapak, M., Kaabinejadian, S., Hundal, J., Petti, A.A., Ly, A., Lie, W.R., Hildebrand, W.H., Mardis, E.R., *et al.* (2015). Cancer immunotherapy. A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells. *Science* 348, 803-808.
31. Castle, J.C., Uduman, M., Pabla, S., Stein, R.B., and Buell, J.S. (2019). Mutation-Derived Neoantigens for Cancer Immunotherapy. *Frontiers in immunology* 10, 1856.
32. Casucci, M., Hawkins, R.E., Dotti, G., and Bondanza, A. (2015). Overcoming the toxicity hurdles of genetically targeted T cells. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 64, 123-130.
33. Cavallo, F., Calogero, R.A., and Forni, G. (2007). Are oncoantigens suitable targets for anti-tumour therapy? *Nature reviews Cancer* 7, 707-713.
34. Cimadamore, A., Cheng, M., Santoni, M., Lopez-Beltran, A., Battelli, N., Massari, F., Galosi, A.B., Scarpelli, M., and Montironi, R. (2018). New Prostate Cancer Targets for Diagnosis, Imaging, and Therapy: Focus on Prostate-Specific Membrane Antigen. *Frontiers in oncology* 8, 653.
35. Clay, T.M., Custer, M.C., Sachs, J., Hwu, P., Rosenberg, S.A., and Nishimura, M.I. (1999). Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity. *J Immunol* 163, 507-513.
36. Clemente, C.G., Mihm, M.C., Jr., 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.
37. Codd, A.S., Kanaseki, T., Torigo, T., and Tabi, Z. (2018). Cancer stem cells as targets for immunotherapy. *Immunology* 153, 304-314.
38. Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J., van der Bruggen, P., and Boon, T. (2014). Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer* 14, 135-146.
39. Danziger, O., Shai, B., Sabo, Y., Bacharach, E., and Ehrlich, M. (2016). Combined genetic and epigenetic interferences with interferon signaling expose prostate cancer cells to viral infection. *Oncotarget* 7, 52115-52134.
40. Davila, M.L., Bouhassira, D.C., Park, J.H., Curran, K.J., Smith, E.L., Pegram, H.J., and Brentjens, R. (2014). Chimeric antigen receptors for the adoptive T cell therapy of hematologic malignancies. *International journal of hematology* 99, 361-371.
41. de La Motte Rouge, T., Galluzzi, L., Olaussen, K.A., Zermati, Y., Tasdemir, E., Robert, T., Ripoche, H., Lazar, V., Dessen, P., Harper, F., *et al.* (2007). A novel epidermal growth factor receptor inhibitor promotes apoptosis in non-small cell lung cancer cells resistant to erlotinib. *Cancer Res* 67, 6253-6262.
42. De Sousa Linhares, A., Battin, C., Jutz, S., Leitner, J., Hafner, C., Tobias, J., Wiedermann, U., Kundi, M., Zlabinger, G.J., Grabmeier-Pfistershammer, K., *et al.* (2019). Therapeutic PD-L1 antibodies are more effective than PD-1 antibodies in blocking PD-1/PD-L1 signaling. *Scientific reports* 9, 11472.
43. De Velasco, M.A., and Uemura, H. (2018). Prostate cancer immunotherapy: where are we and where are we going? *Current opinion in urology* 28, 15-24.
44. de Witte, M.A., Coccoris, M., Wolkers, M.C., van den Boom, M.D., Mesman, E.M., Song, J.Y., van der Valk, M., Haanen, J.B., and Schumacher, T.N. (2006). Targeting self-antigens through allogeneic TCR gene transfer. *Blood* 108, 870-877.
45. Dean, M. (2005). Cancer stem cells: Implications for cancer causation and therapy resistance. *Discovery medicine* 5, 278-282.

46. Dillman, R.O. (1994). The clinical experience with interleukin-2 in cancer therapy. *Cancer Biother* 9, 183-209.
47. Ding, S., Wu, T.Y., Brinker, A., Peters, E.C., Hur, W., Gray, N.S., and Schultz, P.G. (2003). Synthetic small molecules that control stem cell fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7632-7637.
48. Dolgin, E. (2019). Anticancer autophagy inhibitors attract 'resurgent' interest. *Nat Rev Drug Discov* 18, 408-410.
49. Donia, M., Junker, N., Ellebaek, E., Andersen, M.H., Straten, P.T., and Svane, I.M. (2012). Characterization and comparison of 'standard' and 'young' tumour-infiltrating lymphocytes for adoptive cell therapy at a Danish translational research institution. *Scand J Immunol* 75, 157-167.
50. Dronca, R.S., and Dong, H. (2015). Immunomodulatory antibody therapy of cancer: the closer, the better. *Clin Cancer Res* 21, 944-946.
51. Dudley, M.E., Gross, C.A., Somerville, R.P., Hong, Y., Schaub, N.P., Rosati, S.F., White, D.E., Nathan, D., Restifo, N.P., Steinberg, S.M., *et al.* (2013). Randomized selection design trial evaluating CD8⁺-enriched versus unselected tumor-infiltrating lymphocytes for adoptive cell therapy for patients with melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31, 2152-2159.
52. Dudley, M.E., and Rosenberg, S.A. (2003). Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nature reviews Cancer* 3, 666-675.
53. Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Shelton, T.E., Even, J., and Rosenberg, S.A. (2003). Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients. *Journal of immunotherapy* 26, 332-342.
54. Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Yang, J.C., Hwu, P., Schwartzentruber, D.J., Topalian, S.L., Sherry, R.M., Marincola, F.M., Leitman, S.F., Seipp, C.A., *et al.* (2002). A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *Journal of immunotherapy* 25, 243-251.
55. Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Yang, J.C., Sherry, R.M., Topalian, S.L., Restifo, N.P., Royal, R.E., Kammula, U., White, D.E., Mavroukakis, S.A., *et al.* (2005). Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23, 2346-2357.
56. Ebelt, K., Babaryka, G., Figel, A.M., Pohla, H., Buchner, A., Stief, C.G., Eisenmenger, W., Kirchner, T., Schendel, D.J., and Noessner, E. (2008). Dominance of CD4⁺ lymphocytic infiltrates with disturbed effector cell characteristics in the tumor microenvironment of prostate carcinoma. *The Prostate* 68, 1-10.
57. Ebelt, K., Babaryka, G., Frankenberger, B., Stief, C.G., Eisenmenger, W., Kirchner, T., Schendel, D.J., and Noessner, E. (2009). Prostate cancer lesions are surrounded by FOXP3⁺, PD-1⁺ and B7-H1⁺ lymphocyte clusters. *European journal of cancer* 45, 1664-1672.
58. Eggermont, A.M.M., Robert, C., and Suci, S. (2018). Adjuvant Pembrolizumab in Resected Stage III Melanoma. *The New England journal of medicine* 379, 593-595.
59. Eyquem, J., Mansilla-Soto, J., Giavridis, T., van der Stegen, S.J., Hamieh, M., Cunanan, K.M., Odak, A., Gonen, M., and Sadelain, M. (2017). Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature* 543, 113-117.
60. Fakhrejahani, F., Madan, R.A., and Dahut, W.L. (2017). Management Options for Biochemically Recurrent Prostate Cancer. *Current treatment options in oncology* 18, 26.
61. Farhood, B., Najafi, M., and Mortezaee, K. (2019). CD8(+) cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *J Cell Physiol* 234, 8509-8521.

62. Feig, C., Jones, J.O., Kraman, M., Wells, R.J., Deonarine, A., Chan, D.S., Connell, C.M., Roberts, E.W., Zhao, Q., Caballero, O.L., *et al.* (2013). Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 20212-20217.
63. Ferrara, N., Hillan, K.J., Gerber, H.P., and Novotny, W. (2004). Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* *3*, 391-400.
64. Fizazi, K., Drake, C.G., Beer, T.M., Kwon, E.D., Scher, H.I., Gerritsen, W.R., Bossi, A., den Eertwegh, A., Krainer, M., Houede, N., *et al.* (2020). Final Analysis of the Ipilimumab Versus Placebo Following Radiotherapy Phase III Trial in Postdocetaxel Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer Identifies an Excess of Long-term Survivors. *European urology* *78*, 822-830.
65. Flammiger, A., Bayer, F., Cirugeda-Kuhnert, A., Huland, H., Tennstedt, P., Simon, R., Minner, S., Bokemeyer, C., Sauter, G., Schlomm, T., *et al.* (2012). Intratumoral T but not B lymphocytes are related to clinical outcome in prostate cancer. *APMIS* *120*, 901-908.
66. Forero-Torres, A., Infante, J.R., Waterhouse, D., Wong, L., Vickers, S., Arrowsmith, E., He, A.R., Hart, L., Trent, D., Wade, J., *et al.* (2013). Phase 2, multicenter, open-label study of tigatuzumab (CS-1008), a humanized monoclonal antibody targeting death receptor 5, in combination with gemcitabine in chemotherapy-naïve patients with unresectable or metastatic pancreatic cancer. *Cancer medicine* *2*, 925-932.
67. Freedman, J.D., Duffy, M.R., Lei-Rossmann, J., Muntzer, A., Scott, E.M., Hagel, J., Campo, L., Bryant, R.J., Verrill, C., Lambert, A., *et al.* (2018). An Oncolytic Virus Expressing a T-cell Engager Simultaneously Targets Cancer and Immunosuppressive Stromal Cells. *Cancer Res* *78*, 6852-6865.
68. Fucikova, J., Podrazil, M., Jarolim, L., Bilkova, P., Hensler, M., Becht, E., Gasova, Z., Klouckova, J., Kayserova, J., Horvath, R., *et al.* (2018). Phase I/II trial of dendritic cell-based active cellular immunotherapy with DCVAC/PCa in patients with rising PSA after primary prostatectomy or salvage radiotherapy for the treatment of prostate cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* *67*, 89-100.
69. Fukuhara, H., Ino, Y., and Todo, T. (2016). Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer science* *107*, 1373-1379.
70. Gajewski, T.F., Schreiber, H., and Fu, Y.X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol* *14*, 1014-1022.
71. Galluzzi, L., Kepp, O., Vander Heiden, M.G., and Kroemer, G. (2013). Metabolic targets for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* *12*, 829-846.
72. Galluzzi, L., Vacchelli, E., Eggermont, A., Fridman, W.H., Galon, J., Sautes-Fridman, C., Tartour, E., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2012). Trial Watch: Adoptive cell transfer immunotherapy. *Oncoimmunology* *1*, 306-315.
73. Galon, J., and Bruni, D. (2019). Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat Rev Drug Discov* *18*, 197-218.
74. Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., *et al.* (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* *313*, 1960-1964.
75. Gamat, M., and McNeel, D.G. (2017). Androgen deprivation and immunotherapy for the treatment of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* *24*, T297-T310.
76. Gandhi, L., and Garassino, M.C. (2018). Pembrolizumab plus Chemotherapy in Lung Cancer. *The New England journal of medicine* *379*, e18.
77. Gao, J., Ward, J.F., Pettaway, C.A., Shi, L.Z., Subudhi, S.K., Vence, L.M., Zhao, H., Chen, J., Chen, H., Efstathiou, E., *et al.* (2017). VISTA is an inhibitory immune

- checkpoint that is increased after ipilimumab therapy in patients with prostate cancer. *Nat Med* 23, 551-555.
78. Garbe, C. (1993). Chemotherapy and chemoimmunotherapy in disseminated malignant melanoma. *Melanoma research* 3, 291-299.
79. Garnier, D., Jabado, N., and Rak, J. (2013). Extracellular vesicles as prospective carriers of oncogenic protein signatures in adult and paediatric brain tumours. *Proteomics* 13, 1595-1607.
80. Garon, E.B., Rizvi, N.A., Hui, R., Leighl, N., Balmanoukian, A.S., Eder, J.P., Patnaik, A., Aggarwal, C., Gubens, M., Horn, L., *et al.* (2015). Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine* 372, 2018-2028.
81. Gervais, A., Eymard, J.C., Toulmonde, E., and Bernard, J. (2009). Selected allogeneic dendritic cells markedly enhance human tumour antigen-specific T cell response in vitro. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 58, 1831-1841.
82. Gibbons, J.J., Abraham, R.T., and Yu, K. (2009). Mammalian target of rapamycin: discovery of rapamycin reveals a signaling pathway important for normal and cancer cell growth. *Semin Oncol* 36 *Suppl* 3, S3-S17.
83. Gibney, G.T., Weiner, L.M., and Atkins, M.B. (2016). Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *The Lancet Oncology* 17, e542-e551.
84. Goff, S.L., Dudley, M.E., Citrin, D.E., Somerville, R.P., Wunderlich, J.R., Danforth, D.N., Zlott, D.A., Yang, J.C., Sherry, R.M., Kammula, U.S., *et al.* (2016). Randomized, Prospective Evaluation Comparing Intensity of Lymphodepletion Before Adoptive Transfer of Tumor-Infiltrating Lymphocytes for Patients With Metastatic Melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 34, 2389-2397.
85. Gordon, I.O., Tretiakova, M.S., Noffsinger, A.E., Hart, J., Reuter, V.E., and Al-Ahmadie, H.A. (2008). Prostate-specific membrane antigen expression in regeneration and repair. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 21, 1421-1427.
86. Goswami, S., Aparicio, A., and Subudhi, S.K. (2016). Immune Checkpoint Therapies in Prostate Cancer. *Cancer journal* 22, 117-120.
87. Graff, J.N., Beer, T.M., Alumkal, J.J., Slotke, R.E., Redmond, W.L., Thomas, G.V., Thompson, R.F., Wood, M.A., Koguchi, Y., Chen, Y., *et al.* (2020). A phase II single-arm study of pembrolizumab with enzalutamide in men with metastatic castration-resistant prostate cancer progressing on enzalutamide alone. *Journal for immunotherapy of cancer* 8.
88. Grasso, C.S., and Giannakis, M. (2018). Genomic mechanisms of immune evasion in colorectal cancer: from discovery to clinical practice. *Oncotarget* 9, 33743-33744.
89. Green, D.R., Galluzzi, L., and Kroemer, G. (2014). Cell biology. Metabolic control of cell death. *Science* 345, 1250-1256.
90. Grubmuller, B., Rasul, S., Baltzer, P., Fajkovic, H., D'Andrea, D., Berndt, F., Maj-Hes, A., Grubmuller, K.H., Mitterhauser, M., Wadsak, W., *et al.* (2020). Response assessment using [(68) Ga]Ga-PSMA ligand PET in patients undergoing systemic therapy for metastatic castration-resistant prostate cancer. *The Prostate* 80, 74-82.
91. Gulley, J.L., Borre, M., Vogelzang, N.J., Ng, S., Agarwal, N., Parker, C.C., Pook, D.W., Rathenborg, P., Flaig, T.W., Carles, J., *et al.* (2019). Phase III Trial of PROSTVAC in Asymptomatic or Minimally Symptomatic Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 37, 1051-1061.
92. Gurel, B., Lucia, M.S., Thompson, I.M., Jr., Goodman, P.J., Tangen, C.M., Kristal, A.R., Parnes, H.L., Hoque, A., Lippman, S.M., Sutcliffe, S., *et al.* (2014). Chronic inflammation in benign prostate tissue is associated with high-grade prostate cancer in the placebo arm of the prostate cancer prevention trial. *Cancer epidemiology, biomarkers &*

- prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology 23, 847-856.
93. Hahn, W.C., and Weinberg, R.A. (2002). Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nature reviews Cancer* 2, 331-341.
 94. Hall, M., Liu, H., Malafa, M., Centeno, B., Hodul, P.J., Pimiento, J., Pilon-Thomas, S., and Sarnaik, A.A. (2016). Expansion of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) from human pancreatic tumors. *Journal for immunotherapy of cancer* 4, 61.
 95. Hamilos, D.L. (1989). Antigen presenting cells. *Immunol Res* 8, 98-117.
 96. Hammerstrom, A.E., Cauley, D.H., Atkinson, B.J., and Sharma, P. (2011). Cancer immunotherapy: sipuleucel-T and beyond. *Pharmacotherapy* 31, 813-828.
 97. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
 98. Hannani, D., Vetizou, M., Enot, D., Rusakiewicz, S., Chaput, N., Klatzmann, D., Desbois, M., Jacquelot, N., Vimond, N., Chouaib, S., *et al.* (2015). Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade: obligatory contribution of IL-2 receptors and negative prognostic impact of soluble CD25. *Cell research* 25, 208-224.
 99. Hemminki, K. (2012). Familial risk and familial survival in prostate cancer. *World journal of urology* 30, 143-148.
 100. Hernandez-Hoyos, G., Sewell, T., Bader, R., Bannink, J., Chenault, R.A., Daugherty, M., Dasovich, M., Fang, H., Gottschalk, R., Kumer, J., *et al.* (2016). MOR209/ES414, a Novel Bispecific Antibody Targeting PSMA for the Treatment of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Molecular cancer therapeutics* 15, 2155-2165.
 101. Higuchi, T., Flies, D.B., Marjon, N.A., Mantia-Smaldone, G., Ronner, L., Gimotty, P.A., and Adams, S.F. (2015). CTLA-4 Blockade Synergizes Therapeutically with PARP Inhibition in BRCA1-Deficient Ovarian Cancer. *Cancer immunology research* 3, 1257-1268.
 102. Hilders, C.G., Ras, L., van Eendenburg, J.D., Nooyen, Y., and Fleuren, G.J. (1994). Isolation and characterization of tumor-infiltrating lymphocytes from cervical carcinoma. *Int J Cancer* 57, 805-813.
 103. Hillerdal, V., Nilsson, B., Carlsson, B., Eriksson, F., and Essand, M. (2012). T cells engineered with a T cell receptor against the prostate antigen TARP specifically kill HLA-A2+ prostate and breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 15877-15881.
 104. Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., *et al.* (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine* 363, 711-723.
 105. Hoffman, L.M., and Gore, L. (2014). Blinatumomab, a Bi-Specific Anti-CD19/CD3 BiTE((R)) Antibody for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia: Perspectives and Current Pediatric Applications. *Frontiers in oncology* 4, 63.
 106. Holzel, M., Bovier, A., and Tuting, T. (2013). Plasticity of tumour and immune cells: a source of heterogeneity and a cause for therapy resistance? *Nature reviews Cancer* 13, 365-376.
 107. Houot, R., Kohrt, H., and Levy, R. (2012). Boosting antibody-dependant cellular cytotoxicity against tumor cells with a CD137 stimulatory antibody. *Oncoimmunology* 1, 957-958.
 108. Hsu, F.J., Benike, C., Fagnoni, F., Liles, T.M., Czerwinski, D., Taidi, B., Engleman, E.G., and Levy, R. (1996). Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 2, 52-58.
 109. Hubert, P., and Amigorena, S. (2012). Antibody-dependent cell cytotoxicity in monoclonal antibody-mediated tumor immunotherapy. *Oncoimmunology* 1, 103-105.

110. Hudolin, T., Juretic, A., Spagnoli, G.C., Pasini, J., Bandic, D., Heberer, M., Kosicek, M., and Cacic, M. (2006). Immunohistochemical expression of tumor antigens MAGE-A1, MAGE-A3/4, and NY-ESO-1 in cancerous and benign prostatic tissue. *The Prostate* 66, 13-18.
111. Hughes, B. (2010). Antibody-drug conjugates for cancer: poised to deliver? *Nat Rev Drug Discov* 9, 665-667.
112. Hummel, H.D., Kufer, P., Grulich, C., Seggewiss-Bernhardt, R., Deschler-Baier, B., Chatterjee, M., Goebeler, M.E., Miller, K., de Santis, M., Loidl, W., *et al.* (2021). Pasotuzumab, a BiTE((R)) immune therapy for castration-resistant prostate cancer: Phase I, dose-escalation study findings. *Immunotherapy* 13, 125-141.
113. Humphrey, P.A., Moch, H., Cubilla, A.L., Ulbright, T.M., and Reuter, V.E. (2016). The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *European urology* 70, 106-119.
114. Humphries, C. (2013). Adoptive cell therapy: Honing that killer instinct. *Nature* 504, S13-15.
115. Cha, H.R., Lee, J.H., and Ponnazhagan, S. (2020). Revisiting Immunotherapy: A Focus on Prostate Cancer. *Cancer Res* 80, 1615-1623.
116. Chalmers, Z.R., Connelly, C.F., Fabrizio, D., Gay, L., Ali, S.M., Ennis, R., Schrock, A., Campbell, B., Shlien, A., Chmielecki, J., *et al.* (2017). Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome medicine* 9, 34.
117. Cheng, W., Fu, D., Xu, F., and Zhang, Z. (2018). Unwrapping the genomic characteristics of urothelial bladder cancer and successes with immune checkpoint blockade therapy. *Oncogenesis* 7, 2.
118. Chiocca, E.A., and Rabkin, S.D. (2014). Oncolytic viruses and their application to cancer immunotherapy. *Cancer immunology research* 2, 295-300.
119. Choi, B.D., Pastan, I., Bigner, D.D., and Sampson, J.H. (2013). A novel bispecific antibody recruits T cells to eradicate tumors in the "immunologically privileged" central nervous system. *Oncoimmunology* 2, e23639.
120. Choi, B.D., Yu, X., Castano, A.P., Darr, H., Henderson, D.B., Bouffard, A.A., Larson, R.C., Scarfo, I., Bailey, S.R., Gerhard, G.M., *et al.* (2019). CRISPR-Cas9 disruption of PD-1 enhances activity of universal EGFRvIII CAR T cells in a preclinical model of human glioblastoma. *Journal for immunotherapy of cancer* 7, 304.
121. Ichim, G., Lopez, J., Ahmed, S.U., Muthalagu, N., Giampazolias, E., Delgado, M.E., Haller, M., Riley, J.S., Mason, S.M., Athineos, D., *et al.* (2015). Limited mitochondrial permeabilization causes DNA damage and genomic instability in the absence of cell death. *Mol Cell* 57, 860-872.
122. Itzhaki, O., Hovav, E., Ziporen, Y., Levy, D., Kubi, A., Zikich, D., Hershkovitz, L., Treves, A.J., Shalmon, B., Zippel, D., *et al.* (2011). Establishment and large-scale expansion of minimally cultured "young" tumor infiltrating lymphocytes for adoptive transfer therapy. *Journal of immunotherapy* 34, 212-220.
123. Iwai, Y., Hamanishi, J., Chamoto, K., and Honjo, T. (2017). Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *Journal of biomedical science* 24, 26.
124. Jansson, K.F., Akre, O., Garmo, H., Bill-Axelsson, A., Adolfsson, J., Stattin, P., and Bratt, O. (2012). Concordance of tumor differentiation among brothers with prostate cancer. *European urology* 62, 656-661.
125. Jeras, M., Bergant, M., and Repnik, U. (2005). In vitro preparation and functional assessment of human monocyte-derived dendritic cells-potential antigen-specific modulators of in vivo immune responses. *Transpl Immunol* 14, 231-244.
126. Jhanwar-Uniyal, M., Wainwright, J.V., Mohan, A.L., Tobias, M.E., Murali, R., Gandhi, C.D., and Schmidt, M.H. (2019). Diverse signaling mechanisms of mTOR

- complexes: mTORC1 and mTORC2 in forming a formidable relationship. *Advances in biological regulation* 72, 51-62.
127. Jiang, H., Shi, Z., Wang, P., Wang, C., Yang, L., Du, G., Zhang, H., Shi, B., Jia, J., Li, Q., *et al.* (2019). Claudin18.2-Specific Chimeric Antigen Receptor Engineered T Cells for the Treatment of Gastric Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 111, 409-418.
128. Jin, C., Yu, D., Hillerdal, V., Wallgren, A., Karlsson-Parra, A., and Essand, M. (2014). Allogeneic lymphocyte-licensed DCs expand T cells with improved antitumor activity and resistance to oxidative stress and immunosuppressive factors. *Molecular therapy Methods & clinical development* 1, 14001.
129. Johnson, L.A., Morgan, R.A., Dudley, M.E., Cassard, L., Yang, J.C., Hughes, M.S., Kammula, U.S., Royal, R.E., Sherry, R.M., Wunderlich, J.R., *et al.* (2009). Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood* 114, 535-546.
130. Jones, B. (2013). Haematological cancer: rituximab maintenance improves the outcome of elderly patients with FL. *Nat Rev Clin Oncol* 10, 607.
131. Joyce, J.A., and Fearon, D.T. (2015). T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science* 348, 74-80.
132. Kaeuferle, T., Krauss, R., Blaeschke, F., Willier, S., and Feuchtinger, T. (2019). Strategies of adoptive T-cell transfer to treat refractory viral infections post allogeneic stem cell transplantation. *Journal of hematology & oncology* 12, 13.
133. Kageyama, S., Ikeda, H., Miyahara, Y., Imai, N., Ishihara, M., Saito, K., Sugino, S., Ueda, S., Ishikawa, T., Kokura, S., *et al.* (2015). Adoptive Transfer of MAGE-A4 T-cell Receptor Gene-Transduced Lymphocytes in Patients with Recurrent Esophageal Cancer. *Clin Cancer Res* 21, 2268-2277.
134. Kakarla, S., Song, X.T., and Gottschalk, S. (2012). Cancer-associated fibroblasts as targets for immunotherapy. *Immunotherapy* 4, 1129-1138.
135. Kalos, M., Levine, B.L., Porter, D.L., Katz, S., Grupp, S.A., Bagg, A., and June, C.H. (2011). T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Science translational medicine* 3, 95ra73.
136. Kantoff, P.W., Higano, C.S., Shore, N.D., Berger, E.R., Small, E.J., Penson, D.F., Redfern, C.H., Ferrari, A.C., Dreicer, R., Sims, R.B., *et al.* (2010a). Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *The New England journal of medicine* 363, 411-422.
137. Kantoff, P.W., Schuetz, T.J., Blumenstein, B.A., Glode, L.M., Bilhartz, D.L., Wyand, M., Manson, K., Panicali, D.L., Laus, R., Schlom, J., *et al.* (2010b). Overall survival analysis of a phase II randomized controlled trial of a Poxviral-based PSA-targeted immunotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28, 1099-1105.
138. Kaplan-Lefko, P.J., Graves, J.D., Zoog, S.J., Pan, Y., Wall, J., Branstetter, D.G., Moriguchi, J., Coxon, A., Huard, J.N., Xu, R., *et al.* (2010). Conatumumab, a fully human agonist antibody to death receptor 5, induces apoptosis via caspase activation in multiple tumor types. *Cancer Biol Ther* 9, 618-631.
139. Karzai, F., VanderWeele, D., Madan, R.A., Owens, H., Cordes, L.M., Hankin, A., Couvillon, A., Nichols, E., Bilusic, M., Beshiri, M.L., *et al.* (2018). Activity of durvalumab plus olaparib in metastatic castration-resistant prostate cancer in men with and without DNA damage repair mutations. *Journal for immunotherapy of cancer* 6, 141.
140. Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 26, 677-704.
141. Kershaw, M.H., Westwood, J.A., Parker, L.L., Wang, G., Eshhar, Z., Mavroukakis, S.A., White, D.E., Wunderlich, J.R., Canevari, S., Rogers-Freezer, L., *et al.* (2006). A

- phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 12, 6106-6115.
142. Kessler, C., Pardo, A., Tur, M.K., Gattenlohner, S., Fischer, R., Kolberg, K., and Barth, S. (2017). Novel PSCA targeting scFv-fusion proteins for diagnosis and immunotherapy of prostate cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology* 143, 2025-2038.
143. Key, T.J. (2014). Nutrition, hormones and prostate cancer risk: results from the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Recent results in cancer research Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer* 202, 39-46.
144. Kim, C.H., Axup, J.Y., Lawson, B.R., Yun, H., Tardif, V., Choi, S.H., Zhou, Q., Dubrovskaya, A., Biroc, S.L., Marsden, R., *et al.* (2013). Bispecific small molecule-antibody conjugate targeting prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 17796-17801.
145. Kimura, T., Egawa, S., and Uemura, H. (2017). Personalized peptide vaccines and their relation to other therapies in urological cancer. *Nature reviews Urology*.
146. Kirkwood, J. (2002). Cancer immunotherapy: the interferon-alpha experience. *Semin Oncol* 29, 18-26.
147. Kissick, H.T., Sanda, M.G., Dunn, L.K., Pellegrini, K.L., On, S.T., Noel, J.K., and Arredouani, M.S. (2014). Androgens alter T-cell immunity by inhibiting T-helper 1 differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 9887-9892.
148. Klebanoff, C.A., Khong, H.T., Antony, P.A., Palmer, D.C., and Restifo, N.P. (2005). Sinks, suppressors and antigen presenters: how lymphodepletion enhances T cell-mediated tumor immunotherapy. *Trends Immunol* 26, 111-117.
149. Krejci, D., Pehalova, L., Talabova, A., Pokorova, K., Katinova, I., Muzik, J., and Dusek, L. (2021). Novotvary 2018 ČR (Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR).
150. Kute, T., Stehle, J.R., Jr., Ornelles, D., Walker, N., Delbono, O., and Vaughn, J.P. (2012). Understanding key assay parameters that affect measurements of trastuzumab-mediated ADCC against Her2 positive breast cancer cells. *Oncoimmunology* 1, 810-821.
151. Kwon, E.D., Drake, C.G., Scher, H.I., Fizazi, K., Bossi, A., van den Eertwegh, A.J., Krainer, M., Houede, N., Santos, R., Mahammedi, H., *et al.* (2014). Ipilimumab versus placebo after radiotherapy in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer that had progressed after docetaxel chemotherapy (CA184-043): a multicentre, randomised, double-blind, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 15, 700-712.
152. Lakins, M.A., Ghorani, E., Munir, H., Martins, C.P., and Shields, J.D. (2018). Cancer-associated fibroblasts induce antigen-specific deletion of CD8 (+) T Cells to protect tumour cells. *Nature communications* 9, 948.
153. Larkin, J., Hatswell, A.J., Nathan, P., Lebmeier, M., and Lee, D. (2015). The Predicted Impact of Ipilimumab Usage on Survival in Previously Treated Advanced or Metastatic Melanoma in the UK. *PLoS One* 10, e0145524.
154. Laurell, A., Lonnemark, M., Brekkan, E., Magnusson, A., Tolf, A., Wallgren, A.C., Andersson, B., Adamson, L., Kiessling, R., and Karlsson-Parra, A. (2017). Intratumorally injected pro-inflammatory allogeneic dendritic cells as immune enhancers: a first-in-human study in unfavourable risk patients with metastatic renal cell carcinoma. *Journal for immunotherapy of cancer* 5, 52.
155. Lauss, M., Donia, M., Harbst, K., Andersen, R., Mitra, S., Rosengren, F., Salim, M., Vallon-Christersson, J., Tornngren, T., Kvist, A., *et al.* (2017). Mutational and putative neoantigen load predict clinical benefit of adoptive T cell therapy in melanoma. *Nature communications* 8, 1738.
156. Leal, M., Sapra, P., Hurvitz, S.A., Senter, P., Wahl, A., Schutten, M., Shah, D.K., Haddish-Berhane, N., and Kabbarah, O. (2014). Antibody-drug conjugates: an emerging modality for the treatment of cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1321, 41-54.

157. Lee, H.J., Kim, Y.A., Sim, C.K., Heo, S.H., Song, I.H., Park, H.S., Park, S.Y., Bang, W.S., Park, I.A., Lee, M., *et al.* (2017). Expansion of tumor-infiltrating lymphocytes and their potential for application as adoptive cell transfer therapy in human breast cancer. *Oncotarget* *8*, 113345-113359.
158. Lee, J.S., and Ruppin, E. (2019). Multiomics Prediction of Response Rates to Therapies to Inhibit Programmed Cell Death 1 and Programmed Cell Death 1 Ligand 1. *JAMA oncology* *5*, 1614-1618.
159. Lee, P., and Gujar, S. (2018). Potentiating prostate cancer immunotherapy with oncolytic viruses. *Nature reviews Urology* *15*, 235-250.
160. Leitzmann, M.F., and Rohrmann, S. (2012). Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. *Clinical epidemiology* *4*, 1-11.
161. Lesterhuis, W.J., Haanen, J.B., and Punt, C.J. (2011). Cancer immunotherapy--revisited. *Nat Rev Drug Discov* *10*, 591-600.
162. Liede, A., Karlan, B.Y., and Narod, S.A. (2004). Cancer risks for male carriers of germline mutations in BRCA1 or BRCA2: a review of the literature. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *22*, 735-742.
163. Linette, G.P., Stadtmauer, E.A., Maus, M.V., Rapoport, A.P., Levine, B.L., Emery, L., Litzky, L., Bagg, A., Carreno, B.M., Cimino, P.J., *et al.* (2013). Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. *Blood* *122*, 863-871.
164. Lipson, E.J., Sharfman, W.H., Drake, C.G., Wollner, I., Taube, J.M., Anders, R.A., Xu, H., Yao, S., Pons, A., Chen, L., *et al.* (2013). Durable cancer regression off-treatment and effective reinduction therapy with an anti-PD-1 antibody. *Clin Cancer Res* *19*, 462-468.
165. Litwin, M.S., and Tan, H.J. (2017). The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA* *317*, 2532-2542.
166. Liu, Q., Sun, Z., and Chen, L. (2020). Memory T cells: strategies for optimizing tumor immunotherapy. *Protein & cell* *11*, 549-564.
167. Loi, S., Sirtaine, N., Piette, F., Salgado, R., Viale, G., Van Eenoo, F., Rouas, G., Francis, P., Crown, J.P., Hitre, E., *et al.* (2013). Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *31*, 860-867.
168. Lovf, M., Zhao, S., Axcrona, U., Johannessen, B., Bakken, A.C., Carm, K.T., Hoff, A.M., Myklebost, O., Meza-Zepeda, L.A., Lie, A.K., *et al.* (2019). Multifocal Primary Prostate Cancer Exhibits High Degree of Genomic Heterogeneity. *European urology* *75*, 498-505.
169. Lu, Z., Williamson, S.R., Carskadon, S., Arachchige, P.D., Dhamdhare, G., Schultz, D.S., Stricker, H., Peabody, J.O., Jeong, W., Chitale, D.A., *et al.* (2020). Clonal evaluation of early onset prostate cancer by expression profiling of ERG, SPINK1, ETV1, and ETV4 on whole-mount radical prostatectomy tissue. *The Prostate* *80*, 38-50.
170. Luke, J.J., Bao, R., Sweis, R.F., Spranger, S., and Gajewski, T.F. (2019). WNT/beta-catenin Pathway Activation Correlates with Immune Exclusion across Human Cancers. *Clin Cancer Res* *25*, 3074-3083.
171. Luo, J., Solimini, N.L., and Elledge, S.J. (2009). Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* *136*, 823-837.
172. Ma, Q., Gomes, E.M., Lo, A.S., and Junghans, R.P. (2014). Advanced generation anti-prostate specific membrane antigen designer T cells for prostate cancer immunotherapy. *The Prostate* *74*, 286-296.

173. Madan, R.A., Gulley, J.L., Schlom, J., Steinberg, S.M., Liewehr, D.J., Dahut, W.L., and Arlen, P.M. (2008). Analysis of overall survival in patients with nonmetastatic castration-resistant prostate cancer treated with vaccine, nilutamide, and combination therapy. *Clin Cancer Res* *14*, 4526-4531.
174. Marin-Acevedo, J.A., Dholaria, B., Soyano, A.E., Knutson, K.L., Chumsri, S., and Lou, Y. (2018). Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges. *Journal of hematology & oncology* *11*, 39.
175. Maude, S.L., Laetsch, T.W., Buechner, J., Rives, S., Boyer, M., Bittencourt, H., Bader, P., Verneris, M.R., Stefanski, H.E., Myers, G.D., *et al.* (2018). Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *The New England journal of medicine* *378*, 439-448.
176. Maus, M.V., Fraietta, J.A., Levine, B.L., Kalos, M., Zhao, Y., and June, C.H. (2014). Adoptive immunotherapy for cancer or viruses. *Annu Rev Immunol* *32*, 189-225.
177. Melief, C.J., and van der Burg, S.H. (2008). Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nature reviews Cancer* *8*, 351-360.
178. Meng, W., Hao, Y., He, C., Li, L., and Zhu, G. (2019). Exosome-orchestrated hypoxic tumor microenvironment. *Mol Cancer* *18*, 57.
179. Michielsen, A.J., Ryan, E.J., and O'Sullivan, J.N. (2012). Dendritic cell inhibition correlates with survival of colorectal cancer patients on bevacizumab treatment. *Oncoimmunology* *1*, 1445-1447.
180. Ming Lim, C., Stephenson, R., Salazar, A.M., and Ferris, R.L. (2013). TLR3 agonists improve the immunostimulatory potential of cetuximab against EGFR(+) head and neck cancer cells. *Oncoimmunology* *2*, e24677.
181. Monteran, L., and Erez, N. (2019). The Dark Side of Fibroblasts: Cancer-Associated Fibroblasts as Mediators of Immunosuppression in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in immunology* *10*, 1835.
182. Morgan, R.A., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Hughes, M.S., Yang, J.C., Sherry, R.M., Royal, R.E., Topalian, S.L., Kammula, U.S., Restifo, N.P., *et al.* (2006). Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* *314*, 126-129.
183. Mouw, K.W., Goldberg, M.S., Konstantinopoulos, P.A., and D'Andrea, A.D. (2017). DNA Damage and Repair Biomarkers of Immunotherapy Response. *Cancer discovery* *7*, 675-693.
184. Mueller, M.M., and Fusenig, N.E. (2004). Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature reviews Cancer* *4*, 839-849.
185. Mulcahy Levy, J.M., and Thorburn, A. (2020). Autophagy in cancer: moving from understanding mechanism to improving therapy responses in patients. *Cell Death Differ* *27*, 843-857.
186. Nair, S., Archer, G.E., and Tedder, T.F. (2012). Isolation and generation of human dendritic cells. *Current protocols in immunology / edited by John E Coligan [et al] Chapter 7, Unit 7 32*.
187. Ness, N., Andersen, S., Valkov, A., Nordby, Y., Donnem, T., Al-Saad, S., Busund, L.T., Bremnes, R.M., and Richardsen, E. (2014). Infiltration of CD8+ lymphocytes is an independent prognostic factor of biochemical failure-free survival in prostate cancer. *The Prostate* *74*, 1452-1461.
188. Nielsen, M., Krarup-Hansen, A., Hovgaard, D., Petersen, M.M., Loya, A.C., Westergaard, M.C.W., Svane, I.M., and Junker, N. (2020). In vitro 4-1BB stimulation promotes expansion of CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes from various sarcoma subtypes. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* *69*, 2179-2191.

189. Noguchi, M., Arai, G., Matsumoto, K., Naito, S., Moriya, F., Suekane, S., Komatsu, N., Matsueda, S., Sasada, T., Yamada, A., *et al.* (2015). Phase I trial of a cancer vaccine consisting of 20 mixed peptides in patients with castration-resistant prostate cancer: dose-related immune boosting and suppression. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* *64*, 493-505.
190. Noguchi, M., Kakuma, T., Uemura, H., Nasu, Y., Kumon, H., Hirao, Y., Moriya, F., Suekane, S., Matsuoka, K., Komatsu, N., *et al.* (2010). A randomized phase II trial of personalized peptide vaccine plus low dose estramustine phosphate (EMP) versus standard dose EMP in patients with castration resistant prostate cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* *59*, 1001-1009.
191. Okada, H., Kalinski, P., Ueda, R., Hoji, A., Kohanbash, G., Donegan, T.E., Mintz, A.H., Engh, J.A., Bartlett, D.L., Brown, C.K., *et al.* (2011). Induction of CD8+ T-cell responses against novel glioma-associated antigen peptides and clinical activity by vaccinations with α -type 1 polarized dendritic cells and polyinosinic-polycytidylic acid stabilized by lysine and carboxymethylcellulose in patients with recurrent malignant glioma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *29*, 330-336.
192. Othman, N., Jamal, R., and Abu, N. (2019). Cancer-Derived Exosomes as Effectors of Key Inflammation-Related Players. *Frontiers in immunology* *10*, 2103.
193. Page, S.T., Plymate, S.R., Bremner, W.J., Matsumoto, A.M., Hess, D.L., Lin, D.W., Amory, J.K., Nelson, P.S., and Wu, J.D. (2006). Effect of medical castration on CD4+ CD25+ T cells, CD8+ T cell IFN-gamma expression, and NK cells: a physiological role for testosterone and/or its metabolites. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *290*, E856-863.
194. Palucka, K., and Banchereau, J. (2013). Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity* *39*, 38-48.
195. Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer* *12*, 252-264.
196. Park, J.H., Riviere, I., Gonen, M., Wang, X., Senechal, B., Curran, K.J., Sauter, C., Wang, Y., Santomasso, B., Mead, E., *et al.* (2018). Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *The New England journal of medicine* *378*, 449-459.
197. Parkhurst, M.R., Yang, J.C., Langan, R.C., Dudley, M.E., Nathan, D.A., Feldman, S.A., Davis, J.L., Morgan, R.A., Merino, M.J., Sherry, R.M., *et al.* (2011). T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* *19*, 620-626.
198. Patel, S., Fu, S., Mastio, J., Dominguez, G.A., Purohit, A., Kossenkov, A., Lin, C., Alicea-Torres, K., Sehgal, M., Nefedova, Y., *et al.* (2018). Unique pattern of neutrophil migration and function during tumor progression. *Nat Immunol* *19*, 1236-1247.
199. Patterson, J.T., Isaacson, J., Kerwin, L., Atassi, G., Duggal, R., Bresson, D., Zhu, T., Zhou, H., Fu, Y., and Kaufmann, G.F. (2017). PSMA-targeted bispecific Fab conjugates that engage T cells. *Bioorg Med Chem Lett* *27*, 5490-5495.
200. Peng, P.D., Cohen, C.J., Yang, S., Hsu, C., Jones, S., Zhao, Y., Zheng, Z., Rosenberg, S.A., and Morgan, R.A. (2009). Efficient nonviral Sleeping Beauty transposon-based TCR gene transfer to peripheral blood lymphocytes confers antigen-specific antitumor reactivity. *Gene therapy* *16*, 1042-1049.
201. Peranzoni, E., Lemoine, J., Vimeux, L., Feuillet, V., Barrin, S., Kantari-Mimoun, C., Bercovici, N., Guerin, M., Biton, J., Ouakrim, H., *et al.* (2018). Macrophages impede CD8 T cells from reaching tumor cells and limit the efficacy of anti-PD-1 treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* *115*, E4041-E4050.

202. Pilon-Thomas, S., Kuhn, L., Ellwanger, S., Janssen, W., Royster, E., Marzban, S., Kudchadkar, R., Zager, J., Gibney, G., Sondak, V.K., *et al.* (2012). Efficacy of adoptive cell transfer of tumor-infiltrating lymphocytes after lymphopenia induction for metastatic melanoma. *Journal of immunotherapy* 35, 615-620.
203. Pinchuk, I.V., Saada, J.I., Beswick, E.J., Boya, G., Qiu, S.M., Mifflin, R.C., Raju, G.S., Reyes, V.E., and Powell, D.W. (2008). PD-1 ligand expression by human colonic myofibroblasts/fibroblasts regulates CD4+ T-cell activity. *Gastroenterology* 135, 1228-1237, 1237 e1221-1222.
204. Plosker, G.L. (2011). Sipuleucel-T: in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Drugs* 71, 101-108.
205. Podrazil, M., Horvath, R., Becht, E., Rozkova, D., Bilkova, P., Sochorova, K., Hromadkova, H., Kayserova, J., Vavrova, K., Lastovicka, J., *et al.* (2015). Phase I/II clinical trial of dendritic-cell based immunotherapy (DCVAC/PCa) combined with chemotherapy in patients with metastatic, castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget* 6, 18192-18205.
206. Poch, M., Hall, M., Joerger, A., Kodumudi, K., Beatty, M., Innamarato, P.P., Bunch, B.L., Fishman, M.N., Zhang, J., Sexton, W.J., *et al.* (2018). Expansion of tumor infiltrating lymphocytes (TIL) from bladder cancer. *Oncoimmunology* 7, e1476816.
207. Pol, J., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2016). First oncolytic virus approved for melanoma immunotherapy. *Oncoimmunology* 5, e1115641.
208. 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.
209. Porter, D.L., Hwang, W.T., Frey, N.V., Lacey, S.F., Shaw, P.A., Loren, A.W., Bagg, A., Marcucci, K.T., Shen, A., Gonzalez, V., *et al.* (2015). Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Science translational medicine* 7, 303ra139.
210. Pu, Y., Xu, M., Liang, Y., Yang, K., Guo, Y., Yang, X., and Fu, Y.X. (2016). Androgen receptor antagonists compromise T cell response against prostate cancer leading to early tumor relapse. *Science translational medicine* 8, 333ra347.
211. Radvanyi, L.G., Bernatchez, C., Zhang, M., Fox, P.S., Miller, P., Chacon, J., Wu, R., Lizee, G., Mahoney, S., Alvarado, G., *et al.* (2012). Specific lymphocyte subsets predict response to adoptive cell therapy using expanded autologous tumor-infiltrating lymphocytes in metastatic melanoma patients. *Clin Cancer Res* 18, 6758-6770.
212. Rajagopal, C., and Harikumar, K.B. (2018). The Origin and Functions of Exosomes in Cancer. *Frontiers in oncology* 8, 66.
213. Rankin, E.B., and Giaccia, A.J. (2016). Hypoxic control of metastasis. *Science* 352, 175-180.
214. Rapoport, A.P., Stadtmauer, E.A., Binder-Scholl, G.K., Goloubeva, O., Vogl, D.T., Lacey, S.F., Badros, A.Z., Garfall, A., Weiss, B., Finklestein, J., *et al.* (2015). NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nat Med* 21, 914-921.
215. Rawla, P. (2019). Epidemiology of Prostate Cancer. *World journal of oncology* 10, 63-89.
216. Rebbeck, T.R., Devesa, S.S., Chang, B.L., Bunker, C.H., Cheng, I., Cooney, K., Eeles, R., Fernandez, P., Giri, V.N., Gueye, S.M., *et al.* (2013). Global patterns of prostate cancer incidence, aggressiveness, and mortality in men of african descent. *Prostate cancer* 2013, 560857.
217. Restifo, N.P., Dudley, M.E., and Rosenberg, S.A. (2012). Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol* 12, 269-281.

218. Rice, J., Ottensmeier, C.H., and Stevenson, F.K. (2008). DNA vaccines: precision tools for activating effective immunity against cancer. *Nature reviews Cancer* 8, 108-120.
219. Riddell, S.R., Watanabe, K.S., Goodrich, J.M., Li, C.R., Agha, M.E., and Greenberg, P.D. (1992). Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 257, 238-241.
220. Robbins, P.F., Li, Y.F., El-Gamil, M., Zhao, Y., Wargo, J.A., Zheng, Z., Xu, H., Morgan, R.A., Feldman, S.A., Johnson, L.A., *et al.* (2008). Single and dual amino acid substitutions in TCR CDRs can enhance antigen-specific T cell functions. *J Immunol* 180, 6116-6131.
221. Robbins, P.F., Morgan, R.A., Feldman, S.A., Yang, J.C., Sherry, R.M., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Nahvi, A.V., Helman, L.J., Mackall, C.L., *et al.* (2011). Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, 917-924.
222. Robert, C., and Mateus, C. (2011). [Anti-CTLA-4 monoclonal antibody: a major step in the treatment of metastatic melanoma]. *Med Sci (Paris)* 27, 850-858.
223. Rosenberg, S.A., Fox, E., and Churchill, W.H. (1972). Spontaneous regression of hepatic metastases from gastric carcinoma. *Cancer* 29, 472-474.
224. Rosenberg, S.A., Packard, B.S., Aebersold, P.M., Solomon, D., Topalian, S.L., Toy, S.T., Simon, P., Lotze, M.T., Yang, J.C., Seipp, C.A., *et al.* (1988). Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *The New England journal of medicine* 319, 1676-1680.
225. Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Sherry, R.M., Kammula, U.S., Hughes, M.S., Phan, G.Q., Citrin, D.E., Restifo, N.P., Robbins, P.F., Wunderlich, J.R., *et al.* (2011). Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 17, 4550-4557.
226. Ross, S.H., and Cantrell, D.A. (2018). Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 36, 411-433.
227. Rotte, A. (2019). Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 38, 255.
228. Rouleau, M., Patel, A., Hendzel, M.J., Kaufmann, S.H., and Poirier, G.G. (2010). PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nature reviews Cancer* 10, 293-301.
229. Rowshanravan, B., Halliday, N., and Sansom, D.M. (2018). CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood* 131, 58-67.
230. Rubio, V., Stuge, T.B., Singh, N., Betts, M.R., Weber, J.S., Roederer, M., and Lee, P.P. (2003). Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells. *Nat Med* 9, 1377-1382.
231. Sato, E., Olson, S.H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H., Qian, F., Jungbluth, A.A., Frosina, D., Gnjatic, S., Ambrosone, C., *et al.* (2005). Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18538-18543.
232. Scott, S.D. (1998). Rituximab: a new therapeutic monoclonal antibody for non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Pract* 6, 195-197.
233. Sfanos, K.S., and De Marzo, A.M. (2012). Prostate cancer and inflammation: the evidence. *Histopathology* 60, 199-215.
234. Sfanos, K.S., Isaacs, W.B., and De Marzo, A.M. (2013). Infections and inflammation in prostate cancer. *American journal of clinical and experimental urology* 1, 3-11.
235. Sharma, P., Pachynski, R.K., Narayan, V., Flechon, A., Gravis, G., Galsky, M.D., Mahammedi, H., Patnaik, A., Subudhi, S.K., Ciprotti, M., *et al.* (2020). Nivolumab Plus Ipilimumab for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Preliminary Analysis of Patients in the CheckMate 650 Trial. *Cancer Cell* 38, 489-499 e483.

236. Sheikh, N.A., Petrylak, D., Kantoff, P.W., Dela Rosa, C., Stewart, F.P., Kuan, L.Y., Whitmore, J.B., Trager, J.B., Poehlein, C.H., Frohlich, M.W., *et al.* (2013). Sipuleucel-T immune parameters correlate with survival: an analysis of the randomized phase 3 clinical trials in men with castration-resistant prostate cancer. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 62, 137-147.
237. Schellhammer, P.F., Chodak, G., Whitmore, J.B., Sims, R., Frohlich, M.W., and Kantoff, P.W. (2013). Lower baseline prostate-specific antigen is associated with a greater overall survival benefit from sipuleucel-T in the Immunotherapy for Prostate Adenocarcinoma Treatment (IMPACT) trial. *Urology* 81, 1297-1302.
238. Scholz, M., Yep, S., Chancey, M., Kelly, C., Chau, K., Turner, J., Lam, R., and Drake, C.G. (2017). Phase I clinical trial of sipuleucel-T combined with escalating doses of ipilimumab in progressive metastatic castrate-resistant prostate cancer. *Immunotargets Ther* 6, 11-16.
239. Schumacher, T.N., and Schreiber, R.D. (2015). Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* 348, 69-74.
240. Silvestri, I., Cattarino, S., Giantulli, S., Nazzari, C., Collalti, G., and Sciarra, A. (2016). A Perspective of Immunotherapy for Prostate Cancer. *Cancers* 8.
241. Sinha, R., Park, Y., Graubard, B.I., Leitzmann, M.F., Hollenbeck, A., Schatzkin, A., and Cross, A.J. (2009). Meat and meat-related compounds and risk of prostate cancer in a large prospective cohort study in the United States. *American journal of epidemiology* 170, 1165-1177.
242. Smith, K.A. (1980). T-cell growth factor. *Immunol Rev* 51, 337-357.
243. Solimini, N.L., Luo, J., and Elledge, S.J. (2007). Non-oncogene addiction and the stress phenotype of cancer cells. *Cell* 130, 986-988.
244. Solinas, C., Chanza, N.M., Awada, A., and Scartozzi, M. (2017). The immune infiltrate in prostate, bladder and testicular tumors: An old friend for new challenges. *Cancer treatment reviews* 53, 138-145.
245. Speiser, D.E., Ho, P.C., and Verdeil, G. (2016). Regulatory circuits of T cell function in cancer. *Nat Rev Immunol* 16, 599-611.
246. Sprooten, J., Ceusters, J., Coosemans, A., Agostinis, P., De Vleeschouwer, S., Zitvogel, L., Kroemer, G., Galluzzi, L., and Garg, A.D. (2019). Trial watch: dendritic cell vaccination for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 8, e1638212.
247. Srivastava, S., and Riddell, S.R. (2018). Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy: Challenges to Bench-to-Bedside Efficacy. *J Immunol* 200, 459-468.
248. Stakheev, D., Taborska, P., Strizova, Z., Podrazil, M., Bartunkova, J., and Smrz, D. (2019). The WNT/beta-catenin signaling inhibitor XAV939 enhances the elimination of LNCaP and PC-3 prostate cancer cells by prostate cancer patient lymphocytes in vitro. *Scientific reports* 9, 4761.
249. Stanislawski, T., Voss, R.H., Lotz, C., Sadovnikova, E., Willemsen, R.A., Kuball, J., Ruppert, T., Bolhuis, R.L., Melief, C.J., Huber, C., *et al.* (2001). Circumventing tolerance to a human MDM2-derived tumor antigen by TCR gene transfer. *Nat Immunol* 2, 962-970.
250. Strasner, A., and Karin, M. (2015). Immune Infiltration and Prostate Cancer. *Frontiers in oncology* 5, 128.
251. Strebhardt, K., and Ullrich, A. (2008). Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature reviews Cancer* 8, 473-480.
252. Tagawa, S.T., Milowsky, M.I., Morris, M., Vallabhajosula, S., Christos, P., Akhtar, N.H., Osborne, J., Goldsmith, S.J., Larson, S., Taskar, N.P., *et al.* (2013). Phase II study of Lutetium-177-labeled anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 19, 5182-5191.
253. Tagawa, S.T., Vallabhajosula, S., Christos, P.J., Jhanwar, Y.S., Batra, J.S., Lam, L., Osborne, J., Beltran, H., Molina, A.M., Goldsmith, S.J., *et al.* (2019). Phase 1/2 study of

fractionated dose lutetium-177-labeled anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 ((177) Lu-J591) for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancer* 125, 2561-2569.

254. Taguchi, S., Fukuhara, H., Homma, Y., and Todo, T. (2017). Current status of clinical trials assessing oncolytic virus therapy for urological cancers. *Int J Urol* 24, 342-351.

255. Taylor, A., Harker, J.A., Chanthong, K., Stevenson, P.G., Zuniga, E.I., and Rudd, C.E. (2016). Glycogen Synthase Kinase 3 Inactivation Drives T-bet-Mediated Downregulation of Co-receptor PD-1 to Enhance CD8(+) Cytolytic T Cell Responses. *Immunity* 44, 274-286.

256. Tewari, A.K., Stockert, J.A., Yadav, S.S., Yadav, K.K., and Khan, I. (2018). Inflammation and Prostate Cancer. *Adv Exp Med Biol* 1095, 41-65.

257. Thommen, D.S., and Schumacher, T.N. (2018). T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell* 33, 547-562.

258. Thorburn, J., Andrysik, Z., Staskiewicz, L., Gump, J., Maycotte, P., Oberst, A., Green, D.R., Espinosa, J.M., and Thorburn, A. (2014). Autophagy controls the kinetics and extent of mitochondrial apoptosis by regulating PUMA levels. *Cell reports* 7, 45-52.

259. Topp, M.S., Gokbuget, N., Zugmaier, G., Degenhard, E., Goebeler, M.E., Klinger, M., Neumann, S.A., Horst, H.A., Raff, T., Viardot, A., *et al.* (2012). Long-term follow-up of hematologic relapse-free survival in a phase 2 study of blinatumomab in patients with MRD in B-lineage ALL. *Blood* 120, 5185-5187.

260. Towers, C.G., and Thorburn, A. (2016). Therapeutic Targeting of Autophagy. *EBioMedicine* 14, 15-23.

261. Tran, K.Q., Zhou, J., Durflinger, K.H., Langhan, M.M., Shelton, T.E., Wunderlich, J.R., Robbins, P.F., Rosenberg, S.A., and Dudley, M.E. (2008). Minimally cultured tumor-infiltrating lymphocytes display optimal characteristics for adoptive cell therapy. *Journal of immunotherapy* 31, 742-751.

262. Trujillo, J.A., Sweis, R.F., Bao, R., and Luke, J.J. (2018). T Cell-Inflamed versus Non-T Cell-Inflamed Tumors: A Conceptual Framework for Cancer Immunotherapy Drug Development and Combination Therapy Selection. *Cancer immunology research* 6, 990-1000.

263. Tsuji, T., Yasukawa, M., Matsuzaki, J., Ohkuri, T., Chamoto, K., Wakita, D., Azuma, T., Niiya, H., Miyoshi, H., Kuzushima, K., *et al.* (2005). Generation of tumor-specific, HLA class I-restricted human Th1 and Tc1 cells by cell engineering with tumor peptide-specific T-cell receptor genes. *Blood* 106, 470-476.

264. Turcotte, S., Gros, A., Hogan, K., Tran, E., Hinrichs, C.S., Wunderlich, J.R., Dudley, M.E., and Rosenberg, S.A. (2013). Phenotype and function of T cells infiltrating visceral metastases from gastrointestinal cancers and melanoma: implications for adoptive cell transfer therapy. *J Immunol* 191, 2217-2225.

265. Turtle, C.J., Hay, K.A., Hanafi, L.A., Li, D., Cherian, S., Chen, X., Wood, B., Lozanski, A., Byrd, J.C., Heimfeld, S., *et al.* (2017). Durable Molecular Remissions in Chronic Lymphocytic Leukemia Treated With CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells After Failure of Ibrutinib. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 35, 3010-3020.

266. Vacchelli, E., Eggermont, A., Fridman, W.H., Galon, J., Tartour, E., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2013a). Trial Watch: Adoptive cell transfer for anticancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 2, e24238.

267. Vacchelli, E., Eggermont, A., Galon, J., Sautes-Fridman, C., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2013b). Trial watch: Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Oncoimmunology* 2, e22789.

268. Vaishampayan, U., Thakur, A., Rathore, R., Kouttab, N., and Lum, L.G. (2015). Phase I Study of Anti-CD3 x Anti-Her2 Bispecific Antibody in Metastatic Castrate Resistant Prostate Cancer Patients. *Prostate cancer* 2015, 285193.
269. van Horssen, R., Ten Hagen, T.L., and Eggermont, A.M. (2006). TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *The oncologist* 11, 397-408.
270. Vapiwala, N., Hofman, M.S., Murphy, D.G., Williams, S., and Sweeney, C. (2019). Strategies for Evaluation of Novel Imaging in Prostate Cancer: Putting the Horse Back Before the Cart. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 37, 765-769.
271. Varga, A., Piha-Paul, S., Ott, P.A., Mehnert, J.M., Berton-Rigaud, D., Morosky, A., Yang, P., Ruman, J., and Matei, D. (2019). Pembrolizumab in patients with programmed death ligand 1-positive advanced ovarian cancer: Analysis of KEYNOTE-028. *Gynecologic oncology* 152, 243-250.
272. Venkitaraman, A.R. (2014). Cancer suppression by the chromosome custodians, BRCA1 and BRCA2. *Science* 343, 1470-1475.
273. Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature reviews Cancer* 8, 755-768.
274. Vlachostergios, P.J., Niaz, M.J., Skafida, M., Mosallaie, S.A., Thomas, C., Christos, P.J., Osborne, J.R., Molina, A.M., Nanus, D.M., Bander, N.H., *et al.* (2021). Imaging expression of prostate-specific membrane antigen and response to PSMA-targeted beta-emitting radionuclide therapies in metastatic castration-resistant prostate cancer. *The Prostate* 81, 279-285.
275. Waldmann, T.A. (2018). *Cytokines in Cancer Immunotherapy*. Cold Spring Harbor perspectives in biology 10.
276. Wallgren, A.C., Andersson, B., Backer, A., and Karlsson-Parra, A. (2005). Direct allorecognition promotes activation of bystander dendritic cells and licenses them for Th1 priming: a functional link between direct and indirect allosensitization. *Scand J Immunol* 62, 234-242.
277. Walter, R.B. (2014). Biting back: BiTE antibodies as a promising therapy for acute myeloid leukemia. *Expert Rev Hematol* 7, 317-319.
278. Wang, Q., and Wu, X. (2017). Primary and acquired resistance to PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment. *International immunopharmacology* 46, 210-219.
279. Wang, Z., Sun, K., Xiao, Y., Feng, B., Mikule, K., Ma, X., Feng, N., Vellano, C.P., Federico, L., Marszalek, J.R., *et al.* (2019). Niraparib activates interferon signaling and potentiates anti-PD-1 antibody efficacy in tumor models. *Scientific reports* 9, 1853.
280. Webb, J.R., Milne, K., Watson, P., Deleeuw, R.J., and Nelson, B.H. (2014). Tumor-infiltrating lymphocytes expressing the tissue resident memory marker CD103 are associated with increased survival in high-grade serous ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 20, 434-444.
281. Weiner, L.M. (2007). Building better magic bullets--improving unconjugated monoclonal antibody therapy for cancer. *Nature reviews Cancer* 7, 701-706.
282. Weiner, L.M., Belldegrun, A.S., Crawford, J., Tolcher, A.W., Lockbaum, P., Arends, R.H., Navale, L., Amado, R.G., Schwab, G., and Figlin, R.A. (2008). Dose and schedule study of panitumumab monotherapy in patients with advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res* 14, 502-508.
283. Weiner, L.M., Surana, R., and Wang, S. (2010). Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 10, 317-327.
284. Wellen, K.E., and Thompson, C.B. (2012). A two-way street: reciprocal regulation of metabolism and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 270-276.

285. Wellenstein, M.D., and de Visser, K.E. (2018). Cancer-Cell-Intrinsic Mechanisms Shaping the Tumor Immune Landscape. *Immunity* 48, 399-416.
286. Westin, J.R., Chu, F., Zhang, M., Fayad, L.E., Kwak, L.W., Fowler, N., Romaguera, J., Hagemester, F., Fanale, M., Samaniego, F., *et al.* (2014). Safety and activity of PD1 blockade by pidilizumab in combination with rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: a single group, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology* 15, 69-77.
287. Winiarska, M., Glodkowska-Mrowka, E., Bil, J., and Golab, J. (2011). Molecular mechanisms of the antitumor effects of anti-CD20 antibodies. *Front Biosci (Landmark Ed)* 16, 277-306.
288. Xue, J., Yu, X., Xue, L., Ge, X., Zhao, W., and Peng, W. (2019). Intrinsic beta-catenin signaling suppresses CD8(+) T-cell infiltration in colorectal cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 115, 108921.
289. Yang, Y., Attwood, K., Bshara, W., Mohler, J.L., Guru, K., Xu, B., Kalinski, P., and Chatta, G. (2021). High intratumoral CD8(+) T-cell infiltration is associated with improved survival in prostate cancer patients undergoing radical prostatectomy. *The Prostate* 81, 20-28.
290. Yannelli, J.R., Hyatt, C., McConnell, S., Hines, K., Jacknin, L., Parker, L., Sanders, M., and Rosenberg, S.A. (1996). Growth of tumor-infiltrating lymphocytes from human solid cancers: summary of a 5-year experience. *Int J Cancer* 65, 413-421.
291. Yarchoan, M., Johnson, B.A., 3rd, Lutz, E.R., Laheru, D.A., and Jaffee, E.M. (2017). Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. *Nature reviews Cancer* 17, 569.
292. Yearley, J.H., Gibson, C., Yu, N., Moon, C., Murphy, E., Juco, J., Lunceford, J., Cheng, J., Chow, L.Q.M., Seiwert, T.Y., *et al.* (2017). PD-L2 Expression in Human Tumors: Relevance to Anti-PD-1 Therapy in Cancer. *Clin Cancer Res* 23, 3158-3167.
293. Yunger, S., Bar El, A., Zeltzer, L.A., Fridman, E., Raviv, G., Laufer, M., Schachter, J., Markel, G., Itzhaki, O., and Besser, M.J. (2019). Tumor-infiltrating lymphocytes from human prostate tumors reveal anti-tumor reactivity and potential for adoptive cell therapy. *Oncoimmunology* 8, e1672494.
294. Zeng, Z., Li, Y., Pan, Y., Lan, X., Song, F., Sun, J., Zhou, K., Liu, X., Ren, X., Wang, F., *et al.* (2018). Cancer-derived exosomal miR-25-3p promotes pre-metastatic niche formation by inducing vascular permeability and angiogenesis. *Nature communications* 9, 5395.
295. Zhang, L., and Romero, P. (2018). Metabolic Control of CD8(+) T Cell Fate Decisions and Antitumor Immunity. *Trends in molecular medicine* 24, 30-48.
296. Zhang, R., Qi, F., Shao, S., Li, G., and Feng, Y. (2019). Human colorectal cancer-derived carcinoma associated fibroblasts promote CD44-mediated adhesion of colorectal cancer cells to endothelial cells by secretion of HGF. *Cancer cell international* 19, 192.
297. Zhao, Y., Zheng, Z., Cohen, C.J., Gattinoni, L., Palmer, D.C., Restifo, N.P., Rosenberg, S.A., and Morgan, R.A. (2006). High-efficiency transfection of primary human and mouse T lymphocytes using RNA electroporation. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 13, 151-159.
298. Zipfel, P.F., and Skerka, C. (2009). Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol* 9, 729-740.
299. Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2012). Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 1, 1223-1225.

10. Seznam příložených publikací

Příloha 1:

Taborska, P., Stakheev, D., Strizova, Z., Vavrova, K., Podrazil, M., Bartunkova, J., and Smrz, D. (2017). Personalized ex vivo multiple peptide enrichment and detection of T cells reactive to multiple tumor-associated antigens in prostate cancer patients. *Medical oncology* 34, 173. (IF: 2.834)

Příloha 2:

Taborska, P., Lastovicka, J., Stakheev, D., Strizova, Z., Bartunkova, J., and Smrz, D. (2021a). SARS-CoV-2 spike glycoprotein-reactive T cells can be readily expanded from COVID-19 vaccinated donors. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.05.27.446089> (preprint)

Příloha 3:

Taborska, P.*, Stakheev, D.*, Svobodova, H., Strizova, Z., Bartunkova, J., and Smrz, D. (2020). Acute Conditioning of Antigen-Expanded CD8(+) T Cells via the GSK3beta-mTORC Axis Differentially Dictates Their Immediate and Distal Responses after Antigen Rechallenge. *Cancers* 12. (* co-first authors) (IF: 6.126)