

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta



Studijní program: Doktorské studium biomedicíny 1. LF UK

Studijní obor: Experimentální chirurgie

MUDr. Andrej Ozaniak

Nádorové mikroprostředí sarkomů měkkých tkání a jeho prediktivní význam
v moderní onkologické léčbě

Tumor microenvironment of soft tissue sarcomas and its predictive significance
in modern oncological treatment

Autoreferát disertační práce

Školitel:
MUDr. Zuzana Střížová, Ph.D.

Praha, 2023

OBSAH

1	ÚVOD.....	7
1.1	Sarkomy měkkých tkání	7
1.1.1	Epidemiologie a základní charakteristika	7
1.1.2	Diagnostika a léčba sarkomů měkkých tkání	7
1.2	Role imunitního systému v léčbě nádorů.....	8
1.2.1	Nádorové mikroprostředí.....	8
1.2.2	Protinádorová imunoterapie	9
2	HYPOTÉZA A CÍLE	11
3	METODIKA	12
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	13
4.1	„Diagnostic challenges and treatment options in patients with solitary fibrous tumor: A single-center observational study“	13
4.2	„Novel Insights into the Immunotherapy of Soft Tissue Sarcomas: Do We Need a Change of Perspective?“	13
4.3	„A novel anti-CD47-targeted blockade promotes immune activation in human soft tissue sarcoma but does not potentiate anti-PD-1 blockade“	15
5	ZÁVĚR.....	16
6	LITERATURA.....	17

Abstrakt

Sarkomy (Soft tissue sarcomas/STSs) jsou maligní nádory mezenchymálního původu, vyznačující se extrémní heterogenitou v histologické skladbě, biologickém chování i klinickém projevu. Většina se vyznačuje chemorezistencí a radiorezistencí. Klíčovým prognostickým faktorem pro celkové přežívání a riziko vzdálených metastáz je histopatologický stupeň diferenciaci neboli grade nádoru. Grade ovšem nemá vliv na riziko lokální recidivy. Radikální chirurgický zákrok je často jedinou možnou léčebnou modalitou nebo minimálně hraje hlavní roli v terapii. U generalizovaného onemocnění jsou možnosti léčby značně omezené. Chemosenzitivita STSs je všeobecně velmi nízká, s výjimkou některých méně častých podtypů, a celkově činí jenom 5–10 %. Radioterapie je v mnoha případech standardní součástí léčebného protokolu. Podává se zpravidla v neoadjuvantním nebo adjuvantním podání, ovšem její využití u generalizovaných pacientů je okrajové a nezlepšuje prognózu.

Protinádorová imunoterapie je terapeutická modalita, která využívá fyziologických schopností buněk imunitního systému v boji proti nádorovému onemocnění. Není tedy založena na cílené eliminaci rychle proliferujících nádorových buněk, nýbrž na stimulaci imunitních buněk za účelem likvidace nádorových antigenů. V oblasti imunoterapie měkkotkáňových sarkomů bylo testováno nespočet různých strategií, avšak na rozdíl od jiných solidních tumorů jako například maligního melanomu či karcinomu ledviny, nevedly u sarkomů tyto přístupy k signifikantní regresi nádorové hmoty. Jedním z hlavních důvodů je obrovská histologická heterogenita těchto nádorů a různorodá infiltrace sarkomů imunitními buňkami.

Cílem tohoto výzkumného projektu byla prospektivní a retrospektivní analýza nádorových vzorků u pacientů s měkkotkáňovým sarkomem, detailní popis nádorového mikroprostředí měkkotkáňových sarkomů a identifikace vhodných terapií pro pacienty s metastatickým onemocněním.

V rámci projektu jsme pracovali s vzácnými kohortami pacientů, které jsme dále dělili dle jejich histologie a dalších klinicko-patologických charakteristik. Prostřednictvím analýzy klinických vzorků, imunohistochemie, průtokové cytometrie a multiplexových metodik jsme vyhodnocovali nejen fenotypické a funkční charakteristiky imunitních buněk v měkkotkáňových sarkomech, ale hodnotili jsme též faktory, které ovlivňují četnost chirurgických komplikací, riziko recidivy či progresi onemocnění.

V naší první observační studii, která byla zaměřena pouze na histologickou entitu solitární fibrózní tumor, jsme pozorovali vysokou frekvenci mylných primárních diagnóz a vliv nádorové lokalizace na rozvoj metastáz či recidivu onemocnění. Definovali jsme faktory, které souvisely s pooperačními komplikacemi, a rozebrali úskalí diagnostiky a léčby solitárních fibrózních tumorů.

V další studii, kterou byl přehledový článek zabývající se nádorovým mikroprostředím měkkotkáňových sarkomů, jsme diskutovali všechna dostupná data týkající se role T-buněk v nádorovém mikroprostředí sarkomů měkkých tkání. Zaměřili jsme se mimo jiné i na další hojně se vyskytující imunitní buňky v nádorovém mikroprostředí a probírali jejich prognostickou a prediktivní roli. V této práci jsme prezentovali všechny klinické studie zaměřené na stimulaci imunitního systému prostřednictvím cílení konkrétní buněčné subpopulace u sarkomů měkkých tkání. Tyto studie jsme následně diskutovali z hlediska racionality přístupu a možných kombinací jednotlivých terapeutik.

V rámci našeho nejvýznamnějšího projektu jsme sledovali potenciální aditivní účinky kombinace anti-PD-1 a anti-CD47 imunoterapií v léčbě sarkomů měkkých tkání. Předpokládali jsme, že in vitro se budou účinky obou terapií potencovat, neboť nádorové mikroprostředí měkkotkáňových sarkomů má vysoké zastoupení makrofágů a druhou nejpočetnější populací imunitních buněk jsou T-buňky. Do kohorty jsme zařadili 66 pacientů, kterým byla nejprve stanovena exprese molekuly CD47 v nádorovém mikroprostředí. Následně byly vybraným pacientům izolovány tumor-infiltrující lymfocyty z nádorové tkáně a získané buněčné suspenze byly in vitro kultivovány za přítomnosti kostimulačních molekul, anti-PD-1 monoklonální protilátky (nivolumab), anti-CD47 monoklonální protilátky, a též za přítomnosti obou těchto terapeutik. Funkce buněk byla hodnocena prostřednictvím detekce cytokinů metodou Luminex. Zatímco u vybraných diagnóz byla in vitro účinnost jednotlivých terapií vyjádřena vysokou mírou aktivace imunitních buněk, kombinované podání obou terapeutik způsobilo zásadní útlum buněk a sníženou produkci prozánětlivých cytokinů.

Naše práce napomohly pochopení role nádorového mikroprostředí v prognóze pacientů s měkkotkáňovým sarkomem, definovaly faktory spojené s biologickým chováním nádorů a představily moderní přístupy, jimiž lze nádorové mikroprostředí analyzovat a hodnotit efekt imunoterapie.

Klíčová slova: sarkom měkké tkáně, imunoterapie, nádorové mikroprostředí, kombinovaná léčba, solitární fibrózní tumor, T-buňky, PD-1, CD47.

Abstract

Soft tissue sarcomas (STSs) are malignant tumors of mesenchymal origin, characterized by an extreme heterogeneity in histological composition, biological behavior, and clinical manifestation. Most STSs are chemo- and radiotherapy resistant. A key prognostic factor predicting the risk of distant metastases and affecting the overall survival is the tumor grade. However, grade has not been associated with the risk of local recurrence. Radical surgical procedure is in many cases the only possible treatment modality or at least plays a main role in the multimodal treatment. For patients with distant metastases, the treatment options are very limited. The chemosensitivity of STSs is generally very low, with the exception of several less common subtypes, and accounts for only 5–10% of the cases. In many cases, radiotherapy is a standard part of the treatment protocol. It is usually given in either neoadjuvant or adjuvant settings. However, radiotherapy administration in generalized patients does not improve the prognosis.

Cancer immunotherapy is a therapeutic modality that utilizes the physiological cytotoxic antitumoral abilities of the immune cells. Therefore, it does not target the rapidly proliferating tumor cells but rather stimulates the immune cells. A wide variety of different strategies have been tested in the treatment of soft tissue sarcomas, but unlike in other solid tumors, such as malignant melanoma or kidney cancer, these approaches did not lead to significant regression of the tumor mass in sarcomas. One of the main reasons is the enormous histological heterogeneity of these tumors and thus, diverse infiltration of STSs with the immune cells.

The aim of this research was to conduct a prospective and retrospective analysis of tumor samples from patients with soft tissue sarcoma. We also aimed to describe the tumor microenvironment of STSs and identify possible treatment modalities for patients with metastatic disease. We created and closely monitored our study cohort, which was divided into subgroups according to diverse criteria based on the tumor histology, the immune infiltration, the grade (low-grade/high-grade), and the stage of the disease. Formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue blocks were retrospectively obtained from patients and used for the immunohistochemical evaluation of immune infiltrates, including CD8⁺ T-cells, CD4⁺ T-cells, macrophages, and others immune cells in the tumors. Through analysis of the clinical specimens, immunohistochemistry, flow cytometry and multiplex methodology, we evaluated not only the phenotypes and functional characteristics of immune cells in sarcomas, but also factors affecting surgical complications, risk of local recurrence or distant spread.

In our first observational study that was focused on solitary fibrous tumors, we identified high rate of primary misdiagnoses and defined the role of primary tumor location on the development distant metastases or local recurrence of the disease. We reported several factors that were associated with postoperative complications and we discussed the pitfalls of diagnostics and treatment of solitary fibrous tumors.

In our review article, we further focused on the immune infiltrates in the tumor microenvironment of soft tissue sarcomas and we discussed all available data regarding the role of T-cells in the tumor microenvironment of soft tissue sarcomas. We also described other immune cells and we discussed their prognostic and predictive role. In this article, we presented all promising clinical trials focused on the stimulation of the immune system by targeting specific cell subpopulations in soft tissue sarcomas. Together we then discussed rational approaches and potential combinations of certain therapeutics.

In our key project, we were evaluating potential additive effects of anti-PD-1 and anti-CD47 combination therapy in soft tissue sarcomas. Given the fact that the TME of

soft tissue sarcomas in predominantly infiltrated by macrophages and T-cells, we hypothesized that a combination of both therapies may represent a particularly relevant approach. In this cohort we selected 66 patients. In this cohort study, 66 patients who underwent surgery were enrolled. Tumor cells and tumor-infiltrating immune cells were analyzed using flow cytometry and immunohistochemistry. In cell suspensions obtained from surgical resections, human T-cells were activated by superparamagnetic polymer beads and cultured in the absence or presence of therapeutic monoclonal antibodies (anti-PD-1, anti-CD47, and anti-PD-1 + anti-CD47). Supernatants from cell suspensions were analyzed using multiplex Luminex cytokine bead-based immunoassays. In selected histological subtypes, the efficacy of individual therapies was reflected in the high degree of activation of the immune cells, however to our surprise, co-administration of both therapies significantly decreased the production of proinflammatory cytokines.

Our work contributed to the understanding of the tumor microenvironment in soft tissue sarcomas and its role in patients' prognosis. Furthermore, we defined factors associated with biological behaviour of the tumors and introduced modern therapeutic approaches to analyse the tumor microenvironment and evaluate the effect of immunotherapy.

Keywords: soft tissue sarcoma, immunotherapy, tumor microenvironment, combined treatment, solitary fibrous tumor, T-cells, PD-1, CD47.

1 ÚVOD

1.1 Sarkomy měkkých tkání

1.1.1 Epidemiologie a základní charakteristika

Sarkomy jsou extrémně heterogenní skupinou maligních onemocnění, u nichž maligní nádorová populace vychází z embryonální mezenchymální tkáně, která dává vzniknout pojivové tkáni, jako je vazivo, chrupavka a kost, a dále cévám, svalům a nervům. Sarkomy představují jenom přibližně 1 % všech malignit v dospělé populaci. Celá skupina se dělí na dvě základní podskupiny – kostní sarkomy reprezentující přibližně 10 % sarkomů a sarkomy měkkých tkání (angl. soft tissue sarcoma, zkr. STS), které tvoří přibližně 90 % sarkomů. Nejčastějšími kostními sarkomy jsou osteosarkom, chondrosarkom a Ewingův sarkom. Pojem STS v současné době v sobě zahrnuje dle WHO klasifikace více než 80 histologických entit [1]. Ve všeobecnosti se jedná o extrémně vzácná maligní nádorová onemocnění, jejichž incidence jako celku se pohybuje kolem 6,4/100 000 případů ročně [2]. Grade nádoru je nejdůležitější prognostický faktor [3]. Mezi další důležité prognostické faktory patří velikost tumoru a jeho lokalizace, resektabilita tumoru, přítomnost vzdálených metastáz, kvalita chirurgických resekcí a předoperační/perioperační ruptura nádoru. Tumory lokalizované v retroperitoneu mají obecně nejhorší prognózu [4]. Současně platí, že pacienti starší 65 let mají horší prognózu než mladší [5, 6]. Výskyt STS je většinou sporadický. Ovšem dobře dokumentovaný je i jejich výskyt v rámci hereditárních syndromů [7-9]. STS se mohou vyskytovat prakticky kdekoli na těle. Většinou se manifestují jako nebolestivá rezistence různé velikosti. Mohou být povrchové, uložené epifasciálně, nebo v hloubce uložené, subfasciálně.

1.1.2 Diagnostika a léčba sarkomů měkkých tkání

Každá měkkotkáňová povrchová léze větší než 5 centimetrů nebo hluboce uložená jakékoliv velikosti by měla být referovaná do center specializujících se na problematiku sarkomů [10]. Po zhodnocení lokálního nálezu musí klinik rozhodnout ohledně způsobu odběru biopsie a dokončit kompletní staging [11, 12]. V rámci stagingu se provádí standardně CT hrudníku k vyloučení generalizace. Plíce jsou nejčastějším místem generalizace. Postižení lokoregionálních lymfatických uzlin je zcela výjimečné (< 1%). Základem diagnostiky je histopatologické vyšetření biopsických vzorků nádoru v rukách zkušeného patologa, specializujícího se na problematiku měkkotkáňových nádorů [13]. Součástí vyšetření je morfologie doplněná o imunohistochemické a často také molekulární metody [14]. Léčba pacientů s STS je ve většině případů multimodální. Kromě histologického podtypu a stadia nemoci zasahuje do způsobu léčby i primární lokalizace sarkomu a rozsah plánované resekce.

Chirurgická resekce je základní modalitou léčby. Prováděna by měla být onkochirurgem specializovaným v problematice STS. Základním cílem je provedení en-bloc excize s negativním mikroskopickým okrajem (R0). Ideálním způsobem k docílení toho je resekce tumoru s lemem zdravé tkáně. O šířce lemu rozhoduje několik faktorů – histologický typ nádoru, možnost neo/adjuvantní radioterapie, vzdálenost kritických struktur, přítomnost přirozených bariér (svalová fascie, vaskulární adventicie, periost, epineurium) [15].

Radioterapie je základní součástí léčby high-grade sarkomů [16]. Může být podána v neoadjuvantním nebo adjuvantním schématu.

Na podání chemoterapie u primárně resekabilních nádorů, v současné době neexistuje konsenzus mezi jednotlivými centry. Na místě je podání chemoterapie, preferenčně v neoadjuvantním podání u „high-risk“ pacientů [17, 18].

Základem léčby pokročilých/generalizovaných neresekabilních sarkomů je systémová chemoterapie. V první linii léčby se využívá antracyklinu v monoterapii nebo kombinované režimy, zejména s ifosfamidem [19, 20].

1.2 Role imunitního systému v léčbě nádorů

1.2.1 Nádorové mikroprostředí

Nádorové mikroprostředí se tradičně dělí na nádorový parenchym, tvořený maligně transformovanými buňkami vycházejícími z původního orgánu či tkáně, a nádorové stroma, které je tvořené nejen buňkami pojiva, ale též buňkami imunitními [21]. V posledních letech se pozornost výzkumu v protinádorové terapii obrátila právě na buňky stromatu a nyní existují terapie, které cíleně ovlivňují nádorovou angiogenezi, proces metastazování nebo imunitní buňky v nádoru [22]. Pojem tumor-infiltrující lymfocyty (TILs) byl zaveden pro populaci bílých krvinek, která opustila periferní krevní řečiště a vcestovala do nádorového mikroprostředí [23]. Ač je v nádoru celé spektrum imunitních buněk, jako jsou například NK buňky, makrofágy, neutrofilní leukocyty nebo dendritické buňky, pojem TILs je často užíván především pro heterogenní skupinu CD4⁺ a CD8⁺ T-buněk, které mají též největší vztah k prognóze pacienta [23].

Korelace dobré prognózy s mírou lymfocytární infiltrace byla jednoznačně zjištěna u karcinomu prsu, plic nebo ovaríí [24-26]. Zajímavou výjimku tvoří karcinom ledviny, u něhož se stoupajícím počtem infiltrujících T-buněk byla pozorována horší prognóza, zatímco vysoká infiltrace nádoru NK buňkami byla asociována s dlouhodobějším přežitím [27,28]. Rozporuplné nálezy v této oblasti zdůrazňují nutnost studia fenotypu a funkce TILs, protože samotné počty nemusejí mít vypovídající hodnotu. U sarkomů měkkých tkání nebylo nádorové mikroprostředí doposud příliš popsáno. Studie jsou limitovány nejen relativně nízkou infiltrací sarkomů imunitními buňkami, ale též vzácností a vysokou histologickou heterogenitou sarkomů, která brání designu velkých observačních studií [29]. Dnes předpokládáme, že nejvýznamnější imunitní populace měkkotkáňových sarkomů jsou T-buňky, NK buňky, makrofágy a T-regulační buňky. Makrofágy byly dokonce označeny několika studiemi za nejpočetnější skupinu buněk infiltrujících nádorové mikroprostředí u STS [29]. T-buňky v sarkomech mají různý fenotyp a jejich množství se významně liší v závislosti na histologickém typu sarkomu. Například v případě liposarkomů je WDLPS relativně vysoce infiltrován T-buňkami, zatímco MLPS má infiltraci téměř nulovou, a není tedy vhodným kandidátem pro imunoterapii checkpoint inhibitory [30]. Právě zastoupení imunitních infiltrátů v nádorech významně ovlivňuje to, jaký typ imunoterapie lze aplikovat. Dalším aspektem nádorového mikroprostředí je přítomnost tumor-specifických antigenů (TSA) [31]. Je-li definován nějaký TSA, je možné vytvořit imunoterapii cíleně proti danému antigenu. Většina moderních imunoterapií primárně cílí na obnovení efektivních funkcí T-buněk [32]. Jsou-li totiž T-buňky dlouhodobě vystaveny stimulaci antigenu, dochází u nich k útlumu efektorových funkcí, který je charakterizován snížením proliferační a cytolytické kapacity a zvýšenou expresí inhibičních molekul, jako jsou například PD1, LAG-3, TIM-

3 nebo CTLA-4 [33]. Tento stav a s ním související buněčný fenotyp nazýváme funkční vyčerpání [34]. Vyčerpání T-buněk je velmi typické pro nádorové mikroprostředí, nejedná se ovšem o stav nevratný [34]. Právě imunoterapeutické přístupy cílené na překonání imunologického vyčerpání v nádorovém mikroprostředí jsou nyní první linií léčby celé řady metastatických solidních tumorů [35].

Zatímco role NK buněk a CD8⁺ T-buněk je široce popisována v kontextu dobré prognózy u pacientů s vysokou infiltrací nádorového mikroprostředí těmito buňkami, makrofágy a jejich role v nádorech jsou značně kontroverzní [36]. Ukázalo se, že vlivem nádorového mikroprostředí může dojít k přesmyku fenotypu makrofágů a ty se stávají pro-tumorigenní [36, 37]. Jejich role pak spočívá především v tvorbě profibrogenních faktorů a tedy pomáhání v tvorbě účinné fibrotické bariéry, která brání nejen vstupu imunitních buněk do nádoru, ale též vstupu imunoterapií [37]. Makrofágy se zdají být nejčetnější populací v STS, ovšem jejich role není zdaleka objasněna [38]. Současně dodnes nejsou v klinických studiích u STS testovány terapie zaměřené na podporu protinádorového působení makrofágů [29].

1.2.2 Protinádorová imunoterapie

Imunoterapie nádorových onemocnění se stala revolučním přístupem v léčbě onkologických pacientů [39]. Význam tohoto přístupu je zřejmý i z Nobelovy ceny, která byla udělena v roce 2018 za objev takzvaných checkpoint inhibitorů, které jsou nyní první linií léčby celé řady metastatických nádorů [40]. Imunoterapie má více než stoletou tradici a překvapivě první nádorové onemocnění, které bylo v historii léčeno imunoterapií, byl měkkotkáňový sarkom [41, 42]. První imunoterapeutické přístupy spočívaly v inokulaci streptokoka do místa tumoru a umělém vytvoření erysipelu v této lokalitě. Infekce vedla k masivnímu náboru imunitních buněk do místa sarkomu a u vybraných pacientů došlo k regresi nádorové hmoty [41]. Tento přístup měl bohužel již v době svých počátků spoustu odpůrců a vzhledem k riziku systémové reakce spojené s umělým vyvoláním infekce v místě nádoru došlo postupně k upuštění od tohoto imunoterapeutického přístupu [43]. V dnešní době dělíme imunoterapeutické přístupy dle různých kritérií, z nichž jedním z nich je to, nakolik imunoterapeutický přístup nespécificky stimuluje celý imunitní systém nebo specificky ovlivňuje jednu buněčnou skupinu [44]. Do nespécifických stimulátorů řadíme například BCG vakcínu, která stále představuje významný přístup pro léčbu karcinomu močového měchýře, a dále jsou to například cytokiny, jejichž podávání je nyní vázáno především na kombinace s jinými terapiemi [45, 46]. Předmětem specifických imunoterapií se staly především T-buňky. T-buňky lze ovlivnit přímo aplikací monoklonálních protilátek, které brání jejich funkčnímu útlumu, nebo vyjmutím T-buněk z těla pacienta a jejich ex vivo modifikací [47, 48]. Nejrozšířenějším a technologicky jednodušším přístupem je aplikace monoklonálních protilátek, které se váží na inhibiční receptory T-buněk. Těmto protilátkám se říká checkpoint inhibitory [47]. Checkpoint inhibitory zásadně změnilы prognózu pacientů s diagnózami, jako jsou například maligní melanom, metastatický karcinom plic nebo karcinom ledviny [49-51]. Díky své schopnosti zredukovat i vzdálené metastázy se staly první linií léčby mnoha metastatických nádorových onemocnění, ovšem existuje i několik úskalí, která tuto terapii doprovázejí. Prvním úskalím je omezené množství pacientů, kteří na tuto terapii reagují [52]. V tuto chvíli se zdá, že u vybraných diagnóz je pozitivní odpověď na terapii okolo 25 % pacientů, zatímco u zbylých pacientů je klinický přínos minimální [53]. Snahou většiny současných studií je tedy modulace nádorového mikroprostředí tak, aby bylo zvýšeno procento pacientů, kteří na léčbu odpovědí [54]. Druhým úskalím je výskyt

autoimunitně podmíněných nežádoucích reakcí, které se ukázaly být novinkou ve světě onkologie a jejichž management spočívá především v nutnosti imunosupresivní terapie [55]. Přesto jsou checkpoint inhibitory významnou součástí moderní léčby nádorových onemocnění a jejich začlenění do léčebných algoritmů je žádoucí.

Další imunoterapeutické přístupy jsou například adoptivní T-buněčný transfer či terapie prostřednictvím CAR T-buněk [48, 56]. V obou případech jsou opět terčem léčby T-buňky. V případě adoptivního transferu jsou T-buňky izolovány z periferní krve nebo z nádoru pacienta, v laboratoři následně množeny do obrovských počtů, purifikovány, za pomoci dendritických buněk stimulovány nádorovými antigeny a následně injikovány zpět pacientovi [48]. Adoptivní transfer je vysoce personalizovanou léčbou, která je nyní předmětem klinických studií. Pro klinickou praxi byly již schváleny takzvané CAR T-buňky, a to především pro léčbu hematologických malignit. CAR T-buňky jsou geneticky modifikované T-buňky, na jejichž TCR receptor je navázaná monoklonální protilátka, aby k vazbě a aktivaci T-buňky docházelo bez nutnosti MHC molekul, které jsou jinak pro aktivaci T-buňky nezbytné [56]. CAR T-buňky představují průlom v léčbě akutní leukémie, a i přes jejich vysokou efektivitu je jejich široké užívání limitováno cenou přípravku [56, 57].

Pro solidní tumory se tedy zdá být metodou volby terapie checkpoint inhibitory ať už v monoterapii, či v kombinované léčbě [58]. Data naznačují, že checkpoint inhibitory v kombinacích vykazují vyšší účinnost než v monoterapii, a dokonce některé systémové terapie, jako jsou například chemoterapie či radioterapie, zvyšují citlivost nádorů k účinkům imunoterapie [59].

2 HYPOTÉZA A CÍLE

Cílem této práce bylo poskytnout detailní pohled na nádorové mikroprostředí různých podtypů sarkomů měkkých tkání a definovat faktory, které jsou asociované s klinicko-patologickými charakteristikami konkrétních malignit, za účelem rozšíření znalostí o tomto vzácném nádorovém onemocnění.

Naše primární hypotéza předpokládala, že imunitní infiltrace měkkotkáňových sarkomů závisí na histologickém podtypu nádoru a že větší množství klinických parametrů, jako jsou například lokalita nádoru nebo chirurgické komplikace, má vliv na riziko lokální recidivy a generalizace. Vytvořili jsme přehled všech dostupných informací o nádorovém mikroprostředí měkkotkáňových sarkomů, detailně jsme zkoumali histologickou entitu zvanou solitární fibrózní tumor a v neposlední řadě jsme vytvořili in vitro podmínky pro testování různých typů imunoterapie u vybraných pacientů s měkkotkáňovým sarkomem.

3 METODIKA

Popis konkrétních metodik je součástí publikovaných prací.

Metody strukturovaně:

a) Práce s klinicko-patologickými daty

Pro účely hodnocení biologického chování nádoru, jeho potenciálu k zakládání metastáz a rizika lokálních recidiv jsme získávali z centrální databáze Fakultní nemocnice Motol UNIS data o histologickém typu nádoru a jeho platný grade a stage. Z patientských dat jsme dále retrospektivně dohledali v našich pečlivě vedených kohortách záznamy týkající se operačních komplikací, počtu chybných diagnóz, předchozí dispenzarizace na jiných pracovištích, ale i stěžejní klinické proměnné, jako jsou věk či pohlaví pacienta. Soubory klinických dat byly anonymizovány a všechny identifikovatelné odkazy na jednotlivce byly odstraněny. Tento výzkum probíhal se souhlasem Etické komise.

b) Izolace tumor-infiltrujících lymfocytů (TILs)

Tumor-infiltrující lymfocyty byly izolovány bezprostředně po operaci z nativních tumorů po jejich vyjmutí z těla. Tato izolace probíhala za pomoci mechanického rozrušení tkáně nůžkami a následné kultivaci tkáňových fragmentů za přítomnosti enzymů degradujících extracelulární matrix. Tento postup umožnil rozrušení tkáně a následné pasírování tkáňové suspenze přes sto mikrometrů buněčné síto umožnilo získání buněčné suspenze s tumor-infiltrujícími lymfocyty.

c) Kultivace TILs a měření jejich aktivity

U vybraných pacientů jsme získané TILs kultivovali in vitro za přítomnosti terapeutických monoklonálních protilátek. Doba působení terapeutik činila zpravidla 24 hodin. Cytotoxické schopnosti buněk byly testovány nepřímo prostřednictvím produkce cytotoxických cytokinů v buněčných suspenzích.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 „Diagnostic challenges and treatment options in patients with solitary fibrous tumor: A single-center observational study“

OZANIAK A, HLADIK P, LISCHKE R, STRIZOVA Z.

Front Surg. 2022 Aug 31;9:952463. doi: 10.3389/fsurg.2022.952463.

Solitární fibrózní tumor (SFT), v minulosti také označován jako hemangiopericytom, je vzácný mezenchymální nádor s incidencí jenom kolem 2 případů na 1 000 000 lidí ročně. Některé podtypy SFT se vyznačují maligním metastatickým potenciálem. SFT patří k pomalu rostoucím nádorům, které se mohou vyskytovat kdekoliv na těle. Klinicky se prezentují především symptomy z působení tlaku primárního nádoru nebo metastázy v sousedních tkáních. Nejčastěji se vyskytují v oblasti hrudníku.

V naší studii jsme sdíleli naše klinicko-patologické zkušenosti s osmnácti pacienty s touto vzácnou diagnózou. Studie zahrnovala pacienty operované v letech 2014–2021. Medián sledování byl 36 měsíců. U 17 % našich pacientů se předoperační diagnóza neshodovala s pooperační histologií. Četnost chybných diagnóz byla proto značně vysoká, avšak korelovala s dříve publikovanými studiemi. Pozorovali jsme vyšší riziko lokální recidivy u pacientů, kteří na našem oddělení podstoupili operaci pro recidivující SFT, než u pacientů, kteří podstoupili operaci primární SFT (2/10 versus 4/6). Pooperační komplikace byly spojeny s mimohrudní lokalizací SFT. Pacienti s končetinovou lokalizací solitárního fibrózního tumoru měli obecně nejlepší prognózu a žádné známky recidivy či metastáz ve sledovaném období. Tato zjištění však byla omezena počtem účastníků studie a jejich relevance bude vyžadovat ověření dalším výzkumem. Pacienti, kteří vstupovali do studie již s recidivou solitárního fibrózního tumoru, vykazovali signifikantně vyšší šanci k další recidivě (67 %) a k systémové progresi došlo u 33 % pacientů, kteří byli přijati a léčeni pro recidivující SFT.

Základem léčby u lokalizovaného SFT zůstává radikální operace, kde je získání negativních resekcí okrajů nejdůležitějším faktorem prevence recidivy onemocnění. Dosažení radikální resekce s mikroskopicky negativním okrajem může být svízelná v důsledku přítomnosti kritických anatomických struktur.

Samotná radioterapie může významně zlepšit celkové přežití pacientů a kombinace chirurgického výkonu a radioterapie signifikantně snižuje riziko lokální recidivy. Domníváme se, že součástí sofistikovaného terapeutického schématu u SFT by měla být multimodální terapie, jejíž součástí by měly být také cílené terapie a imunoterapie. V současné době je třeba navrhnout nové klinické studie zaměřené na léčbu této vzácné choroby.

4.2 „Novel Insights into the Immunotherapy of Soft Tissue Sarcomas: Do We Need a Change of Perspective?“

OZANIAK A, VACHTENHEIM J JR, LISCHKE R, BARTUNKOVA J, STRIZOVA Z.

Biomedicines. 2021 Aug 1;9(8):935. doi: 10.3390/biomedicines9080935.

Měkkotkáňové sarkomy jsou extrémně biologicky a klinicky různorodé nádory s více než 80 histologickými podtypy. Vzhledem k extrémní vzácnosti těchto nádorů klinické studie často hodnotí všechny typy STS společně, což může přispět k nejednoznačným a někdy až kontroverzním výsledkům při evaluaci účinnosti terapií. Léčba metastatických STS se v posledních letech zásadně nezměnila a se současnými konvenčními terapiemi jsou šance na zlepšení celkového přežití velmi malé.

Nádorové mikroprostředí STS je infiltrováno různými podíly imunitních buněk, které umožňují stratifikovat pacienta podle imunitních parametrů. CD8⁺ T-buňky patří k hlavním protinádorovým hráčům v nádorovém mikroprostředí a vysoký podíl CD8⁺ T-buněk se stejně jako exprese checkpoint molekul staly nezbytnými předpoklady pro účinnost imunoterapie checkpoint inhibitory.

Vytvořili jsme přehledový článek, ve kterém jsme nejprve detailně popsali nejdůležitější imunitní buňky nacházející se v nádorovém mikroprostředí sarkomů měkkých tkání a následně jsme prezentovali klinické studie zaměřené na konkrétní buněčnou populaci u STS. Pleomorfní sarkom a myxofibrosarkom mají jednu z nejvyšších infiltrací CD8⁺ T-buňkami a nejvyšší expresi PD-1. Z tohoto důvodu se předpokládá dobrá účinnost checkpoint inhibitorů u těchto histologických podtypů. Pleomorfní sarkom má dokonce imunitní repertoár srovnatelný s maligním melanomem, což naznačuje jeho vhodnost pro aplikaci imunoterapeutik. Leiomyosarkomy a liposarkomy mají napříč studiemi obecně nízkou infiltraci CD8⁺ T-buňkami, což se odráží ve velmi neuspokojivých výsledcích klinických studií. Kombinované terapie checkpoint inhibitory, jako jsou například nivolumab plus pembrolizumab, ukázaly zvýšení klinické odezvy u pacientů s STS. Mezi další slibné terapie v klinických studiích patří adoptivní buněčný transfer nebo CAR T-buněčná terapie.

Leiomyosarkomy mají relativně vysokou zátěž T-regulačními buňkami a tato infiltrace pozitivně koreluje se stadiem, gradem a hloubkou nádoru. Navíc u nediferencovaných pleomorfních sarkomů se infiltrace T-regulačními buňkami zvyšuje po neoadjuvantní radioterapii a ovlivňuje celkové přežití pacientů. Zatímco intratumorální NK buňky vykazují četnou aktivaci, ale i znaky vyčerpání v nádorovém mikroprostředí, NK buňky v periferní krvi pacientů s STS byly popisovány jako funkčně poškozené.

Makrofágy dominují nádorovému mikroprostředí STS a převyšují počty ostatních imunitních buněk.

Je třeba poznamenat, že změny v zastoupení intratumorálních makrofágů byly prokázány u pacientů po neoadjuvantní chemoterapii. Terapie zaměřené na makrofágy jsou tedy u STS velmi slibné.

Se současnými znalostmi různých populací imunitních buněk infiltrujících STS nádory by se probíhající klinická praxe mohla zásadně změnit a umožnit stratifikaci pacientů na základě imunitního repertoáru nádorového mikroprostředí. Jak ukazují klinické studie, imunoterapie lze snadno kombinovat a chemoterapie může sloužit jako silný nástroj ke zvýšení citlivosti nádorového mikroprostředí k účinkům imunoterapie.

4.3 „A novel anti-CD47-targeted blockade promotes immune activation in human soft tissue sarcoma but does not potentiate anti-PD-1 blockade“

OZANIAK A, SMETANOVA J, BARTOLINI R, RATAJ M, CAPKOVA L, HACEK J, FIALOVA M, KRUPICKOVA L, STRIZ I, LISCHKE R, BARTUNKOVA J, STRIZOVA Z.

J Cancer Res Clin Oncol. 2022 Aug 20. doi: 10.1007/s00432-022-04292-8. Epub ahead of print. PMID: 35986756.

Většina pacientů s měkkotkáňovým sarkomem stále umírá na rozvoj metastáz do několika let od počáteční diagnózy. Systémová chemoterapeutika vyvolávají odpověď pouze u 15–35 % pacientů a neoadjuvantní/adjuvantní radioterapie sice snižuje pravděpodobnost lokální recidivy, na druhou stranu bývá spojena se značnou toxicitou. Navíc kupříkladu u retroperitoneálních STS bývá často problematické podání adekvátní terapeutické dávky. Podíváme-li se na jiné léčebné modalitty, imunoterapie prostřednictvím checkpoint inhibitorů zatím neprokázala přesvědčivé výsledky u STS, ač některé histologické podtypy jistý benefit z terapie prokázaly. Jedním z hlavních důvodů, který stojí za relativně nízkou terapeutickou odpovědí checkpoint inhibitorů u STS, může být relativně nízká infiltrace nádorů imunitními T-buňkami. Na druhou stranu byla prokázána značná přítomnost makrofágů v nádorovém mikroprostředí STS, což značí potenciál v léčbě cílené právě na tuto imunitní populaci.

V této studii jsme hodnotili potenciální synergické účinky kombinace monoklonálních protilátek anti-PD-1 a anti-CD47. Efektivitu léčby jsme hodnotili in vitro prostřednictvím měření aktivace imunitních buněk ve smyslu produkce cytotoxických cytokinů. Pozorovali jsme, že po makrofázích jsou další nejčastější buněčnou populací v STS CD8 T-buňky. Vysoký podíl makrofágů a T-buněk nás dále vedl ke zkoumání kombinované aktivace T-buněk a makrofágů prostřednictvím podání anti-PD-1 a anti-CD47.

Naše zjištění ukázala, že jak anti-PD-1, tak anti-CD47 terapie je schopna signifikantně zvýšit produkci prozánětlivých cytokinů IL-2, IFN- γ a TNF- α in vitro. Nicméně překvapivým zjištěním bylo, že společné podávání anti-CD47 a anti-PD-1 nebylo účinnější, naopak vedlo k potlačení produkce cytotoxických cytokinů, a to i při dělení kohorty dle různých parametrů.

V naší studii byla nejvýznamnější odpověď na anti-CD47 terapii pozorována u nediferencovaného pleomorfního sarkomu, což byl také histologický podtyp s nejvyšší expresí CD47. Na druhou stranu, CD47 byl široce exprimován i v jiných podtypech STS, jako jsou high-grade myxofibrosarkomy nebo angiosarkomy.

Naše data naznačují, že kombinované strategie založené na checkpoint inhibitech a anti-CD47 blokádě nemusejí zajistit požadovaný výsledek. Obě terapie, buď anti-PD-1, nebo anti-CD47 samostatně, by však mohly mít terapeutický potenciál u vybraných nádorů po pečlivém vyhodnocení CD47 a PD-1 exprese v nádoru.

5 ZÁVĚR

Chirurgická léčba je základním kamenem léčby lokalizovaných STS. Naopak léčba metastatických STS zůstává velkou výzvou vzhledem k limitované chemosenzitivě těchto nádorů. Imunoterapie je slibnou léčebnou modalitou, která se dostala v posledních letech do první linie léčby celé řady metastatických nádorových onemocnění, avšak v léčbě STS zatím nemá své místo. Jedním z důvodů může být doposud velmi omezené zmapování nádorového mikroprostředí STS a současně extrémní histologická heterogenita těchto nádorů, která brání koncepci racionálních klinických studií s jednotlivými imunoterapeutiky. Závěry vyplývající z našeho výzkumu zdůrazňují, že centralizace pacientů je jedním z nejdůležitějších aspektů ovlivňujících přežívání pacientů. Současně jsme naší prací poukázali na nutnost pohlížení na konkrétní histologické typy STS, a nikoliv na celou heterogenní kohortu bez ohledu na histologii. V neposlední řadě naše data ukázala, že ne všechna imunoterapeutika mají synergický efekt a je nutné dále *in vitro* testovat různé kombinace terapií, abychom poskytli pacientům s metastatickým STS naději na nové možnosti kombinovaných systémových přístupů.

6 LITERATURA

1. Sbaraglia, M., E. Bellan, and A.P. Dei Tos, *The 2020 WHO Classification of Soft Tissue Tumours: news and perspectives*. Pathologica, 2021. **113**(2): p. 70-84.
2. Gatta, G., et al., *Burden and centralised treatment in Europe of rare tumours: results of RARECAREnet-a population-based study*. Lancet Oncol, 2017. **18**(8): p. 1022-1039.
3. O'Sullivan, B., et al., *The TNM classification of malignant tumours-towards common understanding and reasonable expectations*. Lancet Oncol, 2017. **18**(7): p. 849-851.
4. Gronchi, A., et al., *Outcome prediction in primary resected retroperitoneal soft tissue sarcoma: histology-specific overall survival and disease-free survival nomograms built on major sarcoma center data sets*. J Clin Oncol, 2013. **31**(13): p. 1649-55.
5. Callegaro, D., et al., *Development and external validation of two nomograms to predict overall survival and occurrence of distant metastases in adults after surgical resection of localised soft-tissue sarcomas of the extremities: a retrospective analysis*. Lancet Oncol, 2016. **17**(5): p. 671-80.
6. Callegaro, D., et al., *Development and external validation of a dynamic prognostic nomogram for primary extremity soft tissue sarcoma survivors*. EClinicalMedicine, 2019. **17**: p. 100215.
7. DE MARCHIS, M.L., et al., *Desmoid Tumors in Familial Adenomatous Polyposis*. Anticancer Research, 2017. **37**(7): p. 3357-3366.
8. Evans, D.G.R., et al., *Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1*. Journal of Medical Genetics, 2002. **39**(5): p. 311-314.
9. Correa, H., *Li-Fraumeni Syndrome*. J Pediatr Genet, 2016. **5**(2): p. 84-8.
10. Blay, J.Y., et al., *Improved survival using specialized multidisciplinary board in sarcoma patients*. Ann Oncol, 2017. **28**(11): p. 2852-2859.
11. von Mehren, M., et al., *Soft Tissue Sarcoma, Version 2.2018, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology*. J Natl Compr Canc Netw, 2018. **16**(5): p. 536-563.
12. Miah, A.B., et al., *Optimal management of primary retroperitoneal sarcoma: an update*. Expert Rev Anticancer Ther, 2014. **14**(5): p. 565-79.
13. Ray-Coquard, I., et al., *Sarcoma: concordance between initial diagnosis and centralized expert review in a population-based study within three European regions*. Ann Oncol, 2012. **23**(9): p. 2442-2449.
14. Dei Tos, A.P., et al., *Datasets for reporting of the Soft Tissue Sarcoma: recommendations from the International Collaboration on Cancer Reporting (ICCR)*. Histopathology, 2023.
15. Rosenberg, S.A., et al., *The treatment of soft-tissue sarcomas of the extremities: prospective randomized evaluations of (1) limb-sparing surgery plus radiation therapy compared with amputation and (2) the role of adjuvant chemotherapy*. Ann Surg, 1982. **196**(3): p. 305-15.
16. Beane, J.D., et al., *Efficacy of adjuvant radiation therapy in the treatment of soft tissue sarcoma of the extremity: 20-year follow-up of a randomized prospective trial*. Ann Surg Oncol, 2014. **21**(8): p. 2484-9.
17. Gronchi, A., et al., *Neoadjuvant Chemotherapy in High-Risk Soft Tissue Sarcomas: Final Results of a Randomized Trial From Italian (ISG), Spanish (GEIS), French (FSG), and Polish (PSG) Sarcoma Groups*. J Clin Oncol, 2020. **38**(19): p. 2178-2186.
18. Woll, P.J., et al., *Adjuvant chemotherapy with doxorubicin, ifosfamide, and lenograstim for resected soft-tissue sarcoma (EORTC 62931): a multicentre randomised controlled trial*. Lancet Oncol, 2012. **13**(10): p. 1045-54.
19. Judson, I., et al., *Doxorubicin alone versus intensified doxorubicin plus ifosfamide for first-line treatment of advanced or metastatic soft-tissue sarcoma: a randomised controlled phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2014. **15**(4): p. 415-23.

20. Antman, K., et al., *An intergroup phase III randomized study of doxorubicin and dacarbazine with or without ifosfamide and mesna in advanced soft tissue and bone sarcomas*. J Clin Oncol, 1993. **11**(7): p. 1276-85.
21. Zalutnai, A., *Molecular aspects of stromal-parenchymal interactions in malignant neoplasms*. Curr Mol Med, 2006. **6**(6): p. 685-93.
22. Valkenburg, K.C., A.E. de Groot, and K.J. Pienta, *Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy*. Nat Rev Clin Oncol, 2018. **15**(6): p. 366-381.
23. Paijens, S.T., et al., *Tumor-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy era*. Cellular & Molecular Immunology, 2021. **18**(4): p. 842-859.
24. Schalper, K.A., et al., *Objective measurement and clinical significance of TILs in non-small cell lung cancer*. J Natl Cancer Inst, 2015. **107**(3).
25. Gao, Z.-h., et al., *Predictive and prognostic role of tumour-infiltrating lymphocytes in breast cancer patients with different molecular subtypes: a meta-analysis*. BMC Cancer, 2020. **20**(1): p. 1150.
26. Santoiemma, P.P. and D.J. Powell, Jr., *Tumor infiltrating lymphocytes in ovarian cancer*. Cancer Biol Ther, 2015. **16**(6): p. 807-20.
27. Brummel, K., et al., *Tumour-infiltrating lymphocytes: from prognosis to treatment selection*. British Journal of Cancer, 2022.
28. Su, S., S. Akbarinejad, and L. Shahriyari, *Immune classification of clear cell renal cell carcinoma*. Scientific Reports, 2021. **11**(1): p. 4338.
29. Ozaniak, A., et al., *Novel Insights into the Immunotherapy of Soft Tissue Sarcomas: Do We Need a Change of Perspective?* Biomedicines, 2021. **9**(8).
30. Resag, A., et al., *The Immune Contexture of Liposarcoma and Its Clinical Implications*. Cancers (Basel), 2022. **14**(19).
31. Minati, R., C. Perreault, and P. Thibault, *A Roadmap Toward the Definition of Actionable Tumor-Specific Antigens*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 583287.
32. Houot, R., et al., *T-cell-based Immunotherapy: Adoptive Cell Transfer and Checkpoint Inhibition*. Cancer Immunol Res, 2015. **3**(10): p. 1115-22.
33. Slovak, R.J., et al., *Co-inhibitor expression on tumor infiltrating and splenic lymphocytes after dual checkpoint inhibition in a microsatellite stable model of colorectal cancer*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 6956.
34. Wherry, E.J., *T cell exhaustion*. Nat Immunol, 2011. **12**(6): p. 492-9.
35. Shiravand, Y., et al., *Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy*. Curr Oncol, 2022. **29**(5): p. 3044-3060.
36. Mantovani, A., et al., *Macrophages as tools and targets in cancer therapy*. Nature Reviews Drug Discovery, 2022. **21**(11): p. 799-820.
37. Ireland, L.V. and A. Mielgo, *Macrophages and Fibroblasts, Key Players in Cancer Chemoresistance*. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2018. **6**.
38. Dancsok, A.R., et al., *Tumor-associated macrophages and macrophage-related immune checkpoint expression in sarcomas*. Oncoimmunology, 2020. **9**(1): p. 1747340.
39. Kelly, P.N., *The Cancer Immunotherapy Revolution*. Science, 2018. **359**(6382): p. 1344-1345.
40. Huang, P.W. and J.W. Chang, *Immune checkpoint inhibitors win the 2018 Nobel Prize*. Biomed J, 2019. **42**(5): p. 299-306.
41. Loughlin, K.R., *William B. Coley: His Hypothesis, His Toxin, and the Birth of Immunotherapy*. Urol Clin North Am, 2020. **47**(4): p. 413-417.
42. Coley, W.B., *The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus)*. Proc R Soc Med, 1910. **3**(Surg Sect): p. 1-48.
43. Zhang, Y. and Z. Zhang, *The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications*. Cell Mol Immunol, 2020. **17**(8): p. 807-821.

44. Monjazez, A.M., et al., *The role of antigen-specific and non-specific immunotherapy in the treatment of cancer*. J Immunotoxicol, 2012. **9**(3): p. 248-58.
45. Han, J., et al., *Mechanisms of BCG in the treatment of bladder cancer-current understanding and the prospect*. Biomed Pharmacother, 2020. **129**: p. 110393.
46. Conlon, K.C., M.D. Miljkovic, and T.A. Waldmann, *Cytokines in the Treatment of Cancer*. J Interferon Cytokine Res, 2019. **39**(1): p. 6-21.
47. Bagchi, S., R. Yuan, and E.G. Engleman, *Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Cancer: Clinical Impact and Mechanisms of Response and Resistance*. Annu Rev Pathol, 2021. **16**: p. 223-249.
48. Rosenberg, S.A. and N.P. Restifo, *Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer*. Science, 2015. **348**(6230): p. 62-8.
49. Carlino, M.S., J. Larkin, and G.V. Long, *Immune checkpoint inhibitors in melanoma*. The Lancet, 2021. **398**(10304): p. 1002-1014.
50. Onoi, K., et al., *Immune Checkpoint Inhibitors for Lung Cancer Treatment: A Review*. J Clin Med, 2020. **9**(5).
51. Tung, I. and A. Sahu, *Immune Checkpoint Inhibitor in First-Line Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma: A Review of Current Evidence and Future Directions*. Frontiers in Oncology, 2021. **11**.
52. Bai, R., et al., *Mechanisms of Cancer Resistance to Immunotherapy*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 1290.
53. Borcoman, E., et al., *Patterns of Response and Progression to Immunotherapy*. American Society of Clinical Oncology Educational Book, 2018(38): p. 169-178.
54. Liu, Y., J. Guo, and L. Huang, *Modulation of tumor microenvironment for immunotherapy: focus on nanomaterial-based strategies*. Theranostics, 2020. **10**(7): p. 3099-3117.
55. Darnell, E.P., et al., *Immune-Related Adverse Events (irAEs): Diagnosis, Management, and Clinical Pearls*. Curr Oncol Rep, 2020. **22**(4): p. 39.
56. Feins, S., et al., *An introduction to chimeric antigen receptor (CAR) T-cell immunotherapy for human cancer*. Am J Hematol, 2019. **94**(S1): p. S3-s9.
57. Choi, G., G. Shin, and S. Bae, *Price and Prejudice? The Value of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cell Therapy*. Int J Environ Res Public Health, 2022. **19**(19).
58. Robert, C., *A decade of immune-checkpoint inhibitors in cancer therapy*. Nature Communications, 2020. **11**(1): p. 3801.
59. Galluzzi, L., et al., *Immunostimulation with chemotherapy in the era of immune checkpoint inhibitors*. Nature Reviews Clinical Oncology, 2020. **17**(12): p. 725-741.