

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Obor: Biologie



Linda Kobosilová

Protinádorová imunoterapie karcinomu prostaty
Antitumor immunotherapy of the prostate cancer

Bakalářská práce

Školitel: Doc. MUDr. Radek Špíšek, Ph.D.

Praha, 2012

Děkuji svému školiteli Doc. MUDr. Radkovi Špíškovi, Ph.D. za odborné rady, dohled a trpělivost při zrodu této práce. Ráda bych také chtěla poděkovat své rodině za psychickou podporu.

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

V Praze 14. 5. 2012

Abstrakt:

Pokroky v základní imunologii vedou k lepšímu porozumění interakce mezi imunitním systémem a nádory, což vzbuzuje zájem o využití imunitního systému v léčbě nádorových onemocnění. Preklinické i klinické studie protinádorové imunoterapie vykazují u několika testovaných látek nadějně výsledky a navíc ilustrují základní principy fungování imunitního systému. Nejlépe dokládá naděje vkládané do protinádorové imunoterapie nedávné schválení přípravku buněčné imunoterapie Sipuleucel-T pro léčbu karcinomu prostaty Americkou lékovou agenturou FDA. V této práci jsou shrnuty recentní poznatky o stavu vývoje strategií protinádorové imunoterapie u karcinomu prostaty, ale většinu poznatků a principů, které jsou zde zmíněny lze aplikovat i na další nádorová onemocnění.

Klíčová slova: imunoterapie, karcinom, imunitní systém, prostata, antigen prezentující buňka (APC)

Abstract:

The progressiveness in basic immunology is leading to a better comprehension of the interaction between the immune system and tumours. It arouses the interest in the use of the immune system in cancer treatment. Preclinical and clinical studies of the antitumour immunotherapy report promising results of several tested substances. These results also illustrate the basic operating principles of the immune system. The best illustration of the hopes put into antitumour immunotherapy is a recent approval of a substance for prostate cancer treatment called Sipuleucel-T by the American Food and Drug Administration (FDA). This work summarizes recent findings in the development of strategies for the antitumour immunotherapy of prostate cancer, but most of these findings and strategies are applicable for other types of cancer as well.

Key words: immunotherapy, carcinoma, immune system, prostate, antigen presenting cell (APC)

Seznam zkratk:

APC	antigen prezentující buňka
CEA	karcinoembryonální antigen
CTL	cytotoxický T lymfocyt
CTLA4	cytotoxic T lymphocyte antigen 4
DC	dendritické buňky
GM-CSF	granulocyty monocyty kolonie stimulující faktor
EMA	Evropská léková agentura
FDA	Americký úřad pro kontrolu léčiv
IFN	interferon
MDSCs	(myeloid-derived suppressor cells) supresivní subpopulace makrofágů
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
PAP	prostatická kyselá fosfatáza
PSA	prostatický specifický antigen
PSMA	prostatický specifický membránový antigen
RAG	gen aktivující rekombinaci
TGF	transformující růstový faktor
T _H	pomocný lymfocyt
TLR	Toll-like receptor

Obsah

1. Úvod	6
2. Imunitní systém a nádory	6
2.1. <i>Role imunitního systému v obraně proti nádorům</i>	6
2.2. <i>Editace nádoru imunitním systémem- „Cancer Immune Editing“</i>	7
3. Imunologická charakteristika karcinomu prostaty	8
3.1. <i>Role zánětu při rozvoji karcinomu prostaty</i>	9
3.2. <i>Časné fáze karcinomu prostaty</i>	9
3.3. <i>Pozdní fáze karcinomu prostaty</i>	10
4. Myší modely karcinomu prostaty	11
5. Antigenně specifická imunoterapie	12
5.1. <i>Výběr nádorových antigenů</i>	12
5.2. <i>Klinicky testované přístupy k imunoterapii karcinomu prostaty</i>	13
5.2.1. <i>Poxvirové vektory, Prost-Vac</i>	13
5.2.2. <i>Sipuleucel-T</i>	14
5.2.3. <i>Imunoterapie založená na dendritických buňkách</i>	16
5.3. <i>Další možné postupy protinádorové imunoterapie karcinomu prostaty</i>	17
5.4. <i>Pasivní imunoterapie</i>	18
6. Polyvalentní imunoterapie	19
6.1. <i>Imunoterapie založená na buňkách</i>	19
6.2. <i>Imunitní blokáda kontrolních bodů</i>	20
7. Klinické studie imunoterapie karcinomu prostaty	22
7.1. <i>Přežití je nejsilnějším klinickým cílovým ukazatelem</i>	22
7.2. <i>Imunoterapie může být účinnější u časnějších forem onemocnění</i>	23
7.3. <i>Studie fáze III by měly být založeny na výsledcích studií fáze II</i>	23
8. Kombinovaná imunoterapie	24
8.1. <i>Androgenní ablace</i>	25
8.2. <i>Radioterapie</i>	25
8.3. <i>Blokáda kontrolních bodů</i>	26
9. Závěr	28
10. Seznam použité literatury	29

1. Úvod

V rozvinutých zemích je karcinom prostaty nejčastějším nádorovým onemocněním u mužů a celkově mu patří třetí příčka v úmrtnosti (za karcinomy plic a tlustého střeva) (Jemal, Bray et al. 2011). Lokalizovaná choroba je v první fázi léčena chirurgicky nebo radioterapií (Walsh, DeWeese et al. 2007). V ojedinělých případech, například u starších pacientů lze zvolit strategii tzv. „watchful waiting“ (Bill-Axelsson, Holmberg et al. 2011), kdy je pacient pouze pravidelně sledován. Když se choroba i přes úvodní radikální operaci či radiační terapii vrátí (relaps onemocnění, biochemická recidiva) a objeví se metastatické postižení, je v naprosté většině případů zahájena hormonální terapie, při které dochází k blokadě účinku androgenních hormonů, buď pomocí léků, tzv. anti-androgenů, nebo chirurgickou kastrací. Po určité době, v průměru za cca 24 měsíců přestanou nádorové buňky na hormonální terapii reagovat a začnou proliferovat i v nepřítomnosti androgenů. V tomto stádiu se onemocnění označuje jako metastatický hormonálně refrakterní karcinom prostaty a jedinou léčebnou možností pro pacienty je paliativní chemoterapie, která zmírňuje příznaky nemoci (např. bolest), ale nevede k vyléčení onemocnění. Nejčastěji užívaným lékem v tomto stádiu je docetaxel, u kterého klinické studie prokázaly prodloužení průměrného přežití této skupiny pacientů z 15 na 18 měsíců (Tannock, de Wit et al. 2004). Nedostatek terapeutických možností, špatná prognóza a vysoká úmrtnost metastatického karcinomu prostaty vede k hledání nových léčebných modalit, které by mohly v kombinaci se současnými léčebnými přístupy vést ke zlepšení prognózy karcinomu prostaty. Velmi intenzivně zkoumanou a testovanou léčebnou modalitu u karcinomu prostaty představuje protinádorová imunoterapie. Cílem této práce je shrnout recentní poznatky o stavu vývoje strategií protinádorové imunoterapie u karcinomu prostaty. Protože karcinom prostaty představuje v mnoha ohledech typický epiteliální adenokarcinom, platí řada poznatků získaných při vývoji imunoterapeutických postupů pro karcinom prostaty i pro jiné epiteliální karcinomy.

2. Imunitní systém a nádory

2.1. Role imunitního systému v obraně proti nádorům

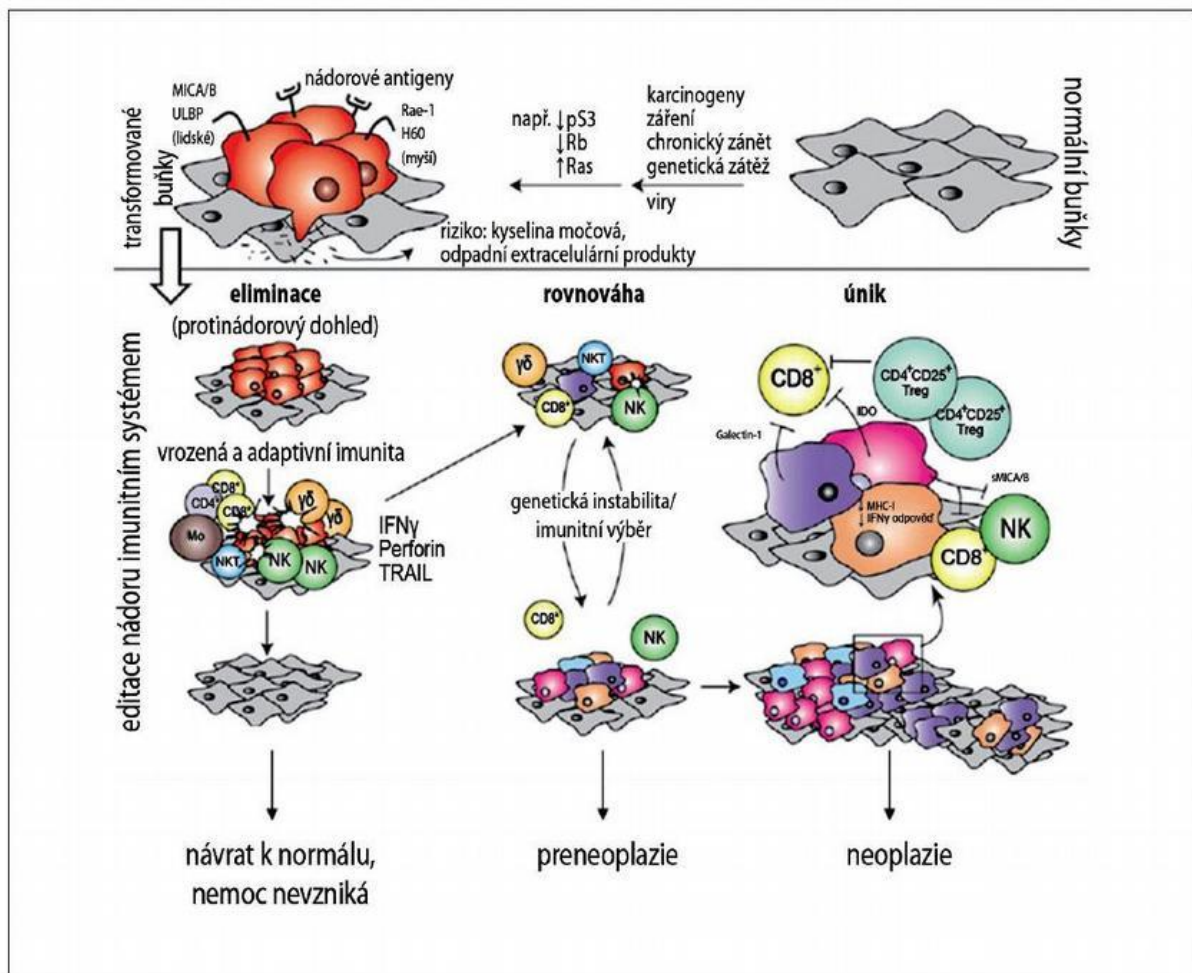
Zásadním předpokladem pro využití imunitního systému v léčbě nádorů je jeho schopnost rozeznat a zničit neoplastické buňky dříve, než se klinicky projeví jako závažné onemocnění. Tato idea byla prvně formulována začátkem dvacátého století americkým chirurgem W. Coleyem, který pozoroval vzácné regrese nádorů při bakteriálních infekcích. Studie publikované v roce 1950 ukázaly, že inbrední myši mohou být imunizovány proti karcinogeny

indukovaným nádorům, a že protilátky proti odvrženému tumoru byly specifické. Tyto objevy vedly v roce 1957 Thomase a Burneta k formulaci hypotézy o protinádorovém imunitním dohledu, která předpokládala existenci strážných buněk pocházejících z thymu a monitorujících přítomnost transformovaných nádorových buněk (Burnet 1970). Z toho by mělo vyplívat, že u imunodeficitních jedinců existuje vyšší frekvence nádorových onemocnění. Důležitým důkazem, potvrzujícím roli imunitního systému v obraně proti nádorům, byly studie na myších (RAG^{-/-}) s nefunkčními geny RAG1 a RAG2 (recombination activating gene – geny pro rekombinaci T a B buněčných receptorů). Tyto myši bez T a B lymfocytů vyvinou chemicky indukované nádory rychleji a s větší frekvencí, než imunokompetentní kontroly (Shankaran, Ikeda et al. 2001). Důležitou komponentou imunitního systému je interferon γ (IFN- γ). Tento cytokin sekretovaný CD4 T_H1 buňkami a CD8 cytotoxickými T lymfocyty (CTL) zároveň podporuje jejich tvorbu, dále podporuje aktivaci DC a makrofágů a inhibuje angiogenezi. Dokonce samotné nádorové buňky jsou cílem IFN- γ , protože tento cytokin indukuje zvýšení exprese MHC I molekul (Shankaran, Ikeda et al. 2001)

2.2. Editace nádoru imunitním systémem- „Cancer Immune Editing“

Hypotéza editace nádoru imunitním systémem (Dunn, Old et al. 2004) je v podstatě rozvinutá původní teorie Thomase a Burneta o poznatky získané během posledních let při pokusech RAG deficitními modely. Byly zjištěny významné rozdíly v imunogenicitě nádorů v závislosti na hostiteli, ve kterém rostly. Při izolaci tumoru z imunodeficitní myši a jeho následné transplantaci do myši stejného kmene, rostl nádor se stejnou kinetikou. Podobně tomu bylo i při přenosu tumoru z imunokompetentní myši do kontrolní myši stejného kmene (implantace a rozvoj všech tumorů). Zajímavé ale bylo, že téměř 50% všech tumorů, které rostly v imunodeficitních myších, bylo po přenosu do imunokompetentních myší odvrženo. Z toho vyplývá, že nádory rostoucí v nepřítomnosti funkčního imunitního systému jsou více imunogenní, než ty vytvořené v imunokompetentních hostitelích. Imunitní systém tedy pravděpodobně vyvíjí na nádory neustálý selekční tlak, který vede k selekci takových variant, které dokáží uniknout imunitnímu systému. Podle Dunna byly navrženy tři úrovně procesu boje imunitního systému proti nádorovým buňkám (obr. 1) – eliminace transformované buňky (elimination), rovnováha mezi transformovanou buňkou a organizmem (equilibrium) a únik transformované buňky před imunitním systémem (escape). Ve většině případů jsou transformované buňky rozpoznány a zničeny mechanismy imunitního systému. Ve stádiu rovnováhy se mezi hostitelským imunitním systémem a přežívajícími nádorovými buňkami

vytvoří stav dynamické rovnováhy, tato fáze je nejdelší a její klinické projevy se nejvíce shodují s preneoplastickým onemocněním, které nejčastěji zůstává nedignostikované. Na konci této fáze dochází buď: a) ke kompletní eliminaci nádorových buněk, b) k dlouhodobému (někdy stálému) udržení rovnováhy, c) k úniku transformovaných buněk imunitnímu systému a rozvoji klinického onemocnění. Fáze úniku je způsobena přizpůsobivostí nádorových buněk pomocí mutací v genech kódujících povrchové bílkoviny, které jsou důležité pro prezentaci antigenů v APC. Nádorové buňky mají řadu strategií, jak uniknout kontrole imunitního systému. Produkují například cytokiny (TGF- β – transformující růstový faktor a IL-10), které inhibují protinádorovou imunitní reakci (Dunn, Koebel et al. 2006).



Obr. 1: Teorie protinádorového dohledu, editace nádoru imunitním systémem a klinické projevy jednotlivých stádií. (Převzato a upraveno dle Dunn a kol., 2004)

3. Imunologická charakteristika karcinomu prostaty

Až na několik málo výjimek, vzniká naprostá většina nádorových onemocnění u člověka u imunokompetentních pacientů s dobře fungujícím imunitním systémem. V průběhu progresu

nádorového onemocnění ze stádia lokalizovaného onemocnění do fáze metastatického postižení dochází k celé řadě interakci mezi nádorovými buňkami a imunitním systémem pacienta.

3.1. Role zánětu při rozvoji karcinomu prostaty

Podobně jako u většiny typů nádorů, jednotlivá příčina vzniku karcinomu prostaty je neznámá. Literární údaje podporují hypotézu, že se na vzniku podílí jak genetické (Sun, Chang et al. 2008), tak environmentální (Kolonel, Altshuler et al. 2004) faktory. Zajímavé je, že lidské i zvířecí studie ukazují, že v patogenezi karcinomu prostaty, i při jeho progresi z lokalizovaného onemocnění do stádia metastatického postižení hraje roli přítomnost zánětu (Ammirante, Luo et al. 2010). Podobná zjištění existují i u karcinomu žaludku, kolorektálního karcinomu a karcinomu plic. I když neexistují přímé důkazy propojující karcinom prostaty s přítomností zánětu, z epidemiologických dat je zřejmé, že karcinom prostaty je častější u demografických skupin s vyšší úrovní zánětlivé reakce (De Marzo, Platz et al. 2007). Bohužel ani studie příčin či konkrétní imunologické charakteristiky vnitřního zánětu prostaty nejsou dobře známy. Pokud jde o adaptivní imunitu, obě skupiny T buněk - CD4 a CD8 - jsou přítomny v prostatě a CD4 T buňky zahrnují jak T pomocné 17 (T_H17), tak regulační T (T_{reg}) (Sfanos, Bruno et al. 2008) populace buněk. CD8 T buňky uvnitř lidské prostaty jsou nefunkční a neupregulují aktivační markery jako CD69 či CD 137 v reakci na stimulaci PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) a ionomycinem (Bronte, Kasic et al. 2005). Tyto data jsou shodná s těmi, získanými užitím antigeně specifických CD8 T buněk, izolovaných z melanomů, stejně jako z modelů transgenních myši s karcinomem prostaty (viz. níže). Pokud jde o imunoterapii, tyto výsledky ukazují, že vakcinace proti karcinomu prostaty je cílená na orgán s již existujícím a komplexním modelem zánětu, který by mohl přispívat k progresi onemocnění.

3.2. Časná fáze karcinomu prostaty

Stejně jako většina solidních nádorů se karcinom prostaty obvykle vyvíjí v několika klinických stádiích. Ve vyspělých zemích je mnoho případů karcinomu prostaty diagnostikováno při záhytu vyšší hladiny prostatického specifického antigenu (PSA) v séru při periodických prohlídkách u praktického lékaře. Zvýšená či výrazně kolísající hladina PSA je podnětem k biopsii prostaty a diagnóza karcinomu prostaty je založená na mikroskopickém hodnocení vzorku tkáně. Časná diagnóza karcinomu prostaty omezeného pouze na prostatu obvykle vede k pokusu o lokální léčbu a to buď ve formě radikální prostatektomie, nebo

radioterapie. Až pro 80% odoperovaných mužů je lokální léčba úspěšná v tom, že metastazující onemocnění se neobjeví během následujících 15-ti let (Pound, Partin et al. 1999). Když dojde k recidivě onemocnění, často se jako úvodní projev opět detekuje zvyšující se hladina PSA, zprvu bez detekovatelných metastáz. Tento klinický stav je známý jako biochemická progrese (Freedland and Moul 2007). Obdobný stav se vyskytuje u některých nádorů gastrointestinálního traktu, kde může být před progresí stanovenou zobrazovacími metodami, detekována zvyšující se hladina CEA (carcinoembryonic antigen) (Locker, Hamilton et al. 2006). Z imunologického pohledu představuje biochemická recidiva stádium, které by mohlo být nejvhodnější pro protinádorovou imunoterapii. V této fázi onemocnění je v těle pacienta poměrně malé množství nádorových buněk a nedošlo ještě k vytvoření imunosupresivních mechanismů, které jsou často asociovány s nádorovým mikroprostředím, jako např. k expanzi regulačních T lymfocytů, MDSCs (myeloid-derived suppressor cells) a produkci TGFβ (transforming growth factor-β) (Drake, Jaffee et al. 2006). Problémem eventuálních klinických studií u pacientů ve fázi biochemického relapsu je ale jejich design. Lékové authority, jako například Evropská léková agentura (EMA) nebo americká FDA neuznávají laboratorní nálezy (PSA) jako validní ukazatele účinnosti léku. Neexistují dosud přesvědčivé klinické studie, které by prokázaly, že lék který snižuje, nebo zpomaluje vzestup hladiny PSA, také prodlužuje přežití pacienta. Proto lékové agentury jednoznačně upřednostňují použití objektivních ukazatelů klinického efektu. Mezi tyto patří celkové přežití, čas do progresu onemocnění apod. U skupiny pacientů s biochemickou recidivou by ovšem klinické studie s těmito ukazateli trvaly neúměrně dlouho, i více než deset let, protože jde o skupinu pacientů s dlouhým přežitím. Z tohoto důvodu jsou klinické studie u pacientů s biochemickým relapsem velmi těžko realizovatelné, z praktických i finančních důvodů.

3.3. Pozdní fáze karcinomu prostaty

Růst epiteliálních buněk prostaty je závislý na přítomnosti androgenů; proto mohou být muži s biochemickou recidivou léčeni androgenní ablací, a to buď chirurgickou či chemickou kastrací. Ačkoliv celkový pozitivní efekt androgenní ablace na přežití (survival benefit) mužů s biochemickou recidivou není příliš přesvědčivě podpořen velkými, randomizovanými klinickými studiemi, je tato terapie běžně používána. V rámci této práce je důležité upozornit na řadu imunologických efektů hormonální léčby, které mohou potenciálně synergizovat s efektem protinádorové imunoterapie (Aragon-Ching, Williams et al. 2007). První pozorování z této oblasti vycházela ze studie, která prokázala, že androgenní ablace před radikálním operačním výkonem pro karcinom prostaty výrazně zvyšovala průnik CD4 T

buněk do žlázy (Mercader, Bodner et al. 2001). T lymfocyty detekované v nádorové tkáni byly navíc specifické proti nádorovým buňkám. Tyto poznatky byly navíc podpořeny nedávnou obsáhlou studií imunologického infiltrátu v prostatě mužů, kteří podstoupili androgenní ablaci. Kromě vyšší frekvence CD4 T lymfocytů, byl u nich zaznamenán také vyšší počet CD8 T buněk (Gannon, Poisson et al. 2009). Na myších modelech karcinomu prostaty bylo dále zjištěno, že androgenní ablace snižuje frekvenci regulačních T lymfocytů, které specificky tlumí protinádorovou imunitní reakci (Drake, Doody et al. 2005). Velmi zajímavé, i když ojedinělé jsou studie, které naznačují, že blokáda androgenů zpomaluje involuci thymu a zvyšuje tvorbu naivních T lymfocytů (Sutherland, Goldberg et al. 2005). Výše shrnutá data tedy naznačují, že androgenní ablace by mohla mít synergizující efekt v kombinaci s protinádorovou imunoterapií a mohla by zvyšovat nádorově specifickou imunitní odpověď. Překvapivě zatím existuje velmi málo klinických studií, které by se toto tvrzení pokusily prokázat v klinické praxi.

Navzdory androgenní ablaci dojde nakonec u naprosté většiny pacientů s karcinomem prostaty k progresi onemocnění, do stádia, kdy nádorové buňky již nereagují na hormonální léčbu. Tato fáze onemocnění se označuje jako hormonálně refrakterní metastatický karcinom prostaty. V této fázi onemocnění byla a je testována většina přípravků protinádorové imunoterapie. Ryze praktickým důvodem pro provádění klinických studií u této skupiny pacientů je fakt, že průměrné přežití se v této fázi nemoci pohybuje kolem 18 měsíců (Tannock, de Wit et al. 2004) a je tedy reálné provést klinickou studii s celkovým přežitím jako parametrem, který je lékovými agenturami akceptován. Z imunologického hlediska je ovšem zřejmé, že imunoterapie v této fázi onemocnění má nižší naději na pozitivní efekt. V těle je přítomno obrovské množství nádorových buněk v mnohočetných lokalitách a navíc již došlo k rozvoji celé řady nádorem indukovaných imunosupresivních mechanismů (Drake, Jaffee et al. 2006). V nádorovém mikroprostředí dochází k indukci regulačních T lymfocytů, produkci imunosupresivních cytokinů a nádorová tkáň je často obalena tuhým fibrózním stromatem.

4. Myší modely karcinomu prostaty

Kromě výše popsaných lidských epidemiologických a klinických dat, by k úvahám o možné podobě klinických studií protinádorové imunoterapie karcinomu prostaty mohly také přispět data z myších modelů. V tomto ohledu poskytuje jedinečnou příležitost pro studium protinádorové imunitní odpovědi u karcinomu prostaty model označovaný jako TRAMP

(transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model) (Greenberg, DeMayo et al. 1995). Studie na TRAMP myších přesvědčivě prokázaly, že v průběhu spontánního vývoje karcinomu prostaty lze detekovat nádorově specifické CD4 a CD8 T lymfocyty. S pokračující progresí onemocnění, ale postupně dochází k nárůstu CD4, ale i CD8 regulačních T lymfocytů, které v pozdních stádiích onemocnění v nádorové tkáni dominují. Tyto populace velmi účinně tlumí proliferaci i aktivaci nádorově specifických efektorových T lymfocytů a v podstatě znemožňují, aby v nádorové tkáni probíhala aktivní imunitní odpověď (Getnet, Maris et al. 2009).

5. Antigenně specifická imunoterapie

Cílem většiny přístupů protinádorové imunoterapie je aktivovat populaci efektorových T buněk, které potom mohou cestovat do vyvíjejících se nádorů a zprostředkovat specifickou lýzu nádorových buněk. U antigenně specifických přístupů je přímo cílený nádorově asociovaný antigen, a to buď naložením tohoto antigenu na antigen prezentující buňky (APC) ex vivo, nebo inkorporací antigenu do vakcínového vektoru na úrovni proteinu nebo DNA. V následující části shrnuji přípravky antigenně specifické imunoterapie, které pokročily nejdále v klinickém testování u pacientů s karcinomem prostaty.

5.1. Výběr nádorových antigenů

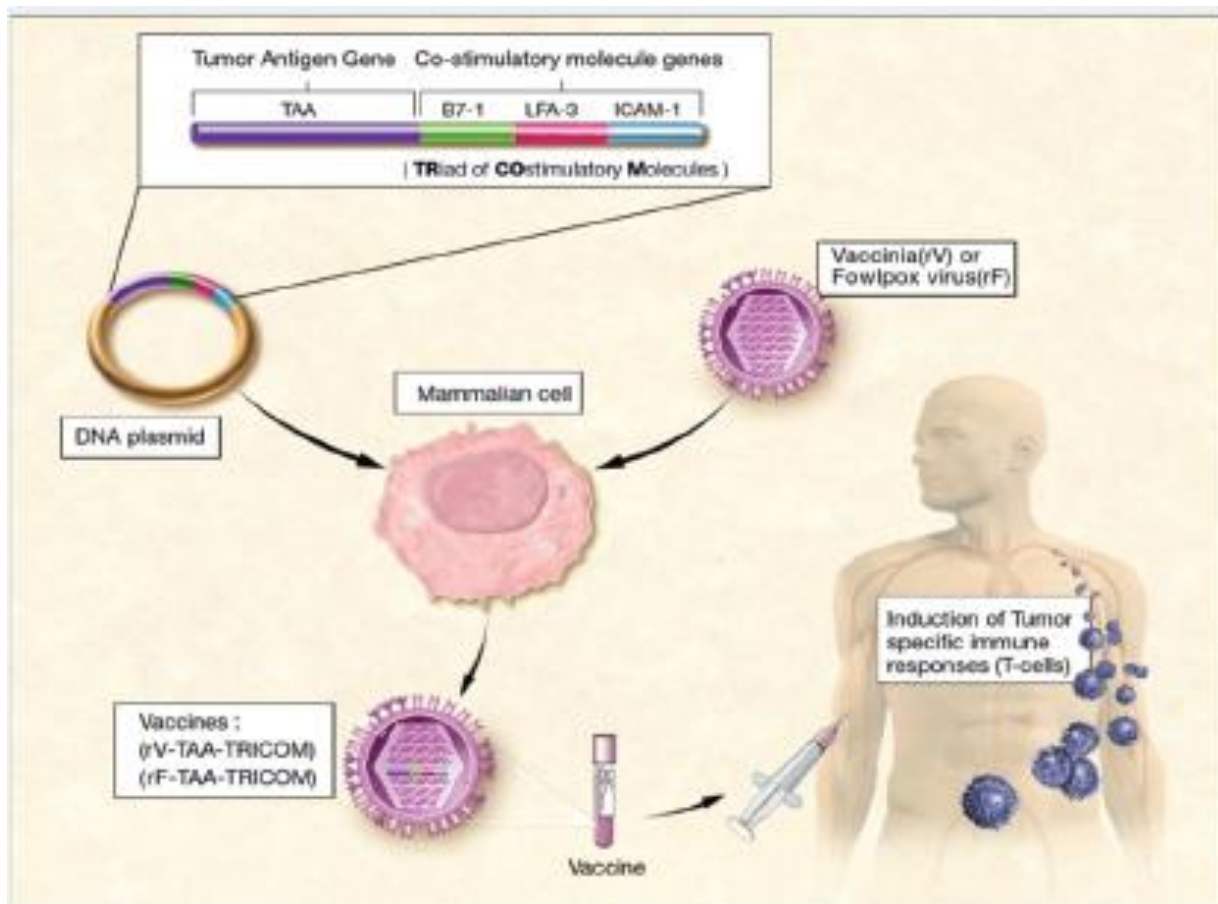
Ačkoli by pro karcinom prostaty mohlo být potenciálně využito velké množství nádorových antigenů, mnoho klinických prací v této oblasti se soustředí na PSA jako na cílový antigen, zřejmě pro jeho dlouhodobé klinické využití jako indikátoru progresse onemocnění. Další antigeny asociované s prostatou zahrnují PAP (prostatic acid phosphatase) a PSMA (prostate-specific membrane antigen). Expresní profil PSA je pro jeho použití jako antigenu v imunoterapii karcinomu prostaty téměř ideální; je exprimovaný výlučně buňkami karcinomu prostaty a netransformovanými epiteliálními buňkami prostaty, takže je specifickým markerem prostatické tkáně. Fakt, že se PSA vyskytuje i na normálních buňkách prostaty není na překážku jeho použití v imunoterapii karcinomu prostaty, protože v čase imunoterapie už většina mužů podstoupila primární terapii a jediné zbývající buňky exprimující PSA by měly být nádorové buňky. Několik studií také poukazuje na roli PSA v iniciaci a progresi karcinomu prostaty, což z PSA činí i potenciální funkční cíl (Williams, Singh et al. 2007). Při absenci imunoterapie je však u pacientů s pozdní fází karcinomu prostaty obtížně detekovatelná T buněčná odpověď proti PSA, což naznačuje, že podobně

jako u myšího modelu zřejmě existuje imunologická tolerance proti tomuto antigenu (Fong, Kwek et al. 2009).

5.2. Klinicky testované přístupy k imunoterapii karcinomu prostaty

5.2.1. Poxvirové vektory, Prost-Vac

Virové vektory mají několik podstatných výhod pro imunoterapii – jsou snadno konstruovatelné, mohou nést velké množství genetického materiálu a je s nimi poměrně dost klinických zkušeností. Příkladem klinicky testovaného vektoru jsou poxviry, jako např. virus vaccinie, který byl celosvětově použit k eradikaci pravých neštovic (Arlen, Kaufman et al. 2005). In vivo, poxvirové vektory nejpravděpodobněji infikují část epitelálních buněk, které následně prodělají buněčnou smrt. Buněčný dermis obsahující zakódovaný antigen je zachycen nezralými APC, které, když jsou správně aktivované, mohou prezentovat tyto antigeny CD4 a CD8 T buňkám v prozánětlivém kontextu. Dalším mechanismem, jak mohou poxvirové vektory zahájit imunitní odpověď je přímá infekce APC, zejména Langerhansových buněk v kůži. Protinádorová imunoterapie pro karcinom prostaty, založená na modifikovaném viru vaccinie, který obsahuje genetickou informaci pro PSA, prošla několika kroky, zahrnující inkorporaci DNA kódující kostimulační molekuly (lymfocyte function- associated antigen 3 (LFA3), CD80 a intercelulární adhezivní molekulu 1 (ICAM1); označované jako TRICOM) do vakcíny (Hodge, Sabzevari et al. 1999) a optimalizaci vazebných vlastností MHC II vakcinového antigenu (Terasawa, Tsang et al. 2002). Hlavní nevýhoda poxvirových vektorů pramení z jejich imunologických vlastností, které činí poxviry účinnými očkovacími vektory. Poxviry vyvolávají silnou protilátkovou odpověď, která limituje účinnost podání následných dávek protinádorové imunoterapie. Protilátky preformované v těle pacienta neutralizují podaný virus dříve, než dojde k expresi nádorového antigenu. Aby se předešlo tomuto imunologickému omezení, vyvinula firma Bavarian Nordic, která se vývojem tohoto přístupu zabývá, strategii takzvané semiheterologní vakcinace (Kaufman, Wang et al. 2004). Ta spočívá v tom, že po úvodní dávce vakcinového vektoru je následně podáván vektor založený na fowlpox viru, který kóduje stejné nádorové antigeny a kostimulační molekuly. Tak je zajištěna déletrvající exprese molekul potřebných pro vyvolání protinádorové imunitní odpovědi. Přípravek Prost-Vac prošel fází I a II klinického hodnocení a nyní byla zahájena studie fáze III u pacientů s hormonálně refrakterním karcinomem prostaty. Navíc je Prost-Vac testován i v kombinaci s dalšími látkami, které se používají v léčbě karcinomu prostaty nebo prochází klinickými zkouškami (Madan, Arlen et al. 2009).

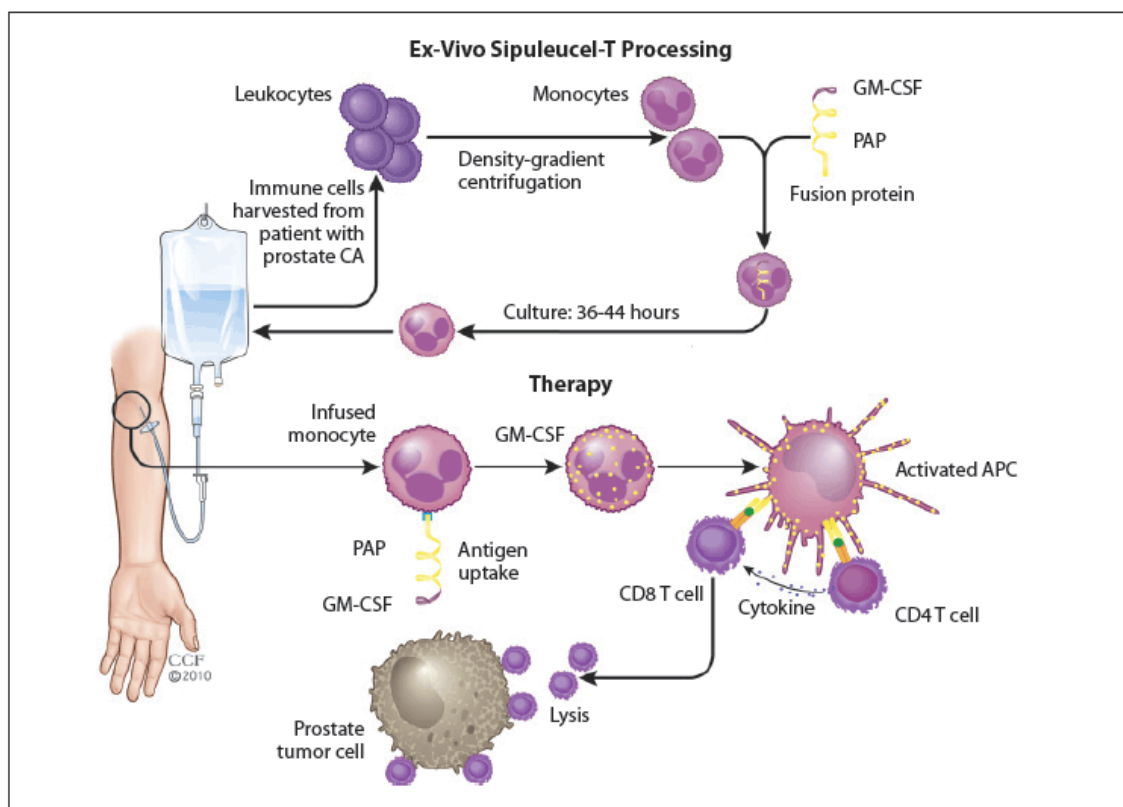


Obr.2: Vakcína ProstVacu se skládá z plasmidové DNA kódující cílový antigen-TAA, konkrétně PSA a řadu tří kostimulačních molekul (LFA3 (lymphocyte function-associated antigen 3), B7-1 (CD80) a ICAM1 (intercellular adhesion molecule 1)). Plasmidová kazeta v je nosičové buněčné linii inkorporovaná do poxviru za vzniku finálního očkovacího produktu. Virové vektory jsou vpraveny pod kůži, infikují pacientovy epiteliální buňky, které posléze prodělají buněčnou smrt. Poté je buněčný debris (zbytky, obsahující také cílový antigen PSA) přijat hostitelskými buňkami prezentující antigen (APC) a prezentován hostitelským CD4 a CD8 T buňkám. (Převzato z <http://www.onclive.com/publications/obtn/2011/may-2011/Immunotherapies-Avoiding-Collisions-Once-the-Brake-Is-Released>)

5.2.2. *Sipuleucel-T*

Na rozdíl od sériového charakteru přípravku Prost-Vac je Sipuleucel-T (Provenge; Dendreon Inc.) personalizovaný produkt, který je individuálně vyráběný pro každého pacienta s karcinomem prostaty (Higano, Schellhammer et al. 2009). V některých ohledech je to podobné vakcínám založených na dendritických buňkách (viz níže), které jsou ve velké míře studovány u mnoha typů nádorů. Nejprve se provede leukaferéze a pomocí gradientové centrifugace jsou obohaceny monocyty. Tyto buňky jsou ještě před nitrožilním podáním zpět pacientovi inkubovány se specifickým imunogenem – v tomto případě jde o fúzní protein granulocyty monocyty kolonie stimulujícího faktoru (GM-CSF) s PAP (prostatic acid phosphatase). Jakmile jsou tyto autologní monocyty léčeným pacientům podány, předpokládá se, že maturují na funkční APC, a že aktivují PAP- specifické CD4 a CD8 T buňky. Dále se

předpokládá, že tyto aktivované T buňky putují do nádorových lézí, kde zprostředkovávají protinádorovou odpověď. V tomto postupu byl jako cílový antigen vybrán PAP, a to na základě předklinických studií na krysích modelech, které ukázaly, že tolerance k PAP u nádoru prostaty nebyla zprostředkována centrální delecí (autotolerance, která vzniká v centrálních lymfoidních orgánech) PAP-specifických T buněk. Takováto PAP-orientovaná vakcinace by mohla vést k infiltraci nádorové specifických T buněk do prostaty (Fong, Ruegg et al. 1997). V rámci klinického vývoje imunoterapií pro karcinom prostaty představuje Provenge zcela přelomový úspěch. Na základě výsledků dokončených studií fáze III byl Provenge v dubnu roku 2010 schválen americkým úřadem pro kontrolu léčiv FDA (US Food and Drug Administration) pro použití u pacientů s hormonálně refrakterním karcinomem prostaty. Sipuleucel-T se tak stal vůbec prvním schváleným lékem pro antigenně specifickou imunoterapii pro léčbu karcinomu prostaty (Cheever and Higano 2011). Poznatky získané během klinického testování jsou popsány níže. Lze si také představit, že při záměně nádorového antigenu (změnou antigenu připojenému k GM-CSF ve fúzním proteinu) je tento přístup teoreticky rozšiřitelný i na další typy nádorů.



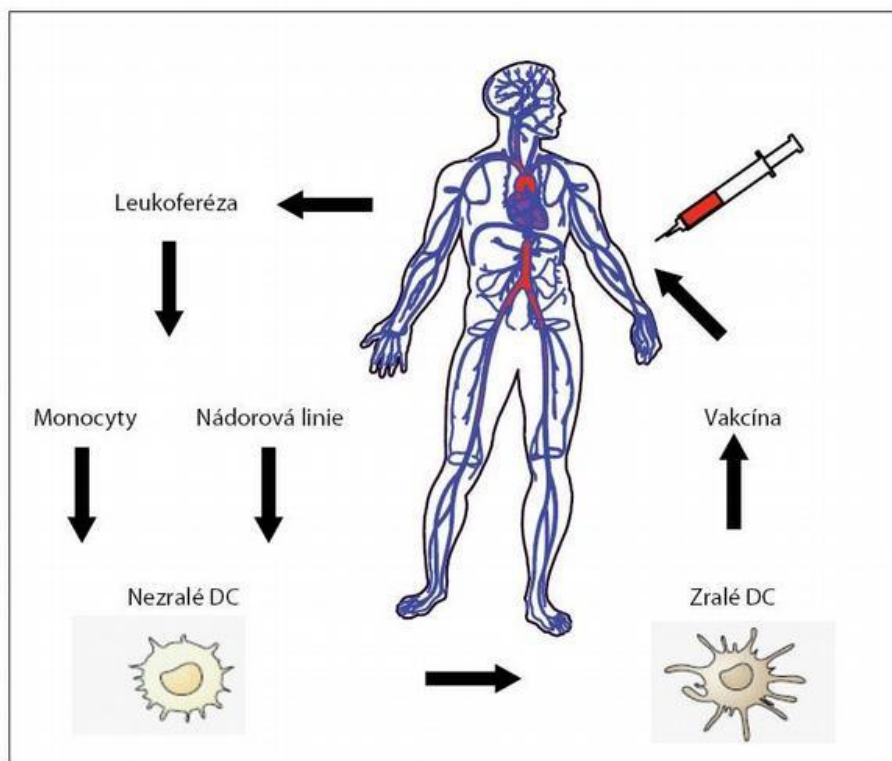
Obr 3: Imunoterapie Sipuleucelem-T: Pacientovy monocyty jsou obohaceny pomocí gradientové centrifugace a následně jsou inkubovány 36-44 hodin se specifickým fúzním proteinem, který spojuje GM-CSF s cílovým antigenem (PAP). GM-CSF zde zesiluje následnou maturaci APC, která následně prezentuje PAP peptidy hostitelskému imunitnímu systému způsobem, který aktivuje CD4 a CD8 T buňky.

(Převzato z <http://www.cancernetwork.com/prostate-cancer/content/article/10165/1821687>)

5.2.3. Imunoterapie založená na dendritických buňkách

Dendritické buňky (DC) jsou neúčinnější zástupci buněk prezentujících antigen (APC), které jako jediné mohou aktivovat naivní T-lymfocyty a tím zahájit primární specifickou imunitní odpověď proti antigenům, které v lymfatických uzlinách prezentují na svém povrchu.

Příkladem imunoterapie založené na DC je léčivý přípravek DCVAC/PCa, který je vyvíjen v laboratořích české společnosti SOTIO a připravován individuálně pro každého pacienta. Leukaferetickým odběrem se získá cca 100 ml krve, a poté je z monocytů připraveno velké množství nezralých dendritických buněk za přítomnosti IL-4 a GM-CSF. Pro aktivaci dendritických buněk je nutné, aby pohltily nádorové antigeny (v tomto případě usmrčené nádorové buňky buněčných linií, které poskytují široké spektrum nádorových antigenů). Zralé dendritické buňky jsou intradermálně injikované do těla pacienta, kde by měly migrovat do lymfatických uzlin a vystavit antigen na svém povrchu spolu s molekulami MHC, kostimulačními a adhezivními molekulami. Tím by měly aktivovat specifické T_H lymfocyty a zahájit tak protinádorovou imunitní odpověď. Léčivý přípravek, jehož aktivní složkou jsou zralé dendritické buňky, je na konci výroby zamražen a skladován při -190°C, protože je v průběhu roku opakovaně intradermálně aplikován pacientovi. V současné době realizuje společnost SOTIO čtyři klinické studie fáze II. pro ověření bezpečnosti a účinnosti přípravku DCVAC/PCa. Do testování se prozatím zapojila zhruba stovka pacientů z 13-ti českých nemocnic, kteří byli náhodně rozděleni do dvou skupin porovnávaných podle předem stanovených parametrů. Jedna skupina je léčena přípravkem DCVAC/PCa a druhá podstupuje standardní léčbu. Rozhodující budou ale výsledky klinického testování z fáze III., která zahrnuje pacienty z dalších zemí. Pro možnost celosvětového prodeje je totiž nutné prokázat účinnost vakcíny i u afroamerické populace, kde je rakovina prostaty až dvakrát častější než u bělochů. Tyto klinické studie fáze III. by měly začít ještě do konce letošního roku (Sotio [online]), (Fucikova, Rozkova et al. 2011).



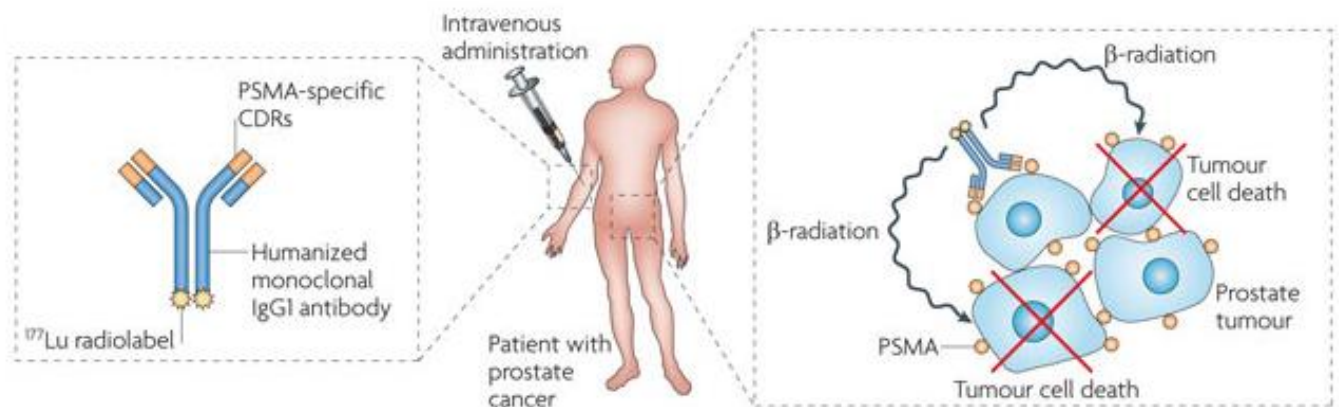
Obr. 4: Obecné schéma protinádorové imunoterapie pomocí vakcíny z dendritických buněk (Převzato z <http://www.zdn.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/moznosti-protinadorove-imunoterapie-u-karcinomu-prostaty-450508>)

5.3. Další možné postupy protinádorové imunoterapie karcinomu prostaty

Další možné postupy k imunoterapii zahrnují vakcíny založené na DNA; na rozdíl od postupů popsaných výše, které používají viry a pacientovy monocyty jako vektory, může být DNA rychle a precizně syntetizována, díky čemuž je jednoduché jí zaměřit téměř na jakýkoli vybraný antigen (Rice, Ottensmeier et al. 2008). Hlavní nevýhodou vektorů založených na DNA je jejich relativně nízký stupeň imunogenity oproti více imunogenním virovým vektorům popsaným výše. Ke zlepšení výsledku byly do DNA vakcín začleněny prozánětlivé molekuly- jako např.: herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 (ke zvýšení šíření z transferovaných do dendritických buněk), či agonisté Toll-like receptoru (TLR - k aktivaci APC) (Tsen, Paik et al. 2007), nebo byl vektorům, jako nespecifické adjuvans, podáván GM-CSF. GM-CSF zde pravděpodobně funguje tak, že atrahuje APC, zejména DC, k místu vakcinace (Shi, Liu et al. 2006). Nedávná klinická studie poukazuje na potenciální užitečnost vektorů založených na DNA u mužů s karcinomem prostaty: u populace mužů s biochemickou recidivou, kterým byla podána DNA vakcína kódující PAP, byla vyvolána PAP-specifická T buněčná odpověď, zároveň s inhibicí tempa růstu hladiny PSA (McNeel, Dunphy et al. 2009).

5.4. Pasivní imunoterapie

Na rozdíl od postupů popsaných výše, které jsou všechny příklady aktivní imunizace, monoklonální protilátky, specifické pro proteiny exprimované na povrchu nádorových buněk, jsou formou pasivní imunoterapie. Pasivní imunoterapie je dnes běžnou v tradiční klinické onkologii- protilátky specifické pro CD20 (jako rituximab (Rituxan/Mabthera; Genetech/Roche/Biogen Idec)), lidský epidermální růstový faktor receptor 2 (trastuzmab (Herceptin; Genetech/Roche)) a další nádorové antigeny jsou široce používány. Podobné látky pro terapii karcinomu prostaty jsou v časnějších fázích vývoje a zaměřují se především na PSMA (Tagawa, Beltran et al. 2010). Překvapivě je PSMA velmi exprimovaný ve vaskulatuře asociované s nádorem a také na povrchu nádorových buněk karcinomu prostaty, což činí tuto látku potenciálně použitelnou pro jiné typy karcinomů (Milowsky, Nanus et al. 2007). Časně klinické studie humanizované PSMA-specifické protilátky (J591; Cornell Weill Medical College) ukázaly imponující cílení nádoru, ale u pacientů s pokročilými nádory, kteří byli zahrnuti v těchto studiích, bylo zaznamenáno jen málo objektivních klinických odpovědí. Podobně jako u jiných monoklonálních protilátek, vyvinutých pro léčbu jiných typů karcinomů, pokračoval aktuální vývoj J591 k verzi radioizotopového značení, s cílem zprostředkování smrti nádorových buněk lokalizací radioaktivního emitoru β záření v blízkosti pacientovy nádorové masy (Bander, Milowsky et al. 2005). V současnosti probíhá několik studií, zahrnující ^{177}Lu -značené J591, včetně studií kombinující tuto látku se standardní terapií karcinomu prostaty.



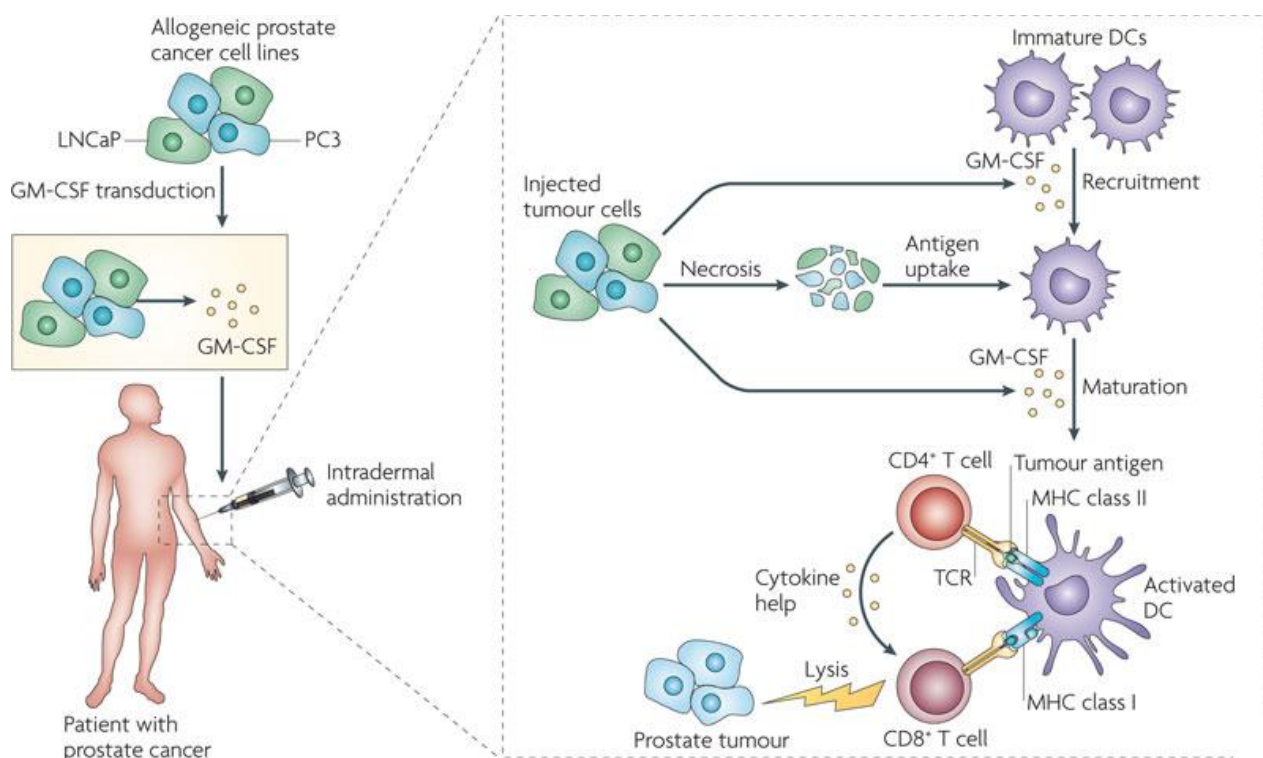
Obr. 5: J591 je antigeně specifický postup používající lidské monoklonální protilátky specifické pro prostatický specifický membránový antigen (PSMA). Ačkoli rané studie používaly neznačené protilátky, nynější studie zahrnují ^{177}Lu značený J591 a beta zářič s poločasem rozpadu a délkou prostupnosti příznivými pro radioterapii a imunoterapii. Zde protilátka specificky zamíří radioaktivní isotop do cílové tkáně, kde je zářením zprostředkovaná smrt nádorové buňky. (Převzato z (Drake 2010))

6. Polyvalentní imunoterapie

Antigenně- specifické imunologické postupy, které jsou popsány výše, mají - co se týče imunitní kontroly - nespornou výhodu: indukce T buněčné odpovědi proti specifickému nádorovému antigenu po podání přípravku může být zkoumána řadou konvenčních metod buněčné imunologie, například metodou ELISPOT (enzyme-linked immunosorbent spot assay) nebo pomocí intracelulárního značení na průtokovém cytometru (Keilholz, Weber et al. 2002). Nicméně, cílení imunitní odpovědi proti jednomu určitému nádorovému antigenu sebou nese nebezpečí, že nádorové buňky pod selekčním tlakem imunitního systému vyvinou tzv. únikové varianty, které již nemusí tento určitý nádorový antigen exprimovat. Tento jev tzv. únik nádoru imunitnímu dohledu byl přesvědčivě zdokumentován u řady experimentálních modelů (Ohnmacht, Wang et al. 2001), ale i u nádorů izolovaných v různých časech od pacientů. Tomuto nežádoucímu jevu by mohly zabránit strategie, které cílí více nádorových antigenů najednou.

6.1. Imunoterapie založená na buňkách

Jedním z příkladů polyvalentní protinádorové imunoterapie karcinomu prostaty je technologie známá jako GVAX (BioSante) (Simons and Sacks 2006), ve které jsou GM-CSF-transdukované nádorové buňky karcinomu prostaty použity pro indukci protinádorové imunitní reakce. Tyto buňky jsou injikovány intradermálně; GM-CSF atrahuje do místa aplikace APC, které následně v lymfatických uzlinách aktivují T lymfocyty specifické proti mnoha nádorovým antigenům (Shi, Liu et al. 2006)(obr. 6). Dřívější studie GVAXu byly založeny na přípravě vakcíny autologních nádorových buněk jednotlivých pacientů. Později byla pro přípravu využita nádorová linie karcinomu prostaty LNCaP, která exprimuje celou řadu nádorových antigenů sdílených mezi jednotlivými pacienty (Thomas, Santarsiero et al. 2004). Nádorová linie je navíc transdukována genem, který kóduje GM-CSF. Tento postup byl postupně vyvinut i pro další typy nádorových onemocnění (karcinom slinivky, prsu, plic a pro některé hematologické malignity). Časně fáze klinického testování prokázaly, že GVAX indukuje protilátkovou i buněčnou odpověď proti použitým buňkám (Nguyen, Tu et al. 2010). Na základě těchto výsledků byla zahájena studie fáze III, která ovšem nebyla úspěšná (Higano, 2009 [online]). Z této neúspěšné studie fáze III je možno vyvodit mnoho důležitých ponaučení týkající se jak designu klinických studií, tak nádorové imunologie u lidí (viz. níže).

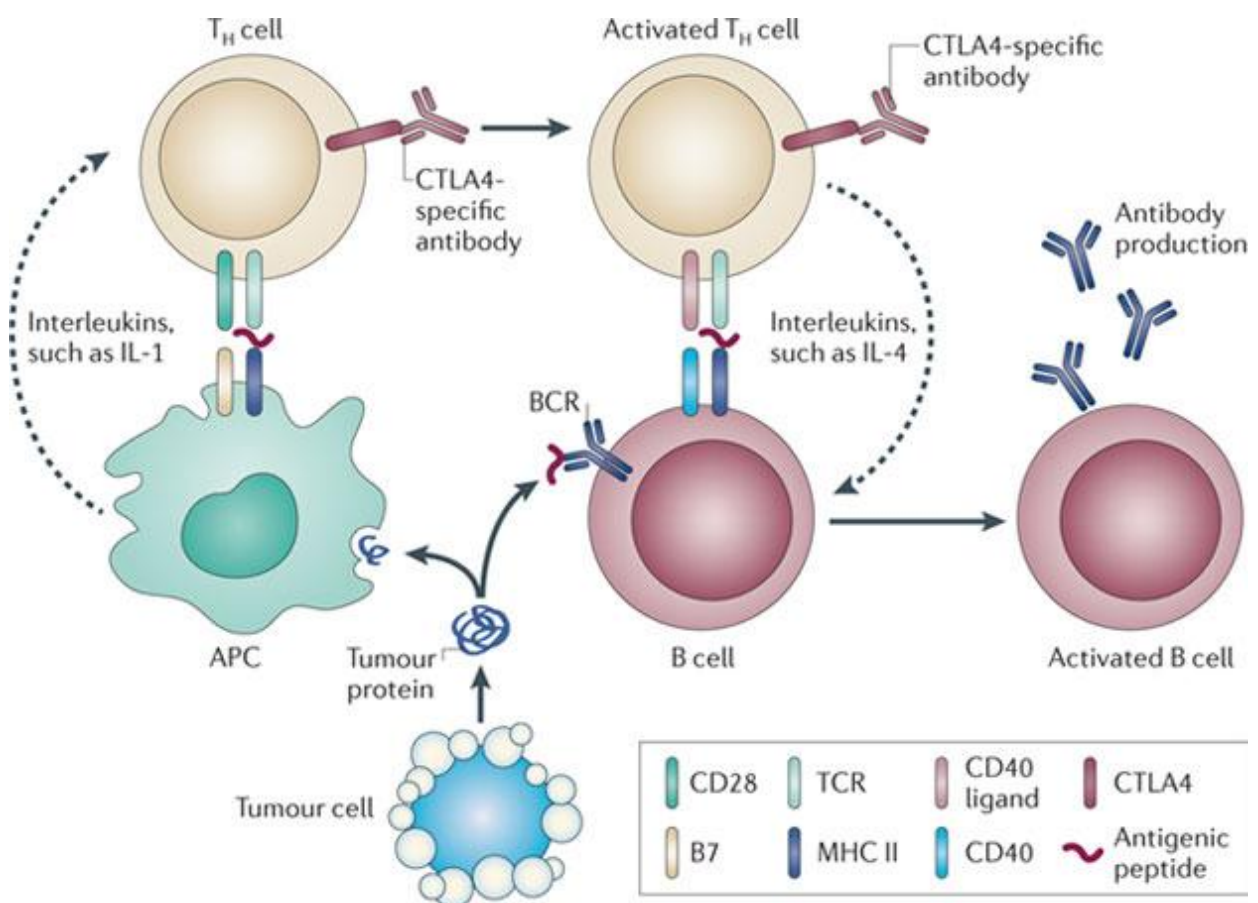


Obr. 6: Nádorové buněčné linie vylučují GM-CSF, ten přitahuje APC do místa vpichu. Injikované nádorové buňky prodělávají nekrózu a buněčný debris je zachycen přitaženými APC, ty musí maturovat, aby mohly efektivně zahájit imunitní odpověď. U prostatického GVAXu jsou injikované nádorové buňky vzhledem k léčeným pacientům alogenní, tudíž se tato imunoterapie spoléhá na zkříženou prezentaci k zahájení CD8 T buněčné protinádorové imunitní odpovědi. Používané prostatické nádorové buněčné linie jsou LNCaP a PC3, což jsou v uvedeném pořadí androgen-senzitivní a kastraci rezistentní prostatické nádorové buňky. (Převzato z (Drake 2010))

6.2. Imunitní blokáda kontrolních bodů

Kromě různých imunologických postupů popsaných výše se nedávné studie zaměřují na koncepci imunitních kontrolních bodů (checkpoints) – molekul, které inhibují právě probíhající imunitní odpověď (Fong and Small 2008). Nejdále v klinickém vývoji inhibitorů kontrolních bodů jsou protilátky specifické pro CTLA4 (ipilimumab a tremelimumab). Důležitost CTLA4 v inhibici imunitní odpovědi byla zřejmá již z dřívějších studií na myších modelech, ve kterých CTLA4- knockoutovaná myš zemřela ve věku ~4-6 týdnů na rychle probíhající lymfoproliferativní onemocnění (Tivol, Borriello et al. 1995). Blokáda CTLA4 je testována u několika maligních onemocnění, nejdále pokročily klinické studie u pacientů s maligním melanomem, u kterých je blokáda CLTA4 pomocí monoklonální protilátky spojena s přibližně 10% objektivních klinických odpovědí, ale také (ve shodě s daty z myších modelů) s významnou mírou (25 - 35%) klinicky významné toxicity (Weber 2009). Většina toxických účinků má charakter autoimunitních reakcí, které jsou u řady pacientů až život ohrožující. Tyto údaje jsou pozoruhodné, neboť bylo zaznamenáno jen málo významných

objektivních odpovědí při testování nádorových vakcín (Rosenberg, Yang et al. 2004); tyto klinické údaje naznačují, že blokování imunitních kontrolních bodů, které omezují stávající protinádorové imunitní odpovědi, může být účinnější, než vyvolání protinádorové imunitní odpovědi očkováním *de novo*. U pacientů ve stádiu IV maligního melanomu byl v minulém roce ipilimumab schválen ke klinickému používání na základě studie fáze III, která prokázala zlepšení přežití u pacientů, kterým byla tato protilátka podávána (Hodi, O'Day et al. 2010). Tyto data také podporují názor, že někteří pacienti mohou mít populaci nádorově-specifických T buněk, které jsou připravené zprostředkovat protinádorovou odpověď, ale tato populace buněk je účinně inhibována expresí CTLA4. Ipilimumab byl testován i u karcinomu prostaty v několika studiích fáze I a II, kde byly popsány objektivní klinické odpovědi a snížení hladiny PSA. Na základě těchto dat jsou nyní v plném proudu studie fáze III, porovnávající ipilimumab s placebem u mužů s hormonálně refrakterním karcinomem prostaty, kteří nereagovali na předchozí chemoterapii (www.ClinicalTrials.gov, identifier: NCT00861614).



Obr. 7: Imunitní blokáda kontrolních bodů je ilustrována protilátkami specifickými pro CTLA4, které blokují imunosupresi zprostředkovanou interakcí mezi CD80 a CD86 (na APC) a CTLA4 (na CD8 a CD4 T buňkách) a zvyšují tak aktivaci T buněk. (Převzato z http://www.nature.com/nrc/journal/v12/n4/fig_tab/nrc3223_F2.html)

Dalším důležitým inhibítozem jsou protilátky specifické pro PD1, kde interakce mezi programovanou buněčnou smrtí 1 (PD1- programmed cell death 1) na T buňkách a jejím ligandem B7-H1 (známým také jako PDL1) buď na APC nebo na nádorových buňkách, byla předmětem několika nedávných studií časné fáze. Interakce mezi LAG3 (lymphocyte activation gene 3) na T buňkách a MHC molekul II. třídy na APC je také inhibiční; samozřejmě absence reakcí CD8 T buněk může záviset na interakci několika vzájemně se nepřekrývajících kontrolních bodech.

7. Klinické studie imunoterapie karcinomu prostaty

Několik imunoterapeutických postupů pro karcinom prostaty popsaných výše bylo testováno v rozsáhlých klinických studiích; analýza těchto studií nám může poskytnout jedinečné poznatky o imunoterapii, které by se mohly použít i pro další solidní nádory. Kromě toho nám tyto studie poskytují zajímavá data týkající se aplikace imunologických poznatků z laboratoře do klinického prostředí.

7.1. Přežití je nejsilnějším klinickým cílovým ukazatelem

Podobně jako má experiment v laboratoři konkrétní výsledek, tak i klinická studie musí mít jasně definované hodnotící parametry, z nichž nejdůležitější je tzv. primary endpoint. Klinické studie u pacientů s nádorovými onemocněními často jako míru progresu nádoru používají ukazatele hodnotící progresi nádoru. Soubor těchto ukazatelů a kritérií jejich hodnocení je známý jako RECIST (response evaluation criteria in solid tumours = kritéria hodnotící odpověď u solidních nádorů) nebo kritéria Světové zdravotnické organizace (WHO criteria). Je důležité poznamenat, že systém RECIST byl vyvinut během éry cytotoxické chemoterapie, a tudíž jsou tyto kritéria založena na dvou implicitních předpokladech: efektivní terapie zmenšuje nádory a smrštění nádoru prospívá pacientovi (Therasse, Arbuck et al. 2000). Takže typický klinický cílový ukazatel v onkologických klinických studiích často bývá doba do progresu nádoru (TTP-time to tumour progression), s progresí stanovenou dle kritérií RECIST. Samozřejmě i první randomizovaná klinická studie fáze III u Sipuleucelu-T (the D901 trial) (Small, Schellhammer et al. 2006) byla navržena s TTP jako klinickým cílovým ukazatelem, stejně jako nedávno publikované výsledky studie fáze II u ProstVacu (Kantoff, Schuetz et al. 2010). Ani v jedné z těchto studií nebyl pozorován statisticky signifikantní rozdíl v době do progresu nádoru mezi aktivní imunoterapií a placebem. Na rozdíl od toho byl u obou testů jasný a statisticky signifikantní rozdíl v celkovém přežití mezi skupinami s imunoterapií a placebem. Toto zjištění je v souladu s výsledky nedávno publikovaných

výsledků randomizovaných studií fáze III s ipilimumabem u pacientů s metastazujícím melanomem, u kterých došlo - navzdory nízké míře (11%) objektivních klinických odpovědí – k významnému prodloužení celkového přežití (Hodi, O'Day et al. 2010). Mechanizmy stojící za tímto rozporem nejsou zcela známy, ale zřejmě jde o to, že indukce protinádorové imunitní odpovědi sice nevede ke zmenšení/vymizení nádorové tkáně, ale imunitní reakce zpomaluje progresi a zřejmě může vést i ke stabilizaci onemocnění, což se projeví prodloužením přežití. Byla navržena modifikovaná provedení RECIST a WHO kritérií, která používají alternativní definice odpovědi a tudíž mohou přesněji zhodnotit potenciální klinické výhody imunoterapie (Wolchok, Hoos et al. 2009). Ovšem nutnost použití celkového přežití jako jediného relevantního parametru klinického hodnocení ve skutečnosti znamená, že proces klinického testování protinádorové imunoterapie u mužů s karcinomem prostaty je v současné době omezen na pacienty s hormonálně refrakterním onemocněním, u kterých lze v reálném čase 3-4 let dosáhnout sledovaného parametru. Tento fakt je v rozporu s teoretickými předpoklady, že imunoterapie by měla mít největší šanci na úspěch u pacientů v časných fázích onemocnění (Gulley, Arlen et al. 2010).

7.2. Imunoterapie může být účinnější u časnějších forem onemocnění

I když se může zdát nepřímý vztah mezi velikostí nádoru a odpovědí na imunoterapii zřejmý, existuje jistá polemika obklopující toto téma, protože objektivní klinické odpovědi byly zaznamenány u pacientů s pokročilým onemocněním léčených adoptivní T buněčnou terapií, stejně jako u pacientů s několika typy nádorů léčených blokádou kontrolních bodů (Korman, Peggs et al. 2006). Nicméně nedávno zveřejněná retrospektivní studie mužů s karcinomem prostaty léčených přípravkem ProstVac v rámci klinické studie fáze II poskytuje pro toto pojetí řadu klinických důkazů. Pro odhad očekávaného přežití pacientů byl v této studii použit zavedený prediktivní algoritmus - Halabi nomogram (model, který používá historická data k odhadu doby přežití u pacientů s progresivním karcinomem prostaty) (Halabi, Small et al. 2003). Halabi skóre bylo při zařazení pacientů do studie použito jako stratifikační kritérium (Gulley, Arlen et al. 2010). Při vyhodnocení studie se ukázalo, že pacienti s vyšším očekávaným přežitím v době zařazení do studie profitovali z protinádorové imunoterapie mnohem více než pacienti s nižším očekávaným přežitím. U pacientů s předpokládanou dobou přežití nižší než 16 měsíců se neprojevil žádný pozitivní efekt na dobu přežití.

7.3. Studie fáze III by měly být založeny na výsledcích studií fáze II

U onkologických onemocnění je mnohem menší úspěšnost klinických studií fáze III než u

jiných lékařských specializací. Bylo předloženo několik hypotéz k vysvětlení této otázky, ale pravděpodobně nejjednodušší se týká designu studií fáze II, které jsou většinou prováděny k určení klinického přínosu zkoumaného agens a k upřesnění designu náročných a drahých fází III klinického hodnocení. Ačkoliv pozitivní prediktivní hodnota výsledků studie fáze II pro úspěch fáze III není rozhodující, negativní prediktivní hodnota je důležitá: negativní výsledek klinické studie fáze II v onkologii jasně předpovídá negativní výsledek klinických studií fáze III (Ratain 2005). Tento problém je nejlépe ilustrován na příkladu vývoje přípravku GVAX pro protinádorovou imunoterapii karcinomu prostaty. Časné studie fáze I a II prokázaly bezpečnost GVAXu a byly použity imunologické koreláty (vývoj protilátek specifických proti nádorovým antigenům) pro výběr dávkovacího režimu (Higano, Corman et al. 2008). Avšak v těchto klinických studiích nebyl GVAX nikdy přímo porovnáván s chemoterapií, ani nebyl podáván souběžně s chemoterapií. Přesto byly zahájeny dvě velmi nákladné studie fáze III, ve kterých byl GVAX porovnáván s pacienty, kteří byli léčeni paliativní chemoterapií docetaxelem. V první studii (VITAL-1) byla, navzdory skutečnosti, že bylo zaznamenáno jen několik radiograficky zjistitelných odpovědí ve studiích fáze II, imunoterapie GVAX přímo porovnávána s chemoterapií u mužů s asymptomatickým hormonálně refrakterním karcinomem prostaty. Následně byla zahájena druhá studie fáze III (VITAL-2), která testovala hypotézu, že by kombinace imunoterapie a chemoterapie mohla prodloužit dobu přežití u mužů s více pokročilým symptomatickým hormonálně refrakterním karcinomem prostaty. I když v testech na zvířatech (Prell, Gearin et al. 2006) bylo prokázáno, že má imunoterapie aditivní účinek k chemoterapii, nebyly provedeny žádné studie fáze II, které by ověřily tento výsledek u lidí, nebo by zkoumaly potřebné množství či rozvrh dávkování. Plánovaná prozatímní analýza testu VITAL-2 prokázala vyšší počet úmrtí u pacientů léčených kombinací GVAXu a chemoterapie a test tím byl ukončen. Tento nečekaný výsledek ještě musí být vysvětlen z hlediska imunologických, nebo klinických mechanismů. Tyto události vedly k předčasné analýze výsledků probíhající studie VITAL-1, která ukázala, že studie pravděpodobně nedosáhne na statisticky významné zlepšení celkového přežití a studie byla předčasně ukončena. Při zpětném pohledu tato zkušenost zdůrazňuje důležitost testování ve fázi II, a to zejména u kombinovaných přístupů, ve kterých by dávkování a načasování mohly mít zásadní význam.

8. Kombinovaná imunoterapie

Většina léčebných režimů pro pacienty s pokročilým onemocněním zahrnuje kombinaci

chemoterapeutických léčiv, nebo kombinaci radioterapie a chemoterapie. Tudíž je možné, že k dosažení maximálního přínosu pro pacienta, bude potřeba imunoterapii kombinovat se standardní terapií. Naštěstí má mnoho tradičních přístupů pro léčbu karcinomu prostaty, ale i jiných typů nádorů, přínosný imunologický efekt (viz níže), což dělá z kombinovaných pokusů atraktivní přístup. Dokonce i chemoterapie, která je obecně vnímána jako imunosupresivní, může do jisté míry podporovat protinádorovou odpověď (Zitvogel, Apetoh et al. 2008).

8.1. Androgenní ablace

Imunologické efekty androgenní ablace, jsou překvapivé, protože ovlivňují thymus, který obecně není vnímán jako androgen-senzitivní orgán (Aragon-Ching, Williams et al. 2007). U starých myší, se pravděpodobně v důsledku androgenní ablace, obnovil původně involující thymus a zvýšila se produkce naivních T lymfocytů, což bylo stanoveno zvýšením počtu T cell receptor excision circles (TRECs- malé kroužky DNA, které vznikají v T buňkách během jejich maturace v brzlíku, když přeskupují TCR geny) v periferní krvi (Sutherland, Goldberg et al. 2005). Podobné úkazy byly pozorovány u lidí. Jak již bylo poznamenáno výše, androgenní ablace před operací karcinomu prostaty má za výsledek infiltraci CD4 T buněk do prostaty a tyto buňky mají aktivovaný fenotyp (Mercader, Bodner et al. 2001). Zároveň nedávné údaje prokazují indukci protilátek s novými specifitami u léčených pacientů (Nesslinger, Sahota et al. 2007) a podporují pro-imunogenní roli androgenní ablace. Představa, že androgenní ablace může zesílit protinádorovou imunitní odpověď u karcinomu prostaty, má tedy silný vědecký základ a byla zhodnocena v několika klinických studiích. Časná studie testovala jednu dávku ProstVacu v kombinaci s androgenní ablací a tato kombinace byla velmi dobře snášena (Sanda, Smith et al. 1999). V pozdějších randomizovaných testech byly imunitní odpovědi na ProstVac mnohem četnější u mužů, kteří podstoupili androgenní ablací po aktivní imunoterapii (Madan, Gulley et al. 2008), než u těch, kteří ji podstoupili před imunoterapií. Také Sipuleucel-T byl testován společně s androgenní ablací: v tomto případě byla imunoterapie podávána až po androgenní ablací, ale výsledky této studie ještě nebyly zveřejněny. Dohromady vzato, tyto studie podporují názor, že kombinace imunitní a hormonální terapie by mohla být klinicky zajímavá a zaslouží si dalšího vyhodnocení.

8.2. Radioterapie

Přestože jsou cytotoxické vlivy radiační terapie brány v potaz, nedávné výsledky podporují

názor, že ozařování nádorových buněk může pomoci zahájit protinádorovou imunitní odpověď (Apetoh, Ghiringhelli et al. 2007). Na buněčné bázi se zdá, že tento proces zahrnuje pohlcení umírajících nádorových buněk buňkami prezentující antigen (APC) a prezentaci nádorových antigenů buňkám imunitního systému, a dále indukci prozánětlivého mikroprostředí způsobenou radiací (Chakraborty, Abrams et al. 2003). U pacientů s karcinomem prostaty jsou důkazem imunologického efektu radioterapie data, která ukazují indukci protilátek s novými specifitami po prodělané léčbě radioterapií (Nesslinger, Sahota et al. 2007). Ačkoliv molekulární mechanismy pro tyto imunologické efekty radioterapie jsou složité (Zitvogel, Apetoh et al. 2008), nedávná studie ukázala, že protein high mobility group box 1 (HMGB1) uvolňovaný z umírající nádorové buňky může fungovat jako agonista TLR4, a tím aktivovat APC přímo v parenchymu nádoru a přispět tak k zahájení imunitní odpovědi (Apetoh, Ghiringhelli et al. 2007). Je třeba poznamenat, že tyto imunostimulační účinky nejsou unikátní pro záření indukovanou buněčnou smrt, ale mohou být vyvolané i když jsou nádorové buňky zabity jistými chemoterapeutickými látkami. Několik preklinických studií se shoduje, že kombinace ozařování a imunoterapie může mít buď aditivní, nebo synergický účinek ve smyslu protinádorové odpovědi (Demaria, Kawashima et al. 2005). Tento koncept byl klinicky hodnocen v malém randomizovaném testu na mužích podstupujících primární radioterapii karcinomu prostaty (Gulley, Arlen et al. 2005); 13 ze 17 pacientů ze skupiny s kombinovanou léčbou radioterapie a imunoterapie mělo více než trojnásobný vzrůst počtu PSA-specifických T buněk, zatímco u skupiny, která byla léčena pouze radioterapií, se nevyskytl žádný nárůst počtu PSA-specifických T buněk. Avšak, stejně jako tomu je i u kombinace chemoterapie s imunoterapií, relativní řazení jednotlivých agens může mít zásadní význam (Harris, Hipkiss et al. 2008). Právě probíhající randomizovaná klinická studie fáze III s ipilimumabem u mužů karcinomem prostaty, u kterých byla chemoterapie neúčinná, začleňuje ve snaze vyvolat počáteční protinádorovou imunitní odpověď - malé dávky radioterapie. Protože se radioterapie běžně používá v primární léčbě různých typů nádorů, o kombinaci radioterapie a imunoterapie by mohl být stále větší zájem.

8.3. Blokáda kontrolních bodů

Nový přístup k imunoterapii zahrnuje kombinaci několika imunologických agens, jež mají úkol zahájit protinádorovou odpověď a zabránit potlačování stávajících a nových odpovědí. U karcinomu prostaty vyšly první publikované výsledky ze studie kombinující CTLA4-specifickou protilátku (ipilimumab) s GM-CSF, ve snaze stimulovat endogenní protinádorovou imunitní odpověď (Fong, Kwek et al. 2009). Dalším významným konceptem

může být kombinace aktivní, specifické imunoterapie s látkou blokující imunitní kontrolní body. Tento koncept byl testován v klinické (dose-escalation study) studii fáze I, kdy byl kombinován GVAX s ipilimumabem. Byly zaznamenány jak poklesy hladiny PSA, tak radiograficky detekovatelné nádorové odpovědi. Analogicky s ostatními studii s ipilimumabem byly tyto odpovědi spojeny s nežádoucími účinky autoimunitního charakteru, zahrnující hypofyzitidu (Blansfield, Beck et al. 2005). Podobná kombinovaná studie byla provedena s ProstVacem, na její výsledky se v současné době čeká. Další studie kombinující použití GVAX u pacientů s karcinomem pankreatu spolu s ipilimumabem je v počátečních fázích sběru výsledků. Je třeba poznamenat, že výskyt vysoké toxicity ipilimumabu může být v těchto studiích limitujícím faktorem.

V zásadě lze shrnout, že existuje řada vědeckých argumentů, které podporují kombinaci různých typů protinádorové imunoterapie, stejně jako kombinaci imunoterapie se standardní léčbou, jako je radioterapie, hormonální terapie a chemoterapie. U některých typů nádorů, jako je například karcinom prsu, mohou tyto postupy zahrnovat také specifické monoklonální protilátky nebo cílená léčiva, jako je například imatinib u chronické myeloidní leukémie (Smith, Kasamon et al. 2010). Kombinované postupy ale mají vyšší požadavky na design klinických studií, který je složitější a stejně tak je velkou výzvou nalezení správného dávkovacího schématu a načasování podávání.

9. Závěr

Cílem této práce bylo shrnout dosavadní strategie protinádorové imunoterapie karcinomu prostaty. V posledních letech se objevilo několik zajímavých přístupů pro boj s nádorovým onemocněním, kdy se po úspěšných myších studiích přistupuje ke klinickému testování na lidech s vidinou klinického přínosu pro pacienty. Nutnost těchto zdlouhavých a nákladných klinických studií je evidentní, jednak eliminují neúspěšné a nebezpečné přípravky, jak tomu bylo u prostatického GVAXu, a také určují optimální dávkování a načasování.

Zatím jediným lékem pro antigenně specifickou imunoterapii pacientů s hormonálně refrakterním karcinomem prostaty byl v dubnu roku 2010 schválen Sipuleucel-T, který pomocí autologních monocytů inkubovaných s GM-CSF a PAP vyvolá CD4 a CD8 T buněčnou odpověď. Většinu zde zmíněných poznatků a principů, lze při drobných změnách aplikovat i na další nádorová onemocnění.

Stálé pokroky v imunologii přinášejí nové a nové metody protinádorové imunoterapie, jako velmi slibnou se rýsuje imunoterapie založená na dendritických buňkách, která je stále ve fázích klinického testování. Proto bych se také ráda tímto tématem zabývala i v diplomové práci.

10. Seznam použité literatury

- Ammirante, M., J. L. Luo, et al. (2010). "B-cell-derived lymphotoxin promotes castration-resistant prostate cancer." *Nature* **464**(7286): 302-305.
- Apetoh, L., F. Ghiringhelli, et al. (2007). "Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy." *Nat Med* **13**(9): 1050-1059.
- Aragon-Ching, J. B., K. M. Williams, et al. (2007). "Impact of androgen-deprivation therapy on the immune system: implications for combination therapy of prostate cancer." *Front Biosci* **12**: 4957-4971.
- Arlen, P. M., H. L. Kaufman, et al. (2005). "Pox viral vaccine approaches." *Semin Oncol* **32**(6): 549-555.
- Bander, N. H., M. I. Milowsky, et al. (2005). "Phase I trial of 177lutetium-labeled J591, a monoclonal antibody to prostate-specific membrane antigen, in patients with androgen-independent prostate cancer." *J Clin Oncol* **23**(21): 4591-4601.
- Bill-Axelson, A., L. Holmberg, et al. (2011). "Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer." *N Engl J Med* **364**(18): 1708-1717.
- Blansfield, J. A., K. E. Beck, et al. (2005). "Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 blockage can induce autoimmune hypophysitis in patients with metastatic melanoma and renal cancer." *J Immunother* **28**(6): 593-598.
- Bronte, V., T. Kasic, et al. (2005). "Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers." *J Exp Med* **201**(8): 1257-1268.
- Burnet, F. M. (1970). "The concept of immunological surveillance." *Prog Exp Tumor Res* **13**: 1-27.
- De Marzo, A. M., E. A. Platz, et al. (2007). "Inflammation in prostate carcinogenesis." *Nat Rev Cancer* **7**(4): 256-269.
- Demaria, S., N. Kawashima, et al. (2005). "Immune-mediated inhibition of metastases after treatment with local radiation and CTLA-4 blockade in a mouse model of breast cancer." *Clin Cancer Res* **11**(2 Pt 1): 728-734.
- Drake, C. G. (2010). "Prostate cancer as a model for tumour immunotherapy." *Nat Rev Immunol* **10**(8): 580-593.
- Drake, C. G., A. D. Doody, et al. (2005). "Androgen ablation mitigates tolerance to a prostate/prostate cancer-restricted antigen." *Cancer Cell* **7**(3): 239-249.
- Drake, C. G., E. Jaffee, et al. (2006). "Mechanisms of immune evasion by tumors." *Adv Immunol* **90**: 51-81.
- Dunn, G. P., C. M. Koebel, et al. (2006). "Interferons, immunity and cancer immunoediting." *Nat Rev Immunol* **6**(11): 836-848.
- Dunn, G. P., L. J. Old, et al. (2004). "The three Es of cancer immunoediting." *Annu Rev Immunol* **22**: 329-360.
- Fong, L., S. S. Kwek, et al. (2009). "Potentiating endogenous antitumor immunity to prostate cancer through combination immunotherapy with CTLA4 blockade and GM-CSF." *Cancer Res* **69**(2): 609-615.
- Fong, L., C. L. Rugg, et al. (1997). "Induction of tissue-specific autoimmune prostatitis with prostatic acid phosphatase immunization: implications for immunotherapy of prostate cancer." *J Immunol* **159**(7): 3113-3117.
- Fong, L. and E. J. Small (2008). "Anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 antibody: the first in an emerging class of immunomodulatory antibodies for cancer treatment." *J Clin Oncol* **26**(32): 5275-5283.
- Freedland, S. J. and J. W. Moul (2007). "Prostate specific antigen recurrence after definitive therapy." *J Urol* **177**(6): 1985-1991.
- Fucikova, J., D. Rozkova, et al. (2011). "Poly I: C-activated dendritic cells that were generated in CellGro for use in cancer immunotherapy trials." *J Transl Med* **9**: 223.
- Gannon, P. O., A. O. Poisson, et al. (2009). "Characterization of the intra-prostatic immune cell infiltration in androgen-deprived prostate cancer patients." *J Immunol Methods* **348**(1-2): 9-17.

- Getnet, D., C. H. Maris, et al. (2009). "Tumor recognition and self-recognition induce distinct transcriptional profiles in antigen-specific CD4 T cells." J Immunol **182**(8): 4675-4685.
- Greenberg, N. M., F. DeMayo, et al. (1995). "Prostate cancer in a transgenic mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(8): 3439-3443.
- Gulley, J. L., P. M. Arlen, et al. (2005). "Combining a recombinant cancer vaccine with standard definitive radiotherapy in patients with localized prostate cancer." Clin Cancer Res **11**(9): 3353-3362.
- Gulley, J. L., P. M. Arlen, et al. (2010). "Immunologic and prognostic factors associated with overall survival employing a poxviral-based PSA vaccine in metastatic castrate-resistant prostate cancer." Cancer Immunol Immunother **59**(5): 663-674.
- Halabi, S., E. J. Small, et al. (2003). "Prognostic model for predicting survival in men with hormone-refractory metastatic prostate cancer." J Clin Oncol **21**(7): 1232-1237.
- Harris, T. J., E. L. Hipkiss, et al. (2008). "Radiotherapy augments the immune response to prostate cancer in a time-dependent manner." Prostate **68**(12): 1319-1329.
- Higano, C. S., J. M. Corman, et al. (2008). "Phase 1/2 dose-escalation study of a GM-CSF-secreting, allogeneic, cellular immunotherapy for metastatic hormone-refractory prostate cancer." Cancer **113**(5): 975-984.
- Higano, C. S., P. F. Schellhammer, et al. (2009). "Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer." Cancer **115**(16): 3670-3679.
- Hodge, J. W., H. Sabzevari, et al. (1999). "A triad of costimulatory molecules synergize to amplify T-cell activation." Cancer Res **59**(22): 5800-5807.
- Hodi, F. S., S. J. O'Day, et al. (2010). "Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma." N Engl J Med **363**(8): 711-723.
- Chakraborty, M., S. I. Abrams, et al. (2003). "Irradiation of tumor cells up-regulates Fas and enhances CTL lytic activity and CTL adoptive immunotherapy." J Immunol **170**(12): 6338-6347.
- Cheever, M. A. and C. S. Higano (2011). "PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine." Clin Cancer Res **17**(11): 3520-3526.
- Jemal, A., F. Bray, et al. (2011). "Global cancer statistics." CA Cancer J Clin **61**(2): 69-90.
- Kantoff, P. W., T. J. Schuetz, et al. (2010). "Overall survival analysis of a phase II randomized controlled trial of a Poxviral-based PSA-targeted immunotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer." J Clin Oncol **28**(7): 1099-1105.
- Kaufman, H. L., W. Wang, et al. (2004). "Phase II randomized study of vaccine treatment of advanced prostate cancer (E7897): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group." J Clin Oncol **22**(11): 2122-2132.
- Keilholz, U., J. Weber, et al. (2002). "Immunologic monitoring of cancer vaccine therapy: results of a workshop sponsored by the Society for Biological Therapy." J Immunother **25**(2): 97-138.
- Kolonel, L. N., D. Altshuler, et al. (2004). "The multiethnic cohort study: exploring genes, lifestyle and cancer risk." Nat Rev Cancer **4**(7): 519-527.
- Korman, A. J., K. S. Peggs, et al. (2006). "Checkpoint blockade in cancer immunotherapy." Adv Immunol **90**: 297-339.
- Locker, G. Y., S. Hamilton, et al. (2006). "ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer." J Clin Oncol **24**(33): 5313-5327.
- Madan, R. A., P. M. Arlen, et al. (2009). "Prostvac-VF: a vector-based vaccine targeting PSA in prostate cancer." Expert Opin Investig Drugs **18**(7): 1001-1011.
- Madan, R. A., J. L. Gulley, et al. (2008). "Analysis of overall survival in patients with nonmetastatic castration-resistant prostate cancer treated with vaccine, nilutamide, and combination therapy." Clin Cancer Res **14**(14): 4526-4531.
- McNeel, D. G., E. J. Dunphy, et al. (2009). "Safety and immunological efficacy of a DNA vaccine encoding prostatic acid phosphatase in patients with stage D0 prostate cancer." J Clin Oncol **27**(25): 4047-4054.
- Mercader, M., B. K. Bodner, et al. (2001). "T cell infiltration of the prostate induced by androgen withdrawal in patients with prostate cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(25): 14565-14570.

- Milowsky, M. I., D. M. Nanus, et al. (2007). "Vascular targeted therapy with anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 in advanced solid tumors." J Clin Oncol **25**(5): 540-547.
- Nesslinger, N. J., R. A. Sahota, et al. (2007). "Standard treatments induce antigen-specific immune responses in prostate cancer." Clin Cancer Res **13**(5): 1493-1502.
- Nguyen, M. C., G. H. Tu, et al. (2010). "Antibody responses to galectin-8, TARP and TRAP1 in prostate cancer patients treated with a GM-CSF-secreting cellular immunotherapy." Cancer Immunol Immunother **59**(9): 1313-1323.
- Ohnmacht, G. A., E. Wang, et al. (2001). "Short-term kinetics of tumor antigen expression in response to vaccination." J Immunol **167**(3): 1809-1820.
- Pound, C. R., A. W. Partin, et al. (1999). "Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy." JAMA **281**(17): 1591-1597.
- Prell, R. A., L. Gearin, et al. (2006). "The anti-tumor efficacy of a GM-CSF-secreting tumor cell vaccine is not inhibited by docetaxel administration." Cancer Immunol Immunother **55**(10): 1285-1293.
- Ratain, M. J. (2005). "Phase II oncology trials: let's be positive." Clin Cancer Res **11**(16): 5661-5662.
- Rice, J., C. H. Ottensmeier, et al. (2008). "DNA vaccines: precision tools for activating effective immunity against cancer." Nat Rev Cancer **8**(2): 108-120.
- Rosenberg, S. A., J. C. Yang, et al. (2004). "Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines." Nat Med **10**(9): 909-915.
- Sanda, M. G., D. C. Smith, et al. (1999). "Recombinant vaccinia-PSA (PROSTVAC) can induce a prostate-specific immune response in androgen-modulated human prostate cancer." Urology **53**(2): 260-266.
- Sfanos, K. S., T. C. Bruno, et al. (2008). "Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing." Clin Cancer Res **14**(11): 3254-3261.
- Shankaran, V., H. Ikeda, et al. (2001). "IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." Nature **410**(6832): 1107-1111.
- Shi, Y., C. H. Liu, et al. (2006). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know." Cell Res **16**(2): 126-133.
- Simons, J. W. and N. Sacks (2006). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced allogeneic cancer cellular immunotherapy: the GVAX vaccine for prostate cancer." Urol Oncol **24**(5): 419-424.
- Small, E. J., P. F. Schellhammer, et al. (2006). "Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer." J Clin Oncol **24**(19): 3089-3094.
- Smith, B. D., Y. L. Kasamon, et al. (2010). "K562/GM-CSF immunotherapy reduces tumor burden in chronic myeloid leukemia patients with residual disease on imatinib mesylate." Clin Cancer Res **16**(1): 338-347.
- Sun, J., B. L. Chang, et al. (2008). "Cumulative effect of five genetic variants on prostate cancer risk in multiple study populations." Prostate **68**(12): 1257-1262.
- Sutherland, J. S., G. L. Goldberg, et al. (2005). "Activation of thymic regeneration in mice and humans following androgen blockade." J Immunol **175**(4): 2741-2753.
- Tagawa, S. T., H. Beltran, et al. (2010). "Anti-prostate-specific membrane antigen-based radioimmunotherapy for prostate cancer." Cancer **116**(4 Suppl): 1075-1083.
- Tannock, I. F., R. de Wit, et al. (2004). "Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer." N Engl J Med **351**(15): 1502-1512.
- Terasawa, H., K. Y. Tsang, et al. (2002). "Identification and characterization of a human agonist cytotoxic T-lymphocyte epitope of human prostate-specific antigen." Clin Cancer Res **8**(1): 41-53.
- Therasse, P., S. G. Arbuck, et al. (2000). "New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada." J Natl Cancer Inst **92**(3): 205-216.

- Thomas, A. M., L. M. Santarsiero, et al. (2004). "Mesothelin-specific CD8(+) T cell responses provide evidence of in vivo cross-priming by antigen-presenting cells in vaccinated pancreatic cancer patients." *J Exp Med* **200**(3): 297-306.
- Tivol, E. A., F. Borriello, et al. (1995). "Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4." *Immunity* **3**(5): 541-547.
- Tsen, S. W., A. H. Paik, et al. (2007). "Enhancing DNA vaccine potency by modifying the properties of antigen-presenting cells." *Expert Rev Vaccines* **6**(2): 227-239.
- Walsh, P. C., T. L. DeWeese, et al. (2007). "Clinical practice. Localized prostate cancer." *N Engl J Med* **357**(26): 2696-2705.
- Weber, J. (2009). "Ipilimumab: controversies in its development, utility and autoimmune adverse events." *Cancer Immunol Immunother* **58**(5): 823-830.
- Williams, S. A., P. Singh, et al. (2007). "Does PSA play a role as a promoting agent during the initiation and/or progression of prostate cancer?" *Prostate* **67**(3): 312-329.
- Wolchok, J. D., A. Hoos, et al. (2009). "Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria." *Clin Cancer Res* **15**(23): 7412-7420.
- Zitvogel, L., L. Apetoh, et al. (2008). "The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success?" *J Clin Invest* **118**(6): 1991-2001.

Internetové zdroje:

Sotio [online]. 2011 [cit. 2012-05-12]. Dostupné z: <http://www.sotio.com>

HIGANO, C. A phase III trial of GVAX immunotherapy for prostate cancer versus docetaxel plus prednisone in asymptomatic, castration-resistant prostate cancer (CRPC). In: *A phase III trial of GVAX immunotherapy for prostate cancer versus docetaxel plus prednisone in asymptomatic, castration-resistant prostate cancer (CRPC)*. [online]. 2009 [cit. 2012-05-12]. Dostupné z: http://www.asco.org/ASCOv2/Meetings/Abstracts?&vmview=abst_detail_view&confID=64&abstractID=20543