Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie

Bc. Iva Malátová

Imunitní odpověď a nádorové mikroprostředí při léčbě polymerními cytostatiky

Immune response and tumor microenvironment in the treatment with polymer cytotoxic drugs

Diplomová práce

Školitelka: RNDr. Milada Šírová, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

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

V Praze dne …….

…….

Iva Malátová

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Miladě Šírové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost a cenné rady při vypracování mé diplomové práce. Dále děkuji všem kolegům z Laboratoře nádorové imunologie za jejich praktickou pomoc.

Velký dík patří mé rodině, přátelům a příteli za podporu a trpělivost.

Abstrakt

Chemoterapie je stále jednou z nepoužívanějších protinádorových terapií. Většinou jde o inhibici proliferace rychle se dělících buněk, není tedy selektivní vůči nádorovým buňkám. Díky tomu se s chemoterapií pojí mnoho nežádoucích vedlejších účinků. Nevýhodné vlastnosti chemoterapeutik je možné do značné míry eliminovat použitím konjugátů polymerů s nízkomolekulárními léčivy. Příkladem takového konjugátu je HPMA polymer s navázaným doxorubicinem. Kromě vlastností získaných vazbou na polymer, jako je dosažení rozpustnosti ve vodných roztocích, snížení systémové toxicity, zvýšení maximální tolerované dávky nebo pasivní cílení pomocí EPR efektu, se při terapii tímto léčivem využívá i faktu, že doxorubicin indukuje imunogenní buněčnou smrt.

Bylo již prokázáno, že po úplném vyléčení experimentálních myší pomocí polymerních konjugátů HPMA s doxorubicinem u části myší vzniká dlouhodobá rezistence vůči opětovné inokulaci letální dávkou nádorových buněk. Rezistence je specifická vůči konkrétnímu typu nádoru, ze kterého byla myš vyléčena a důležitou roli zde hrají $CD8^+$ cytotoxické T lymfocyty a IFNγ.

V této práci jsme sledovali změny v zastoupení imunitních populací a jejich aktivačních markerů po léčbě polymerními konjugáty na bázi HPMA s doxorubicinem a volným doxorubicinem v porovnání s neléčenými kontrolami. Z výsledků vyplývá, že imunitní odpověď proti nádoru je oproti terapii volným léčivem nebo oproti neléčeným kontrolám ve vyšší míře potencovaná terapií polymerním konjugátem. Aktivace imunitního systému se projevuje zejména na změnách exprese sledovaných markerů pro aktivované T lymfocyty (CD25), funkčně vyčerpané (PD-1) a chronicky aktivované (CTLA-4) T lymfocyty a ve zvýšeném zastoupení efektorových paměťových cytotoxických T lymfocytů ($CD44^+CD62L^-$). Tyto změny jsme sledovali u populací tumor infiltrujících lymfocytů (TIL) a také na periferii, ve slezinách. Aktivace imunitního systému byla dále potvrzena zvýšenou hladinou IFNγ v plazmě myší léčených polymerním konjugátem.

Dále bylo ověřeno, zda mohou být polymerní konjugáty na bázi HPMA s doxorubicinem vhodné pro kombinovanou nádorovou terapii s checkpoint inhibitory. Na základě získaných dat můžeme říci, že terapie polymerními konjugáty zvyšuje zastoupení CTLA-4 a PD-1 exprimujících lymfocytů oproti terapii volným léčivem i v porovnání s neléčenými kontrolami. Proto by bylo vhodné využít terapii checkpoint inhibitory k zablokování těchto molekul a prodloužení funkční aktivity lymfocytů.

Klíčová slova

Cílená terapie nádorů, polymerní konjugáty na bázi HPMA, doxorubicin, imunitní odpověď proti nádoru, cytotoxické T lymfocyty, CTLA-4, PD-1

Abstract

Chemotherapy is still one of the most widely used anticancer therapies. It is mostly about inhibiting the proliferation of rapidly dividing cells, so it is not selective for tumor cells. As a result, many undesirable side effects are associated with chemotherapy. The disadvantageous properties of chemotherapeutics can be largely eliminated by using conjugates of polymers with low molecular weight drugs. An example of such a conjugate is a doxorubicin-linked HPMA polymer. In addition to the properties obtained by polymer binding, such as achieving solubility in aqueous solutions, reducing systemic toxicity, increasing the maximum tolerated dose, or passive targeting by the EPR effect, the fact that doxorubicin induces immunogenic cell death is used in therapy with this drug.

It has already been shown that after complete cure of the experimental mice with polymeric conjugates of HPMA with doxorubicin, some mice develop long-term resistance to re-inoculation with a lethal dose of tumor cells. Resistance is specific to the particular line of tumor cells from which the mouse was cured, and $CD8^+$ cytotoxic T cells and IFNγ play an important role.

In this work, we monitored changes in the proportion of immune populations and their activation markers after treatment with HPMA-based polymers with doxorubicin and free doxorubicin compared to untreated controls. The results suggest that the immune response against the tumor is more potentiated by polymer conjugate therapy. Activation of the immune system is manifested mainly by changes in the expression of the monitored markers for activated T lymphocytes (CD25), exhausted (PD-1) and chronically activated (CTLA-4) T lymphocytes and in an increased proportion of effector memory cytotoxic T lymphocytes ($CD44^+CD62L^-$). We observed these changes in tumor infiltrating lymphocyte population (TIL) and also in the periphery, in the spleen. Activation of the immune system was further confirmed by elevated plasma levels of IFNγ in mice treated with the polymer conjugate.

It was further investigated whether HPMA-based polymeric conjugates with doxorubicin may be suitable for combination tumor therapy with checkpoint inhibitors. Based on the data obtained, we can say that polymer conjugate therapy increases the proportion of CTLA-4 and PD-1 expressing lymphocytes compared to free drug therapy even compared to untreated controls. Therefore, it would be appropriate to use checkpoint inhibitor therapy to block these molecules and prolong the functional activity of lymphocytes.

Key words

Targeted tumor therapy, HPMA-based polymer conjugates, doxorubicin, antitumor immune response, cytotoxic T lymphocytes, CTLA-4, PD-1

Seznam použitých zkratek

ABC	ATP Binding Cassette; ABC transportér
ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity; buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách
ADT	Androgenní deprivační terapie
ALL	Akutní lymfoblastická leukemie
AML	Akutní myeloidní leukémie
AMPK	AMP-activated protein kinase; proteinová kináza aktivovaná AMP
ATP	Adenosin trifosfát
bis-MPA	2,2-bis(hydroxymethyl)propionic acid; kyselina 2,2-bis(hydroxymetyl)propionová
CAR-T	Chimeric antigen receptor T cell; T buňka s chimerickým antigenním receptorem
CD	Cluster of differentiation
cDC1	Konvenční dendritické buňky
CDK	Cyklin-dependentní kináza
CML	Chronická myeloidní leukémie
CTL	Cytotoxické T lymfocyty
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4; antigen cytotoxických T lymfocytů 4
DAMP	Danger associated molecular pattern; molekuly uvolněné z poškozených buněk
DC	Dendritické buňky
DOX	Doxorubicin
EPR	Enhanced permeability and retention; zvýšená permeabilita a retence
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting; sortování buněk aktivované fluorescencí
FasL	Fas ligand
FDA	Food and Drug Administration; Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FoxP3	Forkhead box P3
FTS	Fetální telecí sérum
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
GvH	Graft-versus-host; Reakce štěpu proti hostiteli
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2; receptor lidského epidermálního růstového faktoru 2
HLA-I	Human leukocyte antigen I; hlavní lidský (histokopmatibilní) antigen
HMGB1	High mobility group box 1
HPMA	*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamid
HR	Hormonální receptor
i.v.	Intravenózní

ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1; mezibuněčná adhezivní molekula
ICD	Immunogenic cell death; imunogenní buněčná smrt
IDO	Indolamin 2,3-dioxygenáza
IFNγ	Interferon γ
Ig	Imunoglobulin
IL	Interleukin
iTreg	Indukované Treg
LPS	Lipopolysacharid
mAb	Monoclonal antibodies; monoklonální protilátky
MARCO	Macrophage receptor with collagenous structure; receptor makrofágů s kolagenní strukturou
mCRPC	Metastatic castrate-resistant prostate cancer; metastatická kastračně rezistentní rakovina prostaty
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor; faktor stimulující kolonie makrofágů
MDR	Multi-drug resistance; mnohočetná léková rezistence
MDSC	Myeloid-derived suppressor cell; myeloidní supresorové buňky
MHC	Major histocompatibility complex; hlavní histokompatibilní komplex
NK	Natural killer; přirozený zabíječ
NKG2D	Natural killer group 2 member D; receptor NK buněk
NKT	Natural killer T cell; NK T buňky
NO	Oxid dusnatý
NRP2	Neuropilin 2
PAMAM	polyamidoamin
PAP	Prostatic acid phosphatase; fosfatáza prostatické kyseliny
PARP	Poly ADP ribose polymerase; poly ADP rybosová polymeráza
PBS	Fyziologický roztok
PD-1	Programmed death 1; receptor programované buněčné smrti
PD-L1	Programed cell death - ligand 1; ligand PD-1
PEG	Polyethylen glykol
PGE2	Prostaglandin E2
P-gp	P-glykoprotein
ROS	Reactive oxygen species; reaktivní formy kyslíku
s.c.	Subkutánní
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3; transkripční faktor
TAM	Tumor-associated macrophages; maktrofágy asociované s nádorem

TAP	Transporter associated with antigen processing; transportér asociovaný se zpracováním antigenů
TCR	T cell receptor; T buněčný receptor
Tfh	Folicular helper T lymphocyte; folikulární pomocné T lymfocyty
TGF-β	Transforming growth factor; transformující růstový faktor
TH	T helper lymphocyte; pomocný T lymfocyt
TIL	Tumor infiltrující lymfocyt
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor; faktor nekrotizující nádory
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand; ligand indukující apoptózu související s TNF
Treg	Regulační T buňka
tTreg	Thymové Treg
VEGF-A	Vascular endothelial growth factor A; vaskulární endoteliální růstový faktor

OBSAH

1 Úvod 12

2 Cíle 13

3 Literární úvod 14

3.1 Imunitní odpověď proti nádoru 14

3.1.1 Vznik nádoru 14

3.1.2 Populace imunitních buněk v nádoru 15

3.1.2.1 NK buňky 15

3.1.2.2 Makrofágy 16

3.1.2.3 Dendritické buňky 17

3.1.2.4 Cytotoxické T lymfocyty 17

3.1.2.5 Pomocné T lymfocyty 18

3.1.2.6 Regulační T lymfocyty 19

3.1.2.7 Myeloidní supresorové buňky (MDSC) 19

3.1.3 Jak se brání nádor 20

3.2 Současné možnosti léčby 21

3.2.1 Imunoterapie 21

3.2.1.1 Modulace imunitního systému pomocí cytokinů 21

3.2.1.2 Adoptivní transfer T buněk 21

3.2.1.2.1 TIL 22

3.2.1.2.2 CAR-T 22

3.2.1.3 Monoklonální protilátky 22

3.2.1.4 Inhibice kontrolních bodů imunitní reakce 23

3.2.1.4.1 CTLA-4 23

3.2.1.4.2 PD-1 23

3.2.1.5 Vakcíny 24

3.2.2 Cílená terapie 24

3.2.2.1 Gleevec 25

3.2.3 Hormonální terapie 25

3.2.3.1 Karcinom prsu ... 25
3.2.3.2 Karcinom prostaty ... 25
3.2.4 Transplantace kmenových buněk ... 25
3.3 Polymerní léčiva ... 26
3.3.1 Struktura polymerních nosičů rozpustných ve vodě ... 26
3.3.2 Aktivně a pasivně cílené polymerní konjugáty ... 26
3.3.3 Překonání mnohočetné lékové rezistence (MDR) ... 28
3.3.4 Polymerní nosiče léčiv ... 28
3.3.4.1 PEG ... 28
3.3.4.2 HPMA ... 28
3.3.4.2.1 Hvězdicovité polymerní nosiče ... 29
3.3.4.2.2 Micelární polymerní nosiče ... 29
3.3.4.2.3 Imunogenicita ... 30
3.3.4.2.4 Protinádorová účinnost ... 30
4 Materiál a metody ... 32
4.1 Roztoky a média ... 32
4.2 Nádorové linie ... 33
4.3 Experimentální myši ... 33
4.4 Polymerní konjugáty ... 33
4.5 Volné léčivo ... 34
4.6 *In vitro* cytotoxicita – inkorporace ^{3}H-thymidinu ... 34
4.7 *In vitro* cytotoxicita – MTT esej ... 35
4.8 *In vivo* terapie nádorů ... 35
4.9 Izolace splenocytů, příprava jednobuněčné suspenze pro FACS analýzu ... 36
4.10 Izolace buněk z nádoru, příprava jednobuněčná suspenze pro FACS analýzu ... 36
4.11 Průtoková cytometrie ... 36
4.12 ELISA – detekce IFNγ v myší plazmě ... 39
4.13 Statistické zpracování dat ... 39
5 Výsledky ... 40

5.1 *In vitro* cytotoxická aktivita polymerních konjugátů 40
5.2 Růst nádorů a přežívání myší kmenů B6 a SJL s nádory EL4 41
5.3 Subpopulace T lymfocytů SJL myší s EL4 nádory 42
5.4 Efektorové subpopulace T lymfocytů SJL myší s EL4 nádory 44
5.5 Efektorové subpopulace T lymfocytů BALB/c myší s CT26 nádory I. 47
5.6 Změny v uspořádání experimentů na základě předchozích výsledků 50
5.7 Efektorové subpopulace T lymfocytů BALB/c myší s CT26 nádory II. 52
5.8 Stanovení hladiny IFNγ v plazmě myší BALB/c s CT26 nádory pomocí metody ELISA ... 55
6 Diskuse 56
7 Závěr 60
8 Zdroje 61
9 Přílohy 68
9.1 Příloha 1: Reprezentativní dot-ploty ke grafům na obrázku 9 68
9.2 Příloha 2: Reprezentativní dot-ploty ke grafům na obrázku 10 a 11 69
9.3 Příloha 3: Reprezentativní dot-ploty ke grafům na obrázku 12, 13 71
9.4 Příloha 4: Reprezentativní dot-ploty ke grafům na obrázku 15, 16 73

1 Úvod

Jednou z nejčastějších příčin úmrtí v zemích s rozvinutou sociálně ekonomickou strukturou včetně České republiky jsou nádorová onemocnění. Podle statistiky se s rakovinou během svého života setká každý třetí Čech. Incidence zhoubných nádorů z dlouhodobého pohledu roste. Příčinami jsou stárnutí populace, životní styl, lepší a časnější diagnostika a celoplošné sceeningy. V naší populaci jsou nejčastěji diagnostikovány nádory kůže, kolorektální karcinomy, nádory prostaty, prsu a plic. Podobná situace je ale i v dalších vyspělých zemích.

Ačkoliv roste množství onkologických pacientů, roste i podíl vyléčených pacientů nebo pacientů s výrazně prodlouženou dobou přežití. To díky včasné diagnostice, celkovému pokroku ve zdravotnictví a novým možnostem léčby.

V oblasti léčby nádorových onemocnění došlo v posledních několika dekádách k výraznému pokroku. Zpočátku byly jedinými způsoby léčby nádorů jejich chirurgické odstranění, radioterapie a chemotereapie. K nim se přidaly další druhy terapie, cílené specificky na konkrétní typ nádoru. Například endokrinní terapie se využívá pro léčbu rakoviny prsu a rakoviny prostaty, jelikož jsou tato nádorová onemocnění závislá na hormonech. Další možností léčby nádorů jsou imunoterapie, cílená terapie a transplantace kostní dřeně. Obvyklé je využívat u konkrétního pacienta kombinaci různých typů protinádorové terapie. Nejčastěji jde o kombinaci radioterapie, chirurgického odstranění nádoru a chemoterapie.

Základem chemoterapie je zabránění další proliferaci nádorových buněk, které se rychle dělí. Jednou z možností je inhibice mitózy (např. pomocí Docetaxelu), zabránění replikace DNA (analogy bází, inhibitory topoizomeráz, alkylační činidla, cisplatina, interkalační činidla), inhibice enzymů (inhibitory cyklindependentních kináz). Tyto látky (cytostatika) působí na všechny dělící se buňky, proto je jejich efekt nespecifický a nese s sebou množství vedlejších účinků.

Jednou z možností, jak zabránit nežádoucím účinkům cytostatik, je využití polymerních nosičů těchto léčiv. Polymery používané pro tento účel jsou samy o sobě inertní, nemají žádný biologický účinek, nejsou imunogenní a jsou dobře rozpustné ve vodě. Navázáním nízkomolekulárního léčiva na polymerní nosič se výrazně změní jeho vlastnosti. Může se například zvýšit jeho rozpustnost ve vodě, umožní se snadné vyloučení z těla, prodlouží se doba cirkulace léčiva v krevním oběhu a také se využívá cílení, například pomocí protilátek. Polymerní konjugáty jsou pasivně akumulované v prostředí nádorů díky tzv. EPR efektu (Enhanced permeability and retention effect). Vysokomolekulární polymer neprojde přes stěnu normálních cév, ale v pevných nádorech, kde jsou cévy více fenestrované, může opustit krevní řečiště, být pohlcen nádorovou buňkou a uvolnit léčivo z vazby na polymer do prostředí nádoru. Nejvýznamnějšími typy dosud studovaných či využívaných polymerních nosičů jsou polyethylen glykol (PEG) a poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamid) (HPMA).

Vedle chemoterapie je významným typem protinádorové léčby také imunoterapie a biologická léčba cílená na nádorové buňky, molekuly či procesy. Oproti chemoterapii účinkují specifičtěji a mohou

mít méně závažné dopady na organismus. Využívá se monoklonálních protilátek a molekul, které mají vliv na růst nádorových buněk, metastazování a karcinogenezi (například Herceptin, Gleevec).

Možnosti léčby nádorů jsou velmi rozmanité, protože i nádory a nádorové mikroprostředí mají velmi komplexní charakter. Růst nádoru nezávisí jen na nádorových buňkách, ale také na jejich okolí. Nádorové mikroprostředí je složeno z velkého množství nenádorových buněk, jako jsou fibroblasty, endotelové buňky, imunitní buňky a další. Právě imunitní buňky hrají jednu z důležitých rolí při růstu nádoru a jeho terapii. Nachází se zde populace, které jsou cytotoxické (T-lymfocyty) a mají schopnost zabíjet nádorové buňky a naproti tomu imunosupresivní populace buněk, jako jsou regulační T buňky (Treg) nebo nezralé myeloidní buňky (MDSC).

2 CÍLE

Léčba nádorů polymerními konjugáty na bázi HPMA s navázaným doxorubicinem ustavuje u myší dlouhodobou rezistenci vůči danému typu nádoru. Už déle je známo, že jsou za to zodpovědné $CD8^+$ T lymfocyty a důležitou roli zde hraje také IFNγ. Zatím ale ještě nebyly sledovány konkrétní subpopulace T lymfocytů, jejich dynamika a ustavení imunitní odpovědi v určitých intervalech po léčbě polymerními konjugáty na bázi HPMA, aby mohlo být potvrzeno, jakým způsobem vzniká zmíněná rezistence. Pokusy o takové analýzy znesnadňují technické obtíže, jako je příprava jednobuněčné suspenze buněk z nádoru s dostatečným výtěžkem, malá nádorová masa při analýzách v pozdějších časových intervalech po léčbě polymery, nebo velmi malé množství živých buněk u pokročilých neléčených nádorů, a tím pádem i malé množství živých buněk vhodných pro rozsáhlejší analýzy imunitních populací. Zároveň je mezi jednotlivými nádory ve skupinách poměrně vysoká heterogenita.

Cílem této diplomové práce bylo proto především:

- Sledovat rozdíly v imunitní odpovědi u myší při léčbě nádorů polymerními cytostatiky s navázaným doxorubicinem, volným doxorubicinem a bez léčby. Zaměřit se na sledování změn v populacích cytotoxických T lymfocytů a regulačních T buněk ve slezinách a nádorech myší.
- Ověřit, zda může být nádorová terapie polymerními cytostatiky vhodná pro kombinovanou terapii s tzv. checkpoint inhibitory.

3 LITERÁRNÍ ÚVOD

3.1 Imunitní odpověď proti nádoru

3.1.1 Vznik nádoru

Rozvoj nádoru je možné popsat podle „teorie 3E“, vycházející z anglických názvů jednotlivých fází vzniku nádoru (Obr. 1). Těmito fázemi jsou: eliminace (elimination), rovnováha (equilibrium) a únik (escape). Toto rozdělení přehledně shrnuli například Dunn, Old a Schreiber [1].

Během eliminace imunitní systém kontroluje vznikající nádor. Eliminaci je možné ještě rozdělit do čtyř fází, které se ale často prolínají. V každé fázi převažují jiné imunitní buňky.

První fáze eliminace začíná poté, co se v organismu objeví první maligně transformované buňky a naruší svým růstem a angiogenezí okolní tkáň. Stromání remodelace rostoucího nádoru může také produkovat prozánětlivé molekuly a chemokiny.[2] Tím na sebe nádor upozorní vrozený imunitní systém. První buňky, které se dostanou k rostoucímu nádoru, jsou NK (natural killer) buňky, NKT (natural killer T) buňky, makrofágy a γδ T buňky. Rozpoznávají zde ligandy NKG2D (Natural killer group 2 member D) nebo komplexy glykolipidů s CD1 (cluster of differentiation 1).[1] Aktivita těchto imunitních buněk vede k produkci IFNγ (interferon γ), který je velmi důležitý pro další vývoj imunitní odpovědi.[3]–[5]

Ve druhé fázi eliminace nádoru se amplifikuje imunitní odpověď. Hlavní roli zde hraje IFNγ, v menší míře produkovaný od začátku imunitní odpovědi. IFNγ indukuje produkci chemokinů, které do místa nádoru přivedou další imunitní buňky. Při remodelaci stromatu, nutné pro další vývoj nádoru, vznikají produkty, které stimulují makrofágy k produkci IL-12 (interleukin 12).[6] IL-12 stimuluje NK buňky k produkci IFNγ a ten zase zvyšuje produkci IL-12 makrofágy.[7], [8] Tato pozitivní zpětná vazba způsobí nárůst hladiny IFNγ v prostředí nádoru, který může aktivovat antiproliferační[9], proapoptotické [10] a angiostatické [11] procesy. Makrofágy produkují ROS (reactive oxygen species) [12] a NK buňky eliminují nádorové buňky jak pomocí perforinu, tak i díky TRAILu (TNF-related apoptosis-inducing ligand).[13] Tím se část nádorových buněk zabije a do okolí se z mrtvých buněk dostávají antigeny, které mohou být využity k aktivaci adaptivního imunitního systému.

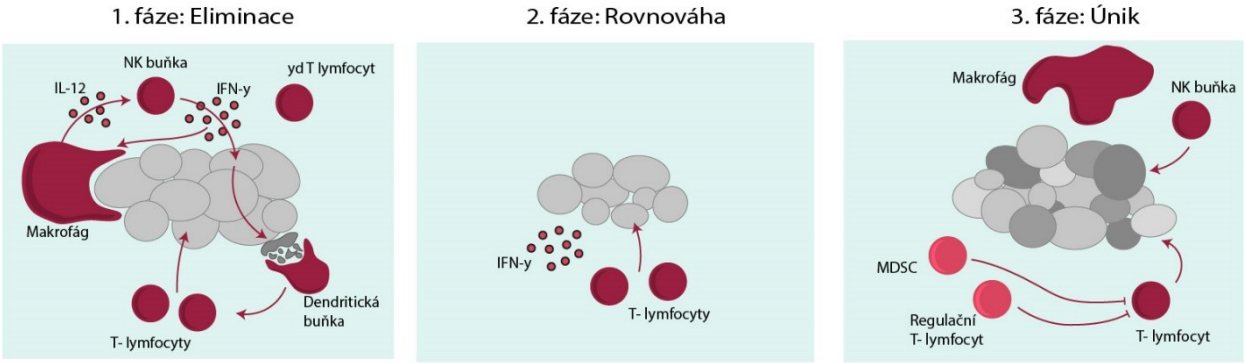
Třetí fáze je charakteristická vznikem nádorově specifické imunitní odpovědi. Nezralé dendritické buňky se díky cytokinovému prostředí stanou aktivovanými a mohou získávat nádorové antigeny, maturovat a aktivovat $CD4^+$ T lymfocyty ve spádové lymfatické uzlině.

Ve čtvrtém kroku je možnost rostoucí nádor kompletně eliminovat. Nádorově specifické $CD4^+$ a $CD8^+$ T lymfocyty doputují do nádorového ložiska a zabíjejí maligní buňky nesoucí nádorový antigen. Zároveň neustále dochází k produkci velkého množství IFNγ, což spouští další mechanismy vedoucí k inhibici buněčného cyklu, apoptóze a indukci makrofágů a jejich protinádorové aktivity.

Nádorové buňky, které unikly eliminaci imunitním systémem, jsou základem nádoru, který tak přechází do fáze rovnováhy. Přechod mezi těmito fázemi nemusí být úplně jasný, protože i v rovnovážné

fázi nalézáme imunitní buňky, které se na počátku snažily nádor eliminovat. Tato fáze vývoje nádoru je ze všech tří nejdelší, u lidí může trvat i kolem dvaceti let nebo v ní nádor zůstane trvale bez dalšího rozvoje. Je to dynamická rovnováha, kdy lymfocyty a IFNγ vytváří silný selekční tlak na nádorové buňky. Nádorové buňky jsou ale velmi geneticky nestabilní a často mutují. Proto se imunitnímu systému nemusí podařit nádor zcela eliminovat.[1]

Fáze nazvaná únik značí to, že nádorové buňky byly schopné uniknout dohledu imunitního systému. (Obr. 1) Tyto buňky prošly selekcí během dlouhé rovnovážné fáze a mohou se dále dělit a hromadit mutace. Teprve v této fázi jsou nádory klinicky detekovatelné. Díky selekčnímu tlaku získaly nádorové buňky vlastnosti, které jim dávají výhodu před imunitním systémem. Například ztrácí některé komponenty proteinů HLA-I (human leukocyte antigen I),[14] přestávají exprimovat nádorové antigeny, ztrácí NKG2D ligandy nebo se stávají rezistentními vůči působení IFNγ.[15]–[17] Také mohou exprimovat protiapoptotické signály, například díky trvale aktivnímu transkripčnímu faktoru STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3).[18] Zároveň mohou nádory využívat aktivitu regulačních T lymfocytů, které inhibují protinádorovou aktivitu T lymfocytů.



Obrázek 1: Tři fáze rozvoje nádoru

3.1.2 Populace imunitních buněk v nádoru

V následujících odstavcích jsou shrnuty hlavní funkce jednotlivých typů imunitních buněk, které se účastní protinádorové odpovědi, a mechanismy, kterými interagují s nádorem.

3.1.2.1 NK buňky

Nejdůležitějším mechanismem v protinádorové imunitě je cytotoxicita. Může být zprostředkovaná přímým kontaktem buněk (receptor Fas-Fas ligand) nebo sekretovanými látkami, jako je perforin a granzym. Důkazem důležitosti perforinu v protinádorové odpovědi je, že myším bez perforinu rostou nádory rychleji.[19] Perforin a granzym využívají jak cytotoxické T lymfocyty, tak NK buňky.

NK buňky patří mezi lymfoidní buňky a zprostředkovávají přirozené, neadaptační imunitní reakce. Byly objeveny v 70. letech minulého století a pojmenovány „natural killer – přirození zabíječi“ podle své schopnosti rychle zabíjet nádorové a virově infikované buňky.[20] NK buňky jsou významnou

součástí protinádorové imunitní odpovědi. Myším, kterým chybí aktivační receptor NKp46, rostou nádory rychleji.[21] Mechanismy působení NK buněk v nádoru jsou zatím málo popsané. Některé z dosud známých jsou: zabíjení nádorových buněk díky rozpoznání ligandů NKG2D a protilátek [22], produkce IFNγ, modifikace funkce neutrofilů [23], produkce chemoatraktantů, které atrahují konvenční dendritické buňky.[24]

Při nádorové terapii se někdy používají protilátky specifické vůči nádorovým antigenům. Mohou přímo inhibovat signalizační dráhy nádorové buňky, aktivovat komplement nebo spustit cytotoxickou reakci závislou na protilátkách (ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity).[25] ADCC je zprostředkovaná vazbou Fc receptoru NK buněk (CD16) na Fc část opsonizační protilátky. Tím se aktivují cytotoxické mechanismy NK buňky.[26] Protilátky také zvyšují stabilitu kontaktu NK buňky s nádorovou buňkou. Pokud NK buňka rozpozná zároveň s ligandy NKG2D i protilátky na nádorové buňce, zvyšuje se stabilita i délka této interakce. Zabíjení nádorových buněk NK buňkami je proto nejúčinnější při kombinaci rozpoznávání ligandů NKG2D a protilátek.[22]

NK buňky infiltrované do nádorového mikroprostředí kontrolují růst nádoru také pomocí modifikace funkce neutrofilů. V tumor infiltrujících neutrofilech potlačují expresi VEGF-A (Vascular endothelial growth factor A) a tím snižují angiogenezi potřebnou pro další růst nádoru. Další mechanismy působení na neutrofily jsou závislé na IFNγ a CXCR3, čímž se negativně ovlivňuje růst nádoru.[23]

NK buňky produkují molekuly CCL5 a XCL1, které slouží jako chemoatraktanty pro konvenční dendritické buňky (cDC1). Díky tomu se v nádorovém mikroprostředí mohou akumulovat cDC1 a získávat antigeny pro aktivaci lymfocytů. Nádor ale produkuje prostagladin E2 (PGE2), který tuto signalizaci přeruší. PGE2 jednak snižuje životnost a produkci chemokinů NK buněk ale také snižuje expresi chemokinových receptorů (XCR1 a CCR5) cDC1.[24]

3.1.2.2 Makrofágy

Jednou z nejhojněji zastoupených populací v nádorovém mikroprostředí jsou makrofágy. Makrofágy mohou mít dva různé, funkčně odlišné fenotypy, M1 a M2. Do těchto rozdílných fenotypů se polarizují podle cytokinového prostředí, ve kterém se nachází. M1 vznikají jako odpověď na IFNγ a ligandy TLR (toll-like receptor), jako je např. LPS (lipopolysacharid) a fungují prozánětlivě, podporují reakce akutního zánětu. Oproti tomu M2 makrofágy vznikají v prostředí s IL-4 a IL-13 a jsou spíše protizánětlivé, podporují a regulují obnovu tkání po akutním zánětu a také proces chronického zánětu. Toto rozdělení na M1 a M2 je hraniční a za normálních podmínek se fenotypy makrofágů pohybují mezi těmito extrémy. V prostředí rostoucího nádoru se vyskytují převážně makrofágy, které jsou polarizované směrem k M2 fenotypu a označují se jako TAM (tumor-associated macrophages). Do hypoxického prostředí nádoru se dostávají díky VEGF-A a semaforinu 3A. Makrofágy prokazují několik mechanismů, kterými působí ve prospěch dalšího rozvoje nádoru. Těmito vlastnostmi jsou zejména produkce cytokinů a indukce angiogeneze.[27]

Nejenom, že se makrofágy pohybují v rozmezí mezi fenotypy M1 a M2, ale je také možné již polarizovanou buňku přeprogramovat. Dřívější pokusy o přeprogramování byly např. pomocí monoklonální protilátky proti receptoru CSF-1R (colony-stimulating factor 1).[28] Nově, zatím v experimentální rovině je to možné např. díky monoklonální protilátce proti scavenger receptoru MARCO (macrophage receptor with collagenous structure). Ten definuje supresivní M2 makrofágy. Použitím této protilátky se makrofágy přeprogramují na prozánětlivý fenotyp.[29]

Makrofágy mohou měnit metabolismus nádorových buněk – produkcí AMPK (AMP-activated protein kinase) přispívají k hypoxii a sekrecí TNF-α podporují glykolýzu. Při depleci makrofágů se ukázalo, že se nádory staly méně hypoxickými a byla u nich nižší míra glykolýzy. Zároveň docházelo k vyšší infiltraci T lymfocytů do nádoru a také vyšší expresi PD-L1 (programed cell death-ligand 1) nádorovými buňkami. Z toho vyplývá, že makrofágy snižují expresi PD-L1 nádorovými buňkami, což může komplikovat imunoterapii.[30]

Další mechanismus, kterým makrofágy pomáhají růstu nádoru, je jejich fagocytóza apoptotických nádorových buněk. Ta je z imunologického hlediska tichá a přispívá tím k zachování imunosupresivního prostředí. Stojí za tím mechanismus založený na NRP2 (Neuropilin-2). Jeho exprese je indukována nádorem a je zodpovědný za regulaci fagocytózy.[31]

3.1.2.3 Dendritické buňky

Dendritické buňky jsou významnou součástí protinádorové imunitní odpovědi. Jsou spojkou mezi vrozenou a adaptivní imunitou. Jejich nejdůležitější funkcí je prezentace antigenů v komplexu s MHC (major histocompatibility complex) molekulami a aktivace T lymfocytů. V prostředí nádoru dendritické buňky shromažďují nádorové antigeny a jejich prezentací ve spojení s MHC aktivují $CD8^+$ T lymfocyty, které díky tomu mohou specificky zabíjet nádorové buňky.[32], [33] Na druhou stranu, nádorové buňky rychle mutují a časem mohou ztrácet své antigeny, zároveň modulují funkci dendritických buněk, a tím způsobují imunosupresi. Vedle toho jsou dendritické buňky negativně ovlivňovány molekulami, které se vyskytují v nádorovém mikroprostředí. Nejen díky jejich produkci nádorovými buňkami, ale i ostatními imunitními buňkami. Těmito molekulami jsou například IL-6, IL-10, M-CSF (macrophage colony-stimulating factor), VEGF nebo TGF-β (transforming growth factor β). Proto vysoké množství dendritických buněk v nádoru nezaručuje vyšší zabíjení nádorových buněk. Často to může znamenat pravý opak, zvýšenou imunosupresi a rozvoj nádoru.[34]

3.1.2.4 Cytotoxické T lymfocyty

Mezi nejvýznamnější buňky nádorového mikroprostředí patří $CD8^+$ cytotoxické T lymfocyty (CTL). Jejich hlavní funkcí je zabíjení buněk, které rozpoznávají pomocí svého T receptoru (TCR). Aby mohly T lymfocyty zabít cílovou buňku, musí být nejdříve aktivované v sekundárních lymfoidních orgánech. Aktivace nastane s pomocí dendritických buněk, které mají na svém povrchu komplex antigenního peptidu s MHC-I molekulou a další kostimulační molekuly.[35] Zároveň je CTL aktivovaný díky cytokinovému prostředí (např. IL-2, IL-7, IL-15, IL-21).[36] Po aktivaci je CTL závislý na IL-2 a

značně cytotoxický.[37] Následuje chemokiny a tím se dostane do prostředí nádoru, kde můžeme CTL nazývat také jako tumor infiltrující lymfocyt (TIL). Tam už může po rozpoznání nádorové buňky využít cytotoxické mechanismy k zabití nádorové buňky.

Mechanismy, které CTL využívají k zabití buňky jsou: degranulace (uvolnění perforinu a granzymů z cytotoxických granulí)[38], vazba Fas-ligandu (FasL) na receptor Fas, který způsobí apoptózu, a sekrece IFNγ a TNF (tumor necrosis factor).[39]

CTL mohou po aktivaci diferencovat v efektorové nebo paměťové lymfocyty. Paměťové CTL se dále dělí na centrální paměťové, které čekají v lymfatických uzlinách na druhé setkání s antigenem, efektorové paměťové, které cirkulují tkáněmi a mají cytotoxické vlastnosti, a rezidentní paměťové T buňky, které zůstávají v místě infekce nebo nádoru. Tyto typy $CD8^+$ lymfocytů můžeme rozpoznat pomocí specifických markerů. Jednou z možností, jak detekovat centrální paměťové a efektorové paměťové T lymfocyty je pomocí markerů CD44 a CD62L. CD44 je povrchový glykoprotein, který se účastní migrace buněk, a CD62L (L-selektin) je adhezivní molekula, která slouží jako „homing" receptor pro lymfocyty, aby vstoupily do sekundárních lymfoidních orgánů. Efektorové paměťové T buňky mají fenotyp $CD44^+CD62L^-$ a centrální paměťové $CD44^+CD62L^+$.[40]

3.1.2.5 Pomocné T lymfocyty

Pro efektivní protinádorovou odpověď jsou potřebné také pomocné $CD4^+$ T lymfocyty (Th). Svou pomocí podporují efektorové i paměťové funkce CTL. Snižují množství inhibičních receptorů na jejich povrchu, prodlužují životnost, zlepšují funkční aktivitu CTL buněk a pomáhají vzniku paměťových CTL. Podporují také jejich klonální expanzi a schopnost produkovat IFNγ. Th buňky ale nepomáhají jen cytotoxickým T buňkám. Pomocí ligandu CD40L stimulují dendritické buňky k vyšší prezentaci antigenů pro aktivaci CTL a jsou také důležité pro aktivitu B buněk. Th buňky byly dlouhou dobu děleny na základě cytokinů, které produkují, na Th1 a Th2 buňky. Dnes se k tomuto dělení přidaly ještě Th17, Th9, Th22, Tfh (folikulární pomocné T lymofocyty) a Treg (regulační T lymfocyty).[41, s. 4], [42]

Th1 subpopulace se diferencuje v prostředí obsahujícím IL-12 a produkuje především prozánětlivé cytokiny IFNγ a IL-2. Hlavní funkcí těchto buněk je eliminace intracelulárních patogenů. Mohou ale také přispívat k autoimunitním onemocněním, jako je diabetes 1. typu nebo roztroušená skleróza. [41]

Th2 subpopulace vzniká v prostředí obsahujícím IL-4 a produkuje hlavně IL-4, IL-5, IL-6 nebo IL-10. Th2 buňky se uplatňují při imunitní odpovědi proti extracelulárním parazitům a pomáhají B buňkám při produkci protilátek IgE (imunoglobulin E). Jejich patologická aktivita může vést ke vzniku alergií, astmatu a podporuje chronický zánět včetně diferenciace makrofágů k M2 fenotypu.[41]

Z části $CD4^+$ buněk se může diferencovat populace indukovaných Treg, které hrají důležitou roli v supresi imunitní odpovědi (viz 3.1.2.6).

Zastoupení Th1 a Th2 cytokinů a Treg u pacientů může být prognostickým markerem nádorových onemocnění. Např. u hepatocelulárního karcinomu jsou Th1 cytokiny spojeny s dobrou prognózou, Th2 cytokiny a Treg s růstem nádoru a metastazováním. [43]

3.1.2.6 Regulační T lymfocyty

Regulační T lymfocyty (Treg) jsou významnou součástí imunitního systému. Za fyziologických podmínek hrají důležitou roli v udržování tolerance vůči vlastním tkáním a zabraňují vzniku autoimunitních onemocnění. Zároveň jsou významnou součástí nádorového mikroprostředí, kde potlačují protinádorovou imunitní odpověď.

Treg můžeme rozdělit na dvě skupiny: thymové Treg (tTreg), které vznikají v thymu z $CD4^+CD8^-$ thymocytů stimulací autoreaktivním peptidem v komplexu s MHC molekulou, a indukované Treg (iTreg), které se diferencují na periferii z $CD4^+$ T lymfocytů po stimulaci TGF- β. [44]

Treg jsou definované pomocí několika markerů. Nejdůležitějším z nich je FoxP3 (forkhead box P3), transkripční faktor, který je pro funkci Treg nezbytný. Dále Treg exprimují koreceptor CD4 a alfa řetězec receptoru pro IL-2 (CD25).[45]

Treg inhibují imunitní odpověď jak celulárními, tak i humorálními mechanismy. Těmito mechanismy jsou: suprese antigen prezentujících buněk pomocí CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4), sekrece cytokinů (IL-10, TGF-β, IL-35), lýza buněk pomocí perforinu a granzymu, anebo vychytávání IL-2 jeho receptorem (CD25). Nejvýznamnějším supresivním mechanismem je suprese buněk pomocí CTLA-4 a spotřeba IL-2.[46]

3.1.2.7 Myeloidní supresorové buňky (MDSC)

MDSC (myeloid-derived suppressor cells) jsou velmi rozmanitou buněčnou populací. Zahrnují prekurzory nebo nezralé buňky, které by se za normálních podmínek dále vyvíjely v makrofágy, dendritické buňky, monocyty, neutrofily, eozinofily, bazofily a žírné buňky. Když je ale myelopoéza aktivovaná trvalou stimulací způsobenou chronickou infekcí, přetrvávajícím zánětem nebo nádorem, vznikají buňky fenotypově podobné myeloidním buňkám, které mají ale jinou funkční aktivitu. Ty jsou označovány jako MDSC a jejich hlavní funkcí je suprese aktivity různých imunitních buněk, v největší míře suprese T buněk.[47] V prostředí nádoru jsou MDSC významnou populací, společně s regulačními T lymfocyty se zde podílejí na potlačování imunitní odpovědi proti nádoru. Stejně jako je rozmanitá populace MDSC, také mechanismů, kterými tlumí aktivitu T buněk je mnoho.

Jsou to například produkce NO (oxid dusnatý) [48] a ROS [49], snižování množství tryptofanu pomocí IDO (indolamin 2,3-dioxygenáza) [50], snižování sekrece IL-12 (podporuje infiltraci $CD8^+$ T buněk do nádoru), produkce imunosupresivních cytokinů (IL-6, IL-10 [51], TGF-β [52]), deplece cysteinu (aminokyselina nezbytná při aktivaci T buněk) [53], nebo redukce exprese L-selektinu (CD62L) [54] na T buňkách, který potřebují pro homing do lymfatických uzlin.

3.1.3 Jak se brání nádor

V předchozích kapitolách bylo stručně shrnuto, jakými způsoby se imunitní systém snaží potlačit vznikající nádor. Nádorové buňky ale během rozvoje nádoru prochází selekčním tlakem imunitního systému (viz kapitola 3.1.1), hromadí mutace a vytvářejí si účinné obranné mechanismy, kterými se brání protinádorové imunitní odpovědi. Těchto mechanismů je celá řada a díky způsobu, jakým vznikají se mohou lišit mezi jednotlivými nádory. Je možné je rozdělit do tří skupin: ztráta antigenicity, ztráta imunogenicity a vytvoření imunosupresivního mikroprostředí (viz tabulka 1) [55]

Tabulka 1: Mechanismy úniku nádoru imunitnímu dohledu. (Vytvořeno podle Zahavi a Weiner, 2019[55])

	Mechanismus	**Výsledný efekt**
Ztráta antigenicity: změny v prezentaci antigenů	Ztráta exprese MHC-I molekuly	Zabránění rozpoznání nádorové buňky pomocí TCR
	Defektní proteiny LMP2, LMP7 (podjednotky proteazomu) a TAP1, TAP2 (transportéry antigenů do endoplazmatického retikula, transporter associated with antigen processing)	
	Ztráta tumor-specifických antigenů	
Ztráta imunogenicity	Zvýšení exprese ligandů checkpoint molekul	Inhibice T lymfocytů
	Exprese inhibičních signálů (např. CD47 – inhibice fagocytózy)	Inhibice složek imunitního systému
	Snížení exprese Fas nebo ztráta senzitivity na signalizaci přes receptor Fas; zvýšení exprese Fas-L	Únik před apoptózou nebo spuštění apoptózy T buněk
	Zisk rezistence vůči IFNγ a TNF	
	Inaktivace granzymu B sekrecí inhibitorů serinových proteáz	
	Snížení exprese adhezivních molekul jako je ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1)	Zabránění adheze T buněk, usnadnění metastazování
Vytvoření imunosupresivního mikroprostředí	Sekrece VEGF (Vascular endothelial growth factor)	Angiogeneze
	Suprese exprese adhezivních molekul na endoteliální buňkách nádorových cév	Zabránění vycestování leukocytů z cévy do prostředí nádoru
	Sekrece imunosupresivních cytokinů (TGF-β, VEGF, PGE2, IL-10, mediátory Th2 odpovědi)	Suprese imunitních buněk
	Produkce enzymu IDO a arginázy-1 (degradace tryptofanu potřebného pro metabolismus T buněk)	Suprese T buněk
	Akumulace Treg a MDSC v nádoru	Imunosuprese
	Diferenciace makrofágů směrem k M2 fenotypu (pomocí cytokinového prostředí)	
	Myofibroblasty produkující nádorové růstové faktory a TGF-β	Usnadnění růstu nádoru

3.2 Současné možnosti léčby

Nejstarším a často využívaným způsobem léčby nádorových onemocnění je chirurgické odstranění primárního nádorového ložiska. K chirurgii se ve 20. letech minulého století přidala radioterapie a později ve 40. letech také chemoterapie. Tyto tři základní přístupy nádorové terapie jsou velmi účinné a využívají se dodnes. Nejčastěji jde o kombinace všech tří možností v závislosti na konkrétním typu nádoru. Dlouhou dobu byly nádory léčeny jen na základě jejich lokalizace a po letech vývoje cytotoxických chemoterapeutik bylo dosaženo terapeutické plató.[56], [57]

Za posledních 20 let došlo k velkým změnám v přístupu k nádorové terapii. Díky vývoji nových technologií je možné molekulárně profilovat nádor a přistoupit k personalizované terapii. Také byly identifikovány některé molekulární prediktivní a prognostické faktory. Důležitou změnou bylo ale zaměření terapie nejen přímo na nádorové buňky, ale na různé složky nádorového mikroprostředí, především na složky imunitního systému.[56]

3.2.1 Imunoterapie

Mezi imunoterapii je možné zahrnout léčbu nádorů, která se zaměřuje jak na blokaci negativní regulace imunitního systému, tak na přímou stimulaci protinádorové odpovědi, nebo na podporu antigenní prezentace. Mezi současné možnosti imunoterapie patří inhibice checkpoint molekul, transfer T buněk, monoklonální protilátky, vakcíny a další způsoby modulace imunitního systému.

3.2.1.1 Modulace imunitního systému pomocí cytokinů

Stimulovat imunitní systém pro protinádorovou terapii je možné například pomocí cytokinů. Z pohledu terapeutického využití jsou významné především interferony typu I (IFN-I; IFN-α a IFN-β) a IL-2, které byly schváleny pro terapii melanomu (IFN-I, IL-2)[58], [59] a renálního karcinomu (IL-2) [60].

IFN-α se stal v roce 1986 první FDA schválenou nádorovou imunoterapií (pro léčbu vlasatobuněčné leukémie).[61] Využívá se také jako adjuvantní terapie melanomu, ale jako samostatné léčivo má jen relativně nízký účinek.

IL-2 je růstovým faktorem T lymfocytů, podporuje také proliferaci NK buněk a diferenciaci B buněk. Pro léčbu metastatického melanomu byl schválen v roce 1998, ale není využíván ve vysoké míře, protože podávání vysokých dávek IL-2 je spojeno se závažnou toxicitou (syndrom kapilárního úniku).[60]

3.2.1.2 Adoptivní transfer T buněk

Adoptivní transfer T buněk je vedle inhibice checkpoint molekul dalším významným typem imunoterapie. Pro adoptivní transfer je možné využít buďto buňky odvozené z tumor infiltrujících lymfocytů (TIL) [62] nebo geneticky upravené T buňky izolované z periferní krve (CAR-T, chimeric antigen receptor-T cell). [63]

3.2.1.2.1 TIL

Aby mohly být TIL transferovány pacientovi, musí být nejprve *ex vivo* expandovány. Resekovaná část nádoru (malé části nebo jednobuněčná suspenze) se vystaví vysokému množství IL-2, TIL díky tomu rychle proliferují a časem přerostou všechny ostatní buňky, které se v resekované části nádoru nacházely. Po dvou až třech týdnech se takto získá čistá kultura TIL. Poté je ještě možné buňky selektovat např. na základě sekrece IFNγ po kokultivaci s autologními nádorovými buňkami. Selektované buňky jsou ještě dále expandovány a poté už mohou být podány infuzí pacientovi. Tímto postupem je možné pro infuzi získat až $2x10^{11}$ lymfocytů. Pro lepší výsledky jsou pacientovi před transferem podávány látky pro depleci lymfocytů, zejména Treg (cyklofosfamid, fludarabin). Po transferu T buněk je pacientovi podáváno vysoké množství IL-2. [64] Ačkoliv na terapii pomocí transferu TIL odpovídá kolem 40-50 % pacientů s metastatickým melanomem, často se u nich vyskytuje toxicita spojená s vysokými dávkami IL-2. To je možné obejít podáváním menší, postupně se snižující dávky IL-2.[62]

3.2.1.2.2 CAR-T

CAR-T lymfocyty (chimeric antigen receptor) jsou lymfocyty izolované z periferní krve a *ex vivo* geneticky modifikované. CAR cílí na antigeny specifické pro nádorové buňky, je vysoce specifický a reaktivní. Skládá se z části odvozené z vazebné části protilátky (single-chain antibody variable fragment, scFv, extracelulární část), a CD3ζ domén TCR komplexu (transmembránové a intracelulární domény). Transfer genů CAR do buňky může být pomocí transientní transfekce mRNA (messenger RNA), retrovirových nebo lentivirových vektorů, transpozonů, nebo homologní rekombinací po genové editaci. Po genetické modifikaci jsou CAR-T lymfocyty expandovány a podány infuzí pacientovi. Stejně jako u transferu TIL je transfer CAR-T účinnější, pokud jsou pacientovi nejprve depletovány lymfocyty.[65]

Klinické testy byly prováděny s CAR-T specifickými pro CD19 (antigen B buněk) pro terapii B buněčných malignit. Testy byly úspěšné, nejvíce pro terapii ALL (akutní lymfoblastická leukemie), kde na léčbu odpovídalo 70-90 % pacientů. Pro CAR-T terapii pevných nádorů je ještě nutné překonat mnoho překážek, jako je výběr nádorového antigenu, dosažení úspěšné lokalizace buněk do nádoru, snížení toxicity mimo nádor a další. [63]

3.2.1.3 Monoklonální protilátky

Poté, co byly pro některé nádory identifikovány specifické antigeny nebo molekuly nezbytné pro jejich přežití, mohly být vyvinuty humanizované nebo chimérické monoklonální protilátky (mAb) proti těmto molekulám. Monoklonální protilátky svůj cíl buďto blokují [66], opsonizují příslušné buňky (indukce ADCC, viz kapitola 3.1.2.2), nebo mohou nést cytotoxické molekuly. Příkladem konjugátu protilátky s léčivem je FDA schválený ado trastuzumab emtasine (cílí na HER2 a léčivo se váže na tubulin) [67] nebo brentuximab vedotin (cílí na CD30 a obsahuje léčivo narušující mikrotubuly).[68]
Příklady mAb používaných k nádorové terapii (schválené FDA):

Rituximab je chimérická mAb proti CD20, transmembránovému proteinu B lymfocytů. Využívá se při léčbě B buněčných malignit. [69]

Trastuzumab, humanizovaná mAb blokující HER2 (human epidermal growth factor receptor 2), se využívá pro terapii HER2 pozitivních nádorů prsu. [70] HER2 se podílí na proliferaci a diferenciaci epiteliálních buněk a ve zvýšeném množství se vyskytuje na povrchu buněk karcinomu prsu. [71]

Bevacizumab je humanizovaná mAb blokující vaskulární endoteliální růstový faktor A (VEGF-A), který zajišťuje angiogenezi. [66] Bevacizumab byl schválen pro terapii metastatického kolorektálního karcinomu [72], metastatické rakoviny plic [73], glioblastomu [74], rakoviny ledvin [75], prsu [76] a vaječníků [77].

3.2.1.4 Inhibice kontrolních bodů imunitní reakce

Jedním z mechanismů imunitního systému, jak předejít autoimunitním onemocněním, je inhibice aktivity T lymfocytů pomocí tzv. checkpoint inhibitorů. Mezi ně patří především CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4) a PD-1 (programmed death 1). Tyto molekuly jsou normálním regulačním prvkem imunitní odpovědi, ale mohou být „zneužity“ nádorem k potlačení protinádorové imunitní odpovědi. Proto jsou vhodným cílem pro nádorovou imunoterapii. [78]

3.2.1.4.1 CTLA-4

CTLA-4 je homolog kostimulačního receptoru T lymfocytů CD28. Stejně jako CD28 i CTLA-4 váže ligandy CD80 a CD86. Oproti CD28 je ale váže s vyšší afinitou a výsledkem není aktivační, ale inhibiční signál.[79] U naivních T lymfocytů je CTLA-4 situováno intracelulárně ve váčcích a až po aktivaci T lymfocytu dojde k jejich exocytóze. Tím se CTLA-4 dostane na membránu. Oproti tomu Treg exprimují CTLA-4 extracelulárně trvale.[80]

Mechanismy inhibice pomocí CTLA-4 jsou tři. Prvním z nich je kompetice s CD28 o molekuly CD80 a CD86, které jsou nezbytné pro aktivaci T lymfocytů. CTLA-4 je ale váže s vyšší afinitou než CD28.[81] Další je spuštění signalizace v T buňce vedoucí k inhibičnímu signálu. Posledním mechanismem je trans-endocytóza[82], kdy CTLA-4 zachytí svůj ligand, odstraní ho z antigen prezentující buňky a degraduje uvnitř buňky. Tím se snižuje množství ligandů, které by mohly vazbou na CD28 pomoci aktivovat T lymfocyt.

Zatím jediná monoklonální protilátka proti CTLA-4, která je schválená FDA (Food and Drug Administration) pro léčbu metastatických melanomů, se jmenuje Ipilimumab. Blokací CTLA-4 se podporuje aktivace a proliferace efektorových T buněk a snižuje se jejich suprese pomocí Treg.[78], [83]

3.2.1.4.2 PD-1

Stejně jako CTLA-4 i PD-1 po vazbě na svůj ligand způsobí inhibici funkcí aktivovaných T lymfocytů. Inhibuje u nich proliferaci, produkci IFNγ, TNF a IL-2 a zkracuje dobu jejich funkční aktivity. PD-1 je ale oproti CTLA-4 exprimován až v pozdějších fázích aktivace T buněk a může také

sloužit jako marker vyčerpaných T lymfocytů. [78], [84] Ligandy PD-1 jsou PD-L1 a PD-L2. PD-L1 se mimo jiné může vyskytovat na nádorových buňkách různého typu.

Dosud jsou FDA schváleny čtyři monoklonální protilátky proti PD-1 nebo PD-L1 (Pembrolizumab, Nivolumab, Durvalumab, Atezolizumab). Blokáda dráhy PD-1 umožnuje obnovu funkcí efektorových T buněk. [78], [85]

Klinicky testována byla také kombinovaná terapie pomocí protilátek Ipilimumab a Nivolumab. Pacienti s metastatickým melanomem nejlépe odpovídali na kombinovanou léčbu (medián přežití bez progrese byl 11,5 měsíců) v porovnání se samotnou protilátkou Nivolumab (6,9 měsíců) a Ipilimumab (2,9 měsíce). [86]

3.2.1.5 Vakcíny

Nádorové vakcíny jsou druhem protinádorové terapie, která je založená na indukci imunitní odpovědi. Vedle toho existují vakcíny, které mají preventivní efekt proti vzniku určitých typů nádorů, jako jsou vakcíny proti hepatitidě B nebo proti papilomavirům.

Jsou vyvíjeny různé typy nádorových vakcín, jako jsou DNA vakcíny, vakcíny založené na virových vektorech nebo na dendritických buňkách. Pro terapii nádorů byla ale zatím schválená pouze vakcína založená na dendritických buňkách (DC vakcína), sipuleucel-T (Provenge). [87], [88]

DC vakcína je vytvořena z prekurzorů dendritických buněk, které se získají leukoferézou z periferní krve pacienta. Tyto prekurzory jsou inkubovány s antigenem (např. lyzát nádorových buněk nebo izolované nádorové antigeny), následně obdrží maturační signály (kombinace cytokinů) a jsou podány infuzí pacientovi. DC poté prezentují antigen T buňkám, které následně specificky zabíjejí nádorové buňky. [89]

Sipuleucel-T je autologní DC vakcína určená k terapii asymptomatické nebo minimálně symptomatické metastatické kastračně rezistentní rakoviny prostaty (mCRPC). Antigenem specifickým pro prostatické buňky je enzym PAP (prostatic acid phosphatase). Ten je inkubován s DC pro výrobu vakcíny. Bylo ověřeno, že pro vyšší účinnost je výhodné vytvořit konjugát PAP s GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor). [88]

3.2.2 Cílená terapie

Cílená terapie, jak už název napovídá, je terapie cílená na konkrétní molekuly, které jsou schopné blokovat růst a šíření nádoru nebo zabíjet nádorové buňky. Tyto cíle se nacházejí buďto přímo v nádorových buňkách, nebo jsou součástí nádorového mikroprostředí. Pro cílenou terapii je možné využít malé molekuly, monoklonální protilátky nebo imunotoxiny (protilátky konjugované s toxinem) (viz kapitola 3.2.1.3).

Malé molekuly, jsou-li dostatečně malé (s molekulovou hmotností menší než zhruba 900 Da) na to, aby mohly projít membránou do buňky, mají většinou intracelulární cíle. Častými cílovými molekulami jsou kinázy (jejich inhibicí se přeruší celá signalizační dráha), proteazom, CDK (cyklin-

dependentní kinázy) nebo PARP (poly ADP ribose polymerase). Nejvýznamnější malou molekulou využívanou pro nádorovou terapii je Gleevec. [90]

3.2.2.1 Gleevec

Gleevec (Imatinib) je inhibitor tyrosin-kinázy Bcr-Abl, která je přítomná v leukemických buňkách u téměř všech pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML). Bcr-Abl je fúzní produkt tzv. Filadelfského chromozomu, který je zodpovědný za vznik CML a vzniká reciproční translokací chromozomu 9 a 22. Gleevec se váže na ATP (adenosine triphosphate) vazebné místo Bcr-Abl, tím inhibuje vazbu ATP a následnou fosforylaci substrátů. Tím se zablokuje růst leukemických buněk. Bcr-Abl se vyskytuje téměř u všech CML pacientů, proto je pozitivní odpověď na léčbu u 98 % pacientů. [91], [92]

3.2.3 Hormonální terapie

Karcinom prsu a prostaty vzniká maligní transformací glandulárního epitelu. Jeho růst závisí na hormonech, které se váží na estrogenové, nebo androgenní receptory. Proto je možné tyto nádory léčit pomocí hormonální terapie.[57]

3.2.3.1 Karcinom prsu

Karcinom prsu je možné rozdělit na tři hlavní subtypy podle exprese hormonálních receptorů (HR) a receptoru pro růstový faktor HER2. Každý subtyp karcinomu prsu vyžaduje jiný druh terapie. Hormonální terapie je možná jen u nádorů exprimujících HR. [93]

Pro $HR^{+}/HER2^{-}$ subtyp je běžně využívaným terapeutikem Tamoxifen, který funguje jako agonista estrogenového receptoru. Přesto, že se využívá hojně, může mít také řadu negativních vedlejších účinků. [93], [94]

3.2.3.2 Karcinom prostaty

Terapie metastatického karcinomu prostaty spočívá v androgenní deprivační terapii (ADT)[95], [96], která se provádí buďto chirurgickou, nebo medicinální kastrací. U té je výhodou, že může být reverzibilní (např. hormon uvolňující luteinizační hormon, LH-RH).[97]

3.2.4 Transplantace kmenových buněk

První úspěšná transplantace kostní dřeně byla provedena v roce 1957.[98] Širšímu využití ale bránila především reakce štěpu proti hostiteli (GvH). V roce 1971 byla provedena transplantace buněk dvojčete se shodou HLA pro léčbu hematologických malignit.[99] Později se stala alogenní transplantace hematopoetických buněk nezbytnou součástí terapie leukemií a lymfomů. Kmenové buňky je možné získat jak z kostní dřeně, tak i z periferní krve.[100]

U pacientů s akutní myeloidní leukemií (AML) se k transplantaci kmenových buněk přistupuje nejčastěji až při druhé kompletní remisi. Pro mnoho rizik, která s sebou transplantace kmenových buněk nese se k této terapii přistupuje především u pacientů s nízkým rizikem. [100]

3.3 Polymerní léčiva

Imunoterapie samotná neposkytuje dostatečné výsledky, standardem léčby proto zůstává chirurgické odstranění nádoru, radioterapie a chemoterapie.

Chemoterapeutika jsou léčiva, která většinou inhibují proliferaci buněk. Nejsou specifická pro nádorové buňky, působí i na zdravou tkáň, a proto mají řadu vedlejších účinků. Zároveň je jejich účinek limitován vlastnostmi dané molekuly; vedle systémové toxicity je problémem krátký biologický poločas, často omezená rozpustnost ve vodě, nebo vývoj mnohočetné lékové rezistence (MDR) nádorových buněk. Potenciálním řešením, jak obejít tyto nedostatky klasických chemoterapeutik, mohou být konjugáty polymerů a léčiva. [101], [102]

3.3.1 Struktura polymerních nosičů rozpustných ve vodě

Polymerní nosič rozpustný ve vodě, vhodný pro navázání léčiva musí být biokompatibilní. To znamená, že tento polymer je hydrofilní, neutrální, degradabilní nebo menší než cca 50 kDa, aby mohl být vyloučen z těla glomerulární filtrací. Dále je nutné omezit jeho nespecifické interakce s plazmatickou membránou pro zabránění akumulace v necílových buňkách. Polymerní nosič musí obsahovat také vhodné chemické skupiny pro navázání léčiva. Vazba léčiva na nosič je zprostředkovaná přes tzv. spacer, který je zvolen podle požadovaných vlastností polymerního konjugátu. Spacer musí být stabilní v krevním oběhu a uvolnit léčivo až v prostředí cílových buněk nebo intracelulárně, v lysozomech. To je zajištěno nejčastěji díky rozdílům pH (nižší v nádorovém mikroprostředí, ještě nižší v endozomech a lysozomech) nebo pomocí lysozomálních enzymů. Takovým příkladem může být spacer složený z peptidu GFLG, kde je vazba mezi peptidem a léčivem štěpitelná katepsinem B (lysozomální cysteinová proteáza). Další parametr, který určuje vlastnosti konjugátu, je jeho architektura. Polymerní nosič může být např. lineární, větvený, hvězdicovitý, micelární nebo založený na dendrimeru. Oproti větveným konjugátům se glomerulární filtrací rychleji eliminuje lineární konjugát, renální limit pro snadnou filtraci je Mw cca 40 000 g/mol, větší molekuly se filtrují obtížněji. [103]

3.3.2 Aktivně a pasivně cílené polymerní konjugáty

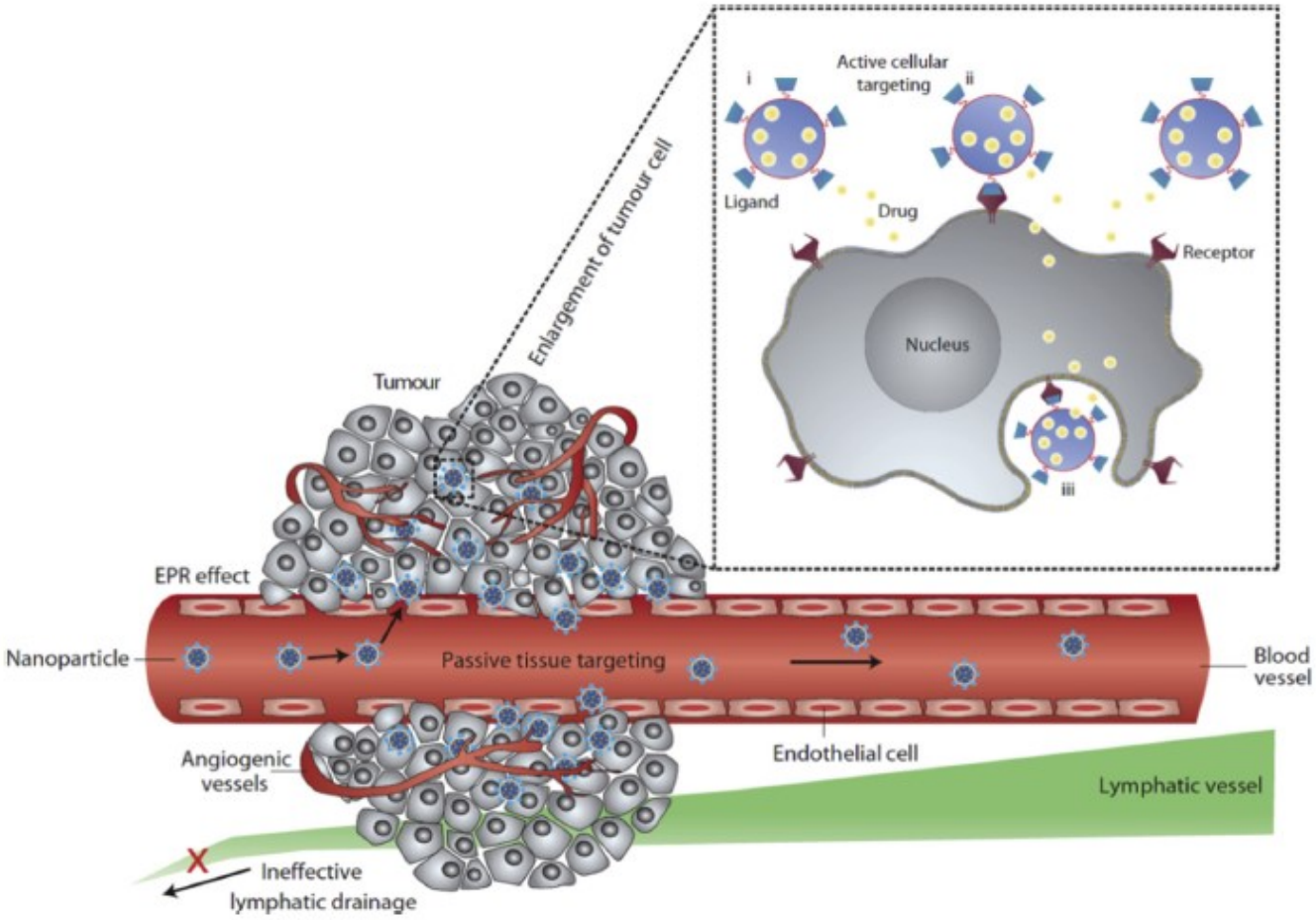
Efektivita cílení polymerních konjugátů závisí na typu nádoru a struktuře polymerního konjugátu. Na polymerní konjugát je možné navázat aktivně cílící strukturu, příkladem může být vazba monoklonálních protilátek [104] nebo cukrů [105].

Pro hematologické malignity je vhodné využít aktivně cílené konjugáty, např. cílené na CD20 (receptor na B buňkách) pro terapii non-Hodgkinova lymfomu. [103], [106] Pro pevné nádory může být pro extravazaci konjugátu do nádorového prostředí dostačující využití pasivního směrování a tzv. EPR (enhanced permeability and retention) efektu. Změn vlastností a efektivity léčby může být dosaženo zvýšením nebo snížením molekulové hmotnosti konjugátu nebo volbou vhodné architektury molekuly.

EPR efekt je jedním ze základních mechanismů, o které se opírá terapie polymerními konjugáty. Poprvé byl popsán v roce 1986 [107] a jedná se o efekt způsobený vyšší permeabilitou cév uvnitř nádoru

a zároveň absencí lymfatické drenáže. (Obr. 2) Cévy v nádoru jsou oproti cévám ve zdravé tkáni chaotické a více fenestrované (mezery v endoteliální výstelce). To je způsobené abnormálně vysokými hladinami vaskulárních růstových faktorů a faktorů zvyšujících permeabilitu cév (bradykinin, NO, prostaglandiny) v nádorovém mikroprostředí. Díky propustnějším cévám a zároveň nedostatečné lymfatické drenáži nádoru se v něm mohou akumulovat molekuly s vysokou molekulovou hmotností a o velikosti až několik stovek nm. [108], [109]

V posledních cca deseti letech se ukazuje, že EPR efekt může být u pacientů velmi heterogenní, a to jak mezi různými typy nádorů, tak i mezi jedinci se stejným typem nádoru. Výsledky klinických studií zabývající se polymerními konjugáty s léčivem často nejsou tak jednoznačné jako preklinické studie. Výzkum naznačuje, že EPR efekt se liší také u lidí a u myších modelů, může se měnit během vývoje nádoru nebo být jen transientní. Proto je potřeba vyvinout protokoly a zobrazovací techniky pro určení míry EPR efektu u konkrétních pacientů pro možnost personalizované terapie polymerními konjugáty. Zároveň je potřeba zdůraznit, že i u nádorů s nižším vlivem EPR efektu na akumulaci léčiva v nádorovém prostředí se uplatňují ostatní výhodné vlastnosti polymerních konjugátů oproti nízkomolekulárním chemoterapeutikům, jako je snížení toxicity léčiva, umožnění rozpustnosti hydrofobních látek, zvýšení doby cirkulace v krvi, zvýšení maximální tolerované dávky léčiva, možnost navázání cílících molekul a specifické uvolňování léčiva z polymerního nosiče. [103], [108]



Obrázek 2: EPR efekt, pasivní a aktivní cílení do nádorového mikroprostředí a do nádorové buňky. (převzato z: Pérez-Harrero, 2015 [102])

3.3.3 Překonání mnohočetné lékové rezistence (MDR)

Velkým problémem chemoterapie je mnohočetná léková rezistence (MDR) nádorových buněk. MDR může být indukovaná podáváním chemoterapeutika, kdy dojde ke zvýšené expresi genu MDR1, který kóduje transmembránovou proteinovou pumpu P-glykoprotein (P-gp).[101]

P-gp patří do skupiny ABC (ATP Binding Cassette) transportérů a díky energii získané hydrolýzou ATP vylučuje toxiny a xenobiotika z buňky do extracelulárního prostoru. Běžně se vyskytuje na buňkách epitelu, tím může bránit absorpci látek přes střevní epitel a znemožnit tak transportu léčiva do cílové tkáně. Je specifický pro velké množství substrátů a v nádorových buňkách je často exprimován ve zvýšené míře. [110] Kromě P-gp mohou podobně fungovat i další molekuly ze skupiny ABC transportérů.

Polymerní konjugáty jsou schopny obejít MDR díky tomu, že se do buňky dostávají pinocytózou a z lysozomu jsou uvolněny až v perinukleárním prostoru, daleko od P-gp [111]. Dále je také možné na polymer navázat nejen léčivo, ale i inhibitory P-gp. [112]

3.3.4 Polymerní nosiče léčiv

Vytvořeno a testováno bylo mnoho různých typů polymerních nosičů léčiv. Mezi nejvíce studované patří polyetylen glykol (PEG) nebo poly[*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] (p-HPMA).

3.3.4.1 PEG

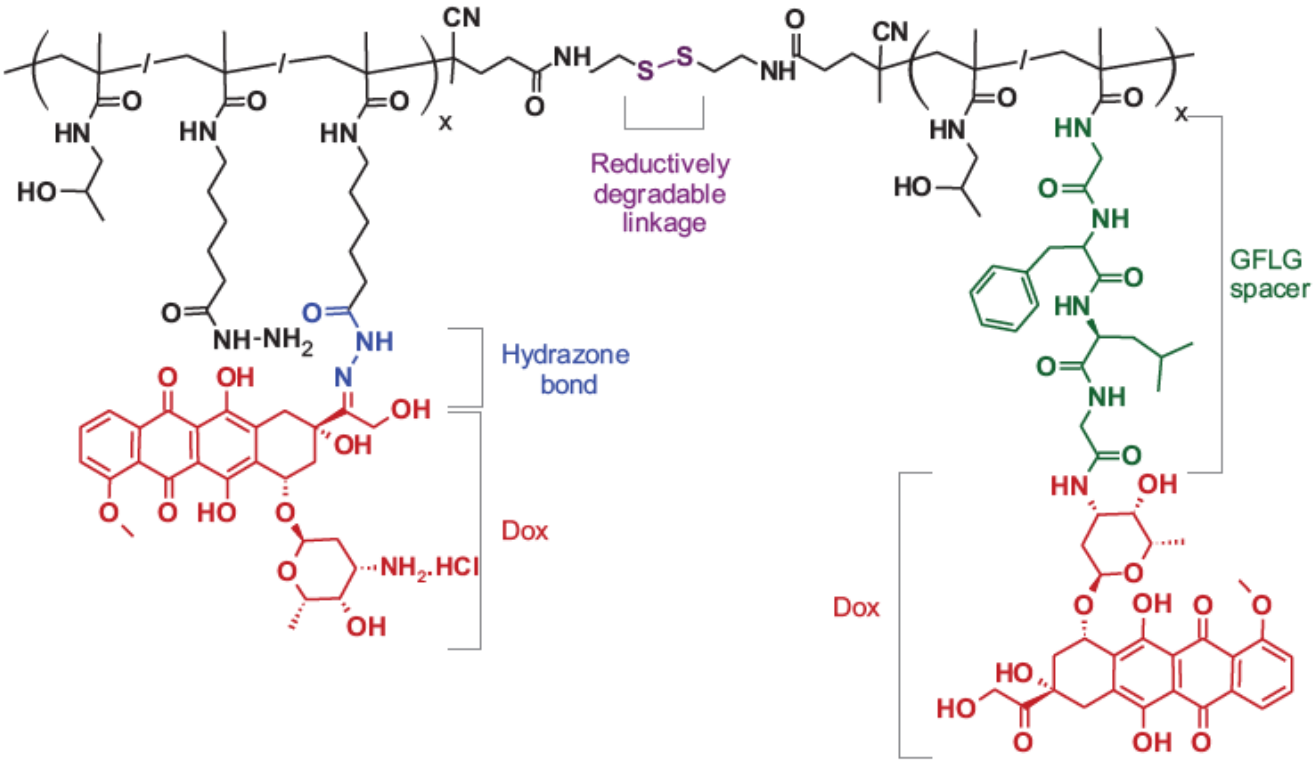
Polyethylen glykol (PEG) je ve vodě rozpustný, neutrální, biokompatibilní polymer. Ve farmaceutickém průmyslu se využívá jako excipient. Po navázání na jinou molekulu snižuje její imunogenicitu, zlepšuje farmakokinetiku nebo prodlužuje poločas cirkulace v krvi. PEGylované mohou být jak proteiny, tak i nukleové kyseliny. Nevýhodou PEG je, že není biologicky degradabilní, a proto je omezena jeho molekulová hmotnost, aby bylo stále možné PEG vyloučit z těla glomerulární filtrací. Také je u něj omezené množství skupin vhodných pro vazbu léčiva, lze využít jen konce řetězců. [113], [114]

3.3.4.2 HPMA

HPMA, neboli *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide, byl poprvé syntetizován v roce 1973.[115] HPMA je biokompatibilní molekula s funkčními skupinami vhodnými pro vazbu léčiva, enzymů nebo hormonů. Nejvíce je polymerní HPMA studován s navázaným nízkomolekulárním léčivem, které má protinádorový účinek (např. doxorubicin). Léčivo je na HPMA možné navázat pomocí spaceru, který zajišťuje kontrolované uvolňování léčiva. Jak už bylo zmíněno výše, spacer může být štěpen v závislosti na pH nebo enzymaticky (Obr. 3). [113]

První generace polymerních konjugátů s HPMA obsahovala nedegradabilní polymerní nosič s optimální molekulovou hmotností, která zajišťovala jak možnost akumulace v nádoru díky EPR efektu, tak možnost odstranění z oběhu glomerulární filtrací. Druhá generace těchto konjugátů má vysokou

molekulovou hmotnost a polymerní nosič je biologicky degradabilní (díky biodegradabilním spojkám), aby mohl být stále filtrován ledvinami. Degradabilní polymerní konjugát může mít různé uspořádání, např. diblok, multiblok, hvězdicovitý konjugát založený na dendrimerním jádru nebo tvoří polymerní micely. [113], [116]



Obrázek 3: Schéma biodegradabilního p-HPMA diblokového konjugátu s doxorubicinem. Vlevo Doxorubicin navázaný na HPMA pH senzitivní hydrazonovou vazbou. Vpravo doxorubicin navázaný na HPMA enzymaticky štěpitelným GFLG spacerem (Převzato z: Chytil, 2018[116])

3.3.4.2.1 Hvězdicovité polymerní nosiče

Hvězdicovité polymerní nosiče jsou založeny na dendrimerním jádru, na které jsou navázány polymery HPMA s léčivem. První syntetizované hvězdicovité polymery pro preklinický výzkum byly nedegradabilní a jejich velikost se pohybovala nad možností glomerulární filtrace. Novější typy těchto kopolymerů obsahují štěpitelné vazby mezi dendrimerem a HPMA polymerem, proto mohou dosahovat vysoké molekulové hmotnosti. Molekulová hmotnost polymerů ale není neomezená. Bylo ověřeno, že maximální velikost tohoto typu konjugátu se pohybuje kolem 600 kDa. Větší velikost už pak nepřináší další výhody. [117], [118]

3.3.4.2.2 Micelární polymerní nosiče

Micelární polymerní nosiče léčiv se skládají z amfifilních polymerů, které po překročení kritické micelární koncentrace samovolně tvoří micely s hydrofobním jádrem a hydrofilním obalem, který micelu stabilizuje. Existují dva druhy micel, první tvoří s léčivem nekovalentní vazbu založenou

na hydrofobních interakcích. Takto je možné do micely uzavřít jakékoli hydrofobní léčivo bez ohledu na jeho funkční skupiny a možnosti vazby na polymer. Druhý typ micely tvoří polymery s kovalentně navázaným léčivem. Po hydrolýze vazeb se může léčivo uvolnit a micela se rozpadá. Jednotlivé unimery, které tvořily micelu tak mohou být vyloučeny z těla ledvinami. Micela nemůže být takto vyloučena, protože její velikost překračuje hranici pro možnost glomerulární filtrace. Výhodnější je využití druhého typu micely s kovalentně navázaným léčivem. Z prvního typu micely se ve větší míře spontánně uvolňuje léčivo a kovalentní vazba toto uvolňování omezuje. [113], [119], [120]

3.3.4.2.3 Imunogenicita

Na různých myších modelech bylo ověřeno, že samotný homo- i kopolymer na bázi HPMA není imunitním systém rozpoznán jako antigen, a proto není imunogenní. Naopak HPMA, podobně jako PEG, snižuje imunogenicitu ostatních látek, které jsou na něj navázány. Tento efekt je vyšší u polymerů s vyšší molekulovou hmotností. Mechanismem je pravděpodobně hydrofilní povaha polymeru a sterické bránění, kdy HPMA „obalí“ navázanou molekulu a zabrání imunitnímu systému, aby ji rozpoznal. [121]

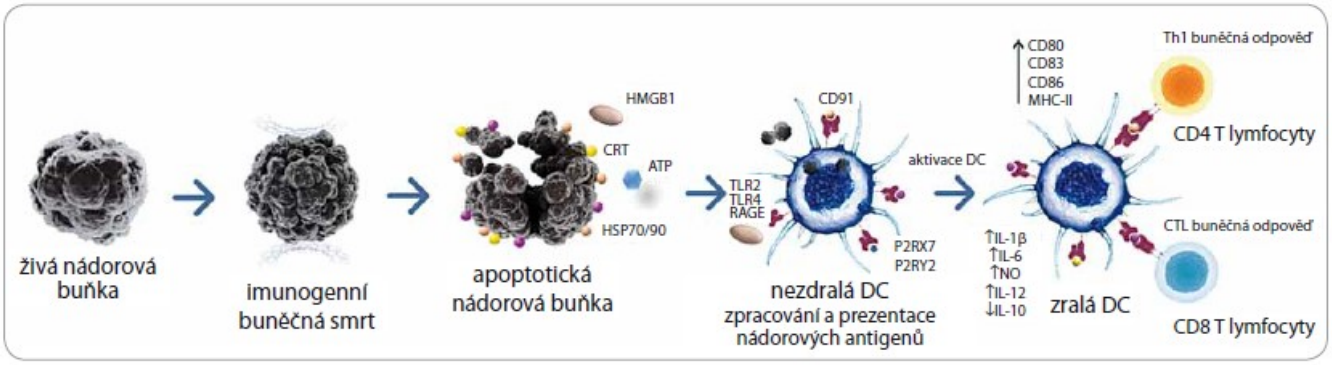
Navázání daunomycinu nebo doxorubicinu na HPMA polymer snížilo jejich toxicitu vůči buňkám kostní dřeně. Při chemoterapii jsou rychle se dělící buňky kostní dřeně eliminovány, což vede k imunosupresi. Omezením této imunosuprese se sníží riziko, že se pacient po chemoterapii nebude moci bránit infekci. [121]

3.3.4.2.4 Protinádorová účinnost

Při léčbě myších nádorových modelů pomocí polymerních konjugátů HPMA s doxorubicinem (DOX) s různou strukturou vzniká u úspěšně vyléčených myší dlouhotrvající rezistence vůči danému typu nádoru. To bylo ověřeno opětovnou inokulací vyléčených myší letální dávkou nádorových buněk (až 130 dní po léčbě). Myši byly ponechány bez léčby a oproti kontrolám vyvinuly nádor později, nebo se nádor nevyvinul vůbec. Další studie ukázaly, že jsou za vznik rezistence zodpovědné $CD8^+$ T lymfocyty. [122]–[124]

Aktivace imunitní odpovědi proti konkrétnímu typu nádoru po úspěšné terapii polymerními konjugáty HPMA s DOX pravděpodobně souvisí s imunogenní buněčnou smrtí (immunogenic cell death, ICD). Tou se aktivuje imunitní odpověď proti nádoru. Imunogenní buněčná smrt závisí na druhu podnětu, který ji spustí. ICD aktivuje protinádorovou imunitní odpověď tím, že se z nádorové buňky uvolňují molekuly DAMP (danger associated molecular pattern) jako je kalretikulin, proteiny teplotního šoku (heat shock proteiny), ATP nebo HMGB1 (High mobility group box 1). Molekuly DAMP podporují aktivaci a maturaci dendritických buněk, které pak aktivují protinádorovou imunitní odpověď zprostředkovanou $CD4^+$ a $CD8^+$ T lymfocyty (Obr. 4). Prvními chemoterapeutiky, která byla popsána jako induktory ICD, jsou mitoxantron a antracykliny (např. doxorubicin). [125]–[128]

Mezi antracykliny patří například doxorubicin. Bylo prokázáno, že polymerní konjugáty s doxorubicinem navázaným hydrazonovou vazbou si zachovávají schopnost indukovat ICD. [126]



Obr. 4: Indukce protinádorové imunitní odpovědi. (převzato z: Fučíková, 2015 [125])

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Roztoky a média

Fosfátový fyziologický roztok (PBS)

9 g NaCl

1,2 g $Na_2HPO_4.12H_2O$

0,2 g $Na_2H_2PO_4.H_2O$

Deionizovaná H_2O do objemu 1 l, pH upraveno na 7,4 pomocí 4 M NaOH

Pufr pro průtokovou cytometrii (FACS pufr)

PBS

2 % fetálního telecího séra (FTS, Invitrogen)

2 nM EDTA (Invitrogen)

RPMI médium pro kultivaci EL4 buněk

Médium RPMI 1640 (Sigma-Aldrich)

10 % FTS

100 U/ml Penicilin (Sigma-Aldrich)

100 µg/ml Streptomycin (Sigma-Aldrich)

2 nM glutamin (Sigma-Aldrich)

4,5 g/l glukóza (Sigma-Aldrich)

1 mM pyruvát sodný (Sigma-Aldrich)

RPMI médium pro kultivaci CT26 buněk

Médium RPMI 1640 (Sigma-Aldrich)

10 % FTS

100 U/ml Penicilin (Sigma-Aldrich)

100 µg/ml Streptomycin (Sigma-Aldrich)

4,5 g/l glukóza (Sigma-Aldrich)

1 mM pyruvát sodný (Sigma-Aldrich)

10 mM HEPES (Sigma-Aldrich)

4.2 Nádorové linie

Buněčné linie

Pro experimenty byly použity buňky myších nádorových linií EL4 (T buněčný lymfom; ATCC, TIB-39) a CT26 (kolorektální karcinom; ATCC, CRL-2638). Pro podání *in vivo* byla využita vždy první pasáž po rozmražení buněk.

Buněčná linie EL4 je odvozena z myší kmene C57BL/6 (B6) a u nádorů z ní odvozených dobře funguje EPR efekt. Po subkutánní (s.c.) inokulaci se nádorové buňky relativně pomalu šíří, do sleziny se rozšíří pravděpodobně hematogenní cestou 21-28 dní po inokulaci. EL4 lymfom odpovídá na léčbu volným doxorubicinem omezeně a výborně odpovídá na léčbu polymerními konjugáty s doxorubicinem. Lepší odpovědi na terapii EL4 lymfomu jsou jen po jedné dávce chemoterapie. Neléčené myši nesoucí EL4 nádor přežívají průměrně 32 dnů.

Buněčná linie CT26 je odvozena z myší kmene BALB/c a nádory jsou obtížně léčitelné. Vůči chemoterapii je karcinom CT26 málo citlivý, protože přirozeně exprimuje vysoké množství ABC transportérů, především P-glykoproteinu (P-gp). Lepší výsledky terapie jsou s opakovanými nižšími dávkami léčiva. CT26 metastazuje pomalu a je poměrně imunogenní, protože má vysokou mutační nálož (mutation load). Neléčené myši nesoucí CT26 nádor přežívají průměrně 60 dnů.

Kultivace buněk

Buňky byly kultivovány v polystyrenových kultivačních lahvích (Nunc, Thermo Fisher Scientific) v kompletním médiu, v inkubátoru se stabilním obsahem 5 % CO_2 při teplotě 37 °C. S buňkami bylo manipulováno v laminárním boxu za sterilních podmínek. Počet buněk v suspenzi byl stanovován automatickou počítačkou buněk Countess (Invitrogen) v roztoku trypanové modři.

4.3 Experimentální myši

Pro experimenty byly použity samice myší kmene BALB/c a C57BL/6 (B6) a obě pohlaví kmene SJL z Mikrobiologického ústavu AV ČR, umístěné v podmínkách konvenčního chovu, potrava a voda *ad libitum*. Experimentální myši byly 2-8 měsíců staré.

4.4 Polymerní konjugáty

Všechny použité polymerní konjugáty byly připraveny v Laboratoři biolékařských polymerů v Ústavu makromolekulární chemie AV ČR. Pro jednotlivé modely bylo léčivo vybráno podle předchozích zkušeností laboratoře tak, aby mělo dobrou terapeutickou účinnost pro daný model.

Hvězdicovitý polymerní konjugát STAR-n

Hvězdicovitý polymerní konjugát STAR-n byl nedegradovatelný HPMA konjugát založený na PAMAM (polyamidoamin) dendrimeru. Molekulová hmotnost (Mw) byla 250 000 g/mol. Obsah doxorubicinu byl 9,5 %. Léčivo bylo na polymerní nosič navázáno pH senzitivní hydrazonovou vazbou.

Hvězdicovitý polymerní konjugát STAR1

Hvězdicovitý polymerní konjugát STAR1 byl degradovatelný HPMA polymerní konjugát s doxorubicinem založený na bis-MPA (2,2-bis(hydroxymethyl)propionic acid) dendrimeru (Obr. 5A).

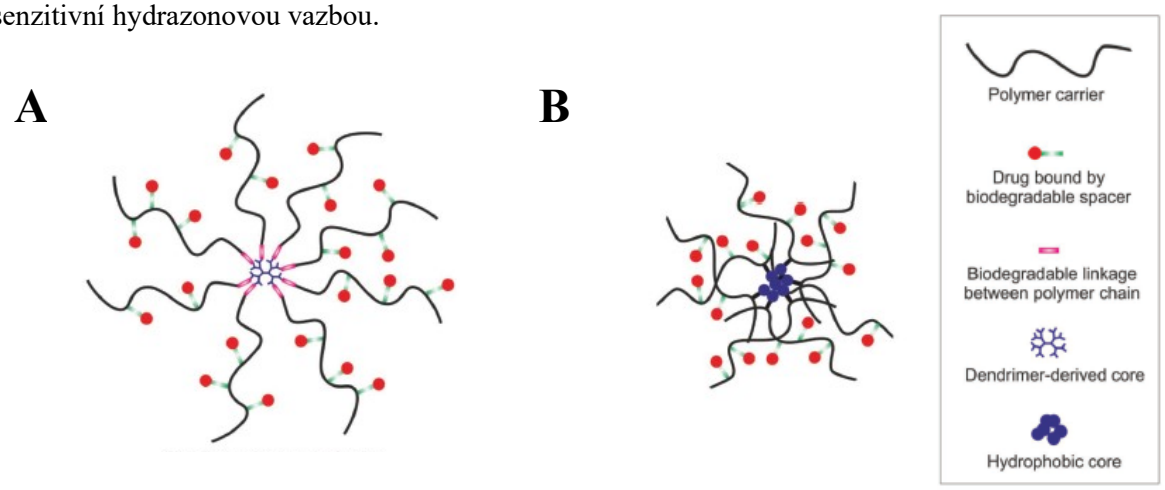
Jeho molekulová hmotnost byla 543 000 g/mol a obsahoval 11,1 % doxorubicinu. Léčivo bylo na polymerní nosič navázáno pH senzitivní hydrazonovou vazbou.

Hvězdicovitý polymerní konjugát STAR2

Hvězdicovitý polymerní konjugát STAR2 byl degradovatelný HPMA polymerní konjugát s doxorubicinem založený na bis-MPA dendrimeru (Obr. 5A). Jeho molekulová hmotnost byla 310 000 g/mol a obsahoval 9,3 % doxorubicinu. Léčivo bylo na polymerní nosič navázáno pH senzitivní hydrazonovou vazbou.

Micelární polymerní konjugát (MIC)

Micelární konjugát HPMA polymeru s doxorubicinem obsahoval hydrofobní složku – analog cholesterolu, cholest-4-en-on (Obr. 5B). Molekulová hmotnost polymeru byla 24 000 g/mol. Obsah doxorubicinu navázaného na polymerní nosič byl 8,7 %. Léčivo bylo na polymerní nosič navázáno pH senzitivní hydrazonovou vazbou.



Obrázek 5: Struktura polymerních konjugátů využitých k terapii nádorů pro následné FACS analýzy. (A) Degradabilní hvězdicovitý polymerní konjugát založený na dendrimerním jádru. **(B)** Micelární polymerní konjugát

4.5 Volné léčivo

Vedle terapie polymerními konjugáty byly některé skupiny myší léčeny také volným doxorubicinem (léková forma, Adriblastina, Pfizer).

4.6 *In vitro* cytotoxicita – inkorporace ^{3}H-thymidinu

Z kultivační láhve byly za sterilních podmínek v laminárním boxu odebrány buňky. Buňky byly jednou promyty kompletním kultivačním médiem a v připravené suspenzi bylo určeno množství buněk a životnost. Byla připravena suspenze s 25x10^{3} buněk/ml. Do každé jamky v 96 jamkové destičce (destička pro tkáňové kultury s plochým dnem, Thermo Fisher Scientific) bylo napipetováno 200 µl buněčné suspenze (5x10^{3} buněk/jamka). K buňkám bylo přidáno 50 µl média s polymerním konjugátem nebo volným doxorubicinem v sérii ředění. Pro každou koncentraci léčiva byly připraveny vždy čtyři

paralelní vzorky. Vedle jamek s léčivem byly kontrolní jamky s buňkami bez léčiva. Kultivační destička byla inkubována celkem 72 hodin v CO_2 inkubátoru při 37 °C s 5 % CO_2.

Na posledních 6 hodin kultivace bylo do každé jamky přidáno 50 µl ^{3}H-thymidinu (0,2 µCi v jamce; Perkin Elmer) naředěného v kompletním médiu. Destičky byly 6 hodin inkubovány v CO_2 inkubátoru (37 °C, 5 % CO_2). Poté byly zmrazeny (-20 °C) a následně harvestovány na filtr ze skleněných vláken (Harvester 96 Mach 3, Tomtec, USA; Glass Fiber filter, Perkin Elmer). Po usušení filtrů při pokojové teplotě a zatavení s pevným scintilátorem (Meltilex, Perkin Elmer) byla měřena radioaktivita jednotlivých jamek (Microbeta 1450 Trilux, Wallac, Finland). Cytostatická aktivita léčiv byla vyjadřována hodnotou IC50; ta je rovna koncentraci léčiva, která indukuje právě poloviční inhibiční efekt.

4.7 *In vitro* cytotoxicita – MTT esej

U buněk EL4, které neinkorporují ^{3}H-thymidin, byla cytotoxická aktivita léčiv stanovena pomocí MTT eseje, kterou se detekuje metabolická aktivita buněk. Buňky byly s léčivem inkubovány 72 hodin v 96 jamkových destičkách stejně jako u detekce cytostatické aktivity léčiv pomocí inkorporace ^{3}H-thymidinu (viz kapitola 4.6).

Po 72 hodinách inkubace buněk s léčivem byla destička centrifugována (400 g, 5 min) a do každé jamky bylo přidáno 100 µl kompletního média a 20 µl MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid; roztok 5 mg/ml PBS). Destička byla inkubována v CO_2 inkubátoru (37 °C, 5 % CO_2). Po 1 až 2 hod bylo do každé jamky přidáno 200 µl DMSO (dimethylsulfoxid). Po 15 minutách ve tmě byla každá jamka promíchána pipetou a měřena absorbance pomocí destičkového spektrofotometru Infinite M200 Pro (Tecan) při vlnové délce 540 nm, referenční vlnová délka 690 nm. Metabolická aktivita léčiv byla vypočítána po odečtu hodnoty blanku a vyjadřována hodnotou IC50; ta je rovna koncentraci léčiva, která indukuje právě poloviční inhibiční efekt.

4.8 *In vivo* terapie nádorů

Z kultivační lahve byly za sterilních podmínek v laminárním boxu odebrány buňky. Buňky byly jednou promyty bezsérovým médiem, poté byla připravena suspenze buněk v bezsérovém médiu a pomocí automatické počítačky buněk v ní bylo určeno množství buněk a životnost. Byla připravena suspenze obsahující 1x10^6 (EL4) nebo 2x10^6 (CT26) živých buněk/ml. Myším SJL nebo B6 bylo v den 0 subkutánně (s.c.) injikováno 100 µl suspenze buněk EL4 (obsahující 1x10^5 živých buněk). Myším BALB/c bylo v den 0 s.c. injikováno 100 µl suspenze buněk CT26 (obsahující 2x10^5 živých buněk). Životnost použitých nádorových buněk se vždy pohybovala nad 90 %. V den 8 (SJL) nebo 9 (BALB/c) bylo myším nesoucím nádor intravenózně (i.v.) podáno léčivo rozpuštěné v PBS nebo byly myši ponechány bez léčby. Poté byla měřena velikost nádorů a sledováno přežívání myší.

Pro FACS analýzu byly myši léčeny podle vybraného schématu (1 nebo 3 dávky léčiva) a v určitém časovém intervalu po terapii byly usmrceny. Myším byla odebrána slezina a nádor, které byly dále zpracovány (viz 4.7-9).

4.9 Izolace splenocytů, příprava jednobuněčné suspenze pro FACS analýzu

Myši byly usmrceny cervikální dislokací a byla jim odebrána slezina. Slezina byla umístěna do kyvety (C tube, Miltenyi Biotec) se 4 ml bezsérového média a pomocí tkáňového disociátoru (GentleMACS Tissue Dissociator, Miltenyi Biotec; program spleen1.1) byly sleziny homogenizovány. Suspenze byla přelita do 50ml kyvety přes 70µm filtr a centrifugována (400 g., 5 min). Supernatant byl odstraněn a buněčná peleta byla resuspendována ve 2 ml yzačního pufru ACK (Sigma-Aldrich) pro lýzu erytrocytů. Po 10 min při normální teplotě bylo do kyvety doplněno 20 ml FACS pufru pro zastavení aktivity ACK pufru a od této chvíle byly suspenze uchovávány na ledu a veškerá manipulace probíhala za chladu. Suspenze byly stočeny (400 g., 5 min) a resuspendovány ve 3 ml FACS pufru. Dále byly přefiltrovány přes 30µm filtr do 15ml kyvety a bylo určeno množství buněk a životnost pomocí automatické počítačky buněk. Poté byla suspenze použita na FACS analýzu.

4.10 Izolace buněk z nádoru, příprava jednobuněčná suspenze pro FACS analýzu

Myši byly usmrceny cervikální dislokací a byl jim odebrán nádor z původní lokalizace. Nádor byl zvážen, rozdělen na menší kousky (cca 3 mm) a umístěn do kyvety (C tube, Miltenyi Biotec) s připravenou enzymovou směsí (Tumor Dissociation Kit, mouse, Miltenyi Biotec). Nádory byly homogenizovány pomocí tkáňového disociátoru (GentleMACS Tissue Dissociator, Miltenyi Biotec; program m-impTumor_02) a za pomalého míchání inkubovány 40 min při 37 °C. Pro přípravu suspenzí z nádorů EL4 i CT26 byl použit postup doporučený výrobcem pro nádory s vysokým podílem stromatu, enzymy D + R + A dle pokynů výrobce, při upraveném postupu (viz kap. 5.6) enzymy D + A. Po inkubaci byly suspenze znovu dvakrát homogenizovány (program m-impTumor_03) a přefiltrovány přes 70µm filtr do 50ml kyvety. Filtr byl ještě promyt 5-10 ml bezsérového média. Suspenze byly stočeny (400 g, 5 min) a supernatant byl odstraněn. Peleta buněk byla resuspendována v 5 ml FACS pufru a od té doby byly buňky uchovávány na ledu. U nádorů s vysokým množstvím erytrocytů byly ještě lyzovány erytrocyty ACK pufrem (viz 4.7). Suspenze byly nakonec přefiltrovány přes 30µm filtr do 15ml kyvety a pomocí automatické počítačky bylo stanoveno množství buněk v suspenzi. Poté byla suspenze použita pro FACS analýzu.

4.11 Průtoková cytometrie

Do 96 jamkové destičky (U profil, TPP) byla napipetována suspenze buněk (viz 4.7 a 4.8) tak, aby v jedné jamce bylo cca 10^6 buněk ve 100 µl pufru. Destička byla stočena (470 g, 4 min, 4 °C) a supernatant byl odstraněn. Peleta byla resuspendována a do každé jamky bylo přidáno 20 µl směsi naředěného Fc bloku (anti-mouse CD16/CD32; eBiosceince, ředěno 1:50) s 10 % myšího séra. Po 10 minutách inkubace na ledu bylo do destičky přidáno 200 µl FACS pufru na jamku a destička byla stočena (470 g, 4 min, 4 °C). Poté byly značeny povrchové markery připravenou směsí monoklonálních protilátek (mAb) konjugovaných s fluorochromem. Protilátky byly naředěny FACS pufrem do požadované koncentrace (Tabulka 2). Do každé jamky bylo přidáno 20 µl směsi protilátek a destička

byla inkubována 30 minut na ledu ve tmě. Poté byly buňky dvakrát promyty 200 µl FACS pufru (470 g, 4 min, 4 °C).

Pro fixaci, permeabilizaci a značení intracelulárních markerů byl použit FoxP3 Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience). Peleta buněk byla resuspendována ve 100 µl připraveného Fix/Perm roztoku (eBioscience, 1 díl Fix/Perm Concentrate, 3 díly Fix/Perm Diluent). Destička byla inkubována 30 minut ve tmě za pokojové teploty nebo přes noc ve tmě při 4 °C. Do každé jamky bylo pak přidáno 100 µl Perm Wash (eBioscience, Perm Wash naředěn 1:10 v destilované vodě) a destička byla stočena (470 g, 4 min, 4 °C). Poté byla destička ještě jednou promyta 200 µl Perm Wash. Peleta byla resuspendována v 50 µl směsi naředěných mAb konjugovaných s fluorochromem (ředěno v Perm Wash) pro značení intracelulárních markerů. Do nebarvených jamek (bez intracelulárního značení) bylo přidáno 50 µl Perm Wash. Destička byla inkubována 30 min na ledu ve tmě a poté buňky dvakrát promyty 200 µl Perm Wash (470 g, 4 min, 4 °C). Peleta byla resuspendována ve 100 µl FACS pufru a poté byly buňky analyzovány průtokovou cytometrií.

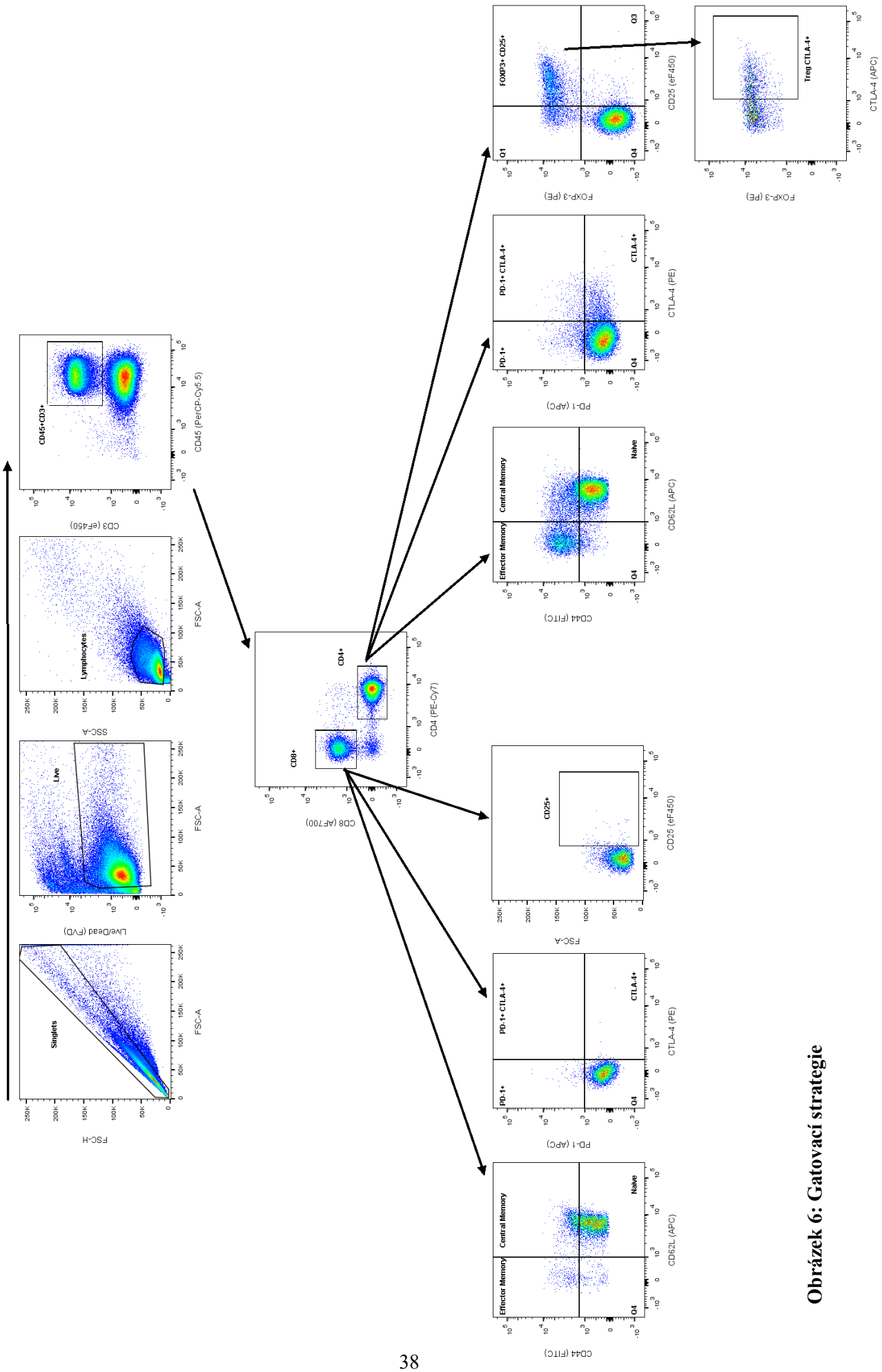
K měření byl využit průtokový cytometr LSRII (BD Biosciences, USA) s HTS (High Throughput sampler) zařízením. Naměřená data byla poté vyhodnocena pomocí softwaru FlowJo verze 10.6 (Tree Star, USA).

Tabulka 2: Seznam monoklonálních protilátek s fluorochromem použitých pro FACS analýzu.

Marker	Fluorochrom	Klon	Ředění	Značení	Panel*
CD45	PerCP-Cy5.5	30-F11	1:300	extracelulární	1,2,3 – BALB/c
CD45.1	PerCP-Cy5.5	A20	1:300	extracelulární	1,2,3 – nádory SJL
CD45.2	PerCP-Cy5.5	104	1:100	extracelulární	1,2,3 – sleziny SJL
CD3	eFluor450	17A2	1:30	extracelulární	1,3
CD3	FITC	17A2	1:100	extracelulární	2
CD4	PE-Cy4	GK1.5	1:200	extracelulární	1,2,3
CD8	AF700	53-6.7	1:50	extracelulární	1,2,3
PD-1	APC	J43	1:50	extracelulární	1
CTLA-4	APC	UC10-4B9	1:100	intracelulární	3
CTLA-4	PE	UC10-4B9	1:100	intracelulární	1
CD44	FITC	IM7	1:300	extracelulární	2
CD62L	APC	MEL-14	1:200	extracelulární	2
CD25	eFluor450	PC61.5	1:400	extracelulární	3
FoxP3	PE	FJK-16s	1:100	intracelulární	3
FVD	eFluor780	-	1:200	extracelulární	1,2,3

* Panel 1: T lymfocyty s PD-1 a CTLA-4; panel 2: T lymfocyty s CD44, CD62L; panel 3: Treg

Všechny protilátky: eBioscience; anti-CD45.2: Invitrogen



Obrázek 6: Gatovací strategie

4.12 ELISA – detekce IFNγ v myší plazmě

BALB/c myši byly inokulovány nádorovými buňkami CT26 a léčeny třemi dávkami léčiva tak, jako je popsáno v kapitole 4.6. V den 21 byla myším odebrána krev do zkumavek s heparinem (odběrové zkumavky Sarstedt). Zkumavky byly ihned umístěny do ledové lázně a centrifugovány (376 g., 10 min), plazma byla odebrána do čisté zkumavky a znovu centrifugována (376 g, 10 min.). Takto připravená plazma byla rozdělena na alikvoty a zamražena (-20 °C). Po rozmrazení bylo v plazmě stanoveno množství IFNγ pomocí kitu mouse IFNgamma ELISA Ready-Set-Go! (eBioscience).

Byl dodržen postup doporučený výrobcem. Stručně shrnuto:

První protilátka byla navázána na 96 jamkovou destičku (Nunc Maxisorp). Destička byla s protilátkou inkubována přes noc při 4 °C a poté byl z destičky vymyt nenavázaný zbytek protilátky (třikrát promyto promývacím pufrem: PBS, 0,05 % Tween-20, Sigma-ALdrich). Destička byla blokována blokovacím roztokem 1 hodinu při pokojové teplotě. Poté byla dvakrát promyta a do jamek byl napipetován naředěný standard (v 8 koncentracích od 15,6 do 2000 pg/ml) a vzorky plazmy (ředěné 2x; všechny vzorky i standard v dupletech). Destička byla se vzorky inkubována 2 hodiny při pokojové teplotě. Poté byla destička promyta čtyřikrát a do jamek byla přidána detekční protilátka, inkubace byla 1 hodinu při pokojové teplotě. Destička byla čtyřikrát promyta a inkubována 30 minut s detekčním enzymem (Avidin-HRP, horseradish peroxidase). Následně byla destička promyta sedmkrát a byl přidán substrát – TMB (Tetramethylbenzidine). Po 15 minutách inkubace při pokojové teplotě byla reakce zastavena 2N H_2SO_4. Nakonec byla změřena absorbance při 450 nm s odečtením referenční hodnoty (absorbance při 570 nm). Množství IFNγ bylo vypočítáno pomocí standardní křivky.

4.13 Statistické zpracování dat

Všechna data byla zpracována pomocí softwaru GraphPad Prism8. Data jsou graficky zobrazena jako průměrné zastoupení dané populace +/- SD. Pro určení statistické signifikance byl proveden dvouvýběrový nepárový t test. V případě sledování přežívání myší byl proveden log-rank (Mantel-Cox) test. Hodnoty *$p < 0,05$, **$p < 0.01$ a ***$p < 0.001$ byly považovány za signifikantní.

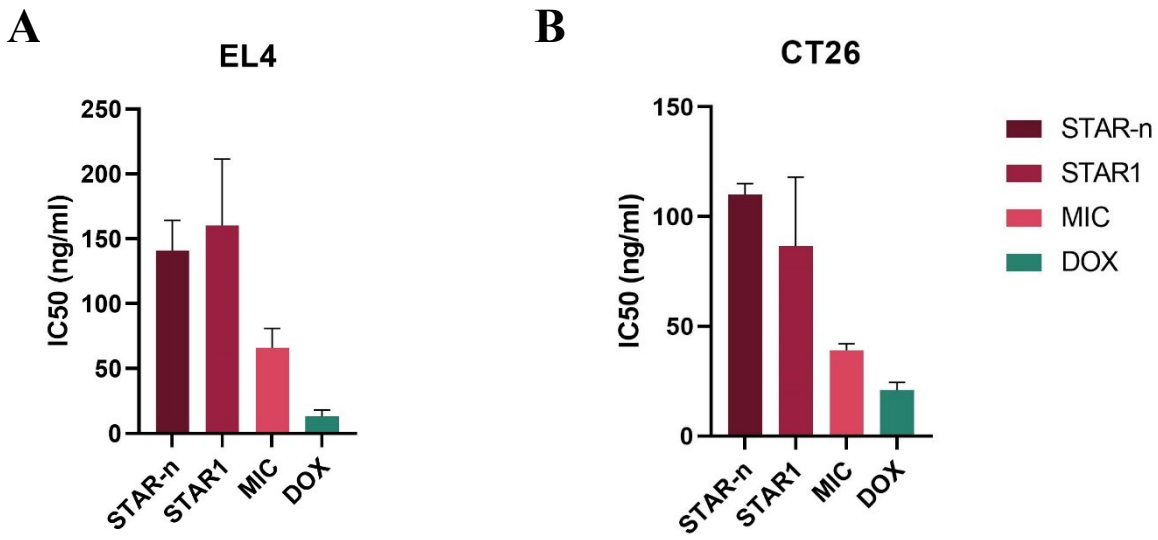
5 VÝSLEDKY

5.1 *In vitro* cytotoxická aktivita polymerních konjugátů

Při charakterizaci polymerních konjugátů s doxorubicinem byla vždy stanovena jejich cytotoxická aktivita *in vitro*. Ta byla testována na několika buněčných liniích pomocí inkorporace ^{3}H-thymidinu (detekce cytostatické aktivity). Buňky EL4, které neinkorporují ^{3}H-thymidin, byly testovány pomocí MTT eseje (detekce metabolické aktivity). Na obr. 7 jsou znázorněny cytotoxické aktivity vybraných polymerních konjugátů na bázi HPMA s doxorubicinem u linií EL4 a CT26. Aktivita polymerních konjugátů STAR1 a MIC byla srovnávána s aktivitou polymerního konjugátu STAR-n, který obsahoval nedegradovatelný HPMA polymerní nosič s navázaným doxorubicinem, a s aktivitou volného doxorubicinu.

IC50, koncentrace léčiva, která indukuje právě poloviční inhibiční efekt, byla pro linii EL4, pro konjugát STAR-n (nedegradovatelný hvězdicovitý konjugát) a STAR1 stanovena přibližně jako desetkrát vyšší než pro volný doxorubicin. IC50 konjugátu MIC byla pětkrát vyšší než hodnota volného DOX (Obr. 7A). Pro linii CT26 byla hodnota IC50 konjugátu STAR-n, STAR1 a MIC stanovena pomocí inkorporace ^{3}H-thymidinu jako přibližně dva až pětkrát vyšší než IC50 volného doxorubicinu. (Obr. 7B).

Charakterizace těchto polymerních konjugátů včetně hodnot IC50 je již publikovaná. [118], [129]



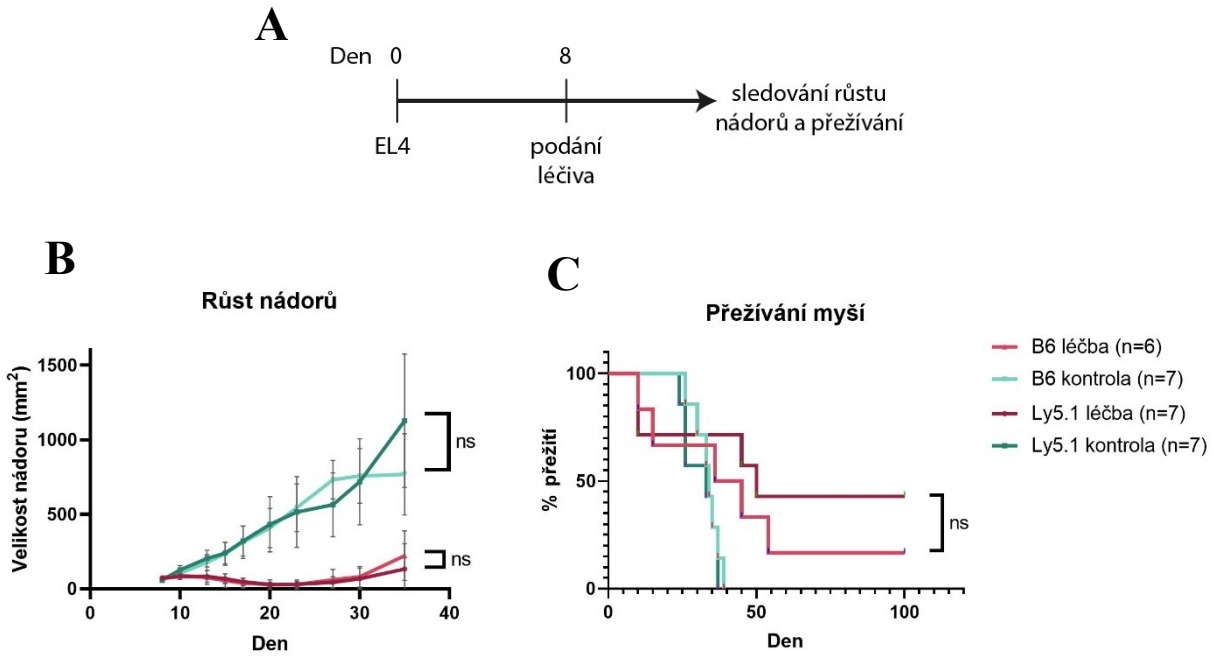
Obr. 7: Cytotoxická aktivita polymerních konjugátů v porovnání s volným doxorubicinem. Cytotoxická aktivita konjugátů STAR-n (nedegradovatelný hvězdicovitý konjugát), STAR1 (degradovatelný hvězdicovitý konjugát), MIC (micelární konjugát) a volného doxorubicinu detekovaná pomocí MTT eseje (detekce metabolické aktivity) u linie EL4 **(A)** a pomocí inkorporace ^{3}H-thymidinu (detekce cytostatické aktivity) u linie CT26 **(B)**. Hodnoty IC50 jsou vyjádřeny jako koncentrace DOX ekv. (ng/ml). (již publikovaná data[118], [129])

5.2 Růst nádorů a přežívání myší kmenů B6 a SJL s nádory EL4

SJL je kongenní kmen k B6. Hematopoetické buňky kmene B6 a z něj odvozená nádorová linie T buněčného lymfomu EL4 exprimují na svém povrchu molekulu CD45.2. Kongenní kmen SJL exprimuje molekulu CD45.1. Díky tomu je možné pomocí průtokové cytometrie rozlišit injikované nádorové buňky EL4 ($CD45.2^+$) a myší tumor infiltrující lymfocyty ($CD45.1^+$).

Myším B6 a SJL byly v den 0 injikovány nádorové buňky EL4 (s.c. $1x10^5$ ve 100 ul PBS). V den 8 jim bylo podáno léčivo (i.v., polymerní konjugát STAR2, 10 mg DOX ekv./kg) (Obr. 8A). Poté byly měřeny velikosti nádorů a sledováno přežívání myší. Růst nádorů byl měřen od dne 8 po inokulaci nádorových buněk EL4 a měření bylo ukončeno v den 35. Sledování přežívajících myší bylo ukončeno v den 100 po inokulaci nádorových buněk.

Pro možné využití myšího kmene SJL pro další experimenty (pro odlišení injikovaných nádorových buněk EL4 a myších lymfocytů) bylo tedy takto ověřeno, že – podle předpokladu – není rozdíl mezi kmeny SJL a B6 v odpovědi na léčbu. Proto byly sledovány rozdíly v růstu nádorů a v přežívání myší mezi kmenem B6 a SJL po podání léčby a mezi kontrolními skupinami bez léčby. Výsledky u těchto dvou kmenů se signifikantně nelišily, a to jak při srovnání léčených skupin, tak i mezi kontrolními skupinami (Obr. 8A, 8B). Rozdíl v růstu nádorů a u přežití mezi skupinou léčenou a bez léčby byl ovšem statisticky signifikantní u obou kmenů.



Obrázek 8: Porovnání růstu nádorů EL4 a přežívání myší kmenů SJL a B6. (A) Schéma experimentu. Myši kmene B6 a SJL byly v den 0 inokulovány s.c. nádorovými buňkami EL4 ($1x10^5$ ve 100 ul PBS) a v den 8 jim byla podána léčba (i.v., polymerní konjugát STAR2, 10 mg DOX ekv./kg) nebo byly ponechány bez léčby. **(B)** Graf růstu EL4 nádorů (průměr +/- SD) **(C)** Graf přežívání myší.

5.3 Subpopulace T lymfocytů SJL myší s EL4 nádory

Myši SJL odpovídají na léčbu polymerním konjugátem s doxorubicinem stejně jako B6 myši. Proto mohly být pro následující experimenty využity myši kmene SJL (exprimující CD45.1 na všech hematopoetických buňkách) inokulované buňkami T buněčného lymfomu EL4 (exprimující CD45.2).

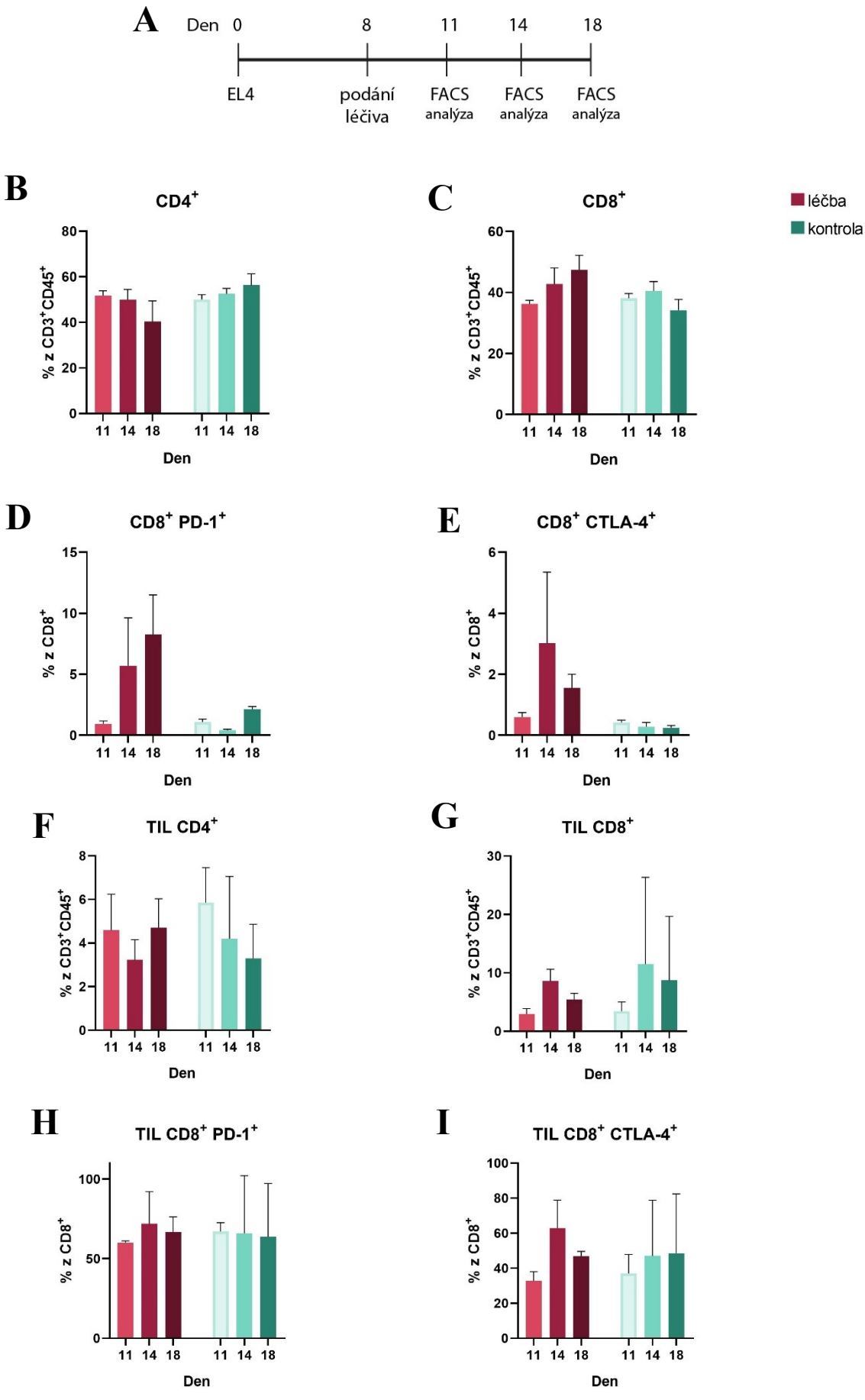
Buňky EL4 byly myším injikovány s.c. v den 0 ($1x10^5$ ve 100 ul PBS) a v den 8 jim byla podána léčba (i.v., polymerní konjugát STAR1, 10 mg DOX ekv./kg) nebo byly ponechány bez léčby. V den 11, 14 a 18 po inokulaci nádorových buněk byly detekovány populace $CD4^+$ a $CD8^+$ T lymfocytů u splenocytů a buněk z nádoru pomocí průtokové cytometrie (Obr. 9A).

Zastoupení $CD4^+$ T lymfocytů se ve slezinách myší v několika časových intervalech významně neměnilo (minimálně do dne 18 po inokulaci nádorových buněk). Rozdíly nebyly statisticky významné ani mezi léčenými a kontrolními skupinami (Obr. 9B, C). U populace $CD8^+$ T lymfocytů byl vidět mírný nárůst v den 18 u léčených myší oproti neléčeným kontrolám (Obr. 9C). Analýza exprese vybraných markerů u $CD8^+$ T lymfocytů už ukázala rozdíl v imunitní odpovědi léčených a kontrolních myší. PD-1, marker vyčerpaných T lymfocytů [84], a CTLA-4 byly od dne 14 po inokulaci nádorových buněk oproti neléčené skupině výrazně více zastoupené u T lymfocytů léčených myší. (Obr. 9D,E) Rozdíl ale nebyl kvůli malým skupinám a poměrně velkému rozptylu v rámci skupin signifikantní. Proto jsme se pro následující experimenty rozhodli sledovat další subpopulace $CD4^+$ a $CD8^+$ lymfocytů, kde bychom mohli vidět aktivaci imunitní odpovědi po podání léčiva.

Analyzovány byly také buňky z nádorů experimentálních myší. Pomocí markerů CD45.1 a CD3 byly při analýze dat z průtokového cytometru vybrány a dále sledovány tumor infiltrující lymfocyty (TIL, $CD45.1^+CD3^+$), (Obr. 9F-I). V zastoupení populací T buněk nebyly u TIL žádné signifikantní rozdíly, díky malým skupinám a velkému rozptylu v rámci skupin. Významný byl ale rozdíl mezi podílem $PD\text{-}1^+$ nebo $CTLA\text{-}4^+$ T lymfocytů ve slezinách a v nádorovém mikroprostředí. Zatímco ve slezinách bylo do 10 % CTLA-4 nebo PD-1 exprimujících $CD8^+$ T lymfocytů, v nádoru toto číslo často přesahovalo 50 % (Obr. 9D,E a 9H,I). Ve slezinách bylo ale jasně vyšší zastoupení $CTLA\text{-}4^+$ a $PD\text{-}1^+$ T buněk u léčených myší oproti kontrolám, u TIL nebyl zásadnější rozdíl mezi léčenými a neléčenými skupinami.

(Reprezentativní dot-ploty viz příloha 1.)

Obrázek 9: Zastoupení populací T lymfocytů ve slezinách a v nádorovém mikroprostředí SJL myší s EL4 nádory. (A) Schéma experimentu. SJL myši byly v den 0 inokulovány nádorovými buňkami EL4 (s.c. $1x10^5$ ve 100 ul PBS) a v den 8 jim byla podána léčba (i.v., polymerní konjugát STAR1, 10 mg DOX ekv./kg) (n=3) nebo byly ponechány bez léčby (n=2). **(B-E)** Zastoupení populací T lymfocytů ve slezinách SJL myší (data z průtokové cytometrie). **(F-I)** Zastoupení populací TIL (data z průtokové cytometrie). Hodnoty jsou znázorněny jako průměrné zastoupení dané populace +/- SD.


A
Den 0
8
11
14
18
EL4
podání léčiva
FACS analýza
FACS analýza
FACS analýza
B
CD4+
% z CD3+CD45+
C
CD8+
% z CD3+CD45+
léčba
kontrola
D
CD8+ PD-1+
% z CD8+
E
CD8+ CTLA-4+
% z CD8+
F
TIL CD4+
% z CD3+CD45+
G
TIL CD8+
% z CD3+CD45+
H
TIL CD8+ PD-1+
% z CD8+
I
TIL CD8+ CTLA-4+
% z CD8+
11 14 18 11 14 18
Den

5.4 Efektorové subpopulace T lymfocytů SJL myší s EL4 nádory

Poté, co jsme viděli změny v populacích PD-1$^+$ a CTLA-4$^+$ T lymfocytů, jsme se zaměřili na další markery, které by pomohly lépe posoudit míru aktivace imunitního sytému po léčbě polymerními cytostatiky. Sledovali jsme populace Treg (CD4$^+$CD25$^+$FoxP3$^+$), CTLA-4$^+$ Treg (intezivně proliferující Treg mají zvýšenou expresi CTLA-4 [130]), aktivované T lymfocyty (CD8$^+$CD25$^+$), centrální paměťové T lymfocyty (CD8$^+$CD44$^+$CD62L$^+$) a efektorové paměťové T lymfocyty (CD8$^+$CD44$^+$CD62L$^-$). Gatovací strategie viz obr. 6.

Schéma léčby a intervaly analýz byly stejné jako v předchozím experimentu (Obr. 10A).

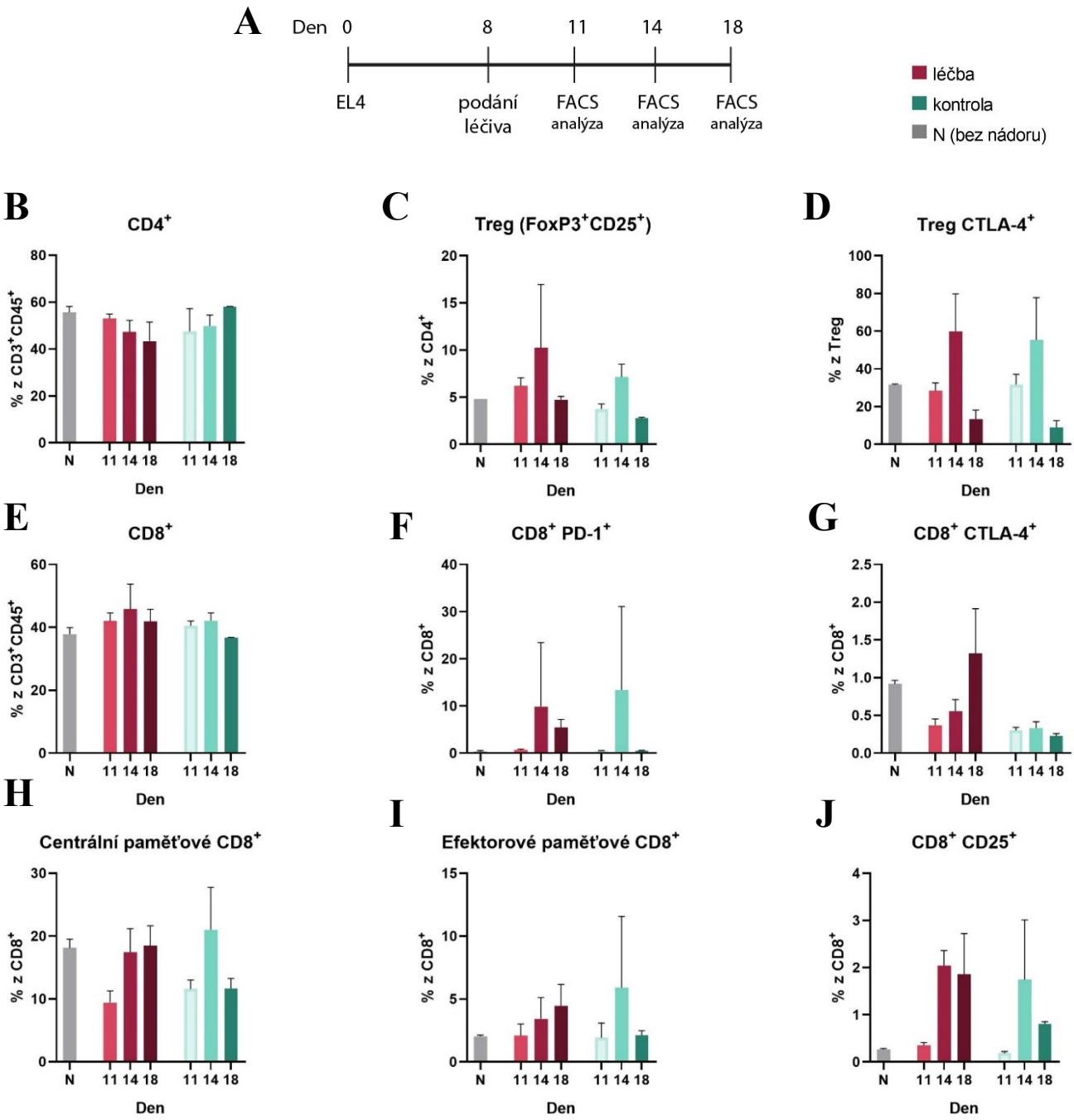
Na grafech v obrázku 9B-D je znázorněno zastoupení populací CD4$^+$ T lymfocytů a Treg ve slezinách SJL myší. Stejně jako v předchozím experimentu se během sledovaného intervalu příliš neměnilo celkové zastoupení CD4$^+$ T lymfocytů ve slezinách SJL myší (Obr. 10B). V průběhu času se zvyšovalo a opět klesalo zastoupení regulačních T lymfocytů (Treg), které jsou definované jako CD4$^+$FoxP3$^+$CD25$^+$, stejně jako zastoupení proliferujících Treg, které exprimují CTLA-4 (Obr. 10C,D)

Zastoupení CD8$^+$ T buněk, které exprimují CTLA-4, bylo ve slezinách vyšší u léčené skupiny myší oproti neléčené skupině (Obr. 10G). Rozdíl ale nebyl signifikantní. Aktivované (CD25$^+$) T lymfocyty byly u léčené skupiny v nejvyšším zastoupení v den 14 a 18. Oproti tomu u neléčených kontrol tento podíl v den 18 opět klesal (Obr. 10J). Na obr. 10H a I jsou grafy zastoupení centrálních paměťových CD8$^+$ T lymfocytů (CD44$^+$CD62L$^+$) a efektorových paměťových CD8$^+$ T lymfocytů (CD44$^+$CD62L$^-$). Jejich zastoupení se v průběhu času také měnilo, pokles a nárůst zde téměř kopíroval trend u aktivovaných CD8$^+$CD25$^+$ T lymfocytů (u léčených skupin nárůst zastoupení populací během časového intervalu a nárůst a pokles u neléčených kontrol).

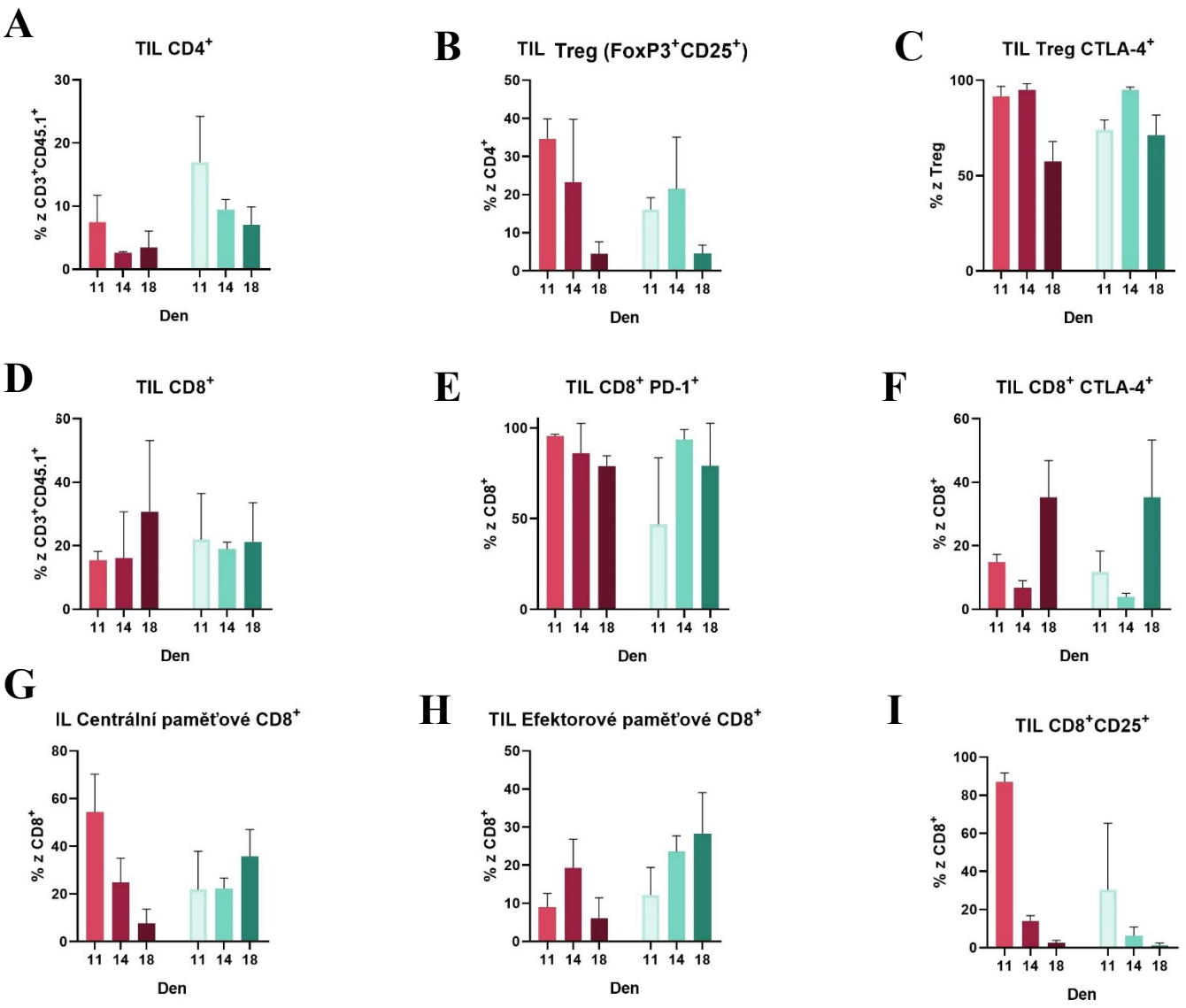
(Reprezentativní dot-ploty viz příloha 2.)

V nádorovém mikroprostředí jsme sledovali populaci TIL (CD45.1$^+$CD3$^+$). Zastoupení cytotoxických CD8$^+$ T lymfocytů bylo vyšší (kolem 20 %) než pomocných CD4$^+$ T lymfocytů (kolem 10 %) (Obr. 11A,D). Oproti tomu ve slezinách byl víceméně zachován normální poměr CD4$^+$ a CD8$^+$ T lymfocytů (kolem 50-60 % CD4$^+$ a kolem 40 % CD8$^+$ buněk; obr. 10B,E). Ve skupině myší, které dostaly léčivo, zastoupení CD8$^+$ T lymfocytů u TIL mezi dny 11 a 18 po inokulaci nádorových buněk mírně stoupalo (Obr 11D). CD8$^+$ TIL měly z většiny fenotyp vyčerpaných lymfocytů, PD-1$^+$ (Obr. 11E). Molekula CTLA-4 byla u TIL exprimovaná výrazně více než u T buněk ve slezinách (Obr. 11F, 10G). Stejně tak efektorových paměťových (CD44$^+$CD62L$^-$), centrálních paměťových (CD44$^+$CD62L$^+$) a aktivovaných (CD25$^+$) CD8$^+$ T lymfocytů byl v nádorovém mikroprostředí větší podíl než ve slezinách. Jejich zastoupení v nádoru ani se slezinách se ale mezi léčenou a kontrolní neléčenou skupinou signifikantně nelišilo. (Obr. 10H-J a 11G-I).

(Reprezentativní dot-ploty viz příloha 2.)



Obrázek 10: Efektorové subpopulace T lymfocytů ve slezinách SJL myší s EL4 nádory. (A) Schéma experimentu. SJL myši byly v den 0 inokulovány nádorovými buňkami EL4 (s.c. $1x10^5$ ve 100 ul PBS) a v den 8 jim byla podána léčba (i.v., polymerní konjugát STAR1, 10 mg DOX ekv./kg) (n=2-4) nebo byly ponechány bez léčby (n=2). **(B-J)** Zastoupení populací T lymfocytů ve slezinách SJL myší (data z průtokové cytometrie). Hodnoty jsou znázorněny jako průměrné zastoupení dané populace +/- SD.



Obrázek 11: Efektorové subpopulace T lymfocytů v nádorovém mikroprostředí SJL myší s EL4 nádory. (A-I) Zastoupení populací TIL u SJL myší (data z průtokové cytometrie). Schéma experimentu viz obr.10A. Hodnoty jsou znázorněny jako průměrné zastoupení dané populace +/- SD.

5.5 Efektorové subpopulace T lymfocytů BALB/c myší s CT26 nádory I.

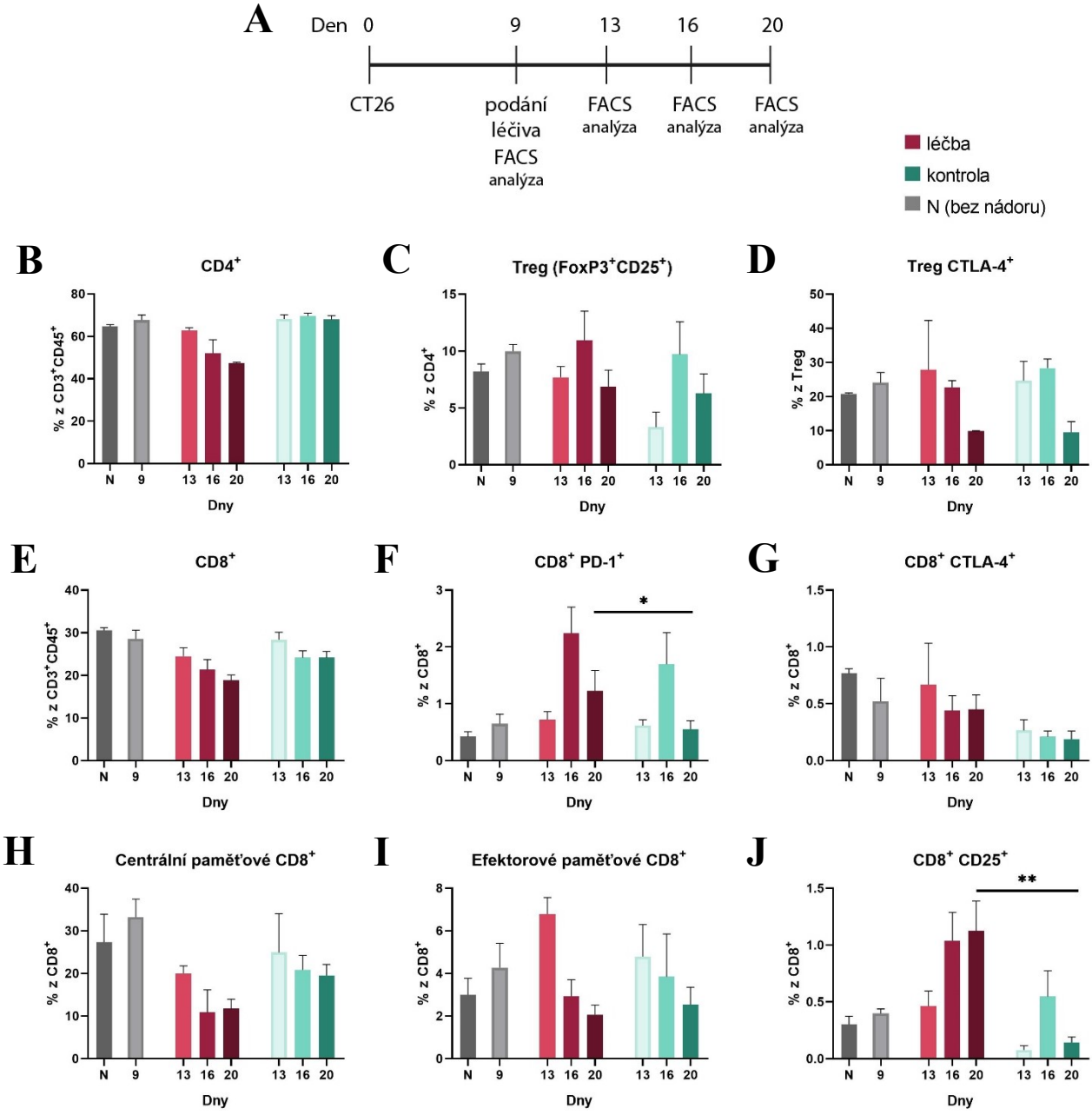
Stejně jako u modelu SJL byly prováděny experimenty s myším kmenem BALB/c a z něj odvozenou nádorovou linií CT26 (kolorektální karcinom). CT26 jsou podobně jako EL4 imunogenní nádorové buňky, pomalu metastazují ze s.c. ložiska. Buňky CT26 ale přirozeně exprimují zvýšenou hladinu P-gp, proto jsou málo citlivé na chemoterapii. [131]

BALB/c myším byly s.c. injikovány nádorové buňky CT26 v den 0 (s.c. $2x10^5$ ve 100 ul PBS) a v den 9 jim byla podána léčba (i.v., polymerní konjugát MIC, 17,5 mg DOX ekv./kg) nebo byly myši ponechány bez léčby. V den 13, 16 a 20 byla provedena analýza splenocytů a buněk z nádoru pomocí průtokové cytometrie (Obr. 12A).

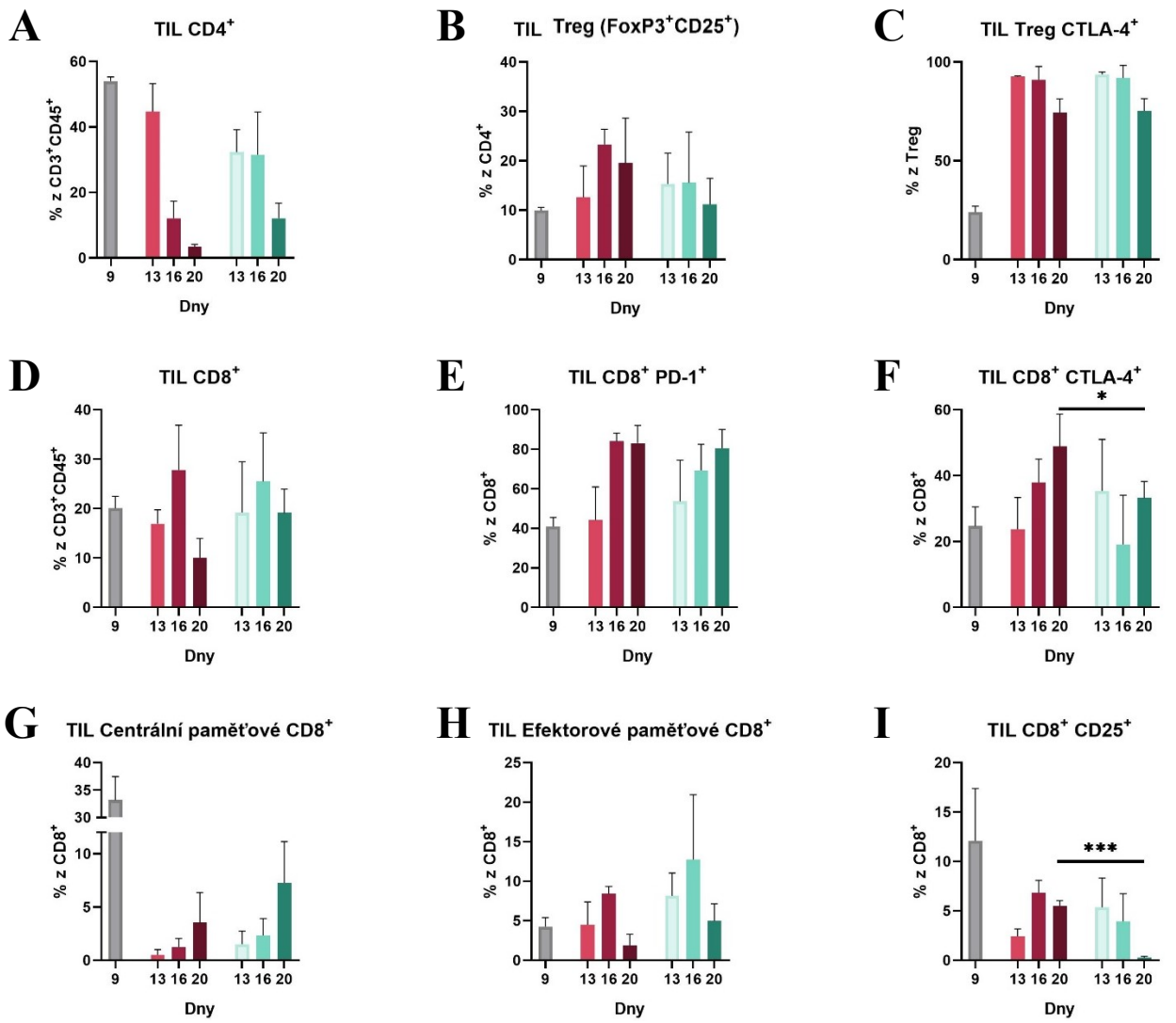
Ve slezinách BALB/c myší jsme sledovali populace T lymfocytů, a to jak celkové zastoupení $CD8^+$ a $CD4^+$ T lymfocytů, tak i další efektorové populace. Stejně jako v experimentech s modelem SJL se zastoupení $CD8^+$ a $CD4^+$ lymfocytů v čase signifikantně neměnilo (Obr. 12B,E). Změny v průběhu sledovaných časových intervalů byly patrné až u efektorových subpopulací lymfocytů. V průběhu času u léčených i neléčených skupin kolísalo zastoupení Treg a snižovalo se zastoupení proliferujících Treg, které exprimují CTLA-4 (Obr. 12C,D). V den 16 stoupl ve slezinách BALB/c myší u léčené i neléčené skupiny podíl $PD\text{-}1^+$ $CD8^+$ T lymfocytů. (Obr. 12F). V posledním sledovaném časovém intervalu, v den 20 po inokulaci nádorových buněk, bylo vyčerpaných T lymfocytů ($PD\text{-}1^+$) ve slezinách léčených myší signifikantně více než u neléčených kontrol (Obr. 12F). Stejně tak $CTLA\text{-}4^+$ T lymfocyty měly mírně vyšší zastoupení u léčené skupiny než u kontrol (Obr. 12G). Centrální ($CD44^+CD62L^+$) a efektorové ($CD44^+CD62L^-$) paměťové $CD8^+$ T lymfocyty byly u léčených skupin zastoupeny méně nebo srovnatelně s neléčenými kontrolami (Obr. 12H,I). Rozdíly zde nebyly statisticky signifikantní. Oproti tomu u aktivovaných, $CD25^+$ T lymfocytů byl ode dne 16 vidět u léčené skupiny nárůst. V den 20 byl pak rozdíl exprese CD25 ve slezinách mezi léčenou a neléčenou skupinou signifikantní. (Obr. 12J).

V nádorovém mikroprostředí klesl mezi dnem 13 a 20 podíl $CD4^+$ T lymfocytů. Podíl $CD8^+$ T lymfocytů v tomto intervalu stoupl a opět klesl (Obr. 13A,D). Zastoupení Treg se během času signifikantně neměnilo (kolem 20 %) a téměř všechny Treg v nádoru exprimovaly CTLA-4 (kolem 90 %). Zastoupení $CTLA\text{-}4^+$ Treg mírně kleslo až v den 20; stále bylo ale přibližně 7krát vyšší (70 %) než ve slezinách (10 %) (Obr. 13C a 12D). Zastoupení vyčerpaných $CD8^+$ T lymfocytů ($PD\text{-}1^+$) v nádoru s postupem času rostlo a bylo opět výrazně vyšší než ve slezinách (v nádoru kolem 70-80 %, ve slezinách do 3 %) (Obr.13E, 12F). Molekula CTLA-4 byla u $CD8^+$ TIL léčených myší s postupem času exprimována ve vyšší míře (kolem 50 %) než u neléčených (kolem 30 %; obr. 13F). V den 20 byl u TIL oproti neléčené kontrole podíl $CTLA\text{-}4^+$ T lymfocytů signifikantně vyšší u léčené skupiny. Podobně jako u PD-1 i zde byl výrazný rozdíl oproti slezinám (kolem 40 %, ve slezinách do 1 %). U centrálních ($CD44^+CD62L^+$) a efektorových ($CD44^+CD62L^-$) paměťových $CD8^+$ TIL rozdíly mezi léčenou a kontrolní neléčenou skupinou nebyly (Obr. 13G,H). Exprese CD25 u TIL v den 20 byla vyšší po léčbě (5 %) oproti neléčené kontrole (pod 0,5 %) (Obr. 13I). (Reprezentativní dot-ploty viz příloha 3.)

Tyto výsledky naznačují, že imunitní systém je nejen v prostředí nádoru, ale i mimo něj ve slezinách aktivovanější po léčbě polymerním konjugátem s doxorubicinem. Proto, abychom viděli jasnější rozdíly v aktivaci imunitního systému, jsme se na základě předchozích výsledků rozhodli změnit schéma a uspořádání následujících experimentů.



Obrázek 12: Efektorové subpopulace T lymfocytů ve slezinách BALB/c myší s CT26 nádory. (A) Schéma experimentu. BALB/c myši byly v den 0 inokulovány nádorovými buňkami CT26 (s.c. $2x10^5$ ve 100 ul PBS) a v den 9 jim byla podána léčba (i.v., polymerní konjugát MIC, 17,5 mg DOX ekv./kg) (n=3-4) nebo byly ponechány bez léčby (n=4). **(B-J)** Zastoupení populací T lymfocytů ve slezinách BALB/c myší (data z průtokové cytometrie). Hodnoty jsou znázorněny jako průměrné zastoupení dané populace +/- SD.



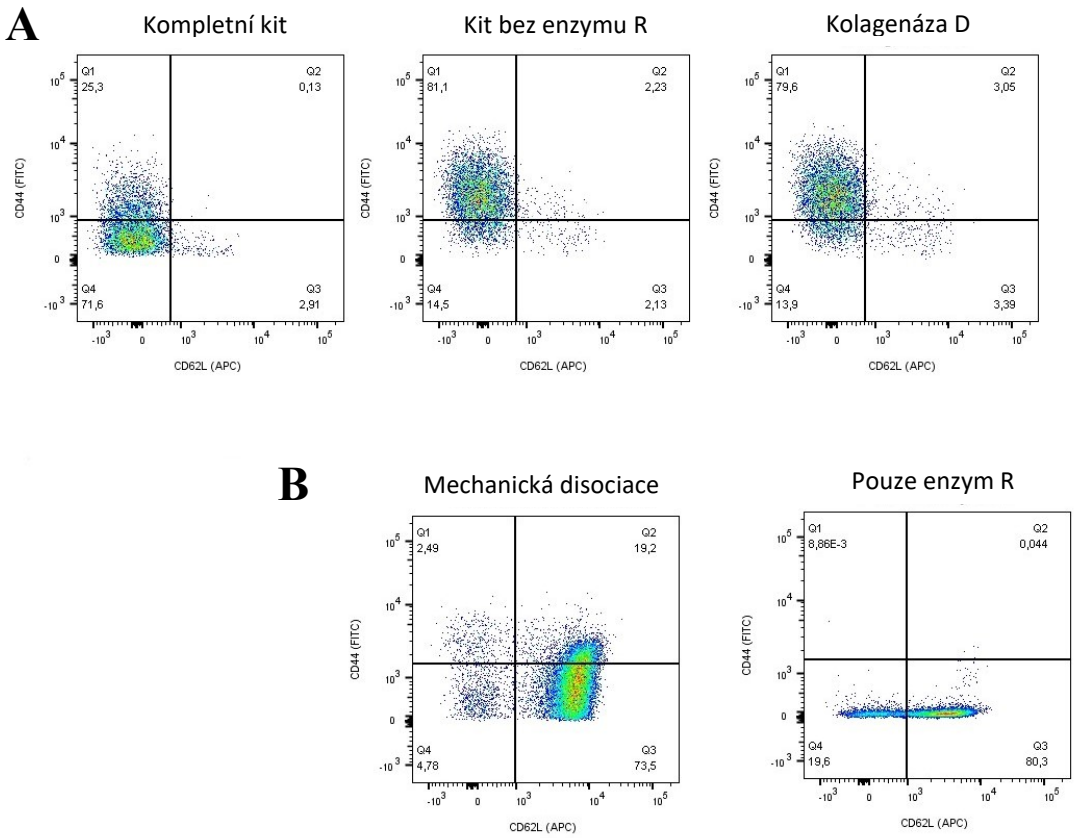
Obrázek 13: Efektorové subpopulace T lymfocytů v nádorech BALB/c myší s CT26 nádory. (A-I) Zastoupení populací TIL u BALB/c myší (data z průtokové cytometrie). Schéma experimentu viz obr. 12A. Hodnoty jsou znázorněny jako průměrné zastoupení dané populace +/- SD.

5.6 Změny v uspořádání experimentů na základě předchozích výsledků

Po vyhodnocení předchozích výsledků jsme se rozhodli změnit uspořádání následujících experimentů. Na základě dat od kolegů jsme zvolili jiné dávkování léčiva. Namísto jedné dávky jsme použili tři menší dávky každý třetí den, které mají u modelu CT26 lepší terapeutický efekt než jedna velká dávka. Pro srovnání efektu polymerního konjugátu s doxorubicinem a efektu volného léčiva jsme přidali další skupinu myší léčenou volným doxorubicinem. Stejně jako u polymerního konjugátu bylo zvoleno schéma třech menších dávek. Dále jsme zvětšili velikost skupin ze 3 myší na 6.

V předchozích pokusech jsme pozorovali, že při analýze buněk v prvním časovém intervalu (4 dny po léčbě) není vidět mnoho změn v populacích imunitních buněk oproti situaci v den podání léčiva. Proto jsme pro analýzu průtokovou cytometrií nyní zvolili pouze jeden časový interval, 6 dní po poslední dávce léčiva. Dále jsme optimalizovai panel protilátek pro analýzu Treg, místo anti-CD25 (FITC) jsme použili anti-CD25 (eF450) a místo anti-CD3 (eF450) jsme využili anti-CD3 (FITC), aby byly při analýze průtokovou cytometrií lépe oddělené populace buněk.

Poslední, významnou změnou byla úprava způsobu přípravy suspenze buněk z nádorů. Obecně je obtížné připravit jednobuněčnou suspenzi z nádorů vhodnou pro FACS analýzu. Testována byla disociace nádorů pomocí kolagenázy D. Ta ale nepřináší uspokojivé výtěžky buněk. Jako optimální byl zvolen komerční kit (Tumor Dissociation Kit, mouse, Miltenyi Biotec), který využívá směs tří neurčených enzymů (enzym A, D a R). S použitím kitu je výtěžek buněk z nádoru zhruba dvojnásobný oproti použití kolagenázy D (1 mg/ml). V předchozích pokusech se ale v nádorovém mikroprostředí často nacházela populace $CD44^{-}CD62L^{-}$ T lymfocytů, která by podle literárních údajů měla být podstatně méně četná. [132] Proto jsme ověřili předpoklad, že některý z enzymů tumor disociačního kitu, interferuje s detekcí molekuly CD44 na povrchu buněk. Byly proto provedeny experimenty s různými kombinacemi enzymů pro disociaci nádorů a tyto enzymy byly také přidány k suspenzi splenocytů, abychom zjistili, který enzym „ztrátu“ CD44 způsobuje a bude vhodné ho pro další analýzy vynechat. Enzym označovaný výrobcem jako R byl identifikován jako ten, který způsoboval „ztrátu“ molekuly CD44 z povrchu buněk. (Obr.14) Suspenzi buněk připravenou inkubací s tumor disociačním kitem bez enzymu R jsme dále porovnávali se suspenzí připravenou pomocí kolagenázy D (1 mg/ml). V případě kolagenázy D se také daří zachovat molekulu CD44 na povrchu buněk, výtěžek buněk je ale v porovnání s komerčním kitem jen poloviční. Pro přípravu buněčných suspenzí v dalších experimentech jsme proto využili Tumor disociační kit, ale vynechali enzym onačovaný výrobcem jako R.



Obrázek 14: Vliv použitých enzymů při přípravě buněčné suspenze na sledované markery. (A) Byl vytvořen mix 3 CT26 nádorů BALB/c myší a rozdělen na 3 části. Suspenze z první části (vlevo) byla vytvořena podle pokynů výrobce kitu (Tumor Dissociation Kit, mouse, Miltenyi Biotec), se směsí enzymů D + R + A. Na druhou suspenzi (uprostřed) byl použit stejný kit bez enzymu označeného výrobcem jako R (směs enzymů D + A). Poslední suspenze (vpravo) byla připravena pomocí kolagenázy D (1 mg/ml). **(B)** Suspenze splenocytů byla vytvořena pouze mechanickou disociací (vlevo) nebo byly buňky inkubovány pouze s enzymem R z Tumor disociačního kitu (vpravo).

5.7 Efektorové subpopulace T lymfocytů BALB/c myší s CT26 nádory II.

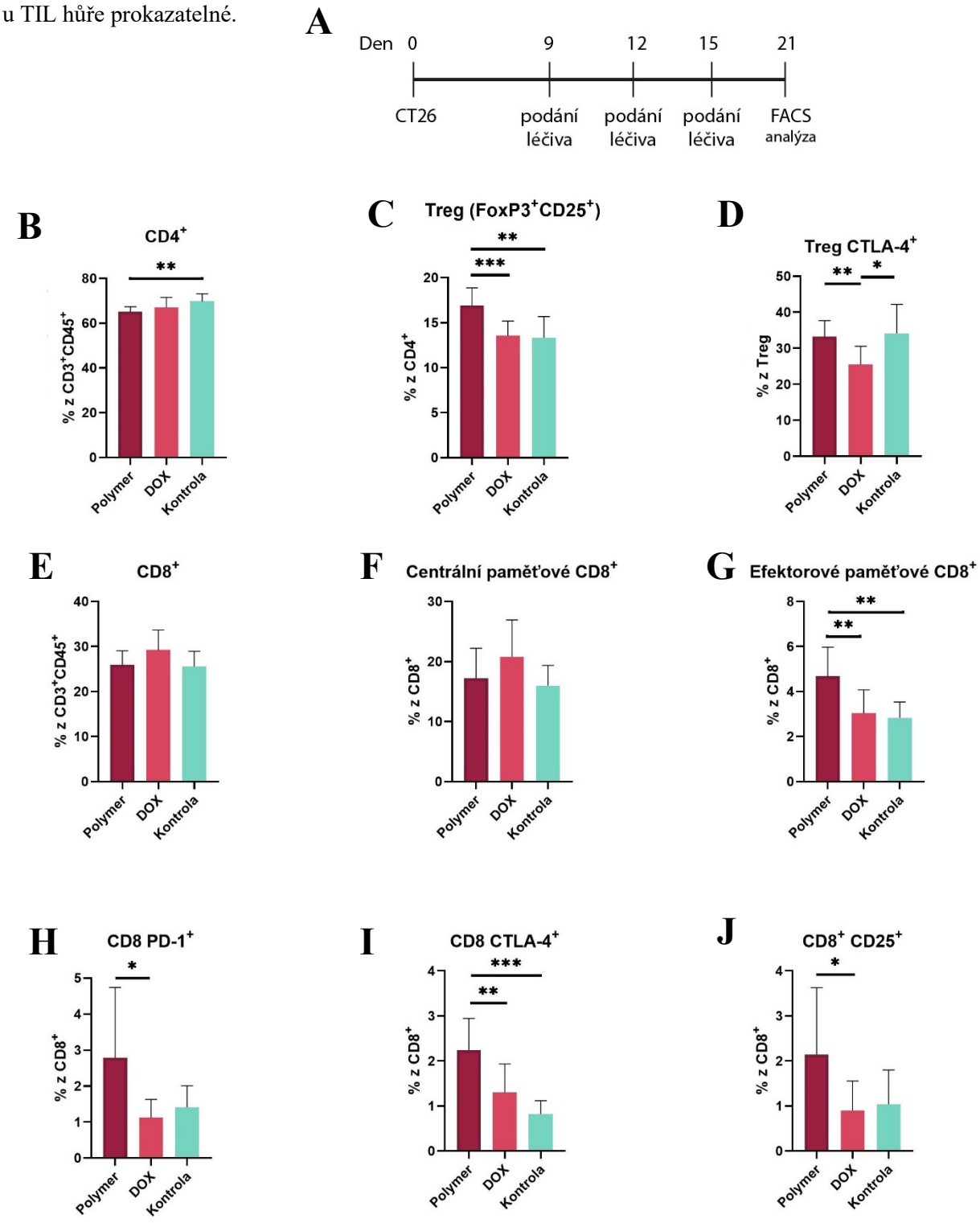
Po změnách popsaných výše byly provedeny dva nezávislé experimenty s totožným uspořádáním. Data z obou experimentů ukazují grafy v obr. 14 a 15. Myši kmene BALB/c byly inokulovány nádorovými buňkami CT26 (s.c. $2x10^5$ ve 100 ul PBS) a v den 9 jim byla podána léčba (i.v., polymerní konjugát MIC, 3x8 mg DOX ekv./kg nebo volný doxorubicin, 3x5 mg/kg) nebo byly myši ponechány bez léčby. V den 21, tedy 6 dní po podání poslední dávky léčiva, byla provedena analýza buněčných suspenzí pomocí průtokové cytometrie (Obr. 15A).

Terapie polymerním konjugátem snižovala zastoupení $CD4^+$ T lymfocytů ve slezinách léčených myší oproti neléčené kontrole. Hodnoty se ale u všech skupin pohybovaly mezi 60 a 70 % (Obr. 15B). Zároveň se ve slezinách myší léčených konjugátem signifikantně zvyšovalo zastoupení Treg lymfocytů ($CD4^+FoxP3^+CD25^+$), a to jak oproti léčbě volným doxorubicinem (DOX), tak oproti neléčené kontrole (Obr. 15C). Zastoupení proliferujících Treg ($CTLA\text{-}4^+$) bylo nejnižší po léčbě DOX (Obr. 15D). Zastoupení $CD8^+$ lymfocytů se mezi třemi skupinami signifikantně nelišilo (kolem 30 %) (Obr. 15E). Statisticky významně byl ale zvýšený podíl efektorových paměťových ($CD44^+CD62L^-$) $CD8^+$ T lymfocytů u léčené skupiny (5 %), a to jako oproti DOX, tak oproti neléčené kontrole (kolem 3 %) (Obr. 15G). Tento trend svědčící o zvýšené aktivaci cytotoxických T lymfocytů po léčbě polymerním konjugátem byl i u dalších sledovaných markerů. Větší část $CD8^+$ T lymfocytů byla ve slezinách po léčbě konjugátem oproti léčbě DOX nebo neléčené kontrole aktivovaná ($CD25^+$) a měla fenotyp vyčerpaných ($PD\text{-}1^+$) nebo chronicky aktivovaných T lymfocytů ($CTLA\text{-}4^+$) (Obr. 15H-I).

U TIL bylo nižší zastoupení $CD4^+$ T buněk u obou léčených skupin (kolem 20 %) oproti neléčené kontrole (kolem 30 %) (Obr. 16A). Podíl Treg se mezi různě léčenými skupinami signifikantně nelišil, ale $CTLA\text{-}4^+$ Treg bylo oproti kontrole menší zastoupení u skupiny léčené konjugátem. Všechny skupiny myší měly ale u TIL nad 80 % $CTLA\text{-}4^+$ Treg lymfocytů; ve slezinách to bylo jen kolem 30 % (Obr. 16B,C a 15D). Podíl $CD8^+$ a centrálních paměťových ($CD44^+CD62L^+$) $CD8^+$ T lymfocytů byl stejný u skupiny léčené konjugátem a neléčené kontroly a mírně vyšší u skupiny léčené DOX (Obr. 16D,E). U TIL se signifikantně neliší ani zastoupení efektorových paměťových ($CD44^+CD62L^-$) $CD8^+$ T lymfocytů (Obr. 16F). Téměř všechny $CD8^+$ T lymfocyty měly v nádorech fenotyp vyčerpaných lymfocytů ($PD\text{-}1^+$ kolem 90 %), tím se výrazně lišily od $CD8^+$ T lymfocytů ve slezinách ($PD\text{-}1^+$ do 5 %) (Obr. 16G a 15H). Stejně tak $CTLA\text{-}4^+$ T lymfocytů zde bylo mnohonásobně více (kolem 40 %) než ve slezinách (do 3 %) (Obr. 16H a 15I). Nejvýznamnější rozdíl v nádorovém mikroprostředí ale byl u aktivovaných $CD8^+CD25^+$ T lymfocytů. Jak po léčbě konjugátem, tak volným doxorubicinem byl jejich podíl vyšší (kolem 50 %) než u neléčených kontrol (10 %) (Obr. 16I).
(Reprezentativní dot-ploty viz příloha 4.)

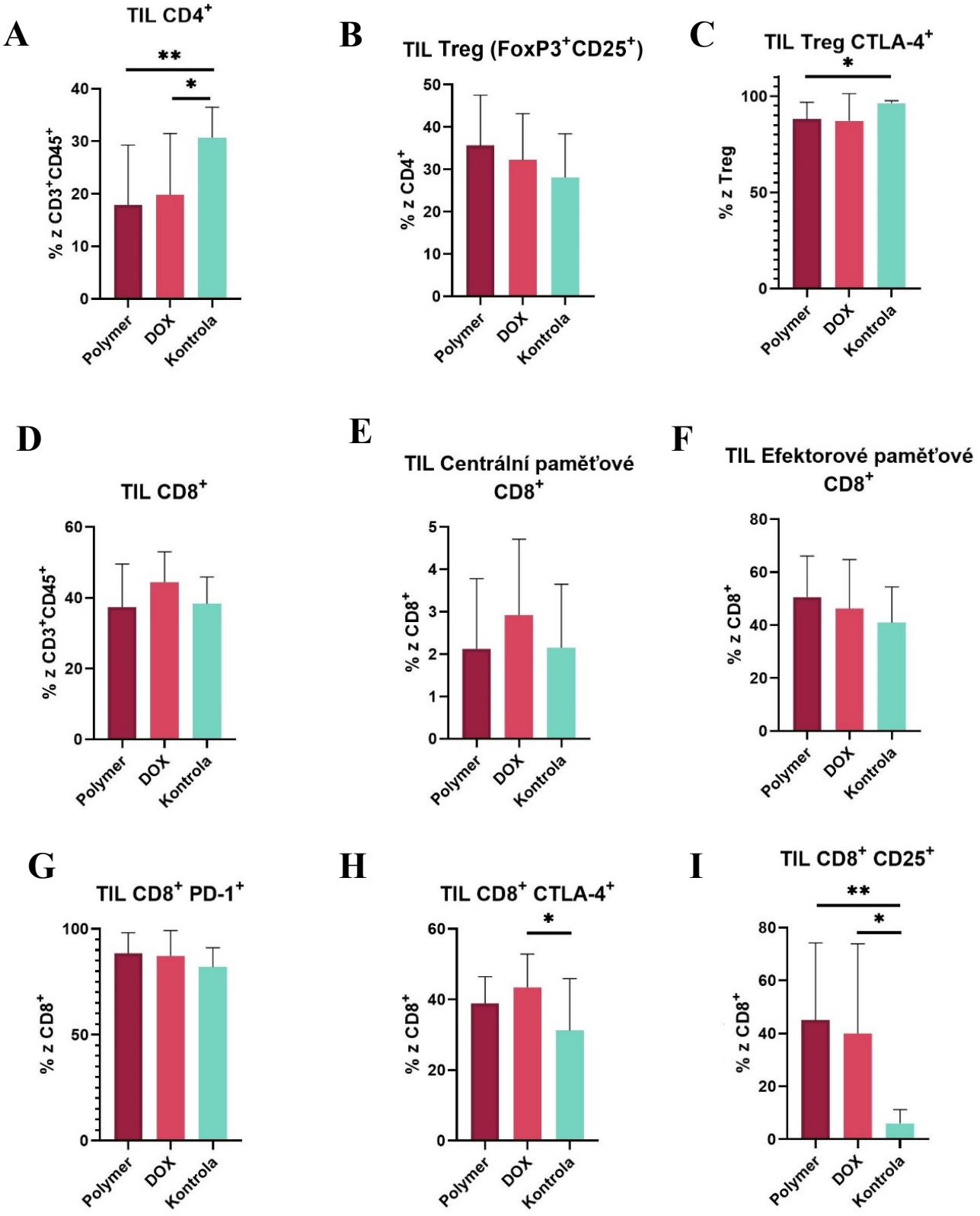
Z těchto dat vyplývá, že léčba polymerním konjugátem, spíše než volným doxorubicinem, vede k vyšší aktivaci imunitní odpovědi při léčbě nádorů CT26 u BALB/c myší. To můžeme sledovat nejen přímo v prostředí nádoru, ale i systémově ve slezinách. Ve slezinách jsou rozdíly v

zastoupení aktivovaných populací T lymfocytů často výraznější, nebo vidíme i menší rozdíly, které jsou u TIL hůře prokazatelné.



Obrázek 15: Subpopulace T lymfocytů ve slezinách BALB/c myší s CT26 nádory. (A) Schéma experimentu. BALB/c myši byly v den 0 inokulovány nádorovými buňkami CT26 ($2x10^5$ ve 100 ul PBS) a v den 9, 12 a 15 jim byla podána léčba (i.v., polymerní konjugát MIC, 3x8 mg DOX ekv./kg nebo volný doxorubicin, 3x5 mg/kg) (n=11) nebo byly ponechány bez léčby (n=8). **(B-J)** Zastoupení populací T lymfocytů ve slezinách BALB/c myší (data z průtokové cytometrie). Hodnoty jsou

znázorněny jako průměrné zastoupení dané populace +/- SD. Data jsou ze dvou nezávislých experimentů.



Obrázek 16: Subpopulace T lymfocytů v nádorech BALB/c myší s CT26 nádory. (A-I) Zastoupení populací TIL u BALB/c myší (data z průtokové cytometrie). Schéma experimentu viz obr. 15A.

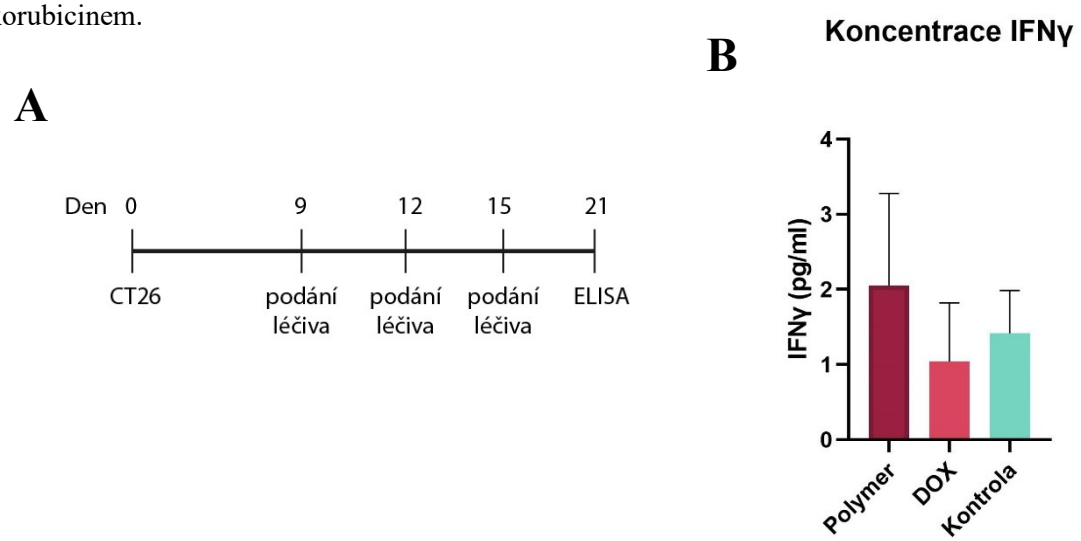
Hodnoty jsou znázorněny jako průměrné zastoupení dané populace +/- SD. Data jsou ze dvou nezávislých experimentů.

5.8 Stanovení hladiny IFNγ v plazmě myší BALB/c s CT26 nádory pomocí metody ELISA

Analýza buněk ze slezin nebo nádorů experimentálních myší BALB/c nesoucích CT26 nádor ukázala, že léčba polymerním konjugátem s doxorubicinem umožňuje aktivaci imunitního systému ve vyšší míře než léčba volným doxorubicinem. Proto jsme se snažili korelovat tento závěr také s detekcí markerů, které jsou spojeny s efektorovou funkcí T buněk, jako je IFNγ. Nejprve byla provedena intracelulární detekce IFNγ pomocí průtokové cytometrie. Zastoupení populace $IFN\gamma^+$ T lymfocytů (u BALB/c myší nesoucích nádor CT26) bylo ale velmi malé (maximálně kolem 1 %). Výsledky jsme tedy hodnotili jako nevyhovující. (Detekce intracelulárního IFNγ průtokovou cytometrií byla předem ověřena a byla funkční.) Proto jsme se pokusili detekovat IFNγ v myší plazmě pomocí ELISA.

Pro detekci IFNγ v plazmě byly použity myši z experimentu popsaném v kapitole 5.7. Uspořádání experimentu tak bylo stejné. (Obr. 17A). Myši byly léčeny třemi dávkami léčiva a v den 21 po inokulaci nádorových buněk bylo stanoveno množství IFNγ v plazmě myší pomocí ELISA.

Na obr. 17B je vidět trend, kdy terapie BALB/c myší polymerním konjugátem mírně zvyšovala množství IFNγ v plazmě. Nebyl zde ale signifikantní rozdíl, především kvůli velkému rozptylu hodnot v rámci skupin. Tento trend je v souladu se závěry z FACS analýz, že terapie nádorů CT26 polymerním konjugátem s doxorubicinem vede k vyšší aktivaci protinádorové imunitní odpovědi než léčba volným doxorubicinem.



Obr. 17: Koncentrace IFNγ stanovená pomocí ELISA v plazmě BALB/c myší nesoucích CT26 nádor. **(A)** Schéma experimentu. BALB/c myši byly v den 0 inokulovány nádorovými buňkami CT26 ($2x10^5$ ve 100 ul PBS) a v den 9, 12 a 15 jim byla podána léčba (i.v., polymerní konjugát MIC, 3x8 mg DOX ekv./kg nebo volný doxorubicin, 3x5 mg/kg) (n=5) nebo byly ponechány bez léčby (n=4). **(B)** Koncentrace IFNγ v plazmě myší stanovená pomocí ELISA. Hodnoty jsou znázorněny jako průměrné zastoupení dané populace +/- SD.

6 DISKUSE

Chemoterapie je dodnes jednou z nejčastěji využívaných protinádorových terapií, a to i přes vývoj nových možností léčby, jako je imunoterapie. Chemoterapie se zakládá na podání léčiv, která ve většině inhibují proliferaci rychle se dělících buněk. Má proto mnoho vedlejších účinků, jelikož působí také na ty nenádorové buňky, které se rychle dělí a jsou tak vůči chemoterapii citlivé. Vedle systémové toxicity je nevýhodou chemoterapeutik také jejich krátká doba cirkulace v krevním oběhu a biologický poločas, úzké terapeutické okno, neselektivní aktivita vůči nádoru, nebo často silně hydrofobní povaha léčiva.[102]

Zlepšení farmakologických vlastností chemoterapeutik je možné dosáhnout např. jejich vazbou na polymerní nosič. Příkladem takového nosiče je polymer založený na HPMA.[115] Nejvíce se dnes studují HPMA polymery v souvislosti s nízkomolekulárními protinádorovými léčivy.[124] Po navázání léčiva na HPMA polymer se zvýší jeho rozpustnost ve vodě, sníží se toxicita, prodlouží se doba cirkulace v krvi a zvýší se jeho maximální tolerovaná dávka. Podle typu vazby léčiva na polymer se léčivo může specificky uvolňovat. Na polymer se léčivo váže přes spacer, který se může štěpit v závislosti na pH nebo enzymaticky.[133] Vedle vazby léčiva se na polymer mohou navázat také molekuly, které zajišťují specifické cílení konjugátu, jako jsou vazebné části protilátek.[104] Vliv na výsledné vlastnosti polymerního konjugátu má také jeho architektura a velikost. Polymerní konjugáty se pasivně akumulují v nádorovém mikroprostředí využitím tzv. EPR efektu.[107] Konjugát se pak pinocytózou a endocytózou dostane do nádorové buňky, kde se může uvolnit léčivo, které má za cíl zabít nádorovou buňku. Z pH senzitivní hydrazonové vazby se léčivo může do jisté míry uvolňovat i ve tkáni pevných nádorů, kde bývá snížené pH v porovnání s normálními tkáněmi.

Je známo, že imunitní systém hraje důležitou roli při terapii nádorů polymerními konjugáty s cytostatiky, jako je konjugát HPMA s doxorubicinem (HPMA-DOX). K úplnému vyléčení experimentálních myší pomocí HPMA-DOX je nezbytná aktivita cytotoxických T lymfocytů. [124] Ty jsou také zodpovědné za vznik dlouhodobé rezistence myši vůči konkrétnímu nádoru poté, co byla vyléčena pomocí HPMA-DOX.[123], [124], [133] Oproti tomu terapie volným doxorubicinem vývoj rezistence proti nádoru nevyvolává. Volným doxorubicinem není možné myš kompletně vyléčit nebo je to možné jen např. u EL4 lymfomu po podání vysoké dávky léčiva. Ustavení rezistence pak pravděpodobně brání vysoká vedlejší toxicita dané léčby.

Experimenty v této diplomové práci proto měly vést k zodpovězení otázky, jakým způsobem se liší množství a funkční aktivita populací imunitních buněk při léčbě myší polymerním konjugátem s doxorubicinem, volným doxorubicinem a u neléčených myší s nádorem. Zaměřili jsme se především na $CD8^+$ cytotoxické T lymfocyty a regulační T lymfocyty. Dále na expresi molekul CTLA-4 a PD-1, abychom mohli zodpovědět otázku, zda by mohla být terapie polymerními konjugáty vhodná v kombinované léčbě s terapií checkpoint inhibitory.

K léčbě experimentálních myší byly využity polymerní konjugáty HPMA s doxorubicinem s vysokou molekulovou hmotností, založené na HPMA polymeru navázaném degradabilní spojkou k dendrimernímu jádru (hvězdicovitá struktura, STAR). Druhou variantou byl micelární konjugát HPMA s doxorubicinem (MIC). Oba druhy polymerů mají nižší *in vitro* cytotoxicitu – vyšší hodnotu IC50 – měřenou pomocí inkorporace ^{3}H-thymidinu nebo pomocí MTT eseje oproti volnému doxorubicinu. Polymerní konjugáty mohou vykazovat rozdílnou aktivitu při *in vitro* a *in vivo* experimentech, protože jejich výhody oproti volnému léčivu se projeví především při terapii *in vivo*. Díky tomu sledujeme, že polymerní konjugáty jsou několikanásobně účinnější než volné léčivo u *in vivo* modelů, ale v jednoduchém systému pouze s nádorovými buňkami *in vitro* má vyšší cytotoxicitu volný doxorubicin.

Pro naše experimenty jsme zvolili dva různé myší modely, kmen SJL a BALB/c. Kmen BALB/c jsme testovali s nádorovou linií kolorektálního karcinomu CT26 a kmen SJL s T buněčným lymfomem EL4. Linie EL4 je odvozena od kmene C57BL/6 (B6). Kmen SJL je kongenním kmenem B6. Kmen SJL jsme zvolili proto, aby bylo možné pomocí průtokové cytometrie odlišit injikované nádorové buňky EL4. Ty nenesou žádný známý tumor-specifický antigen, jsou $CD3^{+}$ a *in vivo* je část nádorových buněk i $CD4^{+}$. Nelze proto u kmene B6 odlišit nádorové buňky od normálních T (zejména $CD4^{+}$) lymfocytů hostitelského původu. EL4 mají na svém povrchu molekulu CD45.2 (stejně jako hematopoetické buňky myší B6) a myší lymfocyty infiltrované do nádoru exprimují molekulu CD45.1. Proto jsme nejprve ověřili předpoklad, že kmen SJL a B6 odpovídá na léčbu polymerním konjugátem stejně. Růst nádorů ani přežívání SJL a B6 myší nesoucích EL4 nádor se signifikantně neliší, a to jak mezi SJL a B6 léčenými skupinami, tak i mezi neléčenými kontrolami.

Analýza buněčných populací ve slezinách u myšího modelu SJL ukázala, že se během deseti dnů po podání léčiva signifikantně nemění zastoupení $CD4^{+}$ a $CD8^{+}$ T lymfocytů, ani jejich vzájemný poměr. Sledování molekuly CTLA-4 a PD-1, která slouží také jako marker vyčerpaných T lymfocytů [84], ale ukázalo, že se po léčbě polymerním konjugátem STAR1 ve slezinách navyšuje množství vyčerpaných T lymfocytů (kolem 8 %) a CTLA-4+ CTL (kolem 2 %). U neléčených kontrol je jejich exprese minimální ($PD\text{-}1^{+}$ 2 %, $CTLA\text{-}4^{+}$ 0,3 %). Analýza TIL neukázala žádné významné rozdíly v zastoupení buněčných populací mezi léčenými a neléčenými skupinami myší. Tento výsledek nás vedl k rozšíření výběru stanovovaných markerů, abychom mohli identifikovat populace, které je vhodné sledovat v dalších experimentech.

Vybrané markery pro hodnocení subpopulací T lymfocytů značí Treg lymfocyty ($CD4^{+}FoxP3^{+}CD25^{+}$) [45], aktivované $CD25^{+}$ T lymfocyty, centrální ($CD44^{+}CD62L^{+}$) a efektorové ($CD44^{+}CD62L^{-}$) paměťové $CD8^{+}$ T lymfocyty [40]. Také analýzy těchto subpopulací T lymfocytů u SJL myší s EL4 lymfomem neukázaly žádné signifikantní rozdíly. Můžeme zde sledovat pouze určité trendy. Nejvýraznější je opět nárůst množství vyčerpaných, $CTLA\text{-}4^{+}$ T lymfocytů ve slezinách myší 10 dní po léčbě ve srovnání s neléčenými kontrolami, kde je zastoupení $CTLA\text{-}4^{+}$ T buněk velmi nízké. I u ostatních markerů sledujeme pokles nebo nárůst v průběhu deseti dnů po terapii. Rozdíly mezi léčenými a neléčenými skupinami jsou ale jen velmi malé. A to jak u buněk ze slezin, tak u TIL.

U obou pokusů s kmenem SJL je vidět výrazný rozdíl v zastoupení CTLA-4$^+$ nebo vyčerpaných, PD-1$^+$, CD8$^+$ T lymfocytů mezi buňkami ve slezině a v nádoru. Stejně tak paměťové CTL jsou více zastoupeny v nádoru. To naznačuje, že se imunitní systém aktivuje a aktivované T lymfocyty, zejména CTL, se skutečně dostávají do prostředí nádoru. Zároveň je ale možné detekovat změny i na periferii.

Také populace imunitních buněk ve slezinách a nádorech myšího kmene BALB/c jsme sledovali v několika časových intervalech po léčbě. BALB/c myši nesly CT26 kolorektální karcinom, který se od EL4 lymfomu liší tím, že je obtížně léčitelný. Buňky CT26 mají zvýšenou hladinu transmembránové pumpy P-gp, která je zodpovědná za MDR [110].

Sleziny BALB/c myší nesoucích CT26 nádor byly analyzovány podobně jako u myší SJL s EL4 lymfomem. Opět se zde nemění celkové zastoupení CD4$^+$ nebo CD8$^+$ T lymfocytů. Významnější rozdíly mezi populacemi buněk léčených a neléčených myší vidíme ve slezinách u sledovaných markerů PD-1 a CD25. PD-1$^+$ jsou vyčerpané T lymfocyty a CD25$^+$ jsou aktivované T lymfocyty. Obě populace jsou 11 dní po léčbě signifikantně více zastoupeny ve slezinách léčené skupiny myší. U ostatních sledovaných populací ve slezinách opět nejsou významné rozdíly oproti neléčené skupině.

Podobný výsledek je vidět také u tumor infiltrujících lymfocytů. V průběhu 11 dnů po léčbě se různým způsobem mění zastoupení jednotlivých populací v nádoru. Signifikantní rozdíly jsou u populace CTLA-4$^+$ CD8$^+$ TIL a u aktivovaných CD8$^+$ TIL (CD25$^+$). Stejně jako ve slezinách, i v nádoru je vyšší zastoupení aktivovaných CD8$^+$ T lymfocytů u léčené skupiny myší 11 dní po léčbě. Těmito výsledky se potvrdily závěry experimentů na myších kmene SJL s EL4 nádorem. I tady nejsou změny celkového zastoupení CD8$^+$ T lymfocytů, ale mění se podíl vyčerpaných a aktivovaných buněk. Stejně tak je zde několikanásobně více CD8$^+$ T lymfocytů s markery CTLA-4 nebo PD-1 v prostředí nádoru oproti slezinám. To platí i pro proliferující Treg lymfocyty, které mají zvýšenou expresi CTLA-4 [130]. V nádoru je téměř 100 % Treg lymfocytů CTLA-4$^+$, ve slezinách je to ale jen kolem 20 %.

Z výše popsaných analýz vyplývá, že terapie nádorů polymerními konjugáty s doxorubicinem zvyšuje zastoupení vyčerpaných nebo aktivovaných T lymfocytů, a to jak u modelu SJL s EL4 nádorem, tak BALB/c nesoucích CT26 nádor. To svědčí o vyšší míře aktivace T buněk v souvislosti s léčbou polymerním konjugátem.

Pro další experimenty jsme udělali několik změn v jejich uspořádání, abychom mohli detekovat i menší změny v zastoupení imunitních buněk. Upravili jsme dávkování léčiva z jedné větší dávky na tři menší každý třetí den, které mají u myší BALB/c s CT26 nádory lepší terapeutický efekt. Ke skupinám myší léčených polymerním konjugátem a neléčeným kontrolám jsme přidali skupinu myší léčenou volným doxorubicinem (také třemi dávkami). Všechny skupiny myší jsme zvětšili na 6 myší na skupinu, abychom mohli sledovat signifikantní rozdíly. Také jsme optimalizovali panel protilátek pro ideální vyhodnocení výsledků. Nejvýznamnější změnou bylo upravení složení enzymové směsi tumor disociačního kitu používaného pro vytvoření jednobuněčné suspenze buněk. Při dodržení doporučeného složení podle výrobce byl vidět úbytek detekce molekuly CD44. Proto jsme v několika experimentech

určili a ověřili, kterou složku kitu je vhodné vynechat pro zachování výtěžku buněk z nádoru a pro zachování detekce molekuly CD44 na buňkách.

Po výše zmíněných změnách jsme analyzovali buňky ze slezin experimentálních myší BALB/c s nádory CT26. Léčba myší polymerním konjugátem zvyšuje zastoupení Treg oproti léčbě volným DOX. Stejně tak se zvyšuje podíl efektorových paměťových ($CD44^+CD62L^-$) CTL a $CTLA\text{-}4^+$ CTL, jak oproti léčbě volným DOX, tak oproti neléčeným kontrolám. Dále terapie polymerním konjugátem zvyšuje zastoupení $PD\text{-}1^+$ a $CD25^+$ $CD8^+$ T lymfocytů oproti léčbě DOX.

Podobný trend je vidět také u TIL. Nejvýznamnější rozdíl vidíme na populaci $CD25^+$ cytotoxických T lymfocytů, kdy je jejich množství výrazně zvýšeno po terapii jak konjugátem, tak i volným léčivem. Zároveň také tento experiment potvrzuje výsledek těch předchozích. Vyčerpaných nebo aktivovaných T lymfocytů je v prostředí nádoru několikanásobně více než ve slezinách.

Tyto výsledky velmi jasně podporují naši hypotézu, že terapie nádorů polymerním konjugátem na bázi HPMA s doxorubicinem podněcuje imunitní odpověď proti nádoru ve větší míře než terapie volným léčivem. Proto jsme se rozhodli podpořit tyto závěry dalším experimentem a stanovili jsme koncentraci IFNγ v plazmě experimentálních myší. Pro stanovení jsme využili myši z předchozího experimentu, stanovení IFNγ následovalo 6 dní po poslední ze tří dávek léčiva. IFNγ byl poté stanoven pomocí komerčního ELISA kitu. Koncentrace IFNγ, který sekretují hlavně efektorové $CD8^+$ T buňky a NK buňky, byla oproti léčbě volným léčivem nebo neléčené kontrole vyšší u skupiny léčené polymerním konjugátem. Viděli jsme zde pouze určitý trend, nebyl vidět signifikantní rozdíl. Podle očekávání byly hladiny IFNγ v plazmě nízké, IFNγ působí spíše jako parakrinní faktor a v cirkulaci se ve vyšší míře nedetekuje. I tak tento výsledek podporuje závěry analýz populací imunitních buněk provedené průtokovou cytometrií.

Výsledky experimentů s kmeny SJL i BALB/c naznačují, že terapie polymerními konjugáty na bázi HPMA s doxorubicinem by mohla být vhodnou součástí kombinované terapie s checkpoint inhibitory. Polymerní konjugát zvyšuje zastoupení CTLA-4 nebo PD-1 exprimujících $CD8^+$ T lymfocytů, proto by mohlo být výhodné tyto molekuly zablokovat jejich inhibitory, a tím prodloužit dobu funkční aktivity T lymfocytů.

Do této doby jsme věděli, že jsou polymerní konjugáty na bázi HPMA s doxorubicinem schopny (oproti volnému doxorubicinu) úplně vyléčit myši nesoucí nádor. Navíc se u části úspěšně vyléčených myší vytváří dlouhodobá rezistence vůči opakované letální dávce stejných nádorových buněk, za kterou jsou zodpovědné $CD8^+$ T lymfocyty a důležitou roli zde hraje také IFNγ [122]–[124].

Terapie polymerními konjugáty zvyšuje zastoupení aktivovaných, vyčerpaných nebo $CTLA\text{-}4^+$ cytotoxických T lymfocytů oproti volnému doxorubicinu. Zároveň zvyšuje koncentraci IFNγ z plazmě.

Polymerní konjugát s doxorubicinem, který indukuje imunogenní buněčnou smrt [126], v porovnání s volným léčivem pravděpodobně zvyšuje míru uvolňování nádorových antigenů z buněk a také méně poškozuje aktivované imunitní buňky. Vedle těchto mechanismů, nebo pravděpodobně

jejich kombinaci, se mohou přidávat ještě další zatím neznámé mechanismy, které napomáhají efektivní aktivaci imunitního systému proti nádoru.

7 ZÁVĚR

Pomocí průtokové cytometrie jsme sledovali rozdíly v imunitní odpovědi po terapii nádorů polymerními konjugáty na bázi HPMA s doxorubicinem (micelární nebo dendrimerní konjugát), volným doxorubicinem a bez léčby. Zaměřili jsme se na $CD4^+$ a $CD8^+$ populaci, populaci Treg lymfocytů ($CD4^+FoxP3^+CD25^+$) exprimujících CTLA-4 a některé efektorové subpopulace $CD8^+$ T lymfocytů, jako jsou aktivované $CD25^+$ lymfocyty, efektorové ($CD44^+CD62L^-$) a centrální paměťové ($CD44^+CD62L^+$) $CD8^+$ T lymfocyty. Detekovali jsme také expresi molekul CTLA-4 a PD-1.
K hlavním výsledkům této diplomové práce patří:

- Terapie myší SJL nesoucích EL4 lymfom polymerním konjugátem v jejich slezinách zvyšuje zastoupení CTLA-4 nebo PD-1 exprimujících CTL (v porovnání s neléčenou skupinou).
- Jedna dávka léčby BALB/c myší s CT26 nádory polymerním konjugátem zvyšuje podíl vyčerpaných, $PD1^+$, a aktivovaných, $CD25^+$, CTL ve slezinách 11 dní po léčbě.
- V prostředí nádoru zvyšuje zastoupení CTLA-4 a CD25 exprimujících TIL 11 dní po léčbě. Oba závěry platí vždy v porovnání s neléčenou skupinou myší.
- Vynechání enzymu R ze směsi enzymů komerčního tumor disociačního kitu umožňuje dokonalou detekci molekuly CD44 průtokovou cytometrií na povrchu buněk.
- Léčba BALB/c myší s CT26 nádory třemi menšími dávkami polymerního konjugátu zvyšuje podíl Treg lymfocytů ve slezinách. Zvyšuje zde také zastoupení efektorových paměťových CTL, aktivovaných ($CD25^+$), PD-1 a CTLA-4 exprimujících cytotoxických T lymfocytů (vše v porovnání s léčbou DOX i neléčenou skupinou). V nádorech těchto myší terapie polymerním konjugátem i volným léčivem snižuje podíl $CD4^+$ T lymfocytů a CTLA-4^+ Treg lymfocytů (oproti neléčené skupině). Zároveň léčba konjugátem i volným léčivem oproti neléčené skupině zvyšuje u TIL zastoupení aktivovaných, $CD25^+$, cytotoxických T lymfocytů.
- V prostředí nádoru léčených i neléčených SJL i BALB/c myší je mnohonásobně vyšší podíl CTLA-4^+ a PD-1^+ cytotoxických T lymfocytů než v jejich slezinách.
- Tři dávky polymerního léčiva u BALB/c myší s CT26 nádory také mírně zvyšují hladinu IFNγ v plazmě (oproti léčbě DOX i neléčené kontrole).
- Terapie myší polymerním konjugátem zvyšuje zastoupení CTLA-4 a PD-1 exprimujících T lymfocytů, proto může být vhodnější pro kombinační terapii s checkpoint inhibitory. Vzhledem k opakovaně prokázané omezené systémové toxicitě i vyšší účinnosti při léčbě experimentálních nádorů se tak polymerní konjugáty na bázi HPMA s cytostatikem ukazují jako potenciálně perspektivní cesta chemoterapie nádorových onemocnění.

8 ZDROJE

[1] G. P. Dunn, L. J. Old, a R. D. Schreiber, „The Three Es of Cancer Immunoediting", *Annual Review of Immunology*, roč. 22, č. 1, s. 329–360, 2004, doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803.

[2] A. P. Vicari a C. Caux, „Chemokines in cancer", *Cytokine Growth Factor Rev.*, roč. 13, č. 2, s. 143–154, dub. 2002, doi: 10.1016/s1359-6101(01)00033-8.

[3] Y. Gao *et al.*, „Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity", *J. Exp. Med.*, roč. 198, č. 3, s. 433–442, srp. 2003, doi: 10.1084/jem.20030584.

[4] C. Fauriat, E. O. Long, H.-G. Ljunggren, a Y. T. Bryceson, „Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition", *Blood*, roč. 115, č. 11, s. 2167–2176, bře. 2010, doi: 10.1182/blood-2009-08-238469.

[5] M. Moreno *et al.*, „IFN-γ-Producing Human Invariant NKT Cells Promote Tumor-Associated Antigen-Specific Cytotoxic T Cell Responses", *The Journal of Immunology*, roč. 181, č. 4, s. 2446–2454, srp. 2008, doi: 10.4049/jimmunol.181.4.2446.

[6] J. Hodge-Dufour *et al.*, „Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages", *J. Immunol.*, roč. 159, č. 5, s. 2492–2500, zář. 1997.

[7] M. Hafner, W. Falk, B. Echtenacher, a D. N. Männel, „Interleukin-12 activates NK cells for IFN-gamma-dependent and NKT cells for IFN-gamma-independent antimetastatic activity", *Eur. Cytokine Netw.*, roč. 10, č. 4, s. 541–548, pro. 1999.

[8] H. Jiang a S. Dhib-Jalbut, „Differential induction of IL-12 by IFN-beta and IFN-gamma in human macrophages", *J. Interferon Cytokine Res.*, roč. 18, č. 9, s. 697–703, zář. 1998, doi: 10.1089/jir.1998.18.697.

[9] Y.-H. Zhao *et al.*, „Anti-proliferation effects of interferon-gamma on gastric cancer cells", *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, roč. 14, č. 9, s. 5513–5518, 2013, doi: 10.7314/apjcp.2013.14.9.5513.

[10] P. Fang, V. Hwa, a R. G. Rosenfeld, „Interferon-gamma-induced dephosphorylation of STAT3 and apoptosis are dependent on the mTOR pathway", *Exp. Cell Res.*, roč. 312, č. 8, s. 1229–1239, kvě. 2006, doi: 10.1016/j.yexcr.2005.12.011.

[11] R. P. A. Wallin, V. S. Sundquist, E. Bråkenhielm, Y. Cao, H.-G. Ljunggren, a A. Grandien, „Angiostatic effects of NK cell-derived IFN-γ counteracted by tumour cell Bcl-xL expression", *Scand. J. Immunol.*, roč. 79, č. 2, s. 90–97, úno. 2014, doi: 10.1111/sji.12134.

[12] H. J. Forman a M. Torres, „Redox signaling in macrophages", *Mol. Aspects Med.*, roč. 22, č. 4–5, s. 189–216, říj. 2001, doi: 10.1016/s0098-2997(01)00010-3.

[13] I. Prager a C. Watzl, „Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity", *J. Leukoc. Biol.*, roč. 105, č. 6, s. 1319–1329, 2019, doi: 10.1002/JLB.MR0718-269R.

[14] N. Aptsiauri, F. Ruiz-Cabello, a F. Garrido, „The transition from HLA-I positive to HLA-I negative primary tumors: the road to escape from T-cell responses", *Curr. Opin. Immunol.*, roč. 51, s. 123–132, 2018, doi: 10.1016/j.coi.2018.03.006.

[15] J. Hilpert *et al.*, „Comprehensive analysis of NKG2D ligand expression and release in leukemia: implications for NKG2D-mediated NK cell responses", *J. Immunol.*, roč. 189, č. 3, s. 1360–1371, srp. 2012, doi: 10.4049/jimmunol.1200796.

[16] G. P. Dunn, K. C. F. Sheehan, L. J. Old, a R. D. Schreiber, „IFN unresponsiveness in LNCaP cells due to the lack of JAK1 gene expression", *Cancer Res.*, roč. 65, č. 8, s. 3447–3453, dub. 2005, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4316.

[17] C.-L. Chen, T.-H. Chiang, P.-C. Tseng, Y.-C. Wang, a C.-F. Lin, „Loss of PTEN causes SHP2 activation, making lung cancer cells unresponsive to IFN-γ", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, roč. 466, č. 3, s. 578–584, říj. 2015, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.085.

[18] H. Lee *et al.*, „Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors", *Cancer Cell*, roč. 15, č. 4, s. 283–293, dub. 2009, doi: 10.1016/j.ccr.2009.02.015.

[19] L. Chiossone, P.-Y. Dumas, M. Vienne, a E. Vivier, „Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer", *Nat. Rev. Immunol.*, roč. 18, č. 11, s. 671–688, 2018, doi: 10.1038/s41577-018-0061-z.

[20] R. Kiessling, E. Klein, H. Pross, a H. Wigzell, „‚Natural´ killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell", *Eur. J. Immunol.*, roč. 5, č. 2, s. 117–121, úno. 1975, doi: 10.1002/eji.1830050209.

[21] M. J. Smyth, N. Y. Crowe, a D. I. Godfrey, „NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma", *Int. Immunol.*, roč. 13, č. 4, s. 459–463, dub. 2001, doi: 10.1093/intimm/13.4.459.
[22] J. Deguine, B. Breart, F. Lemaître, a P. Bousso, „Cutting edge: tumor-targeting antibodies enhance NKG2D-mediated NK cell cytotoxicity by stabilizing NK cell-tumor cell interactions", *J. Immunol.*, roč. 189, č. 12, s. 5493–5497, pro. 2012, doi: 10.4049/jimmunol.1202065.
[23] K. Ogura *et al.*, „NK Cells Control Tumor-Promoting Function of Neutrophils in Mice", *Cancer Immunol Res*, roč. 6, č. 3, s. 348–357, 2018, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0204.
[24] J. P. Böttcher *et al.*, „NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control", *Cell*, roč. 172, č. 5, s. 1022-1037.e14, 22 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.01.004.
[25] B. Boyerinas *et al.*, „Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Activity of a Novel Anti-PD-L1 Antibody Avelumab (MSB0010718C) on Human Tumor Cells", *Cancer Immunol Res*, roč. 3, č. 10, s. 1148–1157, říj. 2015, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0059.
[26] W. Wang, A. K. Erbe, J. A. Hank, Z. S. Morris, a P. M. Sondel, „NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy", *Front Immunol*, roč. 6, s. 368, 2015, doi: 10.3389/fimmu.2015.00368.
[27] S. R. Nielsen a M. C. Schmid, „Macrophages as Key Drivers of Cancer Progression and Metastasis", *Mediators Inflamm.*, roč. 2017, s. 9624760, 2017, doi: 10.1155/2017/9624760.
[28] C. H. Ries *et al.*, „Targeting tumor-associated macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy", *Cancer Cell*, roč. 25, č. 6, s. 846–859, čer. 2014, doi: 10.1016/j.ccr.2014.05.016.
[29] A.-M. Georgoudaki *et al.*, „Reprogramming Tumor-Associated Macrophages by Antibody Targeting Inhibits Cancer Progression and Metastasis", *Cell Rep*, roč. 15, č. 9, s. 2000–2011, 31 2016, doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.084.
[30] H. Jeong *et al.*, „Tumor-Associated Macrophages Enhance Tumor Hypoxia and Aerobic Glycolysis", *Cancer Res.*, roč. 79, č. 4, s. 795–806, 15 2019, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2545.
[31] S. Roy *et al.*, „Macrophage-Derived Neuropilin-2 Exhibits Novel Tumor-Promoting Functions", *Cancer Res.*, roč. 78, č. 19, s. 5600–5617, 01 2018, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0562.
[32] O. P. Joffre, E. Segura, A. Savina, a S. Amigorena, „Cross-presentation by dendritic cells", *Nat. Rev. Immunol.*, roč. 12, č. 8, s. 557–569, čvc. 2012, doi: 10.1038/nri3254.
[33] C. Théry a S. Amigorena, „The cell biology of antigen presentation in dendritic cells", *Curr. Opin. Immunol.*, roč. 13, č. 1, s. 45–51, úno. 2001, doi: 10.1016/s0952-7915(00)00180-1.
[34] C. Fu a A. Jiang, „Dendritic Cells and CD8 T Cell Immunity in Tumor Microenvironment", *Front Immunol*, roč. 9, s. 3059, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.03059.
[35] P. Bousso, „T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies", *Nat. Rev. Immunol.*, roč. 8, č. 9, s. 675–684, zář. 2008, doi: 10.1038/nri2379.
[36] J. P. Di Santo *et al.*, „The common cytokine receptor gamma chain and the pre-T cell receptor provide independent but critically overlapping signals in early alpha/beta T cell development", *J. Exp. Med.*, roč. 189, č. 3, s. 563–574, úno. 1999, doi: 10.1084/jem.189.3.563.
[37] V. Kalia a S. Sarkar, „Regulation of Effector and Memory CD8 T Cell Differentiation by IL-2-A Balancing Act", *Front Immunol*, roč. 9, s. 2987, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.02987.
[38] K. P. Kane a M. F. Mescher, „Activation of CD8-dependent cytotoxic T lymphocyte adhesion and degranulation by peptide class I antigen complexes.", *The Journal of Immunology*, roč. 150, č. 11, s. 4788–4797, čer. 1993.
[39] S. Halle, O. Halle, a R. Förster, „Mechanisms and Dynamics of T Cell-Mediated Cytotoxicity In Vivo", *Trends Immunol.*, roč. 38, č. 6, s. 432–443, 2017, doi: 10.1016/j.it.2017.04.002.
[40] J. Reiser a A. Banerjee, „Effector, Memory, and Dysfunctional CD8(+) T Cell Fates in the Antitumor Immune Response", *J Immunol Res*, roč. 2016, s. 8941260, 2016, doi: 10.1155/2016/8941260.
[41] K. Hirahara a T. Nakayama, „CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm", *Int. Immunol.*, roč. 28, č. 4, s. 163–171, dub. 2016, doi: 10.1093/intimm/dxw006.

[42] J. Borst, T. Ahrends, N. Bąbała, C. J. M. Melief, a W. Kastenmüller, „CD4+ T cell help in cancer immunology and immunotherapy", *Nat. Rev. Immunol.*, roč. 18, č. 10, s. 635–647, 2018, doi: 10.1038/s41577-018-0044-0.
[43] H. L. Lee *et al.*, „Inflammatory cytokines and change of Th1/Th2 balance as prognostic indicators for hepatocellular carcinoma in patients treated with transarterial chemoembolization", *Scientific Reports*, roč. 9, č. 1, Art. č. 1, bře. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-40078-8.
[44] Y.-J. Huang *et al.*, „Induced and thymus-derived Foxp3^{+} regulatory T cells share a common niche", *Eur. J. Immunol.*, roč. 44, č. 2, s. 460–468, úno. 2014, doi: 10.1002/eji.201343463.
[45] C. Devaud, P. K. Darcy, a M. H. Kershaw, „Foxp3 expression in T regulatory cells and other cell lineages", *Cancer Immunol Immunother*, roč. 63, č. 9, s. 869–876, zář. 2014, doi: 10.1007/s00262-014-1581-4.
[46] Y. Takeuchi a H. Nishikawa, „Roles of regulatory T cells in cancer immunity", *Int. Immunol.*, roč. 28, č. 8, s. 401–409, 2016, doi: 10.1093/intimm/dxw025.
[47] D. I. Gabrilovich, „Myeloid-Derived Suppressor Cells", *Cancer Immunol Res*, roč. 5, č. 1, s. 3–8, 2017, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0297.
[48] P. L. Raber *et al.*, „Subpopulations of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) impair T cell responses through independent nitric oxide-related pathways", *Int J Cancer*, roč. 134, č. 12, s. 2853–2864, čer. 2014, doi: 10.1002/ijc.28622.
[49] C. A. Corzo *et al.*, „Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells", *J. Immunol.*, roč. 182, č. 9, s. 5693–5701, kvě. 2009, doi: 10.4049/jimmunol.0900092.
[50] J. Yu *et al.*, „Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer", *J. Immunol.*, roč. 190, č. 7, s. 3783–3797, dub. 2013, doi: 10.4049/jimmunol.1201449.
[51] S. Suzuki *et al.*, „Immunosuppression involving increased myeloid-derived suppressor cell levels, systemic inflammation and hypoalbuminemia are present in patients with anaplastic thyroid cancer", *Molecular and Clinical Oncology*, roč. 1, č. 6, s. 959–964, lis. 2013, doi: 10.3892/mco.2013.170.
[52] K. Chikamatsu, K. Sakakura, M. Toyoda, K. Takahashi, T. Yamamoto, a K. Masuyama, „Immunosuppressive activity of CD14+ HLA-DR− cells in squamous cell carcinoma of the head and neck", *Cancer Science*, roč. 103, č. 6, s. 976–983, 2012, doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02248.x.
[53] M. K. Srivastava, P. Sinha, V. K. Clements, P. Rodriguez, a S. Ostrand-Rosenberg, „Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine", *Cancer Res.*, roč. 70, č. 1, s. 68–77, led. 2010, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2587.
[54] A. W. Ku *et al.*, „Tumor-induced MDSC act via remote control to inhibit L-selectin-dependent adaptive immunity in lymph nodes", *Elife*, roč. 5, 08 2016, doi: 10.7554/eLife.17375.
[55] D. J. Zahavi a L. M. Weiner, „Chapter Three - Tumor mechanisms of resistance to immune attack", in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, roč. 164, D. B. Teplow, Ed. Academic Press, 2019, s. 61–100.
[56] J. Zugazagoitia, C. Guedes, S. Ponce, I. Ferrer, S. Molina-Pinelo, a L. Paz-Ares, „Current Challenges in Cancer Treatment", *Clinical Therapeutics*, roč. 38, č. 7, s. 1551–1566, čvc. 2016, doi: 10.1016/j.clinthera.2016.03.026.
[57] A. Urruticoechea, R. Alemany, J. Balart, A. Villanueva, F. Viñals, a G. Capellá, „Recent advances in cancer therapy: an overview", *Curr. Pharm. Des.*, roč. 16, č. 1, s. 3–10, led. 2010, doi: 10.2174/138161210789941847.
[58] P. Vihinen *et al.*, „Benefit of adjuvant interferon alfa-2b (IFN-α) therapy in melanoma patients with high serum MMP-8 levels", *Cancer Immunol. Immunother.*, roč. 64, č. 2, s. 173–180, úno. 2015, doi: 10.1007/s00262-014-1620-1.
[59] R. Bright, B. J. Coventry, N. Eardley-Harris, a N. Briggs, „Clinical Response Rates From Interleukin-2 Therapy for Metastatic Melanoma Over 30 Years' Experience: A Meta-Analysis of 3312 Patients", *J. Immunother.*, roč. 40, č. 1, s. 21–30, 2017, doi: 10.1097/CJI.0000000000000149.

[60] T. Achkar *et al.*, „High-dose interleukin 2 in patients with metastatic renal cell carcinoma with sarcomatoid features", *PLoS ONE*, roč. 12, č. 12, s. e0190084, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0190084.
[61] H. Ozer, H. M. Golomb, H. Zimmerman, a R. J. Spiegel, „Cost-benefit analysis of interferon alfa-2b in treatment of hairy cell leukemia", *J. Natl. Cancer Inst.*, roč. 81, č. 8, s. 594–602, dub. 1989, doi: 10.1093/jnci/81.8.594.
[62] R. Andersen *et al.*, „Long-Lasting Complete Responses in Patients with Metastatic Melanoma after Adoptive Cell Therapy with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and an Attenuated IL2 Regimen", *Clin. Cancer Res.*, roč. 22, č. 15, s. 3734–3745, 01 2016, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1879.
[63] S. Vairy, J. L. Garcia, P. Teira, a H. Bittencourt, „CTL019 (tisagenlecleucel): CAR-T therapy for relapsed and refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia", *Drug Des Devel Ther*, roč. 12, s. 3885–3898, 2018, doi: 10.2147/DDDT.S138765.
[64] Ö. Met, K. M. Jensen, C. A. Chamberlain, M. Donia, a I. M. Svane, „Principles of adoptive T cell therapy in cancer", *Semin Immunopathol*, roč. 41, č. 1, s. 49–58, 2019, doi: 10.1007/s00281-018-0703-z.
[65] K. Newick, S. O'Brien, E. Moon, a S. M. Albelda, „CAR T Cell Therapy for Solid Tumors", *Annu. Rev. Med.*, roč. 68, s. 139–152, 14 2017, doi: 10.1146/annurev-med-062315-120245.
[66] Y. Wang, D. Fei, M. Vanderlaan, a A. Song, „Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro", *Angiogenesis*, roč. 7, č. 4, s. 335–345, 2004, doi: 10.1007/s10456-004-8272-2.
[67] G. von Minckwitz *et al.*, „Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer", *N. Engl. J. Med.*, roč. 380, č. 7, s. 617–628, 14 2019, doi: 10.1056/NEJMoa1814017.
[68] J. M. Connors *et al.*, „Brentuximab Vedotin with Chemotherapy for Stage III or IV Hodgkin's Lymphoma", *N. Engl. J. Med.*, roč. 378, č. 4, s. 331–344, 25 2018, doi: 10.1056/NEJMoa1708984.
[69] S. Maury *et al.*, „Rituximab in B-Lineage Adult Acute Lymphoblastic Leukemia", *N. Engl. J. Med.*, roč. 375, č. 11, s. 1044–1053, zář. 2016, doi: 10.1056/NEJMoa1605085.
[70] M. J. Piccart-Gebhart *et al.*, „Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer", *N. Engl. J. Med.*, roč. 353, č. 16, s. 1659–1672, říj. 2005, doi: 10.1056/NEJMoa052306.
[71] S. Maximiano, P. Magalhães, M. P. Guerreiro, a M. Morgado, „Trastuzumab in the Treatment of Breast Cancer", *BioDrugs*, roč. 30, č. 2, s. 75–86, dub. 2016, doi: 10.1007/s40259-016-0162-9.
[72] H. Hurwitz *et al.*, „Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer", *N. Engl. J. Med.*, roč. 350, č. 23, s. 2335–2342, čer. 2004, doi: 10.1056/NEJMoa032691.
[73] T. Kato *et al.*, „Erlotinib Plus Bevacizumab Phase ll Study in Patients with Advanced Non-small-Cell Lung Cancer (JO25567): Updated Safety Results", *Drug Saf*, roč. 41, č. 2, s. 229–237, 2018, doi: 10.1007/s40264-017-0596-0.
[74] W. Wick *et al.*, „Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma", *N. Engl. J. Med.*, roč. 377, č. 20, s. 1954–1963, 16 2017, doi: 10.1056/NEJMoa1707358.
[75] B. I. Rini *et al.*, „Atezolizumab plus bevacizumab versus sunitinib in patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma (IMmotion151): a multicentre, open-label, phase 3, randomised controlled trial", *Lancet*, roč. 393, č. 10189, s. 2404–2415, 15 2019, doi: 10.1016/S0140-6736(19)30723-8.
[76] D. Miles *et al.*, „Bevacizumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel as first-line therapy for HER2-negative metastatic breast cancer (MERiDiAN): A double-blind placebo-controlled randomised phase III trial with prospective biomarker evaluation", *Eur. J. Cancer*, roč. 70, s. 146–155, 2017, doi: 10.1016/j.ejca.2016.09.024.
[77] A. Bamias *et al.*, „Bevacizumab with or after chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer: exploratory analyses of the AURELIA trial", *Ann. Oncol.*, roč. 28, č. 8, s. 1842–1848, srp. 2017, doi: 10.1093/annonc/mdx228.
[78] E. I. Buchbinder a A. Desai, „CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition", *Am. J. Clin. Oncol.*, roč. 39, č. 1, s. 98–106, úno. 2016, doi: 10.1097/COC.0000000000000239.

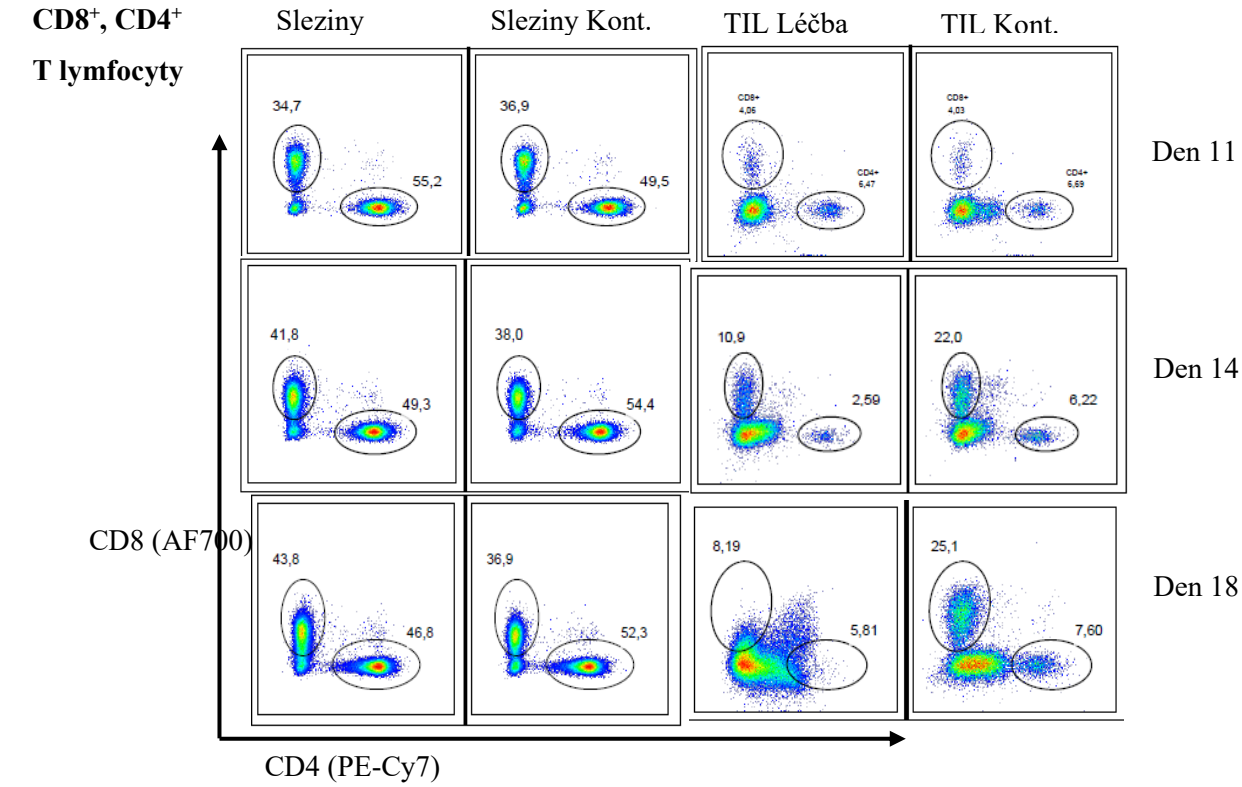
[79] M. F. Krummel a J. P. Allison, „CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation", *J. Exp. Med.*, roč. 182, č. 2, s. 459–465, srp. 1995, doi: 10.1084/jem.182.2.459.
[80] X. Tai *et al.*, „Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4(+) T cells", *Blood*, roč. 119, č. 22, s. 5155–5163, kvě. 2012, doi: 10.1182/blood-2011-11-388918.
[81] J. J. Engelhardt, T. J. Sullivan, a J. P. Allison, „CTLA-4 overexpression inhibits T cell responses through a CD28-B7-dependent mechanism", *J. Immunol.*, roč. 177, č. 2, s. 1052–1061, čvc. 2006, doi: 10.4049/jimmunol.177.2.1052.
[82] O. S. Qureshi *et al.*, „Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4", *Science*, roč. 332, č. 6029, s. 600–603, dub. 2011, doi: 10.1126/science.1202947.
[83] G. Q. Phan *et al.*, „Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma", *Proc Natl Acad Sci U S A*, roč. 100, č. 14, s. 8372–8377, čvc. 2003, doi: 10.1073/pnas.1533209100.
[84] D. R. Sen *et al.*, „The epigenetic landscape of T cell exhaustion", *Science*, roč. 354, č. 6316, s. 1165–1169, 02 2016, doi: 10.1126/science.aae0491.
[85] H. T. Lee *et al.*, „Molecular mechanism of PD-1/PD-L1 blockade via anti-PD-L1 antibodies atezolizumab and durvalumab", *Sci Rep*, roč. 7, č. 1, s. 5532, 17 2017, doi: 10.1038/s41598-017-06002-8.
[86] J. Larkin *et al.*, „Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Previously Untreated Melanoma", *N Engl J Med*, roč. 373, č. 1, s. 23–34, čvc. 2015, doi: 10.1056/NEJMoa1504030.
[87] S. Thomas a G. C. Prendergast, „Cancer Vaccines: A Brief Overview", *Methods Mol. Biol.*, roč. 1403, s. 755–761, 2016, doi: 10.1007/978-1-4939-3387-7_43.
[88] P. W. Kantoff *et al.*, „Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer", *N. Engl. J. Med.*, roč. 363, č. 5, s. 411–422, čvc. 2010, doi: 10.1056/NEJMoa1001294.
[89] C. E. Handy a E. S. Antonarakis, „Sipuleucel-T for the treatment of prostate cancer: novel insights and future directions", *Future Oncol*, roč. 14, č. 10, s. 907–917, dub. 2018, doi: 10.2217/fon-2017-0531.
[90] Y. T. Lee, Y. J. Tan, a C. E. Oon, „Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity", *European Journal of Pharmacology*, roč. 834, s. 188–196, zář. 2018, doi: 10.1016/j.ejphar.2018.07.034.
[91] R. Capdeville, S. Silberman, a S. Dimitrijevic, „Imatinib: the first 3 years", *Eur. J. Cancer*, roč. 38 Suppl 5, s. S77-82, zář. 2002, doi: 10.1016/s0959-8049(02)80607-4.
[92] A. Hochhaus *et al.*, „Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia", *N. Engl. J. Med.*, roč. 376, č. 10, s. 917–927, 09 2017, doi: 10.1056/NEJMoa1609324.
[93] A. G. Waks a E. P. Winer, „Breast Cancer Treatment: A Review", *JAMA*, roč. 321, č. 3, s. 288–300, led. 2019, doi: 10.1001/jama.2018.19323.
[94] K. Dalberg, H. Johansson, U. Johansson, a L. E. Rutqvist, „A randomized trial of long term adjuvant tamoxifen plus postoperative radiation therapy versus radiation therapy alone for patients with early stage breast carcinoma treated with breast-conserving surgery. Stockholm Breast Cancer Study Group", *Cancer*, roč. 82, č. 11, s. 2204–2211, čer. 1998.
[95] M. S. Litwin a H.-J. Tan, „The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review", *JAMA*, roč. 317, č. 24, s. 2532–2542, čer. 2017, doi: 10.1001/jama.2017.7248.
[96] P. L. Nguyen *et al.*, „Adverse effects of androgen deprivation therapy and strategies to mitigate them", *Eur. Urol.*, roč. 67, č. 5, s. 825–836, kvě. 2015, doi: 10.1016/j.eururo.2014.07.010.
[97] E. A. Singer, D. J. Golijanin, H. Miyamoto, a E. M. Messing, „Androgen deprivation therapy for prostate cancer", *Expert Opin Pharmacother*, roč. 9, č. 2, s. 211–228, úno. 2008, doi: 10.1517/14656566.9.2.211.
[98] E. D. Thomas, H. L. Lochte, W. C. Lu, a J. W. Ferrebee, „Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy", *N. Engl. J. Med.*, roč. 257, č. 11, s. 491–496, zář. 1957, doi: 10.1056/NEJM195709122571102.
[99] E. D. Thomas *et al.*, „Allogeneic marrow grafting for hematologic malignancy using HL-A matched donor-recipient sibling pairs", *Blood*, roč. 38, č. 3, s. 267–287, zář. 1971.
[100] A. Takami, „Hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia", *Int J Hematol*, roč. 107, č. 5, s. 513–518, kvě. 2018, doi: 10.1007/s12185-018-2412-8.

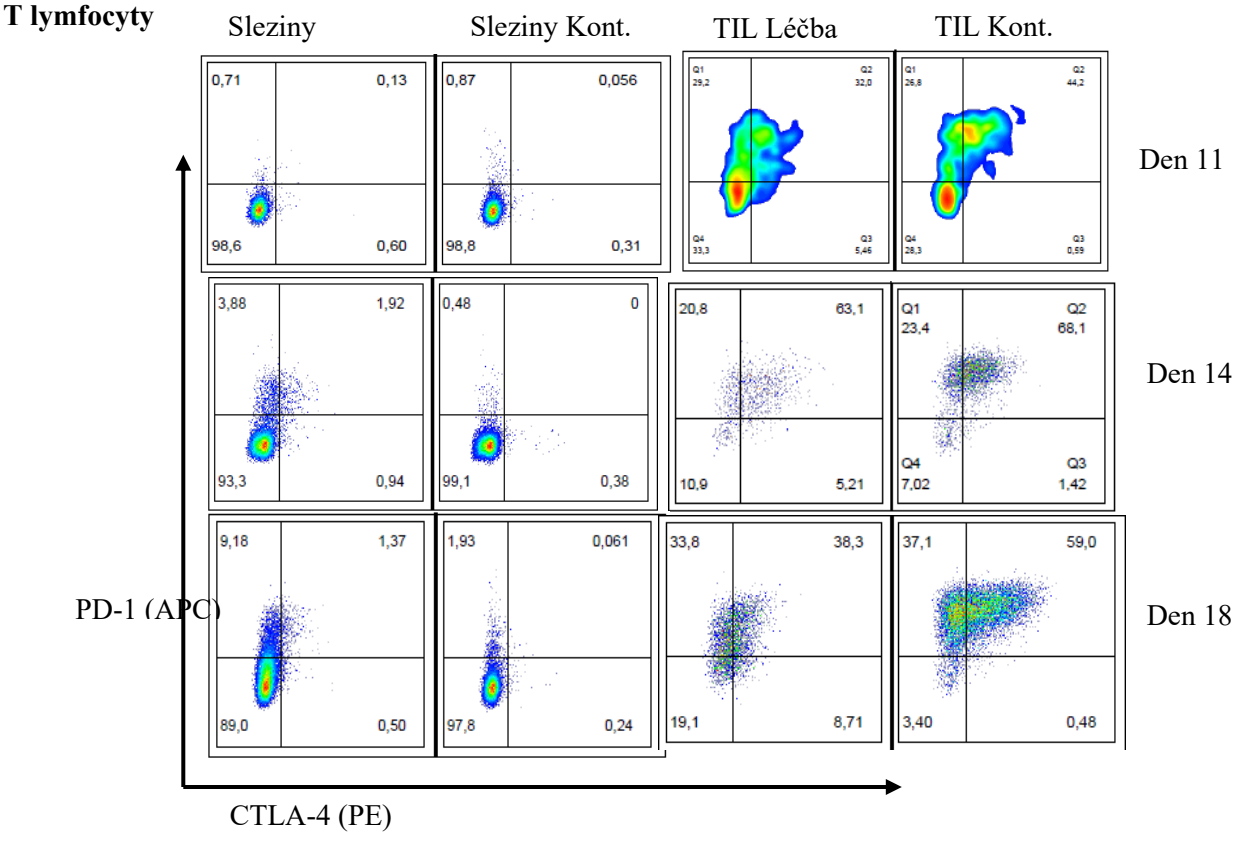
[101] R. C.-Y. Hui *et al.*, „Doxorubicin activates FOXO3a to induce the expression of multidrug resistance gene ABCB1 (MDR1) in K562 leukemic cells", *Mol. Cancer Ther.*, roč. 7, č. 3, s. 670–678, bře. 2008, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-07-0397.
[102] E. Pérez-Herrero a A. Fernández-Medarde, „Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy", *Eur J Pharm Biopharm*, roč. 93, s. 52–79, čer. 2015, doi: 10.1016/j.ejpb.2015.03.018.
[103] J. Yang a J. Kopeček, „Macromolecular therapeutics", *J Control Release*, roč. 190, s. 288–303, zář. 2014, doi: 10.1016/j.jconrel.2014.04.013.
[104] M. Pechar *et al.*, „Polymer Cancerostatics Targeted with an Antibody Fragment Bound via a Coiled Coil Motif: In Vivo Therapeutic Efficacy against Murine BCL1 Leukemia", *Macromol Biosci*, roč. 18, č. 1, 2018, doi: 10.1002/mabi.201700173.
[105] Y. Sun *et al.*, „Galactose-Containing Polymer-DOX Conjugates for Targeting Drug Delivery", *AAPS PharmSciTech*, roč. 18, č. 3, s. 749–758, dub. 2017, doi: 10.1208/s12249-016-0557-4.
[106] L. Li, J. Yang, J. Wang, a J. Kopeček, „Amplification of CD20 Cross-Linking in Rituximab-Resistant B-Lymphoma Cells Enhances Apoptosis Induction by Drug-Free Macromolecular Therapeutics", *ACS Nano*, roč. 12, č. 4, s. 3658–3670, dub. 2018, doi: 10.1021/acsnano.8b00797.
[107] Y. Matsumura a H. Maeda, „A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs", *Cancer Res.*, roč. 46, č. 12 Pt 1, s. 6387–6392, pro. 1986.
[108] S. K. Golombek *et al.*, „Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, roč. 130, s. 17–38, 2018, doi: 10.1016/j.addr.2018.07.007.
[109] F. Bordeleau *et al.*, „Matrix stiffening promotes a tumor vasculature phenotype", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, roč. 114, č. 3, s. 492–497, 17 2017, doi: 10.1073/pnas.1613855114.
[110] S. Mollazadeh, A. Sahebkar, F. Hadizadeh, J. Behravan, a S. Arabzadeh, „Structural and functional aspects of P-glycoprotein and its inhibitors", *Life Sci.*, roč. 214, s. 118–123, pro. 2018, doi: 10.1016/j.lfs.2018.10.048.
[111] T. Minko, P. Kopečková, a J. Kopeček, „Efficacy of the chemotherapeutic action of HPMA copolymer-bound doxorubicin in a solid tumor model of ovarian carcinoma", *International Journal of Cancer*, roč. 86, č. 1, s. 108–117, 2000, doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(20000401)86:1<108::AID-IJC17>3.0.CO;2-8.
[112] E. Koziolová, P. Chytil, T. Etrych, a O. Janoušková, „Ability of polymer-bound P-glycoprotein inhibitor ritonavir to overcome multidrug resistance in various resistant neuroblastoma cell lines", *Anticancer Drugs*, roč. 28, č. 10, s. 1126–1130, 2017, doi: 10.1097/CAD.0000000000000553.
[113] L. Kostka a T. Etrych, „High-molecular-weight HPMA-based polymer drug carriers for delivery to tumor", *Physiol Res*, roč. 65, č. Suppl 2, s. S179–S190, 20 2016, doi: 10.33549/physiolres.933420.
[114] I. Ekladious, Y. L. Colson, a M. W. Grinstaff, „Polymer-drug conjugate therapeutics: advances, insights and prospects", *Nat Rev Drug Discov*, roč. 18, č. 4, s. 273–294, 2019, doi: 10.1038/s41573-018-0005-0.
[115] J. Kopeček a H. Bažilová, „Poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide]—I. Radical polymerization and copolymerization", *European Polymer Journal*, roč. 9, č. 1, s. 7–14, led. 1973, doi: 10.1016/0014-3057(73)90063-3.
[116] P. Chytil, E. Koziolová, T. Etrych, a K. Ulbrich, „HPMA Copolymer-Drug Conjugates with Controlled Tumor-Specific Drug Release", *Macromolecular bioscience*, led. 2018. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28805040/ (viděno čvc. 21, 2020).
[117] P. Chytil, E. Koziolová, O. Janoušková, L. Kostka, K. Ulbrich, a T. Etrych, „Synthesis and Properties of Star HPMA Copolymer Nanocarriers Synthesised by RAFT Polymerisation Designed for Selective Anticancer Drug Delivery and Imaging", *Macromol Biosci*, roč. 15, č. 6, s. 839–850, čer. 2015, doi: 10.1002/mabi.201400510.
[118] L. Kostka *et al.*, „HPMA-based star polymer biomaterials with tuneable structure and biodegradability tailored for advanced drug delivery to solid tumours", *Biomaterials*, roč. 235, s. 119728, bře. 2020, doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119728.
[119] E. A. Lomkova *et al.*, „Biodegradable Micellar HPMA-Based Polymer-Drug Conjugates with Betulinic Acid for Passive Tumor Targeting", *Biomacromolecules*, roč. 17, č. 11, s. 3493–3507, 14 2016, doi: 10.1021/acs.biomac.6b00947.

[120] P. Chytil, M. Šírová, J. Kudláčová, B. Říhová, K. Ulbrich, a T. Etrych, „Bloodstream Stability Predetermines the Antitumor Efficacy of Micellar Polymer-Doxorubicin Drug Conjugates with pH-Triggered Drug Release", *Mol. Pharm.*, roč. 15, č. 9, s. 3654–3663, 04 2018, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00156.
[121] B. Říhová a M. Kovár, „Immunogenicity and immunomodulatory properties of HPMA-based polymers", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, roč. 62, č. 2, s. 184–191, úno. 2010, doi: 10.1016/j.addr.2009.10.005.
[122] B. Rihova *et al.*, „Induction of systemic antitumour resistance with targeted polymers", *Scand. J. Immunol.*, roč. 62 Suppl 1, s. 100–105, čvc. 2005, doi: 10.1111/j.1365-3083.2005.01617.x.
[123] T. Mrkvan *et al.*, „Chemotherapy based on HPMA copolymer conjugates with pH-controlled release of doxorubicin triggers anti-tumor immunity", *J Control Release*, roč. 110, č. 1, s. 119–129, pro. 2005, doi: 10.1016/j.jconrel.2005.09.028.
[124] M. Sirova *et al.*, „Treatment with HPMA copolymer-based doxorubicin conjugate containing human immunoglobulin induces long-lasting systemic anti-tumour immunity in mice", *Cancer Immunol. Immunother.*, roč. 56, č. 1, s. 35–47, led. 2007, doi: 10.1007/s00262-006-0168-0.
[125] J. Fučíková, J. Bartůňková, a R. Špíšek, „[The Concept of Immunogenic Cell Death in Antitumor Immunity]", *Klin Onkol*, roč. 28 Suppl 4, s. 4S48-55, 2015, doi: 10.14735/amko20154s48.
[126] M. Sirova *et al.*, „HPMA copolymer-bound doxorubicin induces immunogenic tumor cell death", *Curr. Med. Chem.*, roč. 20, č. 38, s. 4815–4826, 2013, doi: 10.2174/09298673113206660281.
[127] L. Apetoh, G. Mignot, T. Panaretakis, G. Kroemer, a L. Zitvogel, „Immunogenicity of anthracyclines: moving towards more personalized medicine", *Trends Mol Med*, roč. 14, č. 4, s. 141–151, dub. 2008, doi: 10.1016/j.molmed.2008.02.002.
[128] L. Zitvogel, O. Kepp, L. Senovilla, L. Menger, N. Chaput, a G. Kroemer, „Immunogenic tumor cell death for optimal anticancer therapy: the calreticulin exposure pathway", *Clin. Cancer Res.*, roč. 16, č. 12, s. 3100–3104, čer. 2010, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2891.
[129] A. Braunová *et al.*, „Polymer nanomedicines based on micelle-forming amphiphilic or water-soluble polymer-doxorubicin conjugates: Comparative study of in vitro and in vivo properties related to the polymer carrier structure, composition, and hydrodynamic properties", *J Control Release*, roč. 321, s. 718–733, kvě. 2020, doi: 10.1016/j.jconrel.2020.03.002.
[130] A. L. Tang *et al.*, „CTLA4 expression is an indicator and regulator of steady-state CD4+FoxP3+ T cell homeostasis", *J Immunol*, roč. 181, č. 3, s. 1806–1813, srp. 2008.
[131] L. Sivak *et al.*, „Overcoming multidrug resistance via simultaneous delivery of cytostatic drug and P-glycoprotein inhibitor to cancer cells by HPMA copolymer conjugate", *Biomaterials*, roč. 115, s. 65–80, 2017, doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.11.013.
[132] K. Dai, L. Huang, Y.-B. Huang, Z.-B. Chen, L.-H. Yang, a Y.-A. Jiang, „1810011o10 Rik Inhibits the Antitumor Effect of Intratumoral CD8+ T Cells through Suppression of Notch2 Pathway in a Murine Hepatocellular Carcinoma Model", *Front Immunol*, roč. 8, s. 320, 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.00320.
[133] B. Říhová *et al.*, „Synergistic action of doxorubicin bound to the polymeric carrier based on N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers through an amide or hydrazone bond", *Mol. Pharm.*, roč. 7, č. 4, s. 1027–1040, srp. 2010, doi: 10.1021/mp100121g.

9 PŘÍLOHY

9.1 Příloha 1: Reprezentativní dot-ploty ke grafům na obrázku 9



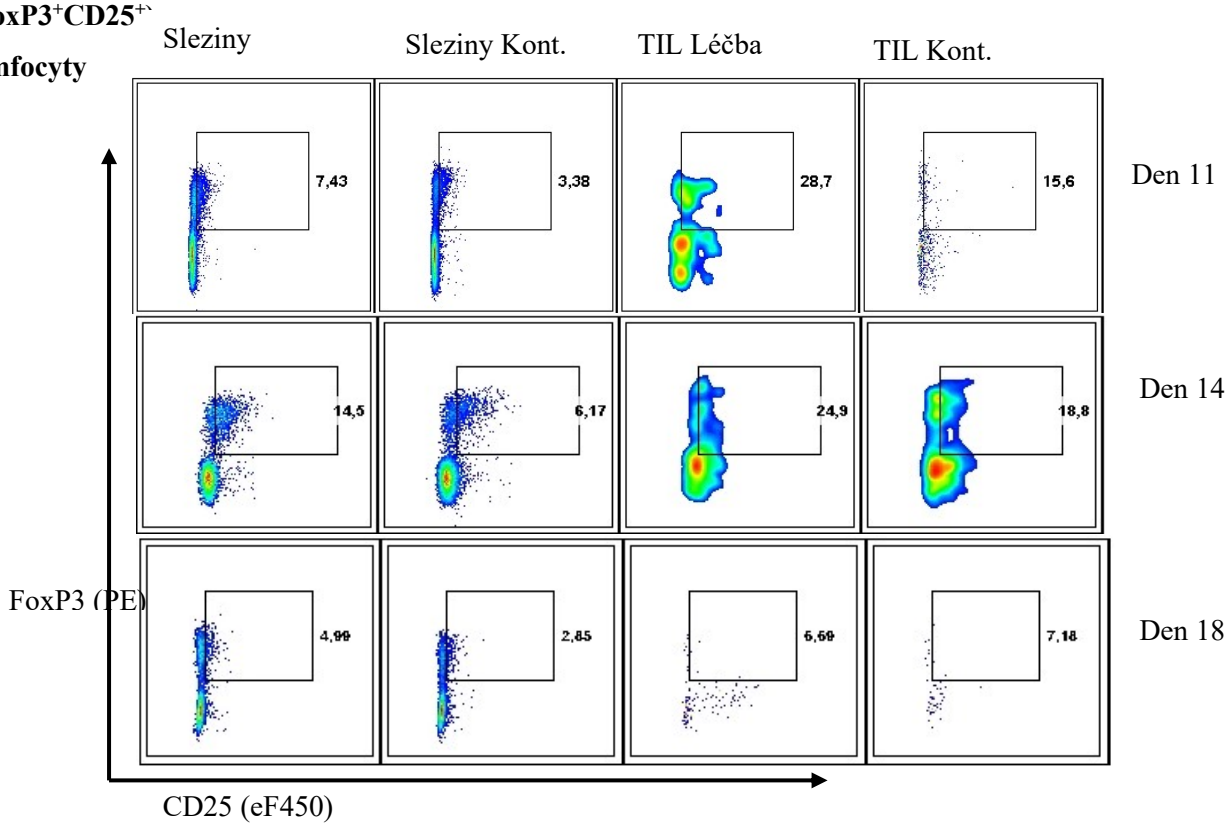


9.2 Příloha 2: Reprezentativní dot-ploty ke grafům na obrázku 10 a 11

Treg

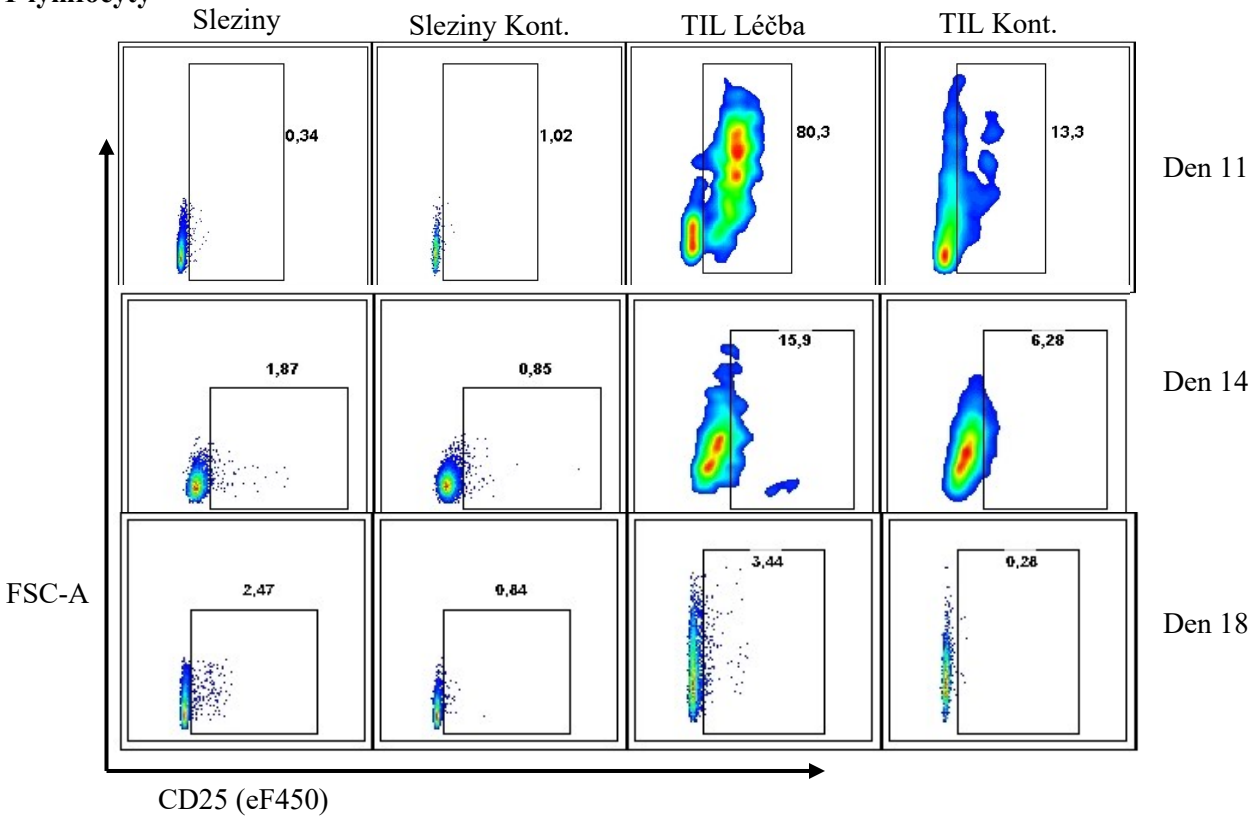
(FoxP3^{+}CD25^{+})

lymfocyty

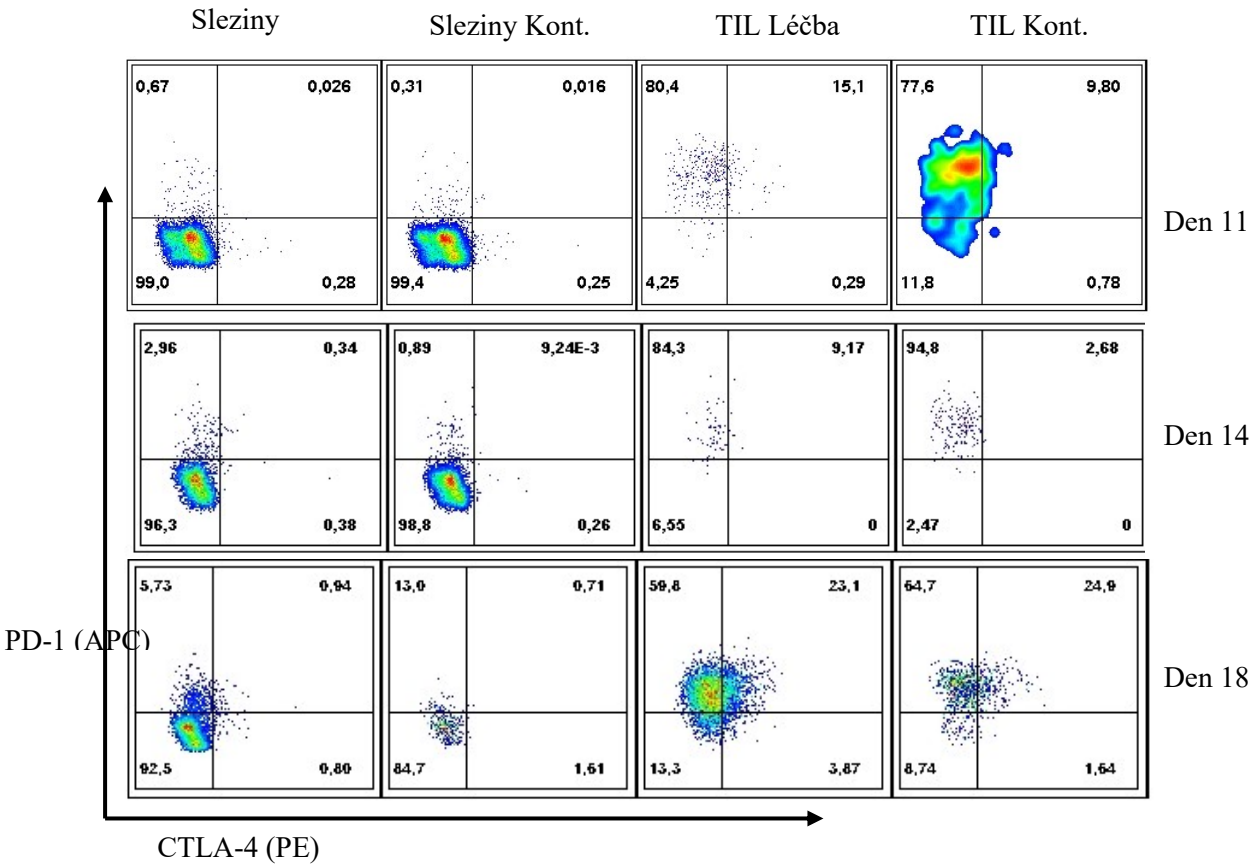


CD8^{+}CD25^{+}

T lymfocyty

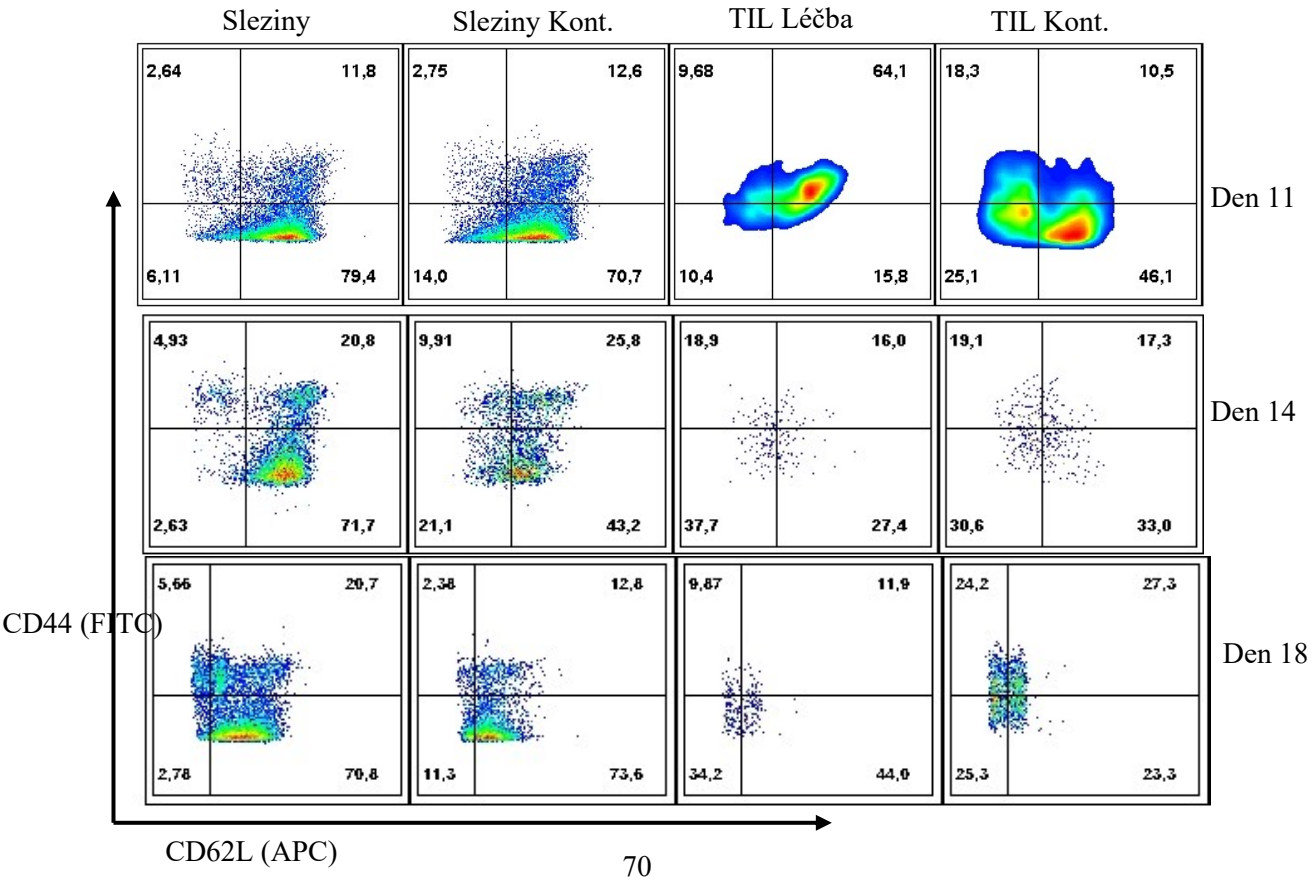


PD-1$^+$, CTLA-4$^+$ T lymfocyty

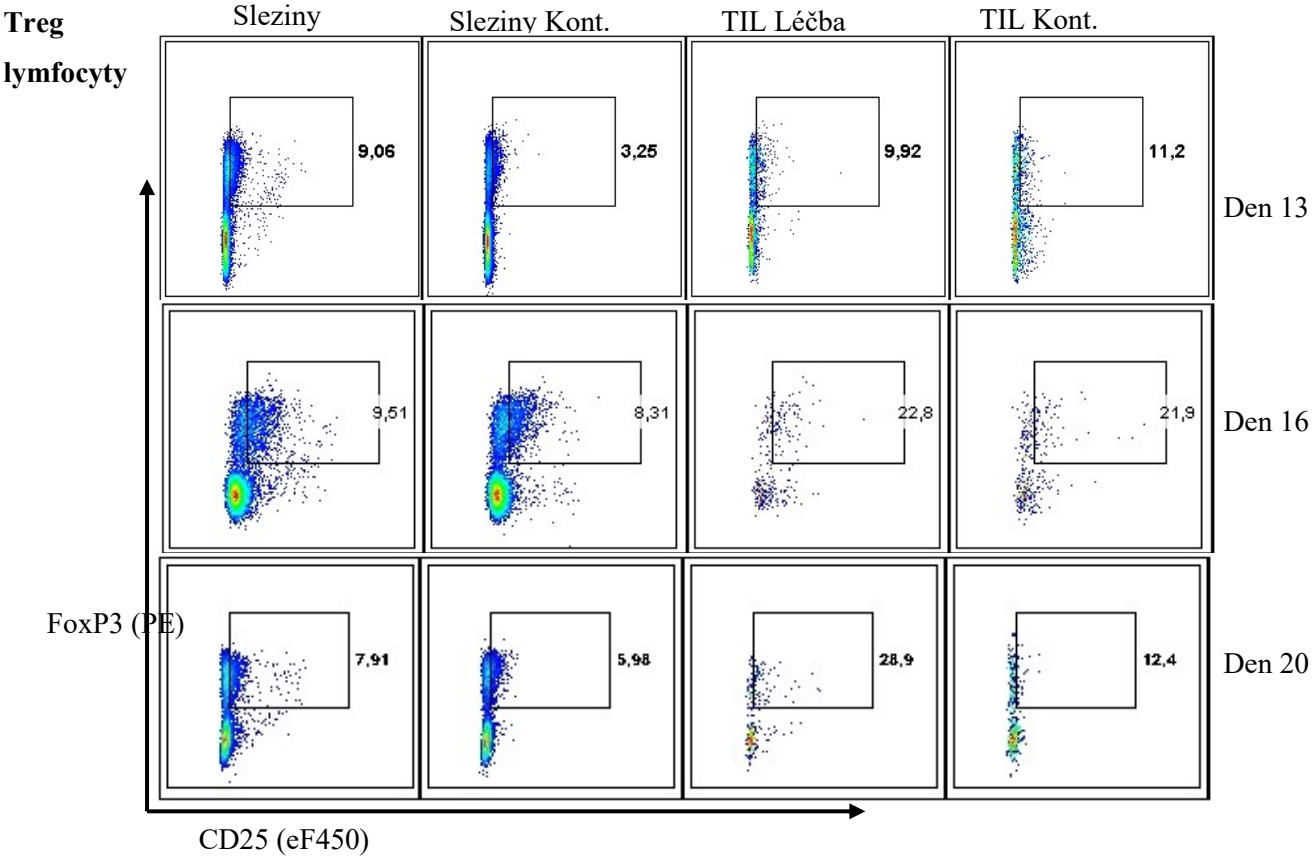


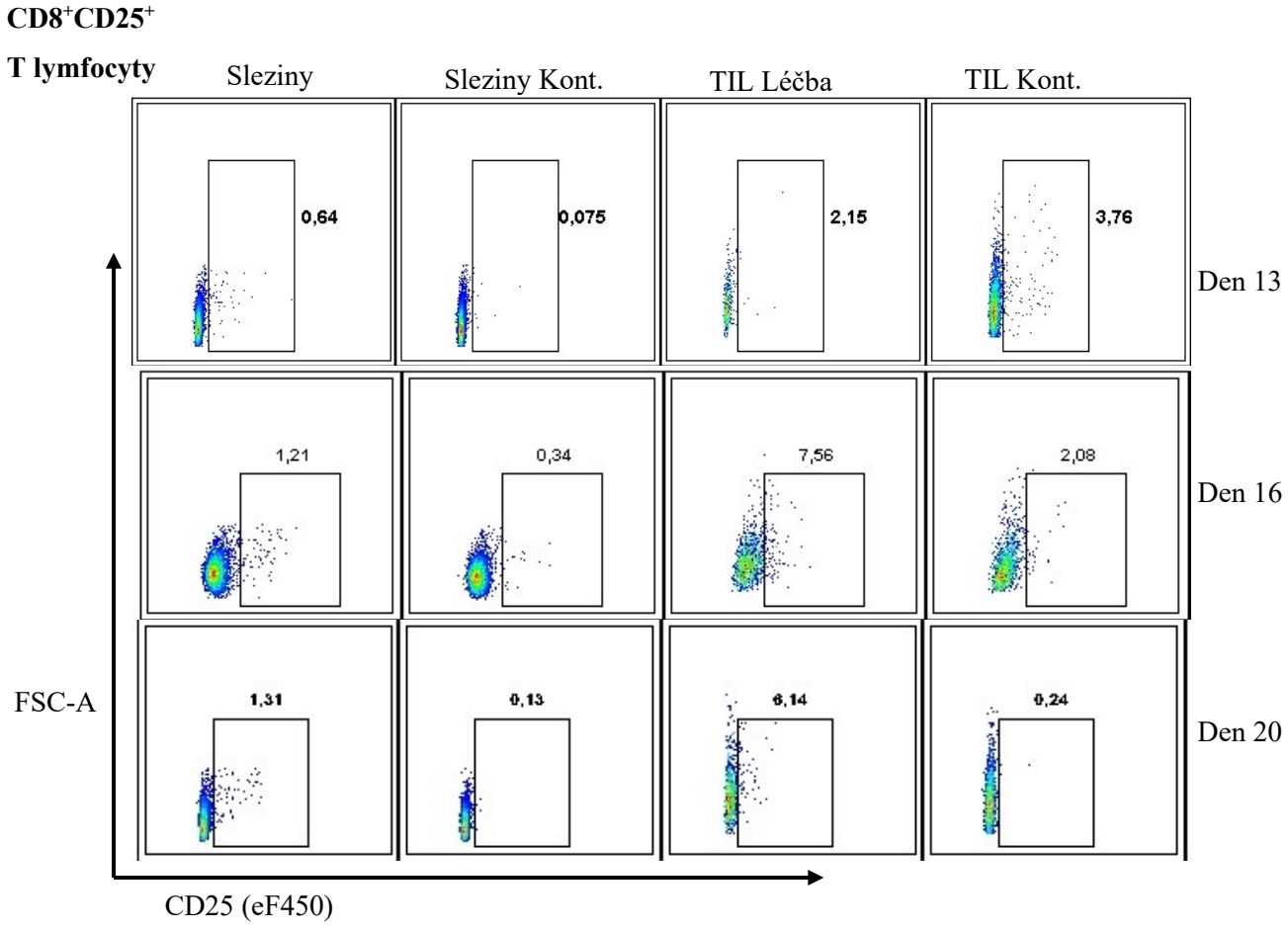
Efektorové a centrální paměťové

T lymfocyty



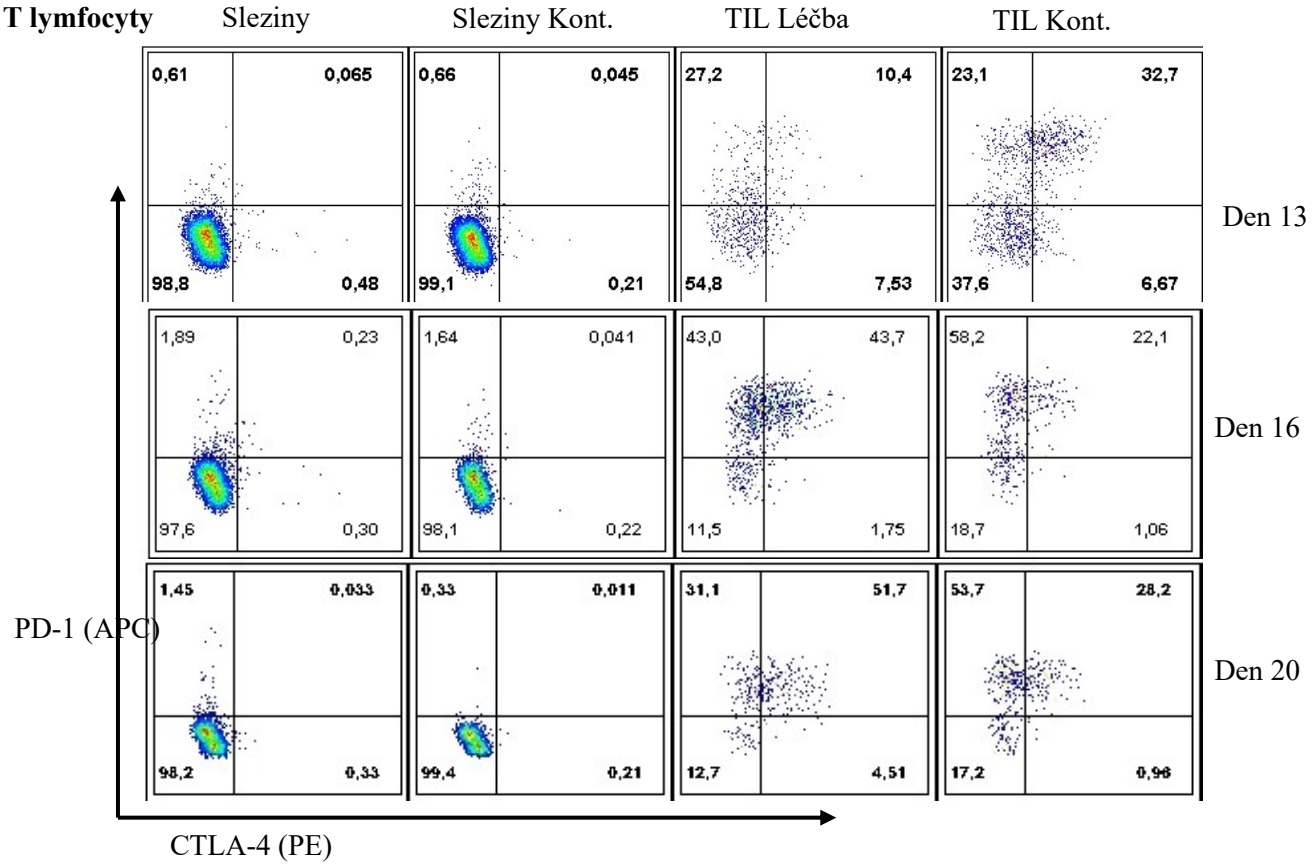
9.3 Příloha 3: Reprezentativní dot-ploty ke grafům na obrázku 12, 13





PD-1$^+$, CTLA-4$^+$

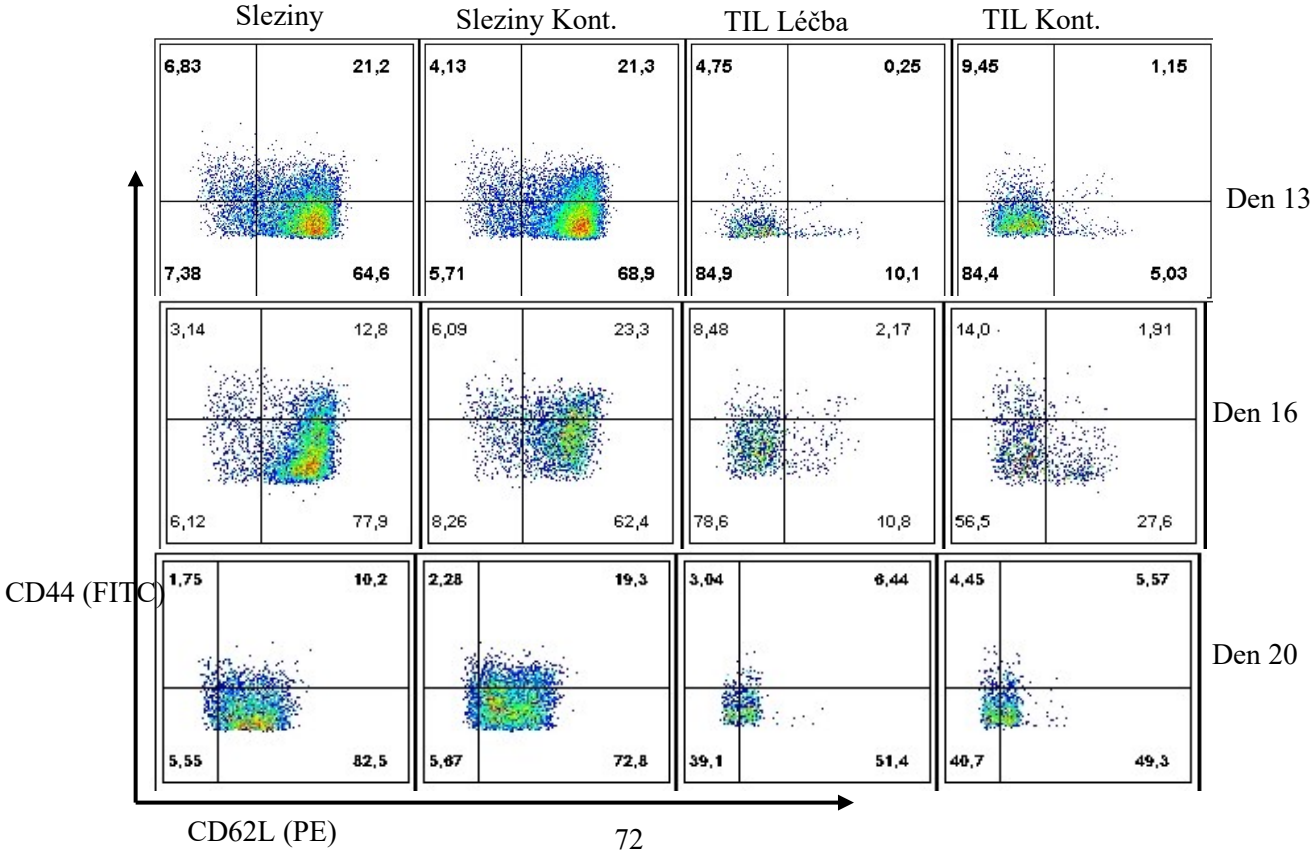
T lymfocyty



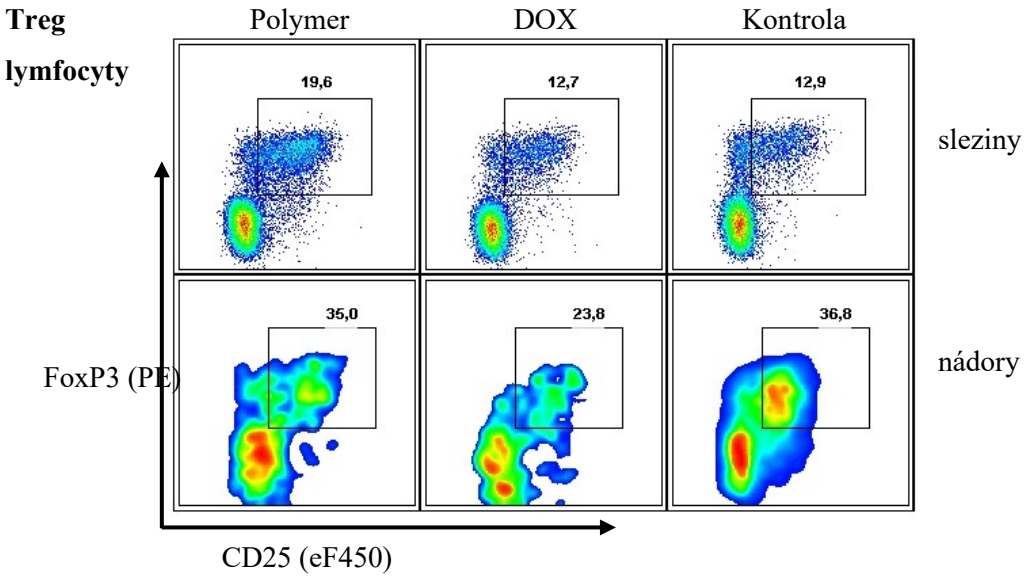
Efektorové a

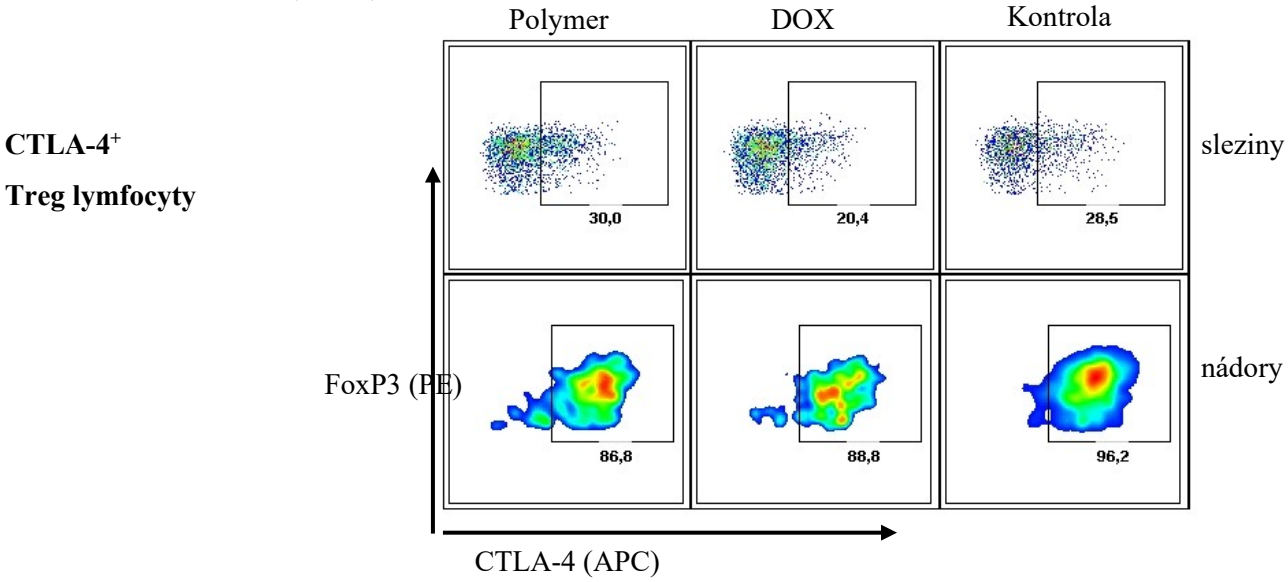
centrální paměťové

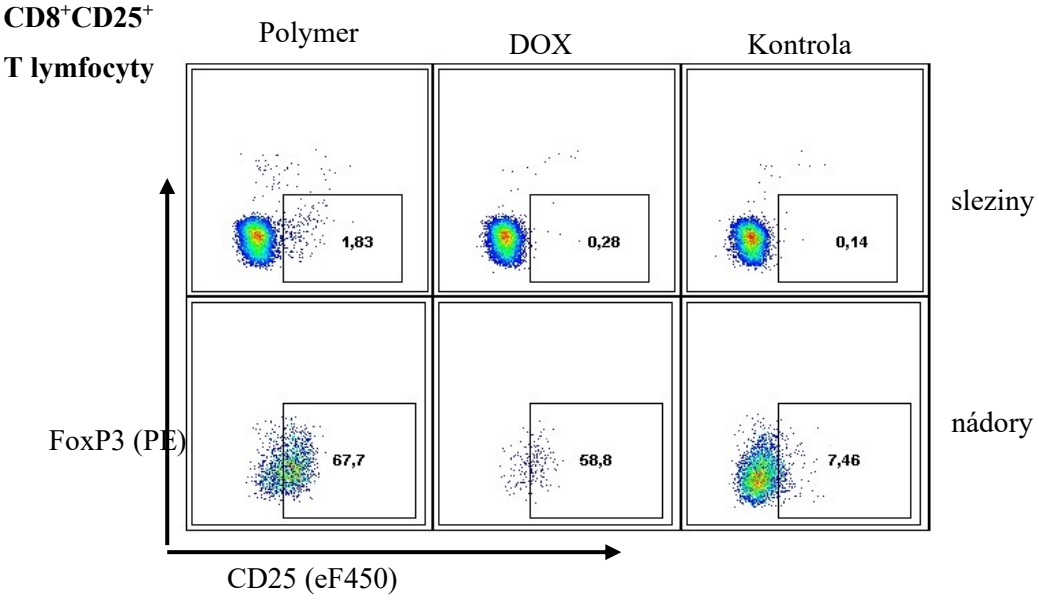
T lymfocyty



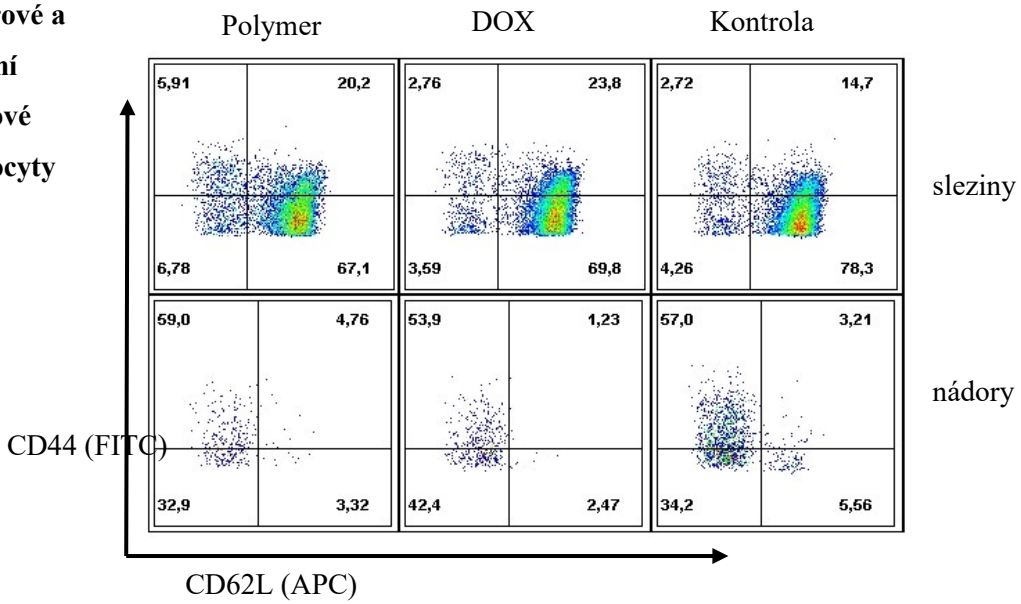
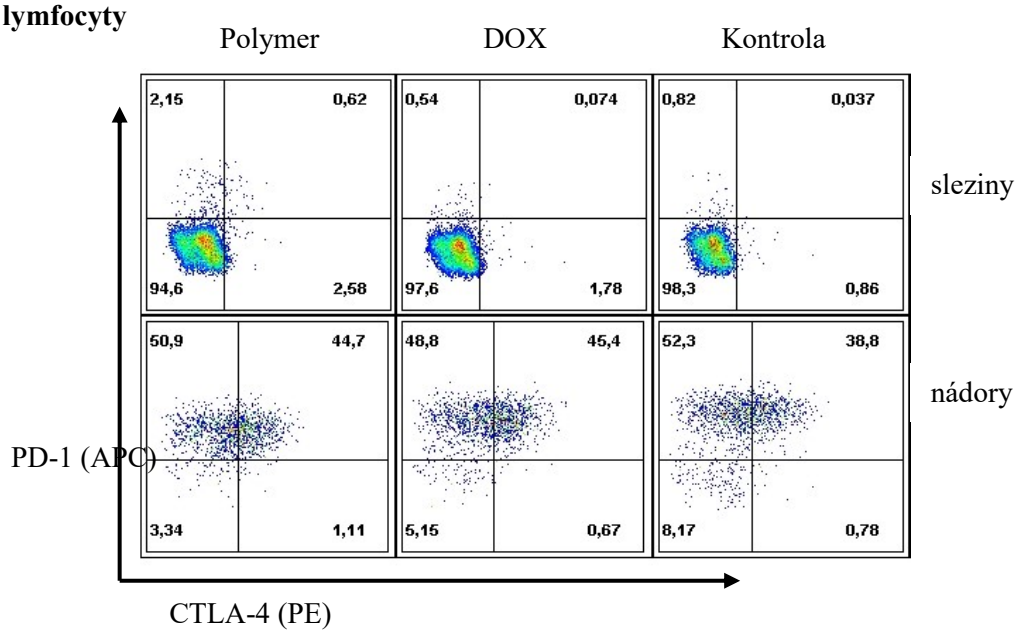
9.4 Příloha 4: Reprezentativní dot-ploty ke grafům na obrázku 15, 16







Efektorové a centrální paměťové T lymfocyty



PD-1^{+}, CTLA-4^{+} T lymfocyty