

**Univerzita Karlova**  
**2. lékařská fakulta**

---

Studijní program: Imunologie



**Mgr. Kateřina VÁVROVÁ**

**Adoptivní transfer tumor-specifických lymfocytů v imunoterapii  
nádorových onemocnění**

Adoptive transfer of tumor-specific lymphocytes for cancer  
immunotherapy

Disertační práce

Školitelka: Prof. MUDr. Jiřina Bartůňková, DrSc., MBA

---

Praha 2020

## **PROHLÁŠENÍ**

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

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

V Praze dne 22. 3. 2020

Mgr. Kateřina Vávrová

## **IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM**

VÁVROVÁ, Kateřina. Adoptivní transfer tumor-specifických lymfocytů v imunoterapii nádorových onemocnění. [Adoptive transfer of tumor-specific lymphocytes for cancer immunotherapy]. Praha, 2020. 106 stran. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Ústav imunologie UK 2. LF a FN Motol.  
Školitelka: Bartůňková, Jiřina.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Velmi ráda bych poděkovala prof. MUDr. Jiřině Bartůňkové, DrSc., MBA za její odborné vedení, podporu v dalším vzdělávání a za poskytnutí příležitosti podílet se na projektu T buněčné terapie. Děkuji Rudovi Horváthovi za plamenné, avšak plodné odborné diskuze, Kamile Alexové Žůrkové za zasvěcení do laboratorních metod a za pomoc s vyhodnocováním dat a také Dominikovi Filippovi za jeho cenné nápady, rady a připomínky. Chtěla bych také poděkovat kolegům a přátelům Petře, Janě, Zuzce, Tomášovi, Honzovi V. a všem ostatním, kteří se na projektu podíleli nebo s ním pomáhali. V neposlední řadě děkuji mé rodině a Lubošovi za jejich trpělivost, lásku, poskytování klidného zázemí a za jejich podporu po celou dobu mého studia.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACT	adoptivní T buněčný transfer, adoptivní T buněčná terapie
ADC	antibody-drug conjugates
ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách
ADT	androgen deprivace terapie
AICD	aktivaci indukovaná buněčná smrt
APC	antigen prezentující buňka
B-ALL	B buněčná akutní lymfoblastická leukemie
BAT3	HLA- B – associated transcript 3
BR	biochemický relaps
BCR	receptor B lymfocytů
CAR	chimérický antigenní receptor
CCL, CXCL	typy chemokinů
CCR	typ chemokinových receptorů
CD	diferenční antigen (cluster of differentiation)
CDC	complement dependent cytotoxicity
CMV	cytomegalovirus
CRPC	kastračně rezistentní karcinom prostaty
CTL	cytotoxické T lymfocyty
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DC	dendritická buňka
DCVAC/PCa	dendritic cell vaccine against prostate cancer
DNA	kyselina deoxyribonukleová
EBV	virus Epsteina-Barrové
FDA	Food and Drug Administration
FoxP3	forkhead box P3
G-CSF	faktor stimulující granulocytární kolonie
GITR	glukokortikoid-induced TNF receptor-related gene
GM-CSF	granulocyty a makrofágy stimulující faktor
GMP	správná výrobní praxe (good manufacturing practice)
gp	glykoprotein
HR	hormonálně refrakterní

HLA	lidský leukocytární antigen (human leukocyte antigen)
ICAM	intercellular adhesion molekule
IDO	indolamine-2,3-deoxygenáza
IFN	interferon
IL	interleukin
IU	international unit
iNOS	inducible nitric oxide synthese
LAK	lymfokine-activated killer cells
LFA-3	lymphocyte function-associated antigen 3
LNCaP	lidská nádorová linie karcinomu prostaty
MAGE-A1,3, 4	melanome associated antigen 1,3, 4
MART-1	melanoma antigen recognized by T cells 1
MDSC	myeloid derived suppressor cells
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MPO	myeloperoxidáza
MRD	minimální reziduální nemoc
NET	neutrofilní extracelulární past (neutrophil extracapsular trap)
NGEP	new gene expressed in prostate
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NK	NK buňky (natural killer)
NO	oxid dusnatý
NY-ESO-1	New York esophageal squamous cell carcinoma 1
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PAP	kyselá prostatická fosfatáza
PBMC	periferní krevní mononukleární buňky
PD-1	programmed cell death protein 1
PD-L1	programmed death-ligand 1
poly I:C	polyinosinic:polycytidylic acid
PRR	pattern recognition receptor
PSA	prostatický specifický antigen
PSADT	PSA doubling time
PSCA	antigen prostatických kmenových buněk
PSMA	prostatický specifický membránový antigen

REP	rapid expansion protocol
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
SKOV-3	lidská ovariální nádorová linie
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TAA	antigeny asociované s nádory
TARP	T cell receptor gamma alternate reading frame protein
TAM	tumor asociované makrofágy
TAN	tumor asociované neutrofily
TCM	centrální paměťové T lymfocyty
TCR	receptor T lymfocytů
TEM	efektorové paměťové T lymfocyty
TGF	transformující růstový faktor
Th	pomocný T lymfocyt
TIDC	tumor-infiltrating dendritic cell
TIL	tumor infiltrující lymfocyty
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor necrosis faktor
Treg	regulační T lymfocyt
TRUCK	T cell redirected for universal cytokine-mediated killing
TSA	antigeny specifické pro nádory
ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor

## ABSTRAKT

Karcinom prostaty je druhou nejčastější příčinou úmrtí mužů na rakovinu v Evropě a USA. V kontextu dosavadních preklinických experimentů a klinických studií existují předpoklady pro úspěšné uplatnění imunoterapie v jeho léčbě. Slibných výsledků je dosaženo převážně kombinací různých léčebných modalit, kdy dochází k jejich synergickému protinádorovému působení. Jednou z možností je využití protinádorových vakcín a adoptivního T buněčného transferu.

Téma této dizertační práce navazuje na dlouhodobý výzkumný program pracoviště kandidátky v oblasti protinádorové imunoterapie. Obecná část dizertační práce podává základní přehled o mechanismech protinádorové imunity a o roli jednotlivých složek imunitního systému při jejím zajištění. Další části se věnují současným imunoterapeutickým přístupům s důrazem na metodu adoptivního T buněčného transferu a jejího uplatnění v léčbě karcinomu prostaty. Ve vlastní výzkumné části předkládá vypracovaný experimentální protokol pro adoptivní transfer tumor specifických T lymfocytů, a dále protokol zabývající se *ex vivo* obohacením buněčných populací o peptid-specifické T lymfocyty u pacientů s karcinomem prostaty. V rámci našeho výzkumu uvádíme též výsledky klinické studie, která si kladla za cíl ověřit biologickou bezpečnost, schopnost indukce imunitní protinádorové odpovědi a zhodnotit klinické odpovědi pacientů na imunoterapeutický léčivý přípravek na bázi dendritických buněk s označením DCVAC/PCa.

### **Klíčová slova:**

adoptivní T buněčný transfer, DCVAC/PCa, karcinom prostaty, protinádorová imunoterapie

## **ABSTRACT**

Prostate cancer is the second leading cause of cancer death in men in Europe and the US. In the context of previous preclinical experiments and clinical studies there are certain assumptions predicating successful application of immunotherapy in the treatment of patients with prostate cancer. Promising results have been achieved by a combination of different treatment modalities which provide a synergistic antitumor effect. One of these combinatorial options is the use of antitumor vaccines and adoptive T cell transfer.

The topic of this thesis is to provide a fresh insight into the past and current trends following the long-term candidate's department program in the field of anti-tumor immunotherapy. The experimental part of this thesis revolves around our own results published in this field. The introductory chapter delivers a basic overview of cellular mechanisms of anti-tumor immunity and the role of individual immune components in these processes. Following chapters are dedicated to current immunotherapeutic approaches with emphasis on the adoptive T cell transfer and implication of this technology in the treatment of prostate cancer. The results section describes the establishment of our protocol for adoptive T cell transfer as well as the protocol for *ex vivo* enrichment of human T cell populations for cancer peptide-reactive T lymphocytes in patients with prostate cancer. Importantly, this thesis also includes our clinical data aimed at testing the biosafety of established protocol, evaluation of the capacity of patients T cells to induce anti-tumor immune responses as well as the assessment of the patient's clinical responses to a DCVAC/PCa dendritic cell-based vaccine.

### **Key words:**

adoptive T cell transfer, DCVAC/PCa, prostate cancer, antitumor immunotherapy



## OBSAH

1	ÚVOD .....	11
1.1	Role jednotlivých složek imunity v obraně proti nádorům.....	12
1.1.1	Složky přirozené imunity .....	12
1.1.2	Složky adaptivní imunity.....	18
1.2	Editace nádoru imunitním systémem .....	23
1.3	Únikové cesty nádorových buněk před imunitním systémem .....	24
2	CHARAKTERISTIKA A MOŽNOSTI IMUNOTERAPEUTICKÝCH PŘÍSTUPŮ .....	26
2.1	Přístupy antigenně nespecifické.....	26
2.2	Přístupy antigenně specifické.....	27
3	PROTINÁDOROVÁ IMUNOTERAPIE POMOCÍ DENDRITICKÝCH BUNĚK .....	30
3.1	Charakterizace stádií a subpopulací dendritických buněk .....	30
3.2	Způsoby využití dendritických buněk v imunoterapii nádorových onemocnění 32	
4	PROTINÁDOROVÁ IMUNOTERAPIE ZALOŽENÁ NA PRINCÍPECH ADOPTIVNÍHO TRANSFERU TUMOR SPECIFICKÝCH T LYMFOCYTŮ.....	34
4.1	Imunitní reakce založené na T lymfocytech .....	35
4.2	Adoptivní T buněčná terapie.....	37
4.2.1	Imunoterapie malignit asociovaných s viry pomocí cytotoxických T lymfocytů 37	
4.2.2	Terapie tumor infiltrujícími T lymfocyty.....	37
4.2.3	Terapie geneticky modifikovanými T lymfocyty.....	39
4.2.4	Kombinované přístupy adoptivního transferu T lymfocytů s imunoterapií dendritickými buňkami .....	42
4.2.5	Strategie zlepšení efektivity adoptivního transferu tumor specifických T lymfocytů .....	43
5	KARCINOM PROSTATY .....	45

5.1	Epidemiologie a léčba .....	45
5.2	Přehled současné imunoterapie u karcinomu prostaty .....	46
6	CÍLE PRÁCE.....	49
7	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	50
7.1	Příloha 1: Výroba efektorových T lymfocytů pro adoptivní terapii s použitím dendritických buněk pulzovaných usmrcenou prostatickou nádorovou linií 50	
7.2	Příloha 2: <i>Ex vivo</i> obohacení buněčné populace o peptid-specifické T lymfocyty a následná detekce T lymfocytů reaktivních k nádorově asociovaným antigenům u pacientů s karcinomem prostaty.....	53
7.3	Příloha 3: Fáze I. / II. klinického hodnocení aktivní buněčné imunoterapie založené na dendritických buňkách pomocí preparátu DCVAC / PCa u pacientů s karcinomem prostaty s rostoucí hladinou PSA po primární prostatektomii nebo salvage radioterapii .....	54
8	SOUHRN.....	56
9	SUMMARY .....	58
10	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	60
11	SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ.....	69

## 1. ÚVOD

Hlavním úkolem imunitního systému je udržení integrity organismu tím, že ho chrání před potencionálně nebezpečnými agens infekčního a neinfekčního původu. Z evolučního hlediska se primárně formoval obranou proti infekcím, které se nejvyšší měrou podílely na úmrtnosti lidské populace. Schopnost adaptace a formování imunitního systému proti nádorům se rozvinula později, a to především pod vlivem rostoucí socioekonomické prosperity a dostupnosti léčiv, kdy došlo k významnému demografickému stárnutí populace, a tím k vyššímu výskytu malignit. Dnes se nádorová onemocnění řadí na přední příčky úmrtnosti, v České republice jsou příčinou zhruba čtvrtiny všech úmrtí.

Karcinom prostaty patří mezi nejčastější zhoubná onemocnění postihující muže starší padesáti let. I zde převládá základní léčebné schéma solidních nádorů - chirurgické vyjmutí, zničení nádorových buněk ozařováním a chemoterapií. Současné terapeutické postupy jsou vysoce efektivní v léčbě časných stádií nemoci, nicméně u metastazujícího karcinomu je situace komplikovanější a tito pacienti mají významně horší prognózu. Snahou moderních postupů je obejít limitující a rizikové faktory „klasických“ protinádorových léčiv - jejich toxicitu a nespecifičnost, které se projevují útlumem krvetvorby a poškozením některých tkání a orgánů. V důsledku toho se nyní velká pozornost zaměřuje na relativně nový přístup, tzv. cílenou imunoterapii, která využívá přirozené imunitní mechanismy k aktivaci protinádorové imunity. Jednou z nejperspektivnějších terapeutických strategií je v současnosti aktivní buněčná imunoterapie založená na adoptivním T buněčném transferu (ACT; adoptive T cell transfer). Tato terapie spočívá v namnožení pacientových T lymfocytů *ex vivo*, případně v jejich modifikaci a v následném vrácení zpět ve formě infuze. ACT představuje typ léčby, jejímž cílem je aktivovat vlastní imunokompetentní buňky pacienta a zesílit tak žádoucí protinádorovou imunitní odpověď. Své místo nachází v kombinaci s jinými léčebnými modalitami zaměřenými na nádorové mikroprostředí. Na rozdíl od jiných léčebných zásahů, především díky využití autologních buněk pacienta, slibuje možnost narušení nádorových buněk s minimálním poškozením přilehlých tkání.

## 1.1 Role jednotlivých složek imunity v obraně proti nádorům

Imunitní systém se prokazatelně podílí na prevenci vzniku i kontrole růstu nádorů. Poskytuje organizmu ochranu před nádory indukovanými virem odstraněním nebo potlačěním virové infekce. Zodpovídá také za včasné odstranění patogenů a zabraňuje vzniku zánětu, který by mohl vytvořit chronické zánětlivé prostředí podporující maligní bujení. Jeho nejdůležitějším úkolem je tzv. imunitní dohled nad vnitřním prostředím organismu, schopnost včas zachytit nádorově transformované buňky, které unikly vnitřním kontrolním tumor supresorovým mechanismům a následně je eliminovat. V opačném případě hrozí riziko rozvoje nádoru a s tím spojená klinická manifestace onkologického onemocnění. Z tohoto důvodu je kontrola růstu nádorových buněk důležitá zejména v raných stádiích kancerogeneze. V případě protinádorové obrany je vyžadována součinnost mechanismů přirozené i adaptivní imunity. K selhání těchto mechanismů dochází zejména proto, že nádory vznikají z normálních buněk, k nimž je ustanovena tolerance a které jsou navíc často rezistentní k apoptotickým signálům. Přeměna nádorové buňky probíhá vícestupňovým procesem zvaným kancerogeneze (neoplastická transformace), při kterém dochází k postupné akumulaci genetických (případně epigenetických) změn, které postihují protoonkogeny a/nebo tumor-supresorové geny. Většina nádorových buněk je tedy vnímána jako tělu „vlastní“ nebo antigeně podobná a tudíž nedostatečně imunogenní. Výjimkou silnější imunitní odpovědi jsou nádory způsobené onkogenními viry. Maligní fenotyp buněk je dále charakterizován schopností utlumit nebo zcela uniknout obranným mechanismům imunitního systému, genomovou nestabilitou, neomezeným replikačním potenciálem, angiogenezí, rezistencí k růstovým inhibičním signálům, soběstačností růstových signálů, schopností invaze a tvorby metastáz ve vzdálených tkáních [1].

### 1.1.1 Složky přirozené imunity

Prvotní detekci nebezpečného agens a aktivaci obranných mechanismů *in situ* většinou provádějí jak buněčné (granulocyty, makrofágy, NK buňky; natural killers), tak humorální (cytokiny, granzymy, perforiny, komplement) složky přirozené imunity. Jejich rychlé působení je do jisté míry efektivní, i bez spolupráce se složkami specifické imunity.

Prokazatelně nejpočetnější populací imunokompetentních buněk v oblasti nádoru jsou fagocytující **neutrofilny**, které působí v zánětlivém prostředí. Zánětlivá reakce asociovaná s nádorem je dnes uznávána jako centrální mechanismus u mnoha malignit a je považována za zdroj prognostických a prediktivních biomarkerů. V nádorovém mikroprostředí paradoxně podporuje růst a invazi nádoru [1, 2]. Neutrofilny migrují do zasažené tkáně na základě chemotaxe, reagují na IL-8, C3a, C5a, leukotrien B4 a další chemokiny. Likvidaci cílové buňky provádějí třemi způsoby: fagocytózou, frustrovanou fagocytózou nebo tvorbou extracelulárních neutrofilních sítí (NETs). Fagocytóza spočívá v likvidaci extracelulárních částic respiračním vzplanutím, které umožňuje NADPH-oxidáza, nebo fúzí fagozomu s granuly obsahující antimikrobiální látky (např. defensiny, lysozym). Reaktivní formy kyslíku (ROS), vzniklé v průběhu fagocytózy, mohou mít buď cytotoxický (vedoucí k regresi tumoru) nebo genotoxický efekt (iniciace poškození DNA) [3]. Azurofilní granula neutrofilů obsahují enzym myeloperoxidázu, která katalyzuje superoxidový radikál s chlorem na kyselinu chlornou [4], potřebnou pro destrukci patogenu. Za určitých podmínek mohou mít uvolněné defensiny, proteázy a myeloperoxidáza také silnou protinádorovou cytotoxickou aktivitu [5].

K frustrované fagocytóze dochází tehdy, když neutrofil není schopen pohltit cílovou cizorodou strukturu v důsledku její velikosti. Následkem toho dochází k uvolnění ROS a obsahu neutrofilních granul exocytózou do okolí buňky [6]. Rozpoznání velikosti cílové buňky se děje pravděpodobně prostřednictvím fagocytárního receptoru dectin-1, jehož přemostění negativně reguluje tvorbu NETs [7].

Třetím druhem likvidace buněk je tvorba extracelulárních neutrofilních sítí, které zachycují mikroby a fyzicky zamezí jejich rozšíření z místa infekce. NETs vznikají procesem zvaný NETóza, což je forma apoptózy, která vede ke vzniku vláknité sítě jaderného chromatinu nesoucího globulární domény obsahující proteiny z primárních (elastáza, MPO, katepsin G), sekundárních a terciálních granul (gelatináza a laktoferin). Tvorba NETs vyžaduje primární stimulaci např. přes TLR4 mikrobiálními produkty a přemostění receptoru CR3 [8], k uvolnění NETs do extracelulárního prostoru dochází po prasknutí buněčné membrány. Klíčovou roli hraje též přítomnost ROS a nezbytně nutné je i uvolnění neutrofilní elastázy [8]. Mechanismus NETs byl dříve pozorován pouze u infekcí, dnes již byla jejich přítomnost prokázána i v nádorovém mikroprostředí [9, 10] při podpoře trombózy [11] a koagulaci [12].

U onkologických pacientů se setkáváme se zvýšeným množstvím neutrofilů v periferní krvi, vnímaném jako klinický negativní prognostický faktor [13]. Neutrofilie je

způsobena tím, že nádory produkují G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), který ovlivňuje rovnováhu retence a uvolňování neutrofilů v kostní dřeni, což vede ke zvýšení počtu periferních neutrofilů. Rozsáhlou metaanalýzou transkriptů nádorových tkání Gentles et al. prokázali, že nejméně příznivou prognostickou buněčnou populací jsou intratumorální neutrofilie [14], označované jako TAN (tumor associated neutroils). Existují však typy nádorů, u kterých je neutrofilie spojena s lepší prognózou [15]. Možným vysvětlením tohoto duálního jevu je existence 2 subpopulací TAN neutrofilů, polarizovaných na N1 a N2 fenotyp. Největší rozdíl mezi TAN a nativními neutrofilie je až stonásobně zvýšená produkce celého spektra cytokinů. N1TAN produkují prozánětlivé cytokiny (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12), zvyšují expresi ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) a směřují k eliminaci nádorových buněk uvolňováním kyslíkových radikálů a interakcí Fas - FasL. Oproti tomu N2TAN neutrofilie mají protumorózní efekt a tvorbou metaloproteináz napomáhají metastázování, podporují tvorbu cév a tlumí účinek CD8<sup>+</sup> T lymfocytů [16]. Přeměny od pronádorové k protinádorové aktivitě neutrofilů bylo dosaženo farmakologickými a imunomodulačními zásahy například inhibicí TGF- $\beta$  v nádoru hostitele, čímž se aktivovala protinádorová aktivita neutrofilů [5].

Neméně důležitou skupinou fagocytů jsou **makrofágy**, které se mimo jiné podílejí na regulaci zánětu, destrukci mikroorganismů a prezentaci antigenu T lymfocytům. Podle druhu cytokinového stimulu rozlišujeme nejméně dva typy aktivovaných makrofágů. Pod vlivem interferonu  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) vznikají prozánětlivé makrofágy typu M1 (produkující vysoké množství interleukinu 12 (IL-12) a IL-23 a zároveň nízké množství IL-10), které efektivně fagocytují a degradují zbytky odumřelých buněk, imunokomplexy v místě poškození tkání a likvidují pohlcené mikroorganismy. Jimi produkováný IL-12 stimuluje NK buňky a způsobuje diferenciaci Th1 lymfocytů, které svou produkcí IFN- $\gamma$  podporují makrofágy v eliminaci patogenu nebo nádoru. M1 makrofágy bojují proti nádoru uvolněním lysozomálních enzymů (ROS, NO) a také produkcí TNF a jsou přítomny hlavně v časných fázích vývoje nádoru.

Naopak pod vlivem Th2 produkováných cytokinů IL-4 a IL-13 vznikají z klidových makrofágů buňky typu M2, jejichž hlavní funkcí je napomáhat hojení a regeneraci při poranění tkání nebo při mikrobiální infekci. Makrofágy M2 produkují především protizánětlivé cytokiny IL-10 a TGF- $\beta$ . V závislosti na fázi svého vývoje

makrofágy dokážou nádorové buňky usmrtit, ale na druhé straně naopak podpořit jejich růst a šíření. Ukazuje se, že nádorové buňky odumírající apoptoticky, tedy způsobem probíhajícím spontánně i navozovaným řadou běžně používaných terapeutických postupů, výrazně stimulují makrofágy přítomné v nádoru a v jeho blízkosti k posílení M2 fenotypu, tedy k posílení jejich vlastností podporujících růst nádoru [17]. Tyto nádor infiltruující buňky typu M2 označujeme jako TAM (tumor associated macrophages). Vyskytují se v hypoxických podmínkách v pozdějších fázích kancerogeneze a produkují vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a TGF- $\beta$ , jež napomáhají angiogenezi nádoru. Zároveň svými působky (IL-10, prostaglandin E2) tlumí efektorové funkce T lymfocytů a NK buněk. M2 makrofágy dále produkují chemokinové ligandy CCL17, CCL22 a CCL24, které přitahují regulační T lymfocyty (Treg). Diferenciace M2 makrofágů je indukována CD4+25+ Treg buňkami, zatímco M1 makrofágy mohou být indukovány CD4+25 – T efektorovými buňkami. Diferenciace M1/ M2 je tedy modifikována přítomností Treg.

Nově objevenou součástí protinádorové imunitní odpovědi je fagocytická aktivita makrofágů, která cílí na molekulu CD47. Za fyziologických podmínek slouží interakce mezi CD47 na zdravých buňkách a inhibičním receptorem SIRPa na makrofázích jako ochrana před fagocytózou. Za patologických podmínek nadměrná exprese CD47 (tzv. „don't-eat-me“ signálu) na solidních i hematologických nádorech [18-20] zabraňuje účinné eliminaci tumoru makrofágy. Na četných modelech bylo prokázáno, že blokáda CD47/SIRPa pomocí monoklonálních protilátek stimuluje *in vitro* fagocytózu rakovinných buněk makrofágy, inhibuje růst nádoru *in vivo* [21-23] a vede k iniciaci protinádorové T buněčné reakce [24]. Řada studií ukazuje, že k aktivaci fagocytózy nestačí pouze odstranění inhibičního signálu, ale zároveň je třeba i druhý, stimulační signál např. pomocí CpG oligodeoxynukleotidu [25] nebo kalretikulinu [26].

Nezastupitelnou roli hrají **NK buňky** – granulární lymfocyty bez imunologické paměti, které mají zásadní význam pro rychlou eliminaci nádorových a virem infikovaných buněk. NK buňky cytotoxicky zabíjí pomocí tzv. ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) působením perforinů a granzymů nebo indukci apoptózy vazbou Fas (CD95)- FasL (CD95L), a to bez nutnosti receptoru pro antigen na cílové buňce. Procesem zvaným ADCC, neboli buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách, se rozumí aktivace NK buněk vazbou receptoru CD16 a Fc fragmentu protilátky IgG na povrchu opsonizovaných buněk. Navázání protilátky na povrchu cílové

buňky na receptor CD16 vyvolá vzestup koncentrace intracelulárního vápníku, aktivaci NFAT (nuclear factor of activated T cells), produkci cytokinů (IFN- $\gamma$ , GM-CSF, TNF- $\alpha$ ), následnou degranulaci buňky a uvolnění granzymů a perforinů. Perforiny mají schopnost vytvářet v cytoplazmatické membráně buněk póry, které buňku destabilizují, zatímco granzymy spustí proces apoptózy [27].

Na základě exprese povrchových molekul CD56 (NCAM, neurální buněčná adhezivní molekula) a CD16 (Fc $\gamma$ III receptor) lze identifikovat dvě subpopulace označované jako CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> a CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>dim/-</sup>. Subpopulace CD56<sup>dim</sup> je z 95 % zastoupena v periferní krvi, kde vykazuje významnou protinádorovou aktivitu zprostředkovanou ADCC. Aktivace NK buněk je podmíněna rovnováhou signalizace mezi inhibičními a aktivačními receptory na jejich povrchu. Inhibiční NK receptory rozpoznávají na cílových buňkách MHC gp. I třídy, které jsou za běžných okolností exprimovány na většině zdravých buněk organismu. Jelikož nádorové buňky a některé viry uplatňují strategii úniku cytotoxickým CD8<sup>+</sup>T lymfocytům potlačením exprese MHC I. glykoproteinů, stávají se tak terčem působení NK buněk. Příkladem inhibičního receptoru je C lektinový receptor CD94/NKG2A vážící ligand MHC HLA-E.

NK buňky vybavené aktivačními receptory se přímo podílejí na usmrcování transformovaných buněk. Příkladem aktivačních receptorů jsou receptory přirozené cytotoxicity-NCR (NKp30, NKp44, NKp46, NKp36, aktivační KIR) a receptory podobné lektinům C-typu (NKG2D). Aktivace přes NKG2D receptor probíhá při odpovědi na buněčný stres, jako je poškození DNA, kdy se na povrchu buněk zvýší množství ligandů MICA a MICB. Konkrétně receptor typu NCR s označením NKp30 váže stresem indukovaný ligand BAT3 (HLA- B- associated transcript 3) a B7-H6, exprimovaný na povrchu některých nádorových buněk [28]. Protinádorové účinky po aktivaci NKp30 receptoru byly zaznamenány v případě gastrointestinálního stromálního tumoru a chronické lymfoidní leukémie [29, 30]. Přítomnost NK buněk v nádorovém stromatu dokládá jejich prognostický význam [31-34]. Nicméně existuje i řada důkazů, že v nádorovém stroma dochází k produkci cytokinů a chemokinů, z nichž mnohé mají ambivalentní efekt.

**MDSCs** (myeloid-derived supressor cells) představují nezralé myeloidní prekurzory, které vznikají v kostní dřeni a akumulují se v lymfoidní tkáni, krvi a v tumorech, kde potlačují protinádorovou reakci vrozeného i získaného charakteru [35]. Jedná se o heterogenní populaci několika buněčných typů, včetně prekurzorů DC, monocytů a neutrofilů. U lidí jsou definovány povrchovými znaky



CD14-CD11b+CD33+ a jsou rozlišeny na myeloidní a granulocytární linii. Migrace do lymfatických a nádorových tkání je iniciována pomocí chemoatraktantů, např. CCL2 a CCL5 a prozánětlivých mediátorů, jako jsou prostaglandin E2, IL-6, VEGF a komplementový fragment C5a. MDSC potlačují imunitní mechanismy sekrecí IL-10, který inhibuje zánětlivé procesy, na kterých se podílejí aktivované makrofágy typu M1 a DC (dendritické buňky; dendritic cells). Skrze produkci cytokinu TGFβ1 inhibují NK cytotoxicitu - produkci IFN-γ i expresi transmembránového proteinu NKG2D [36]. MDSC potlačují efektorové funkce T lymfocytů v mikroprostředí nádoru několika způsoby. Jedním z nich je produkce volných radikálů, jako je peroxynitrit aIDO, která katabolizuje tryptofan nezbytný pro T buněčnou proliferaci. Aktivace MDSC vede ke zvýšené produkci enzymů argináza a iNOS (inducible nitric oxide synthase), které inhibují T lymfocytární reakci. Dále podporují vývoj T regulačních lymfocytů a ovlivňují T buněčnou diferenciaci směrem k Th2 populaci, která, na rozdíl od Th1, má jen omezenou protinádorovou aktivitu [37]. MDSC mohou také snížit expresi L-selektinu, který je nezbytný pro vycestování naivních T lymfocytů do lymfatických uzlin. Tím dochází ke snížené aktivaci T lymfocytů, které nemohou migrovat do lymfatických uzlin, setkat se s nádorovými antigeny, a zahájit tak efektivní imunitní odpověď [38].

NKT buňky jsou speciální populací, která kromě funkčního T receptoru (TCR-αβ řetězce) disponuje i znaky typickými pro NK buňky. Skrze TCR nerozpoznávají antigeny v kontextu s MHC glykoproteiny, nýbrž lipidové a glykolipidové antigeny prezentované MHC-like CD1d molekulami [39]. V protinádorové terapii se uplatňuje modelový antigen izolovaný z mořských hub, α-galactosylceramid (α-GalCer), pomocí kterého lze rozlišit NKT subpopulace. Část NKT buněk, která na tento antigen reaguje, se nazývá NKT buňky typu I (α-GalCer-reaktivní NKT nebo též invariantní NKT). Po stimulaci α-GalCer produkují velké množství Th1 (IFN-γ) a Th2 (IL-4, IL-10, IL-13) cytokinů. Přestože mají cytolytickou funkci, jsou považovány spíše za regulátory imunitní odpovědi. NKT buňky typu II. nejsou α-GalCer-reaktivní, jejich role v imunitním systému spočívá v supresi protinádorové imunitní reakce [40].

### 1.1.2 Složky adaptivní imunity

Specifická imunita se rozvíjí v průběhu života v závislosti na tom, s jakými patogeny se imunitní systém setkává. V případě napadení je aktivována později než imunita nespecifická, rozvíjí se po dobu 4-7 dní a působí cíleně proti antigenu, kterým může být např. virus, bakterie, cizorodá i vlastní tkáň. Nádorové buňky stimulují jak tvorbu protilátek B lymfocyty, tak buněčnou imunitu T lymfocytů. Klíčové populace, na které je zaměřena řada postupů v rámci imunoterapie, jsou efektorové CD8<sup>+</sup> T lymfocyty (CTL; cytotoxic T lymphocytes) a pomocné CD4<sup>+</sup> T lymfocyty (Th). Adaptivní imunitní odpověď je řízena širokým repertoárem vysoce specifických antigenních receptorů na povrchu T buněk (TCR), resp. B buněk (BCR). Diverzita a specifita těchto receptorů je výsledkem genetické V(D)J rekombinace, která umožňuje vytváření milionů (až 10<sup>15</sup>) vysoce specifických receptorů [41], které zajišťují vznik unikátní imunologické paměti. Tato zajistí rychlejší a efektivnější imunologickou odpověď při opakovaném setkání se stejným antigenem.

**Cytotoxické CD8<sup>+</sup> T lymfocyty (CTL)** jsou hlavní činitelé v boji proti nádorovým buňkám, ale i virům, plísním a zodpovídají i za odmítnutí transplantovaných tkání. Vyznačují se přítomností koreceptoru CD8, komplexu CD3 a produkcí INF- $\gamma$  a TNF- $\alpha$ . Samotné nádory nestimulují CTL, protože neexprimují kostimulátory a MHC gp II. Je prokázáno, že nádorové buňky po transfekci B7-1 (CD80) nebo B7-2 (CD86) mohou vyvolat silnou buněčnou protinádorovou reakci. Navození nádorově specifické T buněčné odpovědi vyžaduje cross-priming a cross-prezentaci pomocí profesionálních antigen prezentujících buněk (APC) a kooperaci s pomocnými CD4<sup>+</sup> lymfocyty. Primární imunitní odpověď zahajují naivní T lymfocyty v sekundárních lymfatických orgánech, kde pomocí povrchových TCR rozpoznávají komplex nádorový peptid/MHC-1gp vystavený na APC. Touto interakcí jsou CD8<sup>+</sup> T lymfocyty aktivovány a vzniklé klony efektorových buněk směřují krevním řečištěm do nádorové tkáně. Funkčně modifikované populace CTL se zvýšenou schopností zabíjet nádor, ze kterého byly izolovány a jsou infiltrované do oblasti nádoru, se označují jako **TILs** (tumor-infiltrating lymphocytes). Po kontaktu s cílovými elementy (např. nádorovými buňkami či buňkami infikovanými viry) dochází u CTL k uvolnění serinových proteáz a perforinů nebo k interakci Fas-FasL, které způsobí destrukci zasažených buněk rozrušením buněčné membrány a aktivací apoptotických drah. CTL jsou schopny

indukovat apoptózu i bez přímého kontaktu s cílovou buňkou, a to sekrecí lymfotoxinu TNF- $\beta$ . Bylo prokázáno, že pro účinnou cytotoxickou odpověď a vznik paměťových CD8<sup>+</sup> T lymfocytů je zásadní jejich přímá interakce s molekulou CD40 na pomocných CD4<sup>+</sup> buňkách, a také cytokin IL-2, který produkují [42]. Průběh imunitní reakce T lymfocytů je detailněji popsán v kap. 4.1.

Imunofenotypizace jednotlivých subpopulací umožňuje cílenou selekci buněk pro terapeutické využití. Například adoptivním transferem přenesené CD8<sup>+</sup> T lymfocyty T<sub>CM</sub> fenotypu (CCR7<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) byly schopné *in vivo* proliferovat, přetrvat v organismu a zprostředkovat regresi nádoru ve srovnání s vysoce diferencovanými T buňkami, u kterých tyto markery chybí [43]. Kromě toho T lymfocyty s nízkou expresí terminálně diferenciačního markeru CD57 a vysokou expresí CD27 a CD28 vykazovaly dlouhodobou perzistenci [44].

**CD4<sup>+</sup> lymfocyty** jsou skupinou leukocytů s vysokou fenotypovou plasticitou, které rozpoznávají epitopy v asociaci s MHC gp II. třídy předkládané APC. Na diferenciaci aktivovaného CD4<sup>+</sup> Th0 prekursoru se podílí jak charakter antigenu, tak především cytokinové prostředí. Je-li přítomen IL-12 produkovaný APC po stimulaci agonistů Toll-like receptorů 3, 4 a 8, pak dochází ke vzniku Th1 linie. V přítomnosti IL-4 sekretovaného převážně mastocyty a bazofily dochází k polarizaci na Th2 linii. Za působení IL-4 a zároveň TGF- $\beta$  vznikají lymfocyty Th9 [45]. V prostředí bohatém na TGF- $\beta$  a IL-6 (nebo IL-21) se z Th0 lymfocytů začnou vyvíjet lymfocyty Th17 [46]. Při produkci různých kombinací cytokinů IL-6, IL-1 $\beta$  nebo TNF- $\alpha$  se Th0 buňky diferencují na podskupinu lymfocytů Th22 [47].

Th1 lymfocyty regulují imunitní reakci proti infekčním agens uvnitř buňky a poskytují aktivační signál cytotoxickým CD8<sup>+</sup> T lymfocytům a NK buňkám. Produkují cytokiny TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-12 a INF- $\gamma$ , který má za následek aktivaci makrofágů, následnou fagocytózu a produkci iNOS a zároveň v kombinaci s TNF- $\alpha$  zvyšuje expresi MHC I. na nádorových buňkách. TNF- $\alpha$  působí na buňky nádorového mikroprostředí, a podporuje tak angiogenezi [48]. Jeho působení může také měnit charakter imunitní odpovědi - T lymfocyty polarizuje v Th17 fenotyp, a tedy sekreci IL-17, což ve výsledku vede k akumulaci myeloidních buněk v prostředí nádoru, které následně podporují jeho růst [49]. Vzájemná mezibuněčná interakce a produkce IL-2 jsou signálem pro konečnou diferenciaci CD8<sup>+</sup> T lymfocytů v cytotoxické T lymfocyty, které následně eliminují nádorové buňky. Řada studií např. u nádoru žaludku, tlustého

střeva, prsu nebo ovariálního karcinomu ukázala, že přítomnost Th1 lymfocytů nebo cytokinů, které produkují, pozitivně koreluje s přežíváním pacientů [50-53]. Bylo prokázáno, že pouze samotné CD4<sup>+</sup> Th1 lymfocyty po přímém kontaktu s MHC II.<sup>+</sup> nádorovou buňkou vykazují cytolytickou aktivitu, a to skrze FasL a TRAIL signalizaci, stejně jako přes působení granzymů a perforinu. Th-Th interakce též pomáhá aktivovat CD4<sup>+</sup> lymfocyty specifické pro slabě imunogenní epitopy [54].

Naopak Th2 lymfocyty jsou zaměřeny na obranu proti extracelulárním mikroorganismům a helmintům. Produkci efektorových cytokinů IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 a IL-25 stimuluje proliferaci B lymfocytů, indukují izotopový přesmyk a tvorbu protilátek. Významným účinkem IL-4 je blokáda protinádorové Th1 imunitní odpovědi inhibicí exprese STAT-4 a Runx-3 [55, 56]. Th2 lymfocyty také prostřednictvím IL-4 a IL-13 indukují polarizaci M2 makrofágů, které následně podporují nádorový růst, angiogenezi, invazivitu a tvorbu metastáz [57, 58]. IL-13 v makrofázích a myeloidních buňkách indukuje expresi TGF- $\beta$ , který je významný pro indukci Treg a inhibici CTL. Produkty Th1 a Th2 buněk působí antagonisticky a polarizují imunitní odpověď: INF- $\gamma$  produkovaný Th1 tlumí aktivaci a proliferaci Th2. Naopak Th2 produkcí IL-4 inhibují diferenciaci a aktivaci Th1 [59]. Nerovnováha mezi Th1 a Th2 může být jedním z důvodů, proč nádor unikne imunitnímu dozoru.

T regulační lymfocyty (Treg) jsou nezbytné pro regulaci imunitní homeostázy a prevenci autoimunitních onemocnění. Treg jsou nejčastěji charakterizovány jako CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> a tvoří zhruba 10 % periferních CD4<sup>+</sup> T lymfocytů. CD25 (IL-2 receptor) je problematickým markerem, protože je trvale exprimován na Treg a zároveň tranzientně na aktivovaných T lymfocytech. Pro upřesnění fenotypu se proto používají další znaky jako TNF receptor typu 2 (TNFR2), homing receptor CD103, Glukokortikoid-induced TNF receptor-related gene (*GITR*, CD357), CCR4 nebo TF Helios. Treg udržují periferní toleranci tím, že potlačují aktivitu autoreaktivních T lymfocytů, a tím předcházejí vzniku autoimunitních onemocnění. Při mezibuněčném kontaktu mají schopnost aktivně inhibovat i CD4<sup>+</sup> T lymfocyty, dendritické buňky, NK buňky, NKT buňky a B lymfocyty. Produkci protizánětlivých cytokinů TGF- $\beta$ , IL-10 a IL-35 ovlivňují nádorové mikroprostředí. TGF- $\beta$  u CD8<sup>+</sup> CTL a NK buněk snižuje jejich cytotoxicitu, expresi aktivačního receptoru NKG2D a sekreci IFN- $\gamma$  a indukuje tolerogenní DC. Treg inhibují imunitní systém tím, že v nádorovém mikroprostředí snižují množství přítomného ATP díky expresi ektonukleotidázy CD39 a CD73 [60].

Dle fenotypu, uvolňovaných cytokinů a mechanismů suprese lze rozlišit několik subpopulací: přirozené Treg (nTreg), indukované Tr1 a Th3, dále Tr1-like buňky a Treg ve folikulárních centrech označované jako Tfreg. Tyto buňky charakteristické vysokou expresí PD-1, ICOS, CTLA-4 a IL-10 suprimují T dependentní produkci protilátek a inhibují produkci protilátek CD40 stimulovanými B buňkami v nepřítomnosti Th buněk [61]. Indukované T lymfocyty vznikají i působí na periférii při většině imunitních reakcí typu Th1 a Th2. Jejich aktivita není závislá na přímém buněčném kontaktu. Pro vznik Tr1, Th3 a Tr-like buněk je zapotřebí opakovaná antigenní stimulace. Tr1 buňky produkují abundantně IL-10, který potlačuje imunitní reakci spolu s Tr1 buňkami [62]. Supresivní mechanismus Th3 spočívá v sekreci TGF- $\beta$ , IL-4 a IL-10, zatímco Tr1-like buňky regulují nezralé dendritické buňky [63].

Přirozené Treg se vytvářejí v thymu a efektorovou funkci plní v periferních tkáních. Jsou charakterizovány expresí CD4, CD25, CTLA-4, *GITR* a Foxp3 a jsou závislé na IL-2. K aktivaci naivních nTreg s autoreaktivními TCR dochází pod vlivem chemokinů, jako např. CCL-5, CCL-17, CCL-22, CCL-28, CXCL-10 a -12 sekretovaných nádorovými buňkami. Treg lymfocyty hrají podstatnou roli v zachování imunologické tolerance vůči vlastním tkáním [64] a v diferenciaci M1 a M2 makrofágů. M2 makrofágy jsou indukovány CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nTreg buňkami, zatímco M1 makrofágy mohou být indukovány CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T efektorovými buňkami.

Negativní účinek Treg na průběh nádorového onemocnění byl pozorován např. u ovariálního karcinomu, karcinomu prsu, renálního karcinomu nebo karcinomu pankreatu [65]. Časté zvýšení počtu Treg u onkologických pacientů podporuje myšlenku, že deplece Treg buněk může vést k obnovení protinádorové imunitní odpovědi.

Th17 buňky specifické pro vlastní antigen jsou vysoce patogenní a mohou vést ke vzniku zánětu a těžkých autoimunitních onemocnění (např. revmatoidní artritida, Crohnova choroba, diabetes mellitus I. typu) [66]. Jedná se o vysoce plastické buňky, které se mohou konvertovat na zánětlivé lymfocyty podobné Th1 fenotypu. Pro jejich diferenciaci je zásadní synergie IL-6 a TGF- $\beta$ , jehož samotná přítomnost by vedla k diferenciaci na Treg. Th17 buňky produkují IL-22, IL-21 a především hlavní efektorové cytokiny IL-17A a IL-17F, které stimulují stromální buňky k produkci prozánětlivých a hematopoetických cytokinů a atrahují neutrofile do tkání. Mohou produkovat rovněž CCL-20, GM-CSF i IFN- $\gamma$ . Infiltrace Th17 byla pozorována u řady

nádorů, nicméně s poněkud nejasnou rolí v kontextu nádorového mikroprostředí. Studie popisují jak pozitivní, tak negativní korelace mezi jejich výskytem a dlouhodobým přežíváním pacientů [67]. U pacientek s karcinomem ovaria bylo prokázáno, že časná stadia vývoje se vyznačují silnou imunitní odpovědí Th17 buněk a naopak pokročilá stadia onemocnění souvisejí s nižším zastoupením Th17 v nádoru, nižšími hladinami IL-17 v ascitu a pozitivně predikují přežívání pacientů [68]. Negativní účinek Th17 lymfocytů na přežívání pacientů byl zaznamenán u solidních nádorů, např. u karcinomu žaludku, karcinomu prsu a hepatocelulárního karcinomu [69-71], kdy jejich výskyt pozitivně koreloval s angiogenezí či lymfangiogenezí v nádorech. Zajímavá je souvislost mezi snížením prozánětlivé Th17 a Th1 imunitní odpovědi a zvýšenou infiltrací Treg, jejímž důsledkem je silná imunoprese nádorového mikroprostředí [72]. Je zřejmé, že může docházet ke vzájemné konverzi mezi Treg a Th17 lymfocyty, a to regulací diferenciace na úrovni transkripčních faktorů. Byly detekovány populace buněk s expresí jak FoxP3, tak ROR $\gamma$ t, s imunopresivním účinkem na protinádorovou reakci [73, 74].

Th9 jsou prozánětlivé lymfocyty, které produkují IL-9 a IL-10. Studie na myších modelech ukázala, že transfer *in vitro* diferencovaných Th9 lymfocytů vedl k potlačení růstu nádorů navozením robustní cytotoxické CD8<sup>+</sup> odpovědi. Příčinou byla zvýšená exprese chemokinu CCL-20, který podporuje zánět v nádorových tkáních a atrahuje leukocyty (zejména CD8 $\alpha$  a dendritické buňky) do místa nádoru [75].

Populace Th22 lymfocytů se vyznačuje produkcí IL-22 a expresí CCR10, což naznačuje, že mohou migrovat do kůže, kde mohou přispět k obraně hostitele proti mikrobiálním patogenům a podporovat opravu nebo remodelaci tkáně. Studie ukazují, že Th22 lymfocyty mohou být také zapojeny do patogeneze zánětlivých kožních onemocnění, jako je lupénka, atopický ekzém a alergické kontaktní dermatitidy [47].

Minoritní populace  $\gamma\delta$  T lymfocytů je charakteristická složením TCR z polypeptidických řetězců  $\gamma$  a  $\delta$  a zároveň absencí koreceptorů CD4 a CD8. Tyto buňky se objevují v periferní krvi pouze ve 2-5% z celkového počtu lymfocytů, ale jsou hojně přítomny na sliznicích a v kůži, kde mohou zahájit přímou cytolyzu buněk, se kterými interagují. Vyšší zastoupení  $\gamma\delta$  T lymfocytů je detekováno u autoimunitních onemocnění, imunodeficiencí, infekcí a u nádorových onemocnění.

**B lymfocyty** zajišťují specifickou humorální odpověď a vystupují také jako APC při prezentaci antigenu T lymfocytům. Jsou schopny samy pohlcovat antigen a

poté jej prezentovat na svém povrchu v komplexu BCR s MHC gp. II třídy. Při této signalizaci jsou důležité interakce kostimulačních molekul CD80 a CD86 na povrchu B lymfocytů a CD28 na povrchu T lymfocytů, dále pak CD40 u B lymfocytů a CD40L T lymfocytů. Aktivace B lymfocytu probíhá vazbou antigenu na BCR nebo kooperací s Th1 lymfocyty, jež rozpoznaly stejný antigen na APC. Druhý způsob aktivace je považován za účinnější. Po aktivaci dojde k pomnožení B lymfocytů, část se diferencuje na plazmatické buňky produkující protilátky. Zároveň Th-dependentní cesta aktivace vede ke vzniku paměťových buněk, urychlující produkci imunoglobulinů při dalším setkáním se stejným antigenem. Dle dostupných důkazů má samotná protilátková nádorová imunita *in vivo* malý význam. Přítomnost protilátek byla prokázána např. u pacientů s nádorem asociovaným s virem Epstein-Baarové (EBV) [76].

## 1.2 Editace nádoru imunitním systémem

Experimentální poznatky, že nádory formované v imunodeficitních myších jsou více imunogenní („editované“) ve srovnání se stejnými typy nádorů formovaných v imunokompetentních myších („needitované“), vedly G. P. Dunna a kol. [77] k postulaci hypotézy editace nádoru imunitním systémem - tzv. cancer immune editing. Tato hypotéza předpokládá, že imunitní systém působí neustálým selekčním tlakem, který vede nejen k likvidaci nádorových buněk, ale i k utváření nového imunogenního fenotypu nádoru. Preferenčně vznikají vybrané varianty transformovaných buněk, které dokáží uniknout efektorovým mechanismům imunitního systému. Hypotéza (někdy nazývaná 3E z anglického elimination-equilibrium-escape) popisuje tři vzájemně provázané fáze mezi nádorovou buňkou a imunitním systémem: eliminace nádorové buňky, ustanovení rovnováhy mezi nádorovou buňkou a organizmem a únik nádorové buňky před kontrolou imunitního systému. V časném stadiu kancerogeneze převládá eliminační funkce imunitního systému. Odpovídá původní myšlence imunitního dozoru, kdy složky adaptivní i vrozené imunity kontrolují a v ideálním případě destruuji nádorové buňky ještě před klinickou manifestací nádoru [78]. Většina nádorových buněk je v časných stádiích kancerogeneze rozpoznána a zničena, část nádorových buněk však přežije a přechází do další fáze [79]. Ve fázi equilibria je imunitní systém a nádorová buňka v dynamické rovnováze, kdy složky adaptivní imunity kontrolují růst nádoru, preferenčně likvidují více imunogenní varianty nádorových buněk, ale zároveň

selekčním tlakem vznikají nové genotypy s nižší imunogenicitou, které unikají imunitnímu dozoru. Ustanovení rovnováhy je nejdelším procesem (roky až celý život pacienta), který se klinicky shoduje s preneoplastickým onemocněním. V této době je imunitní systém schopen držet reziduální nádorové buňky pod určitou kontrolou bez kompletní eradikace nádoru, a zároveň zabránit nekontrolovatelnému růstu nebo tvorbě metastáz. Stádium rovnováhy může vyústit v úplnou eradikaci nádoru nebo v ustálení dynamické rovnováhy mezi aktivní imunitní odpovědí a vybranou populací nádorových buněk. Nejhorším scénářem je přechod do fáze úniku, kdy je nádor imunitním systémem již tolerován, dochází k jeho nekontrolovatelné expanzi, tvorbě metastáz a rozvoji klinického onemocnění [77, 80]. Z výše popsané ambivalentní role imunitního systému vyplývá, že ideální zahájení imunoterapie je v časných stádiích karcinogeneze nebo ve fázi minimální reziduální nemoci (MRD, stav, kdy nádorové buňky v organizmu přetrvávají i po léčbě a dosažení klinické remise, mohou být příčinou klinického relapsu).

### **1.3 Únikové cesty nádorových buněk před imunitním systémem**

Nádory unikají vrozené a získané imunitní odpovědi pasivním nebo aktivním způsobem. Při pasivní obraně využívají svých unikátních vlastností, při aktivní obraně zapojují další buněčné systémy hostitele. K nejčastějším únikovým mechanismům patří ztráta exprese MHC gp I., anebo změna antigenního profilu vlivem mutací nebo delecí genů kódujících nádorové antigeny. Pokud nejsou produkty těchto genů potřebné pro růst nádorových buněk nebo udržení transformovaného fenotypu, pak tyto antigen-negativní klony získají v rámci imunoeditace selektivní výhodu a rychle se přemnoží. Současně může docházet k poruchám v procesu prezentace antigenu v důsledku mutací v genech kódujících např.  $\beta$ 2 mikroglobulin, buněčné transportéry nebo podjednotky proteazomů. Dalším mechanismem úniku nádorových buněk je maskování epitopů před rozpoznáním CTL např. sialyzací. Většina nádorových buněk navíc neexprimuje MHC gp II., takže stimulace nádorově specifických Th lymfocytů je omezena na spolupráci s APC a tzv. cross-priming. Nádory jsou často rezistentní k apoptóze indukované vazbou CD95 na svém povrchu a CD95L na povrchu T lymfocytů. Naopak buňky nádorového endotelia podporují lokální supresi imunitní reakce interakcí CD95L, který navozuje



apoptózu v infiltrujících T lymfocytech exprimujících CD95 tzv. nádorovým protiútokem [81, 82].

Samotné nádorové buňky produkují imunosupresivní faktory, jako jsou TGF- $\beta$ , IL-10,IDO nebo vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), které inhibují proliferaci, efektorové funkce makrofágů, T lymfocytů nebo DC. Porucha prezentace antigenu na úrovni DC může vznikat působením oxidu dusnatého, který indukuje jejich apoptózu, dále IL-10 a TGF-  $\beta$  inhibující zraní DC nebo VEGF, který působí inhibičně na prekurzory DC v kostní dřeni.

Může docházet ke zvýšené aktivitě signálních drah inhibitorů kontrolních bodů imunitní reakce (tzv. immune checkpoints), což dále potlačuje protinádorovou činnost imunitního systému. Inhibiční signály přenášené přes molekuly jako např. CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4), receptor PD-1 (programmed death protein-1), LAG-3 (lymfocyte activation gene-3), TIM-3 (T-cell imunoglobulin and mucin-domain containing-3), mají význam v udržení homeostázy a zabraňují nechtěným projevům autoimunity. Vazba na CTLA-4 inhibuje efektorové T lymfocyty, ale naopak zesiluje aktivitu Tregs a jejich proliferaci. Zdá se, že v případě působení terapeutických CTLA-4 blokátorů (ipilimumab, tremelimumab) je protinádorový účinek částečně ovlivněn tím, že blokují imunosupresivní aktivitu Tregs. Podporu ze strany hostitele představují například makrofágy typu 2, které vytvářejí mikroprostředí pro růst nádoru svou produkcí látek podporující angiogenezi (TGF- $\beta$ , VEGF) a látek tlumících efektorové funkce T lymfocytů (IL-10, prostaglandin E2).

## 2. CHARAKTERISTIKA A MOŽNOSTI IMUNOTERAPEUTICKÝCH PŘÍSTUPŮ

Imunoterapie vychází z předpokladu, že onkologické onemocnění je důsledkem selhání imunitního systému, který nádorové buňky včas nerozpoznal a neodstranil. Důvodem může být poškození imunitního systému, nízká imunogenita nádoru nebo použití jeho ochranných mechanismů (např. produkce imunosupresivních cytokinů, změna antigenního profilu nádoru). Na základě poznatků získaných na experimentálních modelech se protinádorová imunoterapie v současnosti koncipuje do tří základních linií výzkumu a terapeutického využití: strategie využívající nescifickou stimulaci imunitního systému; protinádorové vakcíny a adoptivní buněčnou terapii. Snahou těchto imunoterapeutických přístupů je navodit efektorové mechanismy namířené proti nádorové tkáni, které by vedly k eliminaci nádorových buněk nebo ke kontrole jejich růstu. Vzhledem k rozdílnému mechanismu účinku výše uvedených postupů lze očekávat jejich synergické protinádorové působení při kombinovaném podávání. Zásadní předností imunoterapie oproti radio- a chemoterapii je možnost selektivní destrukce buněk, obvykle nezávisle na jejich generačním cyklu. Umožňuje též totální eradikaci málo početných buněčných populací, a v tomto smyslu nachází uplatnění ve fázi minimální reziduální nemoci u pacientů v kompletní remisi po cytostatické léčbě. Ve vybraných případech lze díky využití autologních buněk pacienta očekávat minimální riziko vzniku vedlejších účinků. Úspěšnost imunoterapie obecně naráží na tři druhy překážek: toleranci nádoru imunitním systémem, heterogenitu cílových antigenů a nedostatek efektorových buněk v oblasti nádoru.

### 2.1 Přístupy antigeně nescifické

Obecný mechanismus nescifické stimulace spočívá v podpoře základních funkcí imunitního systému, nezávisle na specificitě nádorového antigenu. Jedná se o aplikaci látek, které vyvolávají zánětlivou odpověď nebo vedou k polyklonální aktivaci lymfocytů. Nejdelsí zkušenosti jsou s aplikací živé vakcíny Bacille Calmette-Guérin v léčbě karcinomu močového měchýře [83]. Oslabené mykobakterie aktivují APC a potažmo mají adjuvantní stimulační účinek na T lymfocyty. Mezi další nescifické imunostimulační metody patří systémová aplikace imunomodulačních cytokinů jako např. IL-2 nebo interferonu  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) [84, 85], které mohou navodit zvýšenou

cytotoxickou aktivitu efektorových T lymfocytů a NK buněk. Rekombinantní forma IL-2 (aldesleukin) se v kombinaci s IFN- $\alpha$  stala jednou z metod léčby metastazujícího adenokarcinomu ledviny nebo maligního melanomu. Systémová aplikace IFN- $\alpha$  se využívá v léčbě hematologických malignit. Použití výše zmíněných cytokinů v klinické praxi je velice účinné, nicméně u pacientů je doprovázeno limitujícími závažnými vedlejšími projevy. Proto se u některých nádorů používá lokalizovaná perfuze oblasti s nádorem cytokinem TNF- $\alpha$  v kombinaci s chemoterapeutiky, např. u sarkomů měkkých tkání [86].

## 2.2 Přístupy antigenně specifické

Specifická stimulace využívá efektorových buněk nebo protilátek cílených na vybraný antigen, s rychlým, většinou však krátkodobým účinkem. Nejrozšířenější formou specifické imunoterapie je léčba monoklonálními protilátkami. V současné době se rutinně používá několik protinádorových terapeutických monoklonálních protilátek cílených proti nádorovým antigenům (např. trastuzumab, anti-Her2 Neu monoklonální protilátka používaná v léčbě karcinomu prsu a žaludku, cetuximab monoklonální protilátka proti EGFR používaná v léčbě karcinomu hlavy, krku a kolorektálního karcinomu nebo rituximab, monoklonální protilátka proti antigenu CD20 B-lymfocytů používaná v léčbě malignit z řady B [87]). Cílená léčba monoklonálními protilátkami může aktivovat mechanismy buněčné cytotoxicity závislé na protilátkách a cytotoxicity zprostředkované komplementem (tzv. CDC - complement dependent cytotoxicity). Výsledkem je eliminace populací buněk, které nesou příslušný nádorový antigen. Kromě samotných monoklonálních protilátek lze využít i jejich konjugátů s účinnými toxiny (tzv. imunotoxiny, ev. antibody-drug conjugates, ADC) nebo radioizotopy (tzv. radioimunotoxiny). Pro terapeutické účely jsou již nyní schváleny desítky monoklonálních protilátek včetně ADC, z nichž celá řada je v různých stádiích klinického vývoje.

Další formou je tzv. adoptivní T buněčná terapie. Jedná se o *ex vivo* expanzi nádorově specifických T lymfocytů, které jsou získávány z periferní krve či přímo z nádorové tkáně pacienta, a jejich vrácení zpět pomocí nitrožilní infuze [88]. Této problematice se podrobněji věnuje samostatná kapitola 4.2.

Ve snaze indukovat specifickou imunitní odpověď proti nádorovým antigenům se testují i různé druhy nádorových vakcín. V současné době se výrazně uplatňují profylaktické vakcíny proti nádorům virového původu, rychlý pokrok lze pozorovat i při vývoji terapeutických protinádorových vakcín. Je možné podat jednoduché peptidové vakcíny až po komplexní buněčné systémy s využitím dendritických buněk pulzovaných nádorovou RNA, autologními tumory, nebo nádorovými liniemi (viz kap. 3). Cílem vakcinace je indukovat protinádorové CTL, skrze DC zvýšením exprese nádorových antigenů, případně MHC gp. a kostimulačních molekul. Nespornou předností vakcín je i skutečnost, že mohou vést ke vzniku imunologické paměti zprostředkované paměťovými T a B lymfocyty. Tato zajišťuje po dalším kontaktu s nádorovým antigenem rychlou aktivaci specifické protinádorové imunity, což může v době, kdy je malignita ještě omezena na relativně nízký počet buněk, vést k její eradikaci. Poměrně nadějně výsledky přináší strategie tzv. „prime-boost“ vakcín aplikovaná např. u pacientů s rezistentním karcinomem prostaty za použití kombinované vakcíny Prostvac-VF [89]. Aplikace vakcíny má dvě fáze. Prvním krokem je podání DNA vakcíny na bázi plazmidové DNA kódující nádorový antigen a kostimulační molekuly (prime), který zajistí vznik nádorově specifických CTL. Druhým krokem je podání silně imunogenního virového vektoru kódující identický nádorový antigen (boost), který by měl vyústit v expanzi již existujícího protinádorového klonu CTL. Povzbudivé výsledky přinesla fáze II. studie s využitím virového vektoru exprimující MUC-1 antigen (vakcína TG4010) u pacientů s karcinomem prsu, prostaty, ledvin a plic [90]. Nicméně ve fázi III. se účinnost neprokázala ani u vakcíny Prostvac, ani u vakcíny cílicí antigen MUC-1.

Zvláštním příkladem jsou vakcíny připravené pomocí tzv. onkolytických virů (viry, které se přirozeně nebo v důsledku genových manipulací selektivně množí v nádorových buňkách a lyzují je). Takto rozrušené nádory vyvolávají silnou imunitní reakci, a navíc jsou schopny přímo infikovat a ničit nádorové buňky a jejich imunosupresivní mikroprostředí [91]. V genové terapii se též používají buněčné terapeutické vakcíny, tedy buněčné linie odvozené z nádorů, které byly *ex vivo* modifikovány vnesením genů kódujících imunostimulační faktory, případně dalších genů. K modifikacím se používá genů pro cytokiny (např. IL-2 a GM-CSF), chemokiny (např. MCP 1) a kostimulační molekuly (jako jsou B7.1 či B7.2). K terapeutickým zásahům se dají použít jak autologní, tak alogenní buňky. Do klinické praxe se zatím

z výše uvedených dostal pouze onkolytický herpes-virus v preparátu T-VEC v terapii maligního melanomu [92].

### 3. PROTINÁDOROVÁ IMUNOTERAPIE POMOCÍ DENDRITICKÝCH BUNĚK

Potenciál terapeutického využití dendritických buněk k vakcinaci se zakládá na jejich schopnosti významně regulovat imunitní reakce a na nových technikách kultivace umožňující produkci velkého množství DC *in vitro*. Zralé dendritické buňky představují neúčinnější APC se schopností aktivovat naivní nediferencované T lymfocyty, a tím zahájit primární imunitní odpověď. Díky tomuto je u DC předpokládán vysoký potenciál v léčbě nádorů, v současné době hlavně u zbytkového nádorového onemocnění, které nereaguje na standardní léčbu, a které může být zodpovědné za recidivu onemocnění [93]. DC se využívají především ve formě vakcín, jejichž cílem je překonat nefunkčnost nebo absenci endogenních dendritických buněk manipulací autologních DC *in vitro* za účelem posílení T buněčné protinádorové odpovědi. Účinnost vakcíny závisí nejenom na cílovém nádorovém antigenu, ale i na schopnosti organismu úspěšně překonat mechanismy imunotolerance a vytvoření dostatečné populace efektorových a paměťových buněk. Ze závěrů prováděných studií lze vysledovat, že indukce imunity proti nádorovým antigenům se dá velmi často prokázat testy *in vitro*, nicméně klinická odezva je podstatně vzácnější.

#### 3.1 Charakterizace stádií a subpopulací dendritických buněk

Dendritické buňky představují důležitý spojovací článek mezi mechanismy vrozené a adaptivní imunity díky nescifickému odstraňování patogenů/abnormálních buněk resp. díky specifické imunitní reakci proti antigenu, zprostředkovanou T a B lymfocyty. Vznikají z progenitorových buněk v kostní dřeni a v nezralém stádiu sídlí v periferních tkáních. Nezralé DC (iDC) se specializují na zachytávání, zpracování a prezentaci antigenu, a vykazují nízkou expresi kostimulačních molekul. Z tohoto důvodu neposkytují dostatečně silné aktivační signály T lymfocytům, což může vést k jejich anergii, delecii antigen specifických T lymfocytů nebo vzniku Treg [94]. Schopnost DC indukovat za určitých okolností toleranci k danému antigenu je předmětem zkoumání v oblasti potenciální imunoterapie stavů přecitlivělosti, a to jak k exogenním antigenům (alergie), tak k endogenním antigenům (autoimunitní onemocnění). Skrze povrchové receptory označované jako PRR (pattern recognition receptors) rozpoznávají vysoce konzervované patogenní struktury (tzv. PAMP,

pathogen-associated molecular pattern). Mezi PRR patří manózoový receptor, galaktózoový receptor, Toll-like receptory (TLR), receptor CD14, scavenger receptory, ale také třeba cytosolické Nod-like receptory. Po stimulaci zprostředkované zánětlivými signály a vazbou PAMP podstupují dendritické buňky proces zrání. V klinických protokolech je nejčastěji maturačním koktejlem směs prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6 a PGE-2. Experimentálně se používá např. kombinace IFN- $\gamma$  a LPS nebo tzv. „ $\alpha$ -type-1 polarizing“ koktejl obsahující TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  a poly I:C. Zralé DC exprimují kostimulační molekuly CD80 a CD86, CD40, MHC gp., chemokiny a adhezivní molekuly umožňující vznik imunologické synapse. V závislosti na ligandu produkují cytokiny (heterodimer IL-12, IL-12 p70, IL-1 $\beta$ , IL-6) a migrují do sekundárních lymfoidních orgánů, kde aktivují antigen-specifické T lymfocyty. Kromě prezentace exogenních antigenů na MHC gp. II jsou DC schopny zkříženě prezentovat exogenně zachycené antigeny v komplexu s MHC gp. I. Takto mohou DC prezentovat TAA CD8 + T lymfocytům, což je činí zvláště zajímavými pro imunoterapii nádorů.

Mezi DC lze rozlišit řadu vývojově a funkčně odlišných subpopulací, jež můžeme díky vysoké heterogenitě klasifikovat na několika úrovních. Dle typu prekurzoru, ze kterého se diferencují, lze rozlišit DC odvozené z monocytů (CD14<sup>+</sup> DCs), plazmacytoidní DC (pDCs) a myeloidní DC (mDC), též označované jako konvenční. Rozdíly populace vykazují i podle anatomické lokalizace (např. Langerhansovy buňky). Plazmacytoidní DC jsou významnými producenty interferonů typu I v reakci na virové nukleové kyseliny vázané na TLR 7 a TLR 9, což ve výsledku podporuje přeměnu v účinné APC a aktivaci CD8 + T lymfocytů. Sekretované interferony dále aktivují NK a NKT buňky. Hlavním identifikačním znakem pDC je exprese receptoru pro IL-3 (CD123), dále molekula BDCA2, CD4 a fenotyp CD11c<sup>-</sup>, CD13<sup>-</sup>, CD33. Růstové faktory představují CD40L a IL-3.

Lidské myeloidní DC jsou charakteristické expresí molekuly CD11c. V lidské periferní krvi lze identifikovat dva typy mDC – populaci CD11c<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup>BDCA-1<sup>+</sup>, která je prekurzorem Langerhansových buněk [95]. Druhá populace je charakterizována fenotypem CD11c<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup>BDCA-3<sup>+</sup>, která je prekurzorem intersticiálních DC [96]. Intersticiální DC jsou nejpočetnější populací myeloidních buněk lokalizovanou téměř ve všech tkáních a orgánech. Exprimují markery CD14 a CD68. Pokud jsou vmezeřeny mezi keratinocyty v epidermis, jedná se o tzv. Langerhansovy buňky, které exprimují na svém povrchu znak CD1a langerin (CD207).

V mikroprostředí některých solidních nádorů (např. karcinom prsu, kolorektální karcinom, karcinom plic, ledvin, hlavy a krku, močového měchýře) lze detekovat tzv. tumor infiltruující DC (TIDC; tumor-infiltrating dendritic cell). Dle typu nádoru je infiltrace TIDC asociována s horší nebo lepší prognózou. Například pacienti s kolorektálním karcinomem a vysokým počtem TIDC vykazovali kratší celkové přežití než pacienti s nízkým počtem TIDC. Naopak infiltrace TIDC u pacientů s melanomem příznivě korelovala s jeho regresí [97].

### **3.2 Způsoby využití dendritických buněk v imunoterapii nádorových onemocnění**

Existuje řada imunoterapeutických protokolů pro přípravu DC. Cesta k získání dendritických buněk začíná nejčastěji izolací hematopoetických CD34+ z krve pacienta, nebo *ex vivo* diferenciací z monocytů za přítomnosti cytokinů (především faktoru stimulujičho růst granulocytů a makrofágů, GM-CSF, v kombinaci s IL-4, IFN- $\alpha$  nebo IL-15). Takto připravené DC jsou *ex vivo* pulzovány antigenem, v případě karcinomu prostaty to může být prostatický specifický antigen (PSA), prostatická kyselá fosfatáza (PAP), prostatický specifický membránový antigen (PSMA) nebo antigen prostatických kmenových buněk (PSCA). Antigen může být podán ve formě peptidu, celého proteinu (který je po zpracování prezentován T lymfocytům) nebo ve formě mRNA kódující daný antigen. Výhodou takto vyvolané imunitní reakce je její specifita – reakce je zaměřena pouze proti antigenům přítomným v tumoru. Naopak limitací peptidových vakcín je HLA restrikce umožňující podání vakcíny pouze pacientům disponujícím příslušnou HLA alelou. Příkladem je peptidová vakcína testovaná v klinické studii fáze I., ve které byly použity autologní DC pacienta pulzované HLA-A0201 specifickým PSMA peptidem [98]. Širší spektrum antigenů poskytují DC pulzované usmrcenou nádorovou buňkou (nekrotickou či apoptotickou) nebo extraktem nádorové RNA. U těchto druhů vakcín hrozí riziko rozvoje autoimunitní reakce vůči antigenům, které jsou exprimovány i na jiných tkáních v těle. Stávající vakcíny na bázi peptidů přednostně aktivují CD8 + T lymfocyty (většinou s HLA-A2 restrikcí), které jsou schopné přímo zabít nádorové buňky, nicméně bez pomoci CD4 + T lymfocytů mají pouze omezenou životnost. Oproti tomu proteinové vakcíny účinně indukují CD4 + T lymfocyty s MHC II. restrikcí, ale jsou méně účinné při indukci CD8 + CTL



[93]. Současné poznatky ukazují, že pro protinádorovou imunoterapii je žádoucí plně zralý fenotyp DC, tj. s vysokou expresí CD80, CD86, CD83 a MHC typu II, produkcí IL-12p70, s vysokou migrační schopností a indukci cytotoxické protinádorové odpovědi [99], a naopak nežádoucí je produkce IL-10, který přispívá k vývoji Treg, k indukci tolerance na prezentovaný antigen a k supresi imunitní odpovědi [100].

Jednou ze zásadních prací, které přinesly pionýrské výsledky v imunoterapii karcinomu prostaty, je studie s preparátem Sipuleucel-T (Provenge) [101]. V této studii byla pacientům ve stádiu hormonálně refrakterního karcinomu prostaty aplikována autologní vakcína připravená *in vitro* kultivací antigen-prezentujících buněk s fúzním proteinem GM-CSF a PAP, která je silně exprimována u více než 90 % buněk karcinomu prostaty. Fáze III. studie prokázala prodloužení mediánu přežívání pacientů o 4,1 měsíce a Provenge se stal první imunoterapeutickou vakcínou, která byla schválena kontrolním úřadem FDA (Food and Drug Administration) pro léčbu karcinomu prostaty v USA. Na podobném principu byla připravena vakcína Lapuleucel-T s fúzním proteinem obsahujícím sekvence ERBB2/Her-2 Neu, která je v klinických testech účinná v léčbě pacientů s karcinomem prsu [102].

Ve III. fázi klinických zkoušek hodnotící účinnost a bezpečnost se nachází terapeutická protinádorová vakcína s pracovním názvem DCVAC/PCa (NCT02111577), založená na DC pulzovaných nádorovou buněčnou linií LNCap. Přípravek je srovnáván s placebem u mužů indikovaných k chemoterapii metastatického kastračně rezistentního karcinomu prostaty.

Nová generace vakcín je založena na dendritických buňkách produkujících interleukin-12, který polarizuje imunitní odpověď ve směru pomocných Th1 a cytotoxických T lymfocytů [103]. Výsledky na myších modelech ukazují, že takto připravené DC maximalizují protinádorovou reakci imunitního systému.

Důležitým aspektem vakcinace DC je způsob aplikace a počet dendritických buněk v dávce vakcíny. Nejčastěji je vakcína podávána subkutánně nebo intravenózně, což s sebou přináší omezení v podobě nízkého procenta injikovaných buněk, které jsou schopny doputovat do lymfatických uzlin. Dosažené výsledky publikovaných studií často zkresluje skutečnost, že vakcíny jsou podávány pacientům v pokročilé fázi onemocnění, a u kterých selhaly jiné způsoby terapie. Je vysoce pravděpodobné, že by tato forma imunoterapie byla účinnější v počátečním stadiu nemoci, nicméně optimální strategie využití DC k léčbě nádorů se stále hledá.

#### 4. PROTINÁDOROVÁ IMUNOTERAPIE ZALOŽENÁ NA PRINCIPECH ADOPTIVNÍHO TRANSFERU TUMOR SPECIFICKÝCH T LYMFOCYTŮ

V rámci aktivní buněčné imunoterapie je současný výzkum orientován na možnost terapeutického využití tzv. adoptivního buněčného transferu antigen specifických T lymfocytů, který představuje doplnění imunitního systému pacienta *ex vivo* modifikovanými a aktivovanými imunitními efektory. Zdrojem transferovaných lymfocytů může být přímo nádorová tkáň (TILs), nebo periferní krev (tzv. lymfokine-activated killer cells, LAK) či lymfatické uzliny, zejména po indukční terapii protinádorovými vakcínami. *In vitro* expanze a polyklonální aktivace tumor specifických lymfocytů se nejčastěji provádí pomocí monoklonální protilátky anti-CD3, která simuluje antigenní signál přes TCR. Stejného účinku lze dosáhnout i pomocí kombinace protilátek anti-CD3 a anti-CD28 [104]. Výhodou manipulace s buňkami *ex vivo* je fakt, že umožňuje obejít endogenní regulační mechanismy a vyhnout se možnému supresivnímu vlivu nádorového mikroprostředí. V ACT protokolech jsou nejčastěji generovány vysoké počty (až  $10^{11}$ ) antigen specifických CTL nebo TILs buněk [88]. K expanzi buněk se využívají vysoké dávky IL-2, který je autokrinním růstovým faktorem T lymfocytů a jehož přítomnost prodlužuje délku trvání buněčné odpovědi, a zvyšuje tak účinnost ACT terapie. První důkazy o účinnosti adoptivní buněčné terapie byly publikovány v několika klinických studiích již v devadesátých letech minulého století. Jednalo se o podání dárcovských lymfocytů pacientům s relapsem chronické myeloidní leukemie po alogenní transplantaci kostní dřeně, které vedlo u většiny pacientů ke kompletní remisi onemocnění [105, 106]. Podobný efekt této metody byl také zaznamenán v léčbě pacientů s EBV-asociovanými malignitami, s relapsem leukemie po transplantaci kmenových buněk a v některých případech v léčbě metastatického melanomu [107]. Za historický milník buněčné imunoterapie lze považovat rok 2017, kdy FDA poprvé schválila pro komerční použití genovou terapii pomocí T lymfocytů exprimujících chimérický antigenní receptor (CAR) (přípravek Tisagenlecleucel, komerční název Kymriah) v léčbě dětských pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií a přípravek axicaptabene ciloleucel (komerční název Yescarta) pro léčbu difuzního velkobuněčného B lymfomu. Jednotlivé ACT přístupy jsou podrobněji rozebrány v následujících kapitolách (viz kap. 4.2).

## 4.1 Imunitní reakce založené na T lymfocytech

Protinádorová imunitní odpověď má charakter adaptivní imunity, protože vykazuje specifitu, imunologickou paměť a je uskutečňována zejména T lymfocyty. Vývoj T lymfocytů probíhá především v thymu z prothymocytů, které tam vycestovaly z kostní dřeně během prenatálního vývoje. V kortexu thymu probíhá pozitivní selekce, přežívají pouze buňky schopné vázat MHC molekuly vlastní danému jedinci (zhruba 10–30 %), poté navazuje v kortikomedulární části negativní selekce, kdy jsou eliminovány potenciálně autoreaktivní buňky, které váží MHC molekuly s vlastními peptidy vysokou afinitou [108]. Na základě fenotypových znaků můžeme u CD8<sup>+</sup> a CD4<sup>+</sup> lymfocytů rozlišit maturační fáze podle exprese CD28 a CD45R0 na naivní CD28<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup>, T<sub>CM</sub> (central memory T cell) CD28<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup>, T<sub>EM</sub> (effector memory T cell) CD28<sup>-</sup>CD45R0<sup>+</sup> a T<sub>TD</sub> (terminally differentiated T cell) a CD28<sup>-</sup>CD45R0<sup>-</sup> T lymfocyty. Podle přítomnosti znaku CCR7 lze dále odlišit naivní a centrální paměťové T lymfocyty od stádií T<sub>EM</sub> a T<sub>TD</sub>, jež expresi tohoto znaku ztrácejí.

Zahájení T buněčné odpovědi proti nádorovému antigenu nastává v situaci, kdy nádor syntetizuje neo-antigeny, které jsou následně rozpoznány a prezentovány naivním T lymfocytům dendritickými buňkami aktivovanými v zánětlivém prostředí. Jedná se o „nefyziologické“ proteiny, které normální buňka neprodukuje - tzv. antigeny specifické pro nádory (TSA; tumor specific antigen), nebo které v těle plní svoji fyziologickou funkci, ale jsou produkovány v jiném množství popř. jiné fázi ontogenetického vývoje – tzv. antigeny asociované s nádory (TAA; tumor associated antigen). V rámci imunoterapie se často využívají tzv. nádorové testikulární antigeny, např. MAGE-A1, NY-ESO-1, k jejichž expresi dochází kromě nádorů pouze v germinálních buňkách bez exprese MHC I. a MHC II. [109].

První krok reakce je doprovázen útlumem periferní tolerance k nádorovým antigenům díky prozánětlivým cytokinům a dalším produktům uvolňovaným z rozpadlých nádorových buněk. Samotná aktivace naivních T lymfocytů probíhá přes vazbu specifického TCR na MHC molekuly s navázaným antigenním peptidem na povrchu APC (aktivované DC, makrofágy nebo B lymfocyty). Vazba spolu se signalizací kostimulačních molekul CD28, OX40, 4-1BB, CD27 a GITR navozuje v naivních CD8<sup>+</sup> T lymfocytech prostřednictvím NF-κB dráhy expresi perforinu, granzymu a efektorových cytokinů IL-2 a IFN-γ. Souběžně signalizace přes TCR

aktivuje Ras-MAPK a PI3K-Akt-mTOR dráhy, které spouští metabolické reprogramování a regulaci exprese genů indukujících anergii.

Tyto změny plně aktivují T buněčnou odpověď, sekreci příslušných cytokinů včetně IL-2, který indukuje proliferaci T lymfocytů a vznik klonálních efektorových, aktivovaných CTL lymfocytů. Stadium aktivovaných T lymfocytů je provázeno expresí HLA-DR, CD69 a CD25. V případě naivních pomocných CD4<sup>+</sup> způsobí IL-12 produkovaný DC jejich diferenciaci na Th1 lymfocyty. Th1 v oblasti nádoru produkují např. TNF a IFN- $\gamma$  a společně s cytotoxickými CD8<sup>+</sup> T lymfocyty se podílejí na eliminaci transformovaných buněk.

T lymfocyty, které byly aktivovány ve spádové uzlině, migrují zpět do místa primárního nádoru. Jakmile jsou tyto buňky aktivovány, už nevyžadují druhý kostimulační signál, ale stačí jim rozpoznání MHC antigenu s navázaným peptidovým fragmentem, což vede k expanzi nádorově specifického klonu CTL. Výsledkem je napadení nádorové buňky a v ideálním případě její likvidace indukci apoptózy (degranulací cytotoxických granul nebo vazbou Fas-FasL). Část aktivovaných T lymfocytů se na konci imunitní odpovědi diferencuje v tzv. paměťové T lymfocyty, které jsou schopny rychlejší a silnější reakce v případě opětovného setkání s antigenním peptidem.

Jak CD8<sup>+</sup>, tak CD4<sup>+</sup> T lymfocyty mohou být navíc aktivovány pomocí dendritických buněk, které pohltily nádorové antigeny a prezentovaly je T lymfocytům na MHC I. resp. MHC II. gp. (tzv. „cross-presentation“). Tím jsou selektovány populace T lymfocytů specifické k nádorovým antigenům, a které při dalším setkání s nádorovou buňkou nepotřebují kostimulační signály.

## 4.2 Adoptivní T buněčná terapie

### 4.2.1 Imunoterapie malignit asociovaných s viry pomocí cytotoxických T lymfocytů

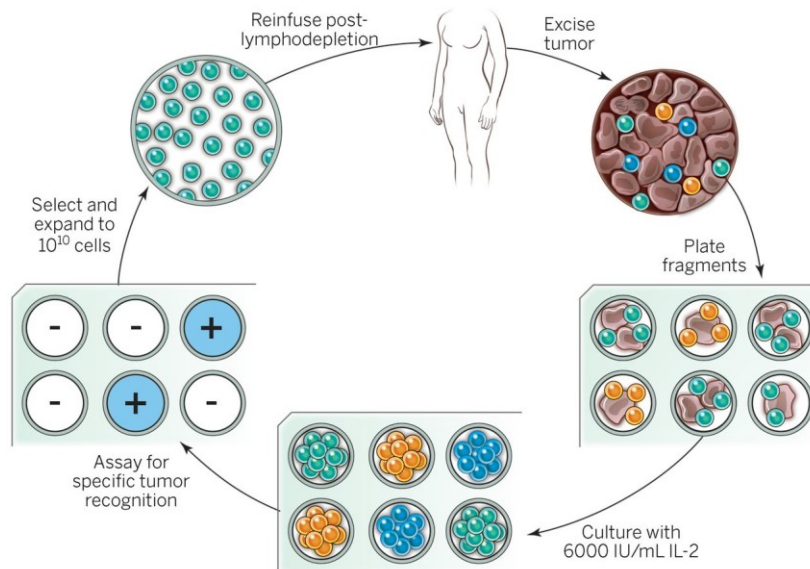
Pilotní studie adoptivního buněčného transferu se snažily charakterizovat fenotypové a funkční vlastnosti T lymfocytů, které ovlivňují úspěšnost léčby. Bylo prokázáno, že cytotoxické CD8<sup>+</sup> T lymfocyty v kooperaci s CD4<sup>+</sup> T lymfocyty jsou schopny specificky rozpoznat nádorový antigen, a mohou tak cíleně působit na nádorové buňky. Významný pokrok byl učiněn také díky identifikaci řady nádorových antigenů exprimovaných na lidských tumorech. Experimentální práce poukázaly na významnou asociaci mezi aviditou T lymfocytů k nádorovému antigenu *in vitro* a efektivitou ACT terapie *in vivo* [110, 111]. Při adoptivní terapii cytotoxickými T buňkami jsou lymfocyty senzitivovány daným nádorovým antigenem *in vitro* nebo *in vivo*. Proces dále pokračuje selekcí tumor-reaktivních CTL a jejich expanzí na terapeuticky významné množství. Nejlepších výsledků adoptivního transferu CTL bylo dosaženo v léčbě a prevenci virem-asociovaných malignit. Infekce virem Epsteina-Baarové, při níž je replikace viru kontrolována specifickými CTL, představuje riziko vzniku imunoblastického lymfomu u pacientů po alogenní transplantaci kostní dřeně. Aplikace EBV- specifických lymfocytů vedla k rejekci lymfomu a obnovení imunitních reakcí namířených proti EBV [112, 113]. CTL byly také úspěšně použity v prevenci komplikací způsobených infekcí cytomegalovirem (CMV). Tato oportunní infekce se vyskytuje u pacientů po alogenní transplantaci a koreluje s absencí CMV- specifických T lymfocytů. Adoptivní transfer CMV- specifických CTL klonů izolovaných z dárce transplantátu umožní restaurovat imunitu vůči cytomegaloviru [114], a zabraňuje tak posttransplantačním komplikacím.

### 4.2.2 Terapie tumor infiltrujícími T lymfocyty

Zdrojem buněk pro adoptivní transfer jsou v tomto případě nativní tumor infiltrující T lymfocyty izolované přímo z nádorové tkáně (obr. 1). Izolované lymfocyty by měly být již nádorově specifické, nicméně často jsou jejich efektorové funkce utlumeny vlivem nádorového mikroprostředí a ke své aktivaci vyžadují vhodný stimul např. ve formě

cytokinů. Proto před reinfuzí pacientovi mohou být TILs *in vitro* dodatečně manipulovány a následně pomnoženy (až tisícinásobně, většinou metodou REP, rapid expansion protocol). Potenciál adoptivního transferu TILs byl v minulosti prokázán na zvířecích modelech [115], nicméně humánní klinické studie, až na výjimku [116] moc úspěšné nebyly [117, 118]. Otázkou byla diskrepance nálezů a nejvíce diskutovaným důvodem byla krátká doba přežívání transferovaných buněk *in vivo*. Posun nastal až po zavedení lymfodeplečních režimů před samotnou aplikací ACT. U části pacientů s metastatickým melanomem, kteří před adoptivním transferem podstoupili non-myeloablativní chemoterapii (cyklofosfamidem a fludarabinem) a byla jim podána vysoká dávka IL-2, dosahuje počet objektivních léčebných odpovědí včetně kompletní regrese nádoru až 50% [119-121]. Tento režim u pacientů navodil přechodnou myelosupresi a krátkodobě eliminoval lymfocyty cirkulující v oběhu. Pacientům se následně obnovila aktivita a funkce kostní dřeně a jejich lymfocytární profil se po 2-3 týdnech po chemoterapii uvedl do původního stavu [122, 123]. Nicméně nutnost současného podání vysokých dávek IL-2 souvisela s řadou nežádoucích účinků. Ty byly odstraněny, jestliže se dávka IL-2 potřebná pro dlouhodobé přežití TILs *in vivo*, snížila na koncentraci 500-1000 IU a byla podána subkutánně [124, 125]. Nedávné výsledky naznačují, že účinnou alternativou namísto IL-2 může být aplikace INF- $\alpha$  předcházející transferu TIL [126]. Příznivý léčebný efekt pozorovaný u pacientů s maligním melanomem zřejmě souvisí s vyšší imunogenicitou oproti jiným solidním nádorům. V současnosti je testován efekt TIL terapie u nádorů s metastázemi (karcinom prsu, ovaria, kolorektálního karcinomu, glioblastomu a karcinomu slinivky) v rozsáhlé II. fázi klinické studie (clinicaltrials.gov, NCT01174121). Využití TILs pro adoptivní transfer přináší několik výhod: buňky nepodléhají žádným genetickým změnám během jejich expanze a zároveň si zachovávají vysoký stupeň specifické protinádorové reaktivity [127, 128]. Tato metoda má však i svá technická omezení: od každého typu nádoru nelze získat vzorek tkáně, navíc pouze 30-40 % bioptických vzorků poskytuje T lymfocyty vhodné ke kultivaci [129]. Limitujícím faktorem je také dlouhá kultivační doba potřebná pro produkci dostatečného množství TILs. Terapie se tak stává časově a finančně náročná, což lze považovat za hlavní omezení aplikace v širší klinické praxi. Na druhé straně je zajímavé uvést i druhý pohled na TILs, a to s ohledem nejen na jejich terapeutické využití. Publikované studie na ovariálním a kolorektálním karcinomu prokázaly, že přítomnost tumor infiltrujičích lymfocytů v nádorové tkáni pozitivně

koreluje s dobou přežívání pacientů a že na základě charakterizace infiltrátu imunokompetentních buněk je možné predikovat relaps onemocnění.



**Obr. 1: Obecné schéma adoptivního T buněčného transferu autologních TIL.**

Převzato z [88].

#### 4.2.3 Terapie geneticky modifikovanými T lymfocyty

V případech, kdy nádor nemůže sloužit jako primární zdroj buněk, se zkouší technika genetické modifikace T lymfocytů (obr. 2). Transferované T lymfocyty jsou upraveny *in vitro* transdukcí pomocí virového vektoru, který vnese do genomu T lymfocytů sekvenci DNA kódující modifikovaný povrchový receptor. Takto modifikovaný T lymfocyt exprimuje  $\alpha\beta$  TCR heterodimer, s žádanou specifitou a aviditou k nádorovému antigenu. První studie se zaměřily na adoptivní transfer T buněk s receptorem pro MART-1 a gp100 antigen. 20-30 % pacientů s metastatickým melanomem vykazovalo objektivní klinickou odpověď, bohužel i řadu nežádoucích reakcí (vitiligo, akutní uveitida) [130]. Pozitivní efekt ve smyslu infiltrace transferovaných T buněk do kožní i nádorové tkáně byl pozorován po podání autologních CD8<sup>+</sup> lymfocytů cílených na nádorový antigen MART-1 spolu s nízkou dávkou IL-2 [131]. Yee a kol. tak přinesli první důkazy o tom, že transferované CTL se *in vivo* přednostně lokalizují do míst s cílovým antigenem v nádorové i normální tkáni. Tento výsledek potvrdila fáze I. klinické studie u metastatického melanomu, která

detekovala MART-1 reaktivní T lymfocyty v místech nádoru pomocí specifických tetramerů. Indukovaná klinická odpověď byla zaznamenána u tří z jedenácti pacientů, u kterých klony CTL perzistovaly v periferní krvi několik týdnů po adoptivním transferu [132]. Povzbudivých výsledků přineslo několik prací s použitím TCR proti antigenům NY-ESO1 [133, 134], MAGE-A1 [134] a MAGE-A3 [135, 136].

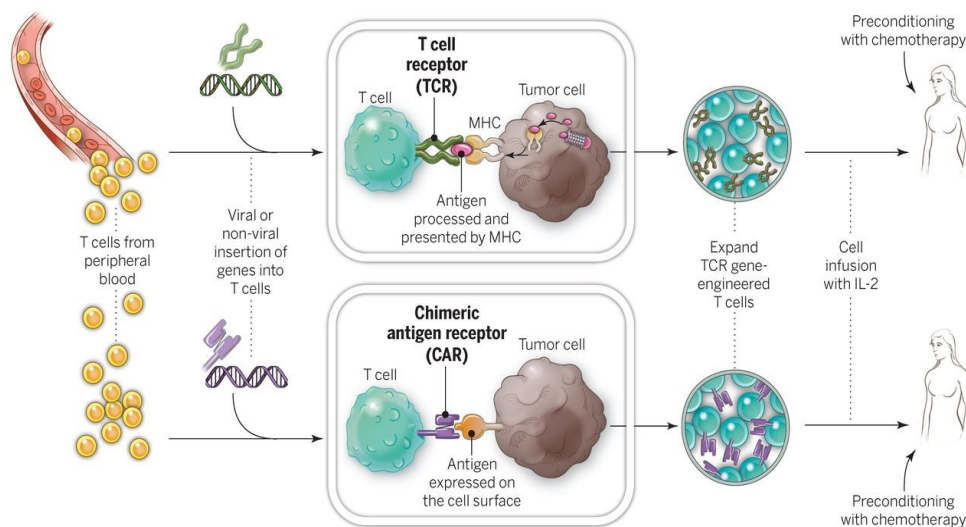
Současným trendem je adoptivní transfer pomocí T lymfocytů exprimujících chimerický antigenní receptor (CAR), který ke své aktivaci nevyžaduje vazbu nádorového antigenu na molekuly MHC [137] a umožňuje signalizaci bez nutnosti APC. CAR T lymfocyty je možné připravit nejen z vlastních lymfocytů pacienta, ale je možné modifikovat i alogenní lymfocyty dárcovského původu u pacientů po alogenní transplantaci kostní dřeně. Fúzní genový konstrukt vnesený do T lymfocytu kóduje transmembránový protein skládající se ze dvou částí. Extracelulární část je tvořena variabilní doménou monoklonální protilátky (scFv), která zajišťuje specifickou vazbu antigenu. Struktura intracelulární části receptoru prošla několika stupni vývoje. První generace CARs (zvaná „T bodies“) měla intracelulární signalizační doménu z CD3 $\zeta$  řetězce nebo Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ . Využití těchto konstruktů však neprokázalo významnější klinický přínos. Druhé generaci byly pro zlepšení aktivačního signálu přidány cytosolické domény z různých kostimulačních receptorů (např. CD28, 4-1BB)[137]. Celý konstrukt tak získal přednosti cílené specificity monoklonální protilátky a zároveň schopnost aktivovat T lymfocyty svými kostimulačními doménami. CARs této generace jsou experimentálně využívány např. v léčbě chronické lymfatické leukémie, akutní lymfatické leukémie nebo folikulárního lymfomu, a nejčastěji cílí proti antigenu CD19 [138-140]. Využívá se i kombinovaná imunoterapie zahrnující CAR T lymfocyty a anti-CD20 protilátku nebo CARs s kombinovanou specificitou (např. proti CD19 a CD22 antigenům). Výsledky studií prokazují klinický terapeutický efekt nejenom ve stadiu MRD, ale i při měřitelné nádorové mase. Účinnost léčby se ověřuje také u solidních nádorů, výsledky jsou však méně povzbudivé. Nejvýznamnější úspěch CARs druhé generace zaznamenaly dva výše zmíněné léčivé přípravky - axicabtagen ciloleucel (Yescarta) společnosti Gilead a tisagenlecleucel (Kymriah) společnosti Novartis, které v roce 2018 obdržely evropskou registraci. Přípravek Yescarta je indikován k léčbě dospělých pacientů s relabujícím nebo refrakterním difuzním velkobuněčným B lymfomem (DLBCL) a s primárním mediastinálním velkobuněčným B lymfomem (PMBCL) po dvou či více liniích systémové léčby. Přípravek Kymriah je určen pro



léčbu B-ALL u jedinců do 25 let věku a k léčbě dospělých s DLBCL. V pokročilé fázi testování je obdobný produkt s názvem JCAR017 společnosti Celgene [141]. Současná třetí generace CARs se liší přidavkem dalších kostimulačních domén, nejčastěji v kombinaci CD28 a CD137, nebo CD28 a CD134. Doposud byly publikovány nadějně výsledky s CD19-specifickými CAR T lymfocyty v terapii pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií [142]. V pre-klinickém výzkumu se pro posílení homingu CAR T lymfocytů do místa nádoru zkouší zavedení receptorů pro chemokiny či cytokiny (např. CXCR2, CCR4) [143]. Zajímavý způsob, jak zvýšit stimulaci a expanzi tumor specifických CAR T lymfocytů *in vivo*, je intravenózní podání tzv. RNA-LTX vakcíny. Jedná se o programovatelné RNA nanočástice obalené liposomy, které jsou díky svému elektrickému náboji navigovány k APC. Zde fungují jako TLR ligand a zároveň jako adjuvans pro APC (především DC) ve slezině, lymfatických uzlinách a kostní dřeni. Výsledkem stimulace je priming a expanze jak endogenních T lymfocytů, tak CAR T lymfocytů cílených na stejný antigen, jaký nese vakcína. RNA-LTX stimulované CARs vykazují cytolytickou aktivitu a vytváří klony paměťových lymfocytů s dlouhou persistencí *in vivo*. U solidních nádorů je testována např. claudin 6 (CLDN6)- kódující RNA-LTX vakcína pro expanzi CLDN6-CAR T lymfocytů [144].

Probíhají též klinické testy s použitím CAR čtvrté generace (označované jako TRUCKs, T cell redirected for universal cytokine-mediated killing), které kombinují CAR druhé generace s přidáním klíčových cytokinů (např. IL-12, IL-15, IL-7), které významně zvyšují expanzní aktivitu T lymfocytů, nebo s tzv. sebevražednými geny, které umožňují „vypnutí“ aktivity T lymfocytů v případě nežádoucích účinků. Vylepšení další, páté generace CAR technologie zahrnuje například genetický knock-out HLA a TCR genů T lymfocytů pro snížení rizika reakce štěpu proti hostiteli [145]. V současnosti je celosvětově evidováno více než 250 klinických studií s CAR cílených především vůči celé řadě leukemických, lymfomových či myelomových antigenů. Použití geneticky modifikovaných T receptorů s sebou bohužel přináší i riziko nežádoucích vedlejších účinků, nejčastěji tzv. „on-target/off-tumor“ efektu, syndromu vysoké hladiny cytokinů (cytokine release syndrome) nebo s ním spojenou cytokinovou bouří. Tvorba TCR z endogenních a transgenních řetězců může také vést ke vniku nových forem autoreaktivních receptorů, vyvolávajících autoimunitní onemocnění. Dalším úskalím je toxické působení CAR modifikovaných T buněk, které napadají zdravé tkáně exprimující stejné cílové antigeny, jaké jsou obsaženy v nádorových

buňkách. Ke zmírnění těchto účinků by mohla přispět tzv. „sebevražedná genová terapie“, která využívá modifikované T lymfocyty exprimující sebevražedné molekuly. Jako první byla úspěšně provedena metoda vnesení genu pro tymidin kinázu z Herpes simplex viru při transplantaci hematopoetických kmenových buněk [146]. Ta byla navržena tak, aby podáním léku (acyklovir nebo gancyklovir) došlo k aktivaci takto modifikovaných buněk a jejich následné apoptóze. Testují se i další alternativy kandidátních sebevražedných genů (např. iCaspase 9, Fas).



Obr. 2: Možnosti genetických modifikací T lymfocytů pro ACT. Převzato z [88].

#### 4.2.4 Kombinované přístupy adoptivního transferu T lymfocytů s imunoterapií dendritickými buňkami

Další možností, jak zvýšit protinádorovou imunitní odpověď, je kombinovaná terapie adoptivního transferu tumor specifických T lymfocytů a vakcín. Tato metoda využívá schopnosti vakcíny indukovat efektorové antigen specifické T lymfocyty, které mohou být izolovány, *ex vivo* expandovány a následně zpět podány pacientovi. Na myších modelech bylo demonstrováno, že ACT zvyšuje účinek terapeutických vakcín [147, 148]. První humánní testy byly provedeny u hematologických malignit. Výsledkem byla rapidní rekonstituce lymfocytů u pacientů s non-Hodgkinovým lymfomem, kteří podstoupili transplantaci CD34<sup>+</sup> hematopoetických kmenových buněk následovanou infúzí autologních *ex vivo* expandovaných T lymfocytů [149]. Fáze I/II randomizované

studie provedená Rapoportem a kol. [150] byla navržena tak, aby analogicky otestovala možný přínos této strategie u mnohočetného myelomu. Pacientům byla podána pneumokoková vakcína Prevenar, a poté jim ve dvou intervalech (14 nebo 100 dní) byly odebrány a *ex vivo* expandovány indukované T lymfocyty. Po následné transplantaci kmenových buněk jim byly takto generované autologní T lymfocyty injikovány zpět do těla. Pouze u pacientů, kteří obdrželi *ex vivo* expandované T lymfocyty v kratším intervalu po transplantaci došlo k rekonstituci lymfocytů. Výstupní data této pilotní studie ukázala, že terapie sestávající se z vakcíny podané před transplantací a časného adoptivního transferu zlepšuje imunodeficitní stav pacienta během jednoho měsíce po transplantaci.

Dalším terčem testování se stal metastatický melanom a renální karcinom. Na základě poznatků z preklinických studií byla provedena fáze I. klinické studie, ve které byla pacientům aplikována vakcína z ozářených autologních nádorových buněk s bakteriálním adjuvans [151]. Za několik dní byly vakcínou indukované T lymfocyty použity pro adoptivní transfer. Tato metoda vedla k částečné regresi tumoru u 1 z celkem 11 pacientů s metastatickým melanomem. Několik dalších studií tento koncept v následujících letech následovalo, s použitím různých druhů DC vakcín [152, 153]. V případě pacientů s renálním karcinomem byly zaznamenány čtyři kompletní a pět částečných regresí nádoru z celkových třiceti čtyř [154]. Uvedené výsledky ukazují na klinický potenciál této strategie [136].

#### **4.2.5 Strategie zlepšení efektivity adoptivního transferu tumor specifických T lymfocytů**

Na úspěšnost adoptivní buněčné terapie má vliv řada faktorů. Byl popsán přímý vztah mezi počtem transferovaných buněk a úspěšností léčby. Důležitý je i fenotyp transferovaných buněk. Bylo prokázáno, že efektorové paměťové T lymfocyty (TEM) mají sice zesílenou efektorovou funkci, ale jsou náchylné k aktivací-indukované buněčné smrti (AICD) a po transferu přežívají jen krátkodobě [131]. Experimentální studie prováděné na animálních modelech naopak naznačují, že podání centrálních paměťových T lymfocytů (TCM) vede k rejekci nádoru a zajistí dlouhodobou imunitní odpověď. Z tohoto důvodu se do ACT protokolů pro podporu diferenciaci zařadila kultivace T lymfocytů v přítomnosti IL-7 a IL-15. Detailnější fenotypová analýza

expandovaných lymfocytů se zaměřuje především na znaky spojené s efektorovými funkcemi a schopností přežívání lymfocytů v podmínkách *in vivo*. Z publikovaných dat vyplývá, že žádaná je indukce tzv. early/intermediate lymfocytů, které se vyznačují ko-expresí molekul CD27, CD28 a CD62L a naopak absencí molekuly CD57. Ukazuje se, že při vysokých hladinách exprese znaků CD27 a CD28 perzistují transferované T lymfocyty v krvi déle [44]. Naopak nízká exprese znaku CD57 demonstruje, že daná populace není terminálně diferenciovaná v efektorové buňky, a nemá tedy omezenou proliferační kapacitu. Ukazuje se, že vyššího protinádorového efektu po ACT je dosaženo současným podáním CD8<sup>+</sup> a CD4<sup>+</sup> T lymfocytů, transdukovaných v časném diferenciačním stádiu.

Dříve pacienti podstupovali ACT bez předchozí chemoterapie, docházelo však k nežádoucím efektům způsobovaným regulačními T lymfocyty. Zablokování negativních regulačních mechanismů zodpovědných za udržování imunologické tolerance lze dosáhnout prostřednictvím  $\alpha$ -CD25 neutralizačních protilátek nebo farmakologicky. Zavedení lymfodeplečních režimů předcházejících transferu vedlo k eliminaci těchto supresorových faktorů a k významnému prodloužení přežívání transferovaných lymfocytů [155, 156]. Poskytlo také prostor pro rekonstituci protinádorových efektorových buněk. Tento postup byl úspěšný například při léčbě pacientů s maligním melanomem [156] a lymfomem, ale představuje i možnost léčby dalších typů nádorů [79].

Pro potlačení lokální imunosuprese po ACT byl vyvinut dominantní negativní TGF- $\beta$  receptor, který je nyní testován ve fázi I klinické studie (NCT0308920). Je zvažována i další manipulace s organizmem pacienta ve smyslu eliminace dalších buněk (B, T a NK), které by mohly soupeřit s těmi transferovanými o důležité homeostatické cytokiny, jako jsou IL-7 a IL-15 [157, 158].

## 5. KARCINOM PROSTATY

Nejčastějším histologickým typem nádoru prostaty je acinární adenokarcinom. Z hlediska pokročilosti rozlišujeme tři kategorie. Lokalizovaný nádor je ohraničen pouze na prostatu, lokálně pokročilý přesahuje přes pouzdro žlázy nebo postihuje pánevní mízní uzliny a metastatický zakládá vzdálená ložiska, nejčastěji v kostech. Stupeň histologické diferenciaci nádoru se určuje pomocí Gleasonova skóre (2-10). Nádor prostaty vzniká spontánně a není znám jasný rizikový faktor.

### 5.1 Epidemiologie a léčba

V České republice je karcinom prostaty nejčastější urologickou malignitou u mužů. Podle dat uvedených v Národním onkologickém registru se incidence karcinomu prostaty od roku 1990 do roku 2016 zvýšila ze 31,91/100 000 obyvatel na 140,7/100 000 obyvatel. Jelikož kromě věku nejsou známy žádné další rizikové faktory karcinomu prostaty, není primární prevence v současné době možná. V roce 2016 bylo v ČR hlášeno 7 305 nových případů, přičemž nemoci podlehl 1 421 pacientů (což tvoří 9,2 % všech úmrtí na zhoubné novotvary). Téměř 20 % nemocných má již v době stanovení diagnózy generalizované onemocnění (převzato z ÚZIS). Ve srovnání se světovým výskytem nádorů jsou čeští muži na 40. místě ve výskytu karcinomu prostaty (1. místo USA), přičemž jen v Evropě je diagnostikováno ročně zhruba 450 000 nových případů se 107 000 úmrtí (Globocan 2018). Vyšší výskyt nádorů prostaty je vysvětlován jednak stárnutím populace, jednak nárůstem rutinního preventivního vyšetřování hodnot PSA u starších mužů. Díky tomu jsou častěji odhalena i časná stadia karcinomu, klinicky dosud nemá, která by se za jiných okolností ještě nezjistila. Metodami první volby v časně detekci jsou palpační vyšetření prostaty *per rectum* a vyšetření hladin prostatického specifického antigenu v krvi. Léčba se odvíjí od klinického stadia nemoci a zahrnuje radikální prostatektomii (chirurgické odstranění), radioterapii, chemoterapii a hormonální léčbu. Hormonální léčba (androgen deprivační terapie, ADT) se obecně dělí na kastročnící (blokáda syntézy testosteronu vedoucí k jeho kastročním hladinám) a na léčbu antiandrogeny (blokáda vazby testosteronu na androgenní receptor bez vlivu na hladinu testosteronu). Karcinom prostaty získává v průběhu léčby ADT nové růstové charakteristiky a vyvíjí mechanismy, které mu umožňují růst nezávisle na přítomnosti

testosteronu. Tímto přestává být hormonálně dependentní a rozvíjí se stadium kastračně rezistentního karcinomu prostaty (CRPC). Do tohoto stadia dospěje asi 20 % pacientů v průběhu pěti let po zahájení léčby hormonální deprivací.

Kurativně (radikální prostatektomií nebo radikální radioterapií) lze karcinom prostaty léčit ve fázi lokálního postižení, kdy se desetileté přežívání pohybuje kolem 75 – 93 %. U řady pacientů po skončení léčby dojde k relapsu provázenému nárůstem hladin PSA. Nepříznivými faktory biochemického relapsu je Gleasonovo skóre > 7, hladina PSA a stadium nemoci v době diagnózy. K prognostice výsledků se používá parametr odvozený z PSA - čas zdvojení hladiny prostatického specifického antigenu (PSA doubling time, PSADT). Situace u metastazujícího karcinomu je mnohem komplikovanější a takto postižení pacienti mají významně horší prognózu. Obvykle je indikována ADT, která má za cíl vyvolat apoptózu v primárním tumoru a metastatických ložiscích. Hormonální léčba u diseminovaného onemocnění umožňuje pacientovi přežít zpravidla 18 až 30 měsíců. Metastatický kastračně-rezistentní karcinom prostaty (mCRPC) je definován přítomností kostních nebo jiných vzdálených metastáz a kontinuálním nárůstem PSA. V tomto stadiu je kromě paliativní léčby doporučeno podání docetaxelu (cytostatikum). V případě selhání léčby jsou k dispozici i další nové preparáty, které vedou ke zlepšení přežití u těchto pacientů (hormonální přípravky další generace – abirateron-acetát, enzalutamid; cytotoxické přípravky – kabazitaxel; radiofarmakum cílené na kostní tkáň – radium-223). K prevenci kostních komplikací lze použít denosumab – monoklonální protilátku proti RANKL nebo bisfosfonáty.

## **5.2 Přehled současné imunoterapie u karcinomu prostaty**

Zásadní pro imunoterapii je skutečnost, že lze u pacientů detekovat autoprottilátky proti prostatickým buňkám karcinomu [159], což poukazuje na určitý stupeň imunogenicity nádoru. Dalším předpokladem je přítomnost nádorově asociovaných antigenů, jako jsou PSA, PSCA, PAP, PSMA, NGEP (new gene expressed in prostate), TARP (T cell receptor gamma alternate reading frame protein) nebo androgenového receptoru v séru či nádorové tkáni pacienta. Tyto představují možné cíle imunoterapie. Na druhou stranu např. buňky kastračně rezistentního karcinomu prostaty nevykazují expresi PD-L1,

tudíž potenciál terapie zaměřené na PD-1/PD-L1 inhibitory je u tohoto typu nádoru sporný [160].

Dosud jediným schváleným preparátem v rámci aktivní buněčné terapie je vakcína Sipuleucel-T pro léčbu pacientů s asymptomatickým či minimálně symptomatickým mCRPC. Jedná se o vakcínu na bázi aktivovaných monocytů (detailněji viz kap. 3.2), která je vyráběna individuálně pro každého pacienta. V roce 2010 byla uvedena na americký farmaceutický trh. Sipuleucel-T je tvořen autologními monocytami kultivovanými s fúzním proteinem PA2024, pacientům je zpětně podán v infuzi. Mechanismus účinku spočívá v tom, že po podání dojde k maturaci na funkční APC, které následně aktivují PAP- specifické CD4 a CD8 T lymfocyty. Aktivované T lymfocyty posléze putují do nádorových lézí, kde eliminují nádorové buňky. Schválení vakcíny bylo provedeno na základě výsledků studie fáze III. s názvem IMPACT, která se zabývala vlivem vakcíny na celkové přežití [101]. Výsledky prokázaly, že Sipuleucel-T vykazoval o 22 % větší relativní redukci rizika úmrtí oproti placebo. Jeho podání tak zvýšilo pravděpodobnost přežití na 36 měsíců.

V režimu klinických testů byla terapeutická vakcína PROSTVAC (komerční označení TRICOM) určená pro pacienty s minimálně symptomatickým CRPC. Přípravek je složený z rekombinantního viru vakcinie a ptačích neštovic kódující PSA a trojici kostimulačních molekul T lymfocytů (B7.1, ICAM-1 a LFA-3). Virové vektory jsou vpraveny pod kůži, kde infikují pacientovy epiteliální buňky, které posléze prodělají buněčnou smrt. Poté je buněčný debris, obsahující také cílový antigen PSA, zpracován hostitelskými APC a prezentován CD4 a CD8 T lymfocytům. Cílem je indukovat CTL klony, které budou lyzovat nádorové tkáně exprimující PSA. Ve studii fáze II. byl prokázán trend delšího celkového přežívání a poklesu Treg u skupiny pacientů s vyššími hodnotami PSA-specifických T lymfocytů. Nemocní léčení vakcínou žili o 8,5 měsíce déle a bylo u nich dosaženo 43 % redukce rizika úmrtí v následných třech letech [161]. Příznivé výsledky však nedávno ukončená fáze III. (NCT01322490) nepotvrdila.

V současnosti probíhá také fáze I. klinické studie pacientů s karcinomem prostaty (NCT01140373), zaměřená na adoptivní transfer autologních CAR T lymfocytů cílených proti PSMA.

Z imunoterapie zaměřené na blokádu checkpoint inhibitorů je nejvíce klinických zkušeností s monoklonální IgG1 protilátkou ipilimumab (anti-CTLA-4). Samotná

protilátka byla klinicky testována v multicentrických randomizovaných studiích [162], které však neprokázaly zlepšení celkového přežití. Momentálně se testuje účinnost ipilimumabu v kombinaci např. se Sipuleucelem-T nebo vakcínou PROSTVAC.



## 6. CÍLE PRÁCE

Předchozí kapitoly teoretického úvodu popisují současný koncept komplexních vztahů složek imunitního systému při vzniku nebo rozvoji nádoru. Dále shrnují aktuální stav poznání v oblasti protinádorové imunoterapie, snahy o její začlenění do klinické praxe, a to s důrazem na techniku adoptivního transferu T lymfocytů pro léčbu nádorů. Vzhledem k vědeckému zaměření a předešlé rozsáhlé experimentální zkušenosti našeho pracoviště s imunoterapeutickou léčbou nádoru prostaty lze cíle předložené dizertační práce shrnout do následujících bodů:

1. Vytvoření experimentálního protokolu výroby autologních nádorově specifických T lymfocytů vhodných pro adoptivní transfer pacientům s karcinomem prostaty.
2. Optimalizace protokolu krokem obohacení lymfocytární populace o polyklonální efektorové T lymfocyty.
3. Sledování a zhodnocení bezpečnostních parametrů, schopnosti navodit imunitní protinádorové odpovědi a kinetiky PSA u pacientů s lokalizovaným karcinomem prostaty léčených pomocí aktivní buněčné imunoterapie preparátem DCVAC/PCa ve fázi I. /II. klinického hodnocení.

## 7. VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledky této práce byly shrnuty do tří publikací otištěných v zahraničním tisku s impakt faktorem. V následujícím oddílu jsou uvedeny ve formě, ve které byly publikovány. Komentář ke každé z přiložených publikací shrnuje zásadní výsledky a závěry práce a hodnotí jejich význam. Vzhledem k heterogenitě experimentálních postupů jsou příslušné metody podrobně uvedeny v jednotlivých publikacích.

### 7.1 Příloha 1: Výroba efektorových T lymfocytů pro adoptivní terapii s použitím dendritických buněk pulzovaných usmrcenou prostatickou nádorovou linií

Adoptivní T buněčná terapie je moderní léčebnou platformou, která prokázala terapeutickou účinnost u pacientů s vysoce imunogenním typem nádoru, a to i v pozdních stádiích onemocnění. Její účinnost v širší klinické praxi je však stále neuspokojivá. Naším cílem bylo zvýšit její efektivitu a možné klinické využití cestou implementace nejnovějších poznatků z oblasti ACT do vývoje laboratorního protokolu přípravy autologních nádorově specifických T lymfocytů. Zaměřili jsme se na optimalizaci experimentálního protokolu výroby *ex vivo* expandovaných autologních tumor specifických T lymfocytů pomocí DC vakcíny u zdravých osob. Jednotlivé kroky výrobního procesu jsme testovali za různých kultivačních podmínek. Naším záměrem bylo získat takovou populaci efektorových T lymfocytů, které by zajistily protinádorový účinek po jejich adoptivním transferu. U výsledného protokolu jsme očekávali, že bude splňovat kritéria pro případné klinické využití u pacientů s karcinomem prostaty.

Výchozím bodem pro naši experimentální aktivitu byl fakt, že nízká imunogenicita karcinomu prostaty a nedostatek bioptického materiálu z primárního nádoru nám neumožnily zvolit techniku výroby nádorově specifických T lymfocytů pomocí TIL. Proto jsme využili imunoterapeutický potenciál vakcíny z dendritických buněk pulzovaných prostatickou nádorovou linií LNCaP. Zvolili jsme inovativní způsob navození imunogenní buněčné smrti, kdy nádorová linie LNCaP, jakožto zdroj antigenů pro DC, byla usmrcena pomocí vysokého hydrostatického tlaku. Publikované studie prokázaly, že DC pulzované takto ošetřenými nádorovými buňkami dokázaly indukovat nádorově specifické T lymfocyty a naopak velmi nízké hladiny regulačních

T lymfocytů. Vakcínu jsme poté kultivovali s autologními T lymfocyty dárce s cílem indukovat tumor specifické T lymfocyty. Postupně jsme se zaměřili na optimalizaci kultivačních podmínek, konkrétně na výběr kultivačních médií a jejich suplementů. Během kultivace jsme zjišťovali vhodné koncentrace cytokinů (IL-2, IL-7, IL-15 a jejich kombinace) a jejich účinky na proliferaci T lymfocytů. Podle našich výsledků se jako nejvhodnější jevílo využití kompletního RPMI 1640 média s 20 IU/ml cytokinu IL-2.

Dále jsme vypracovali vhodný fluorocytometrický panel pro detekci a určení fenotypových charakteristik vhodných pro adoptivní transfer a následně jsme stanovovali expresní profil expandovaných T lymfocytů. Pomocí multiparametrické průtokové cytometrie jsme u CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů analyzovali markery lymfocytárních populací (CD62L, CD28, CD27, CCR7 a CD57), které jsou asociovány s účinnou aktivací protinádorové odpovědi a dlouhodobým přežíváním buněk *in vivo* po adoptivním transferu. Analýza finálního produktu ukázala, že většina expandovaných T lymfocytů vykazovala tzv. effector memory fenotyp (CD62L<sup>low</sup>CCR7<sup>-</sup>) s nízkým zastoupením terminálně diferenciovaných T lymfocytů (CD57<sup>+</sup>). Významná frakce CD8<sup>+</sup> T lymfocytů si po expanzi zachovala expresi molekul CD27 a CD28, ale zároveň snížila expresi znaku CD57. Tento profil odpovídá tzv. early/intermediate fenotypu, který je dle výsledků dostupných publikací vhodný pro účely adoptivního transferu T lymfocytů.

V průběhu experimentu jsme stanovovali frekvenci tumor specifických lymfocytů pomocí intracelulární detekce IFN- $\gamma$ . Zavedli jsme pre-stimulační krok pomocí DC vakcíny, který signifikantně zvýšil počet tumor specifických CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T lymfocytů v kultuře. K navýšení počtu takto indukovaných T lymfocytů jsme použili nescifickou stimulaci pomocí anti-CD3/anti-CD8 Dynabeads a za použití WAVE bioreaktoru se nám podařilo namnožit T lymfocyty na jejich klinicky potřebné množství vhodné pro ACT. Frekvence tumor specifických T lymfocytů, měřená jejich schopností produkovat IFN- $\gamma$ , ve finálním produktu v průměru odpovídala 2,3 % CD8<sup>+</sup> a 22 % CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T lymfocytů. Zároveň obě lymfocytární subpopulace vykazovaly vysoký proliferační potenciál (> 92%), stanovený měřením jaderného proliferačního faktoru Ki-67.

V závěru jsme *in vitro* testovali schopnost takto připravených T lymfocytů zabíjet nádorové buňky reprezentované lidskými nádorovými liniemi. Finální

expandované T lymfocyty vykazovaly signifikantně vyšší cytotoxicitu proti LNCaP linii ve srovnání s kontrolní ovariální SKOV-3 linií, což naznačuje jejich specificitu vůči prostatickým antigenům. Tyto výsledky podporují i naše výsledná data ze souběžného stanovení frekvence TAA-reaktivních T lymfocytů. Frekvence PSA a NY-ESO-1 reaktivních CD8+ T lymfocytů prokazatelně narůstala po restimulaci DC vakcínou, s nejvyšším zastoupením ve finálním produktu. Dalším důležitým parametrem byla celková kultivační doba, kterou se nám podařilo stanovit v průměru na 26 dní, což je zhruba dvojnásobně kratší doba než u současných ACT protokolů.

Naše výsledky naznačují, že vypracovaný experimentální protokol má potenciál v budoucím klinickém použití, nicméně vyžaduje následné testování na krevním produktu pacientů s karcinomem prostaty, a s tím spojené modifikace protokolu splňující požadavky režimu správné výrobní praxe (GMP). Předpokládáme, že kombinovaná terapie vakcíny a adoptivního transferu by mohla vést k podstatnému zvýšení specifické protinádorové imunitní odpovědi a přispět tak k účinnější léčbě pacientů s karcinomem prostaty.

## **7.2 Příloha 2: *Ex vivo* obohacení buněčné populace o peptid-specifické T lymfocyty a následná detekce T lymfocytů reaktivních k nádorově asociovaným antigenům u pacientů s karcinomem prostaty**

V této studii jsme pracovali s leukaferetickým materiálem získaným od 14 pacientů ve stádiu biochemického relapsu (BR) a 12 pacientů s metastatickým hormonálně refrakterním karcinomem prostaty (HR). K obohacení jsme na rozdíl od běžně využívaných periferních krevních mononukleárních buněk (PBMC) použili jakožto výchozí materiál non-adherentní frakci PBMC. Pomocí degranulačního markeru CD107a jsme zjišťovali, zda získaná lymfocytární frakce obsahuje peptid-specifické T lymfocyty a optimalizovali jsme stimulační kroky, které by vedly k obohacení této populace o polyklonální efektorové T buňky. Zvolili jsme techniku tzv. primingu peptidem - aktivaci již existujících antigenně specifických T lymfocytů (definovaných jako CD3+CD8+CD107a+). Tento personalizovaný přístup byl přizpůsoben charakteristice antigenní imunitní odpovědi pacienta, která se v jednotlivých stádiích onemocnění velmi liší. Výhodou zvolené metody je předpokládaná specifita působení.

U vstupních lymfocytárních vzorků jsme nedetekovali T buněčnou odpověď na žádný z testovaných nádorově asociovaných antigenů (PSA, PAP, NY-ESO-1, MAGE-A1, MAGE-A3 a MAGE-A4). Priming T lymfocytů jsme provedli bez přítomnosti autologních APC, pouze stimulací peptidovou směsí o celkové koncentraci 0,2 µg/mL. Ve srovnání s kontrolní skupinou vedl krok primingu k signifikantnímu obohacení o peptid-specifické CD8+ T lymfocyty u osmi pacientů s BR a u pěti pacientů s HR. U takto reaktivních T lymfocytů jsme následně identifikovali jejich cílový antigen. Testování jednotlivých peptidů odhalilo u T reaktivních lymfocytů specifitu vůči PSA, MAGE-A1 a MAGE-A4.

### **7.3 Příloha 3: Fáze I./II. klinického hodnocení aktivní buněčné imunoterapie založené na dendritických buňkách pomocí preparátu DCVAC/PCa u pacientů s karcinomem prostaty s rostoucí hladinou PSA po primární prostatektomii nebo salvage radioterapii**

Řada experimentálních dat naznačuje, že protinádorová imunoterapie má větší naději na výrazný klinický efekt, pokud je zahájena co nejčasněji v průběhu onemocnění. V provedené klinické studii fáze I./II. jsme testovali efekt protinádorové imunoterapie pomocí vakcíny z dendritických buněk u pacientů s karcinomem prostaty ve stadiu biochemického relapsu. Vycházeli jsme z předpokladu, že dendritické buňky obsažené v preparátu DCVAC/PCa budou fungovat jako účinné adjuvans pro indukci imunitní reakce buněčného typu, která je nutná pro efektivní aktivní protinádorovou imunitu. Mezi lety 2010 až 2014 bylo do studie registrované pod označením EudraCT 2009-017259-91 zařazeno 27 pacientů s histologicky potvrzeným karcinomem prostaty ve fázi biochemického relapsu po radikální prostatektomii nebo po salvage radioterapii. V rámci studie byli pacienti léčeni 12 dávkami dendritických buněk, které prezentovaly nádorové antigeny z linie LNCap (DCVAC/PCa). DCVAC je léčivý přípravek aktivní buněčné imunoterapie, který je vyráběn individuálně pro každého pacienta s využitím jeho vlastních dendritických buněk s cílem indukovat imunitní reakce proti nádorovým antigenům. Subkutánně bylo aplikováno v jedné dávce  $1 \times 10^7$  dendritických buněk v intervalu zhruba 4 týdnů. Hodnotila se bezpečnost a toxicita preparátu DCVAC/PCa, a zároveň se sledovala kinetika PSA markeru a změny v testovaných parametrech. Hodnotila se bezpečnost a toxicita preparátu DCVAC/PCa, a zároveň se sledovala kinetika PSA markeru a změny v testovaných parametrech. Hodnocení rychlosti změn hladin PSA probíhalo stanovením PSA-doubling time, který je definován jako čas potřebný ke zdvojnásobení jeho hladiny. Parametr PSADT se využívá k předpovědi progresu karcinomu prostaty.

Při podávání DCVAC/PCa jsme nezjistili žádné závažné nežádoucí účinky vázané na testovaný přípravek. Kontinuální protinádorová imunoterapie pomocí DCVAC/PCa signifikantně prodloužila PSADT u všech pacientů. V průměru došlo k 3,32násobnému prodloužení PSADT po skončení léčebného cyklu. Medián PSADT se zvýšil z 5,67 měsíců při zahájení imunoterapie na 18,85 měsíců při dokončení aplikace dávek. Neidentifikovali jsme žádný ze sledovaných imunologických parametrů, který

by koreloval s prodloužením PSADT. V průběhu cyklu terapie došlo u pacientů k signifikantnímu nárůstu CD3<sup>+</sup> T lymfocytů, ale nikoliv ke změnám frekvence aktivovaných CD3<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> lymfocytů, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> T lymfocytů, Treg, ani hladin IgG a IgM protilátek. U léčených pacientů jsme detekovali stabilní T buněčnou imunitní reakci proti nádorovým antigenům PSA, NY-ESO1, MAGE A1 a MAGE A3. U pacientů-respondérů jsme našli korelaci mezi expresí genů spojených s CD8/NK cytotoxicitou v populacích T lymfocytů před vakcinací a klinickou odpovědí po vakcinaci. Tato studie indikuje, že kontinuální protinádorová imunoterapie pomocí přípravku DCVAC/PCa prodlužuje PSADT u pacientů s biochemickým relapsem karcinomu prostaty. Příznivý bezpečnostní profil léčivého přípravku s prokázanou schopností indukce imunitní odpovědi na nádorové struktury a potvrzeným klinickým efektem pro pacienty posunul testování přípravku DCVAC/PCa do III. fáze globálního klinického hodnocení u pacientů s kastročně rezistentním karcinomem prostaty.

## 8. SOUHRN

Výsledky předložené dizertační práce jsou součástí dlouhodobého zaměření Ústavu imunologie, na kterém byla vyvinuta vakcína na bázi dendritických buněk. Realizaci studie s léčebným přípravkem DCVAC/PCa jsme prováděli mimo jiné ve spolupráci s biotechnologickou společností Sotio a.s., která v současnosti realizuje výrobu a klinické testování této vakcíny. Přípravek DCVAC/PCa byl podán v rámci monoterapie pacientům s lokalizovaným karcinomem prostaty ve stádiu biochemického relapsu po radikální primární terapii, tedy klinicky asymptomatickým jedincům s narůstající hladinou PSA v séru. Tento stav nám umožnil zhodnotit biologickou bezpečnost podávaného přípravku. Uvedené výsledky ukazují, že vakcína DCVAC/PCa je schopna indukovat specifickou protinádorovou odpověď a navíc prodloužit život pacientů nad očekávaný medián a to bez závažných vedlejších účinků. V rámci rozsáhlé metodiky jsem se podílela na testování patientských sér (analýza peptid-specifické T buněčné odpovědi) a na následném vyhodnocování dat. Naše data byla podpořena výstupy dalších klinických studií fáze I./II. a II. (nejsou součástí dizertační práce), ve kterých byl přípravek DCVAC/PCa podáván v kombinaci s hormonální léčbou u pacientů s nově diagnostikovaným metastatickým karcinomem prostaty, pacientům s lokálně pokročilým karcinomem prostaty, a též v kombinaci s radioterapií a androgen deprivační terapií. Na základě příznivých výsledků byla zahájena ojedinělá globální multicentrická studie fáze III. a indikace vakcíny byla rozšířena o další onkologická onemocnění.

Jelikož počty vakcínou indukovaných tumor specifických lymfocytů byly relativně malé, zaměřili jsme se na aplikaci metody adoptivního T buněčného transferu, díky kterému lze jejich množství navýšit, a tím potencovat protinádorovou odpověď. Zvolený přístup umožňuje kompletní využití leukaferetického produktu, ze kterého se jednak produkuje vakcína z dendritických buněk a zároveň se izolují autologní T lymfocyty pacienta pro adoptivní transfer. Předností zvoleného postupu je fakt, že manipulace autologními imunokompetentními buňkami *ex vivo* nepředstavuje pro organizmus invazivní zákrok. Dlouhodobou optimalizací kultivačních podmínek a zavedením nových technik jsme sestavili protokol výroby *ex vivo* expandovaných tumor specifických T lymfocytů pomocí DC vakcíny. V rámci projektu jsem se podílela na veškeré přípravě a provedení metod, včetně vyhodnocování dat. Výhodou



vypracovaného protokolu je jeho krátká celková kultivační doba a zvolený postup výroby, který kombinuje pre-inkubační krok s DC vakcínou, krok expanze T lymfocytů a využití bioreaktoru. Jelikož jde o protokol vypracovaný na vzorcích zdravých jedinců, je zapotřebí adjustace protokolu na podmínky správné klinické praxe (GMP), která by umožnila podání produktu onkologickým pacientům.

Jako alternativu *in vitro* aktivace protinádorových efektorových T buněk jsme zvolili detekci a pomnožení peptid-reaktivních T lymfocytů u pacientů v různých stádiích karcinomu prostaty. Získané efektorové T lymfocyty lze po fenotypové analýze použít v rámci ACT. Vzhledem k velké variabilitě T buněčné odpovědi na antigenní stimulaci se ukázalo, že bychom měli brát v úvahu nejenom stádium nemoci, ale i konkrétní stav imunitního systému pacienta.

Na progresi nádoru se podílí několik odlišných molekulárních mechanismů a zvolená léčba cílí většinou na jediný z těchto mechanismů. Logickým krokem je zvolit více personalizovaný a cílený imunoterapeutický přístup. Do budoucna se dá předpokládat, že právě zjednodušení a optimalizace výrobních procesů umožní širší uplatnění imunoterapeutických strategií v praxi. Z našich výsledků vyplývá, že perspektivní možností může být kombinace standardních léčebných metod a moderní buněčné imunoterapie.

## 9. SUMMARY

Data presented in this thesis are indispensable part of a long-term research project running at the Department of immunology which was utilized as a viable platform for the development of dendritic cell-based vaccine referred to as DCVAC/PCa. This study was conducted in cooperation with biotechnological company Sotio a.s. where the vaccine is being currently manufactured and clinically tested. DCVAC/PCa was administered as a monotherapy to patients with localized prostate cancer in the stage of biochemical relapse after radical primary therapy. Since all patients enrolled in the study represented clinically asymptomatic subjects with increased serum PSA levels, this condition allowed us to assess the efficacy and safety of administered vaccine. Our results show that DCVAC/PCa is capable of inducing specific anti-tumor responses and, in addition, can prolong the patient's survival beyond the expected median value without serious side effects. Within the plethora of methodological approaches assessed in this project, I specifically contributed by testing of patient's sera for peptide-specific T cell responses and subsequent data analysis. Our data were further supported by the outcomes of the phase I/II. and II. of relevant clinical trials (which are not the part of presented thesis) where DCVAC/PCa was administered in the combination with hormone therapy in patients with recently diagnosed metastatic prostate cancer, in patients with locally advanced prostate cancer and also in the combination with radiotherapy and androgen deprivation therapy. Based on favorable results, a unique phase III. of global multicentre study was launched. Moreover, the testing of DCVAC/PCa vaccine has been extended to other types of malignancies.

Due to a low frequency of vaccine-induced tumor-specific T cells we have assessed the efficacy of the adoptive T cell transfer method to increase their numbers and thus mediate more robust responses. The advantage of this approach is that it enables a complete utilization of the leukapheretic product from which both the dendritic cell-based vaccine and the autologous T cells for ACT are generated. Because of *ex vivo* manipulation of their autologous immunocompetent cells, the benefit for patients is that such method is not an invasive procedure. Together, optimizing the long-term cell culture conditions and combining it with the introduction of new techniques, we have established a viable experimental protocol for *ex vivo* generation of DC vaccine-primed tumor-specific T cells. In this project I participated in all aspects of the

preparation and implementation of selected protocols, including data evaluation. The biggest advantage of established protocol is its significantly shortened time for T cell cultivation and effective production process which combines the DC vaccine pre-stimulation, T cell expansion and the use of a bioreactor culture system. However, due to the use in our experiments of healthy donor's blood samples, it is still necessary to adjust the resulting protocol to GMP conditions to potentially allow clinical use.

As an alternative strategy for *in vitro* activation of antitumor T cell effectors, we have also opted for the detection and expansion of cancer specific peptide-reactive T cells in patients at different stages of prostate malignancy. After performing a necessary phenotypic analysis, obtained T cell effectors could be used for ACT. However, rather a wide range of T cell antigen responses obtained in this experimental setting has shown that one must consider not only the stage of disease but also the individual condition of the patient's immune system.

Several distinct molecular mechanisms are involved in tumor progression but often, only one of these mechanisms is selected as a target for the clinical intervention. In the context of presented work, it is clear that more personalized and targeted immunotherapeutic approach is needed in clinical treatments. The simplification and optimization of production processes will be required to widen the application of immunotherapeutic strategies in future practice. As documented in this work, a promising option seems to be the combination of standard treatment and modern cellular immunotherapy.

## 10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
2. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer*. Cell, 2010. **140**(6): p. 883-99.
3. Gungor, N., et al., *Genotoxic effects of neutrophils and hypochlorous acid*. Mutagenesis, 2010. **25**(2): p. 149-54.
4. Fialkow, L., Y. Wang, and G.P. Downey, *Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function*. Free Radic Biol Med, 2007. **42**(2): p. 153-64.
5. Brandau, S., C.A. Dumitru, and S. Lang, *Protumor and antitumor functions of neutrophil granulocytes*. Semin Immunopathol, 2013. **35**(2): p. 163-76.
6. Herant, M., V. Heinrich, and M. Dembo, *Mechanics of neutrophil phagocytosis: experiments and quantitative models*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 9): p. 1903-13.
7. Branzk, N., et al., *Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens*. Nat Immunol, 2014. **15**(11): p. 1017-25.
8. Brinkmann, V. and A. Zychlinsky, *Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin?* J Cell Biol, 2012. **198**(5): p. 773-83.
9. Urban, C.F., et al., *Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms*. Cell Microbiol, 2006. **8**(4): p. 668-76.
10. Park, J., et al., *Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps*. Sci Transl Med, 2016. **8**(361): p. 361ra138.
11. Brill, A., et al., *Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice*. J Thromb Haemost, 2012. **10**(1): p. 136-44.
12. Massberg, S., et al., *Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases*. Nat Med, 2010. **16**(8): p. 887-96.
13. Schmidt, H., et al., *Elevated neutrophil and monocyte counts in peripheral blood are associated with poor survival in patients with metastatic melanoma: a prognostic model*. Br J Cancer, 2005. **93**(3): p. 273-8.
14. Gentles, A.J., et al., *The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers*. Nat Med, 2015. **21**(8): p. 938-945.
15. Caruso, R.A., et al., *Prognostic value of intratumoral neutrophils in advanced gastric carcinoma in a high-risk area in northern Italy*. Mod Pathol, 2002. **15**(8): p. 831-7.
16. Di Carlo, E., et al., *The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions*. Blood, 2001. **97**(2): p. 339-45.
17. Ford, C.A., et al., *Oncogenic properties of apoptotic tumor cells in aggressive B cell lymphoma*. Curr Biol, 2015. **25**(5): p. 577-88.
18. Galli, S., et al., *CD47 protein expression in acute myeloid leukemia: A tissue microarray-based analysis*. Leuk Res, 2015. **39**(7): p. 749-56.
19. Baccelli, I., et al., *Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(6): p. 539-44.
20. Willingham, S.B., et al., *The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPα) interaction is a therapeutic target for human solid tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(17): p. 6662-7.

21. Edris, B., et al., *Antibody therapy targeting the CD47 protein is effective in a model of aggressive metastatic leiomyosarcoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(17): p. 6656-61.
22. Krampitz, G.W., et al., *Identification of tumorigenic cells and therapeutic targets in pancreatic neuroendocrine tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(16): p. 4464-9.
23. Weiskopf, K., et al., *CD47-blocking immunotherapies stimulate macrophage-mediated destruction of small-cell lung cancer*. J Clin Invest, 2016. **126**(7): p. 2610-20.
24. Tseng, D., et al., *Anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis of cancer by macrophages primes an effective antitumor T-cell response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(27): p. 11103-8.
25. Liu, M., et al., *Metabolic rewiring of macrophages by CpG potentiates clearance of cancer cells and overcomes tumor-expressed CD47-mediated 'don't-eat-me' signal*. Nat Immunol, 2019. **20**(3): p. 265-275.
26. Chao, M.P., et al., *Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47*. Sci Transl Med, 2010. **2**(63): p. 63ra94.
27. Bellora, F., et al., *Human NK cells and NK receptors*. Immunol Lett, 2014. **161**(2): p. 168-73.
28. Vivier, E., et al., *Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 239-52.
29. Correia, D.V., et al., *Differentiation of human peripheral blood Vdelta1+ T cells expressing the natural cytotoxicity receptor NKp30 for recognition of lymphoid leukemia cells*. Blood, 2011. **118**(4): p. 992-1001.
30. Delahaye, N.F., et al., *Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors*. Nat Med, 2011. **17**(6): p. 700-7.
31. Coca, S., et al., *The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma*. Cancer, 1997. **79**(12): p. 2320-8.
32. Hsia, J.Y., et al., *Prognostic significance of intratumoral natural killer cells in primary resected esophageal squamous cell carcinoma*. Chang Gung Med J, 2005. **28**(5): p. 335-40.
33. Villegas, F.R., et al., *Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer*. Lung Cancer, 2002. **35**(1): p. 23-8.
34. Beano, A., et al., *Correlation between NK function and response to trastuzumab in metastatic breast cancer patients*. J Transl Med, 2008. **6**: p. 25.
35. Parker, K.H., D.W. Beury, and S. Ostrand-Rosenberg, *Myeloid-Derived Suppressor Cells: Critical Cells Driving Immune Suppression in the Tumor Microenvironment*. Adv Cancer Res, 2015. **128**: p. 95-139.
36. Sarhan, D., et al., *Adaptive NK Cells with Low TIGIT Expression Are Inherently Resistant to Myeloid-Derived Suppressor Cells*. Cancer Res, 2016. **76**(19): p. 5696-5706.
37. Perez-Gracia, J.L., et al., *Orchestrating immune check-point blockade for cancer immunotherapy in combinations*. Curr Opin Immunol, 2014. **27**: p. 89-97.
38. Hanson, E.M., et al., *Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells*. J Immunol, 2009. **183**(2): p. 937-44.
39. Jerud, E.S., G. Bricard, and S.A. Porcelli, *CD1d-Restricted Natural Killer T Cells: Roles in Tumor Immunosurveillance and Tolerance*. Transfusion Medicine and Hemotherapy, 2006. **33**(1): p. 18-36.

40. Terabe, M. and J.A. Berzofsky, *The immunoregulatory role of type I and type II NKT cells in cancer and other diseases*. *Cancer Immunol Immunother*, 2014. **63**(3): p. 199-213.
41. Lythe, G., et al., *How many TCR clonotypes does a body maintain?* *J Theor Biol*, 2016. **389**: p. 214-24.
42. de Goer de Herve, M.G., et al., *Direct CD4 help provision following interaction of memory CD4 and CD8 T cells with distinct antigen-presenting dendritic cells*. *J Immunol*, 2010. **185**(2): p. 1028-36.
43. Gattinoni, L., et al., *Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(6): p. 1616-26.
44. Huang, J., et al., *Survival, persistence, and progressive differentiation of adoptively transferred tumor-reactive T cells associated with tumor regression*. *J Immunother*, 2005. **28**(3): p. 258-67.
45. Pan, H.F., et al., *Targeting T-helper 9 cells and interleukin-9 in autoimmune diseases*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2013. **24**(6): p. 515-22.
46. Mai, J., H. Wang, and X.F. Yang, *Th 17 cells interplay with Foxp3+ Tregs in regulation of inflammation and autoimmunity*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2010. **15**: p. 986-1006.
47. Tong, Z.H. and H.Z. Shi, *Subpopulations of helper T lymphocytes in tuberculous pleurisy*. *Tuberculosis (Edinb)*, 2013. **93**(3): p. 279-84.
48. Zhang, R., et al., *Etk/Bmx transactivates vascular endothelial growth factor 2 and recruits phosphatidylinositol 3-kinase to mediate the tumor necrosis factor-induced angiogenic pathway*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(51): p. 51267-76.
49. Charles, K.A., et al., *The tumor-promoting actions of TNF-alpha involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(10): p. 3011-23.
50. Ubukata, H., et al., *Evaluations of interferon-gamma/interleukin-4 ratio and neutrophil/lymphocyte ratio as prognostic indicators in gastric cancer patients*. *J Surg Oncol*, 2010. **102**(7): p. 742-7.
51. Camus, M., et al., *Coordination of intratumoral immune reaction and human colorectal cancer recurrence*. *Cancer Res*, 2009. **69**(6): p. 2685-93.
52. Teschendorff, A.E., et al., *Improved prognostic classification of breast cancer defined by antagonistic activation patterns of immune response pathway modules*. *BMC Cancer*, 2010. **10**: p. 604.
53. Marth, C., et al., *Interferon-gamma expression is an independent prognostic factor in ovarian cancer*. *Am J Obstet Gynecol*, 2004. **191**(5): p. 1598-605.
54. Galaine, J., et al., *Interest of Tumor-Specific CD4 T Helper 1 Cells for Therapeutic Anticancer Vaccine*. *Vaccines (Basel)*, 2015. **3**(3): p. 490-502.
55. Yagi, R., et al., *The transcription factor GATA3 actively represses RUNX3 protein-regulated production of interferon-gamma*. *Immunity*, 2010. **32**(4): p. 507-17.
56. Usui, T., et al., *GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet*. *Immunity*, 2003. **18**(3): p. 415-28.
57. DeNardo, D.G., et al., *CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages*. *Cancer Cell*, 2009. **16**(2): p. 91-102.

58. Gocheva, V., et al., *IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion*. *Genes Dev*, 2010. **24**(3): p. 241-55.
59. Zissler, U.M., et al., *Interleukin-4 and interferon-gamma orchestrate an epithelial polarization in the airways*. *Mucosal Immunol*, 2016. **9**(4): p. 917-26.
60. Mandapathil, M., et al., *Increased ectonucleotidase expression and activity in regulatory T cells of patients with head and neck cancer*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(20): p. 6348-57.
61. Linterman, M.A., et al., *Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response*. *Nat Med*, 2011. **17**(8): p. 975-82.
62. Gregori, S., et al., *Isolation, expansion, and characterization of human natural and adaptive regulatory T cells*. *Methods Mol Biol*, 2007. **380**: p. 83-105.
63. Jonuleit, H., et al., *Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells*. *J Exp Med*, 2000. **192**(9): p. 1213-22.
64. Richards, D.M., et al., *Treg Cell Differentiation: From Thymus to Peripheral Tissue*. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2015. **136**: p. 175-205.
65. Oleinika, K., et al., *Suppression, subversion and escape: the role of regulatory T cells in cancer progression*. *Clin Exp Immunol*, 2013. **171**(1): p. 36-45.
66. Iwakura, Y., et al., *Functional specialization of interleukin-17 family members*. *Immunity*, 2011. **34**(2): p. 149-62.
67. Fridman, W.H., et al., *The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome*. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(4): p. 298-306.
68. Kryczek, I., et al., *Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments*. *Blood*, 2009. **114**(6): p. 1141-9.
69. Su, Z., et al., *Th17 cell expansion in gastric cancer may contribute to cancer development and metastasis*. *Immunol Res*, 2014. **58**(1): p. 118-24.
70. Benevides, L., et al., *Enrichment of regulatory T cells in invasive breast tumor correlates with the upregulation of IL-17A expression and invasiveness of the tumor*. *Eur J Immunol*, 2013. **43**(6): p. 1518-28.
71. Zhang, J.P., et al., *Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients*. *J Hepatol*, 2009. **50**(5): p. 980-9.
72. Fialova, A., et al., *Dynamics of T-cell infiltration during the course of ovarian cancer: the gradual shift from a Th17 effector cell response to a predominant infiltration by regulatory T-cells*. *Int J Cancer*, 2013. **132**(5): p. 1070-9.
73. Koenen, H.J., et al., *Human CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>pos</sup> regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells*. *Blood*, 2008. **112**(6): p. 2340-52.
74. Yang, B.H., et al., *Foxp3(+) T cells expressing RORgammat represent a stable regulatory T-cell effector lineage with enhanced suppressive capacity during intestinal inflammation*. *Mucosal Immunol*, 2016. **9**(2): p. 444-57.
75. Lu, Y., et al., *Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(11): p. 4160-71.
76. Ai, P., et al., *Tumor microenvironment contributes to Epstein-Barr virus anti-nuclear antigen-1 antibody production in nasopharyngeal carcinoma*. *Oncol Lett*, 2017. **14**(2): p. 2458-2462.
77. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The three Es of cancer immunoediting*. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 329-60.

78. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 991-8.
79. Vavrova, K.B., J.; Horvath, R., *Adoptivní T-buněčná terapie v léčbě nádorových onemocnění*. Alergie, 2013. **15**(3): p. 204-213.
80. Spisek, R., et al., *Imunitní reakce na nádorové buňky a možnosti vakcinace proti nádorům*. Vakcinologie, 2010. **1**(4): p. 12-19.
81. Igney, F.H., C.K. Behrens, and P.H. Krammer, *Tumor counterattack--concept and reality*. Eur J Immunol, 2000. **30**(3): p. 725-31.
82. Motz, G.T., et al., *Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors*. Nat Med, 2014. **20**(6): p. 607-15.
83. Morales, A., D. Eidinger, and A.W. Bruce, *Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors*. J Urol, 1976. **116**(2): p. 180-3.
84. Achkar, T., et al., *High-dose interleukin 2 in patients with metastatic renal cell carcinoma with sarcomatoid features*. PLoS One, 2017. **12**(12): p. e0190084.
85. Hasselbalch, H.C. and M.O. Holmstrom, *Perspectives on interferon-alpha in the treatment of polycythemia vera and related myeloproliferative neoplasms: minimal residual disease and cure?* Semin Immunopathol, 2019. **41**(1): p. 5-19.
86. Roberts, N.J., et al., *Systemic use of tumor necrosis factor alpha as an anticancer agent*. Oncotarget, 2011. **2**(10): p. 739-51.
87. Grilo, A.L. and A. Mantalaris, *The Increasingly Human and Profitable Monoclonal Antibody Market*. Trends Biotechnol, 2019. **37**(1): p. 9-16.
88. Rosenberg, S.A. and N.P. Restifo, *Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer*. Science, 2015. **348**(6230): p. 62-8.
89. Madan, R.A., et al., *Prostvac-VF: a vector-based vaccine targeting PSA in prostate cancer*. Expert Opin Investig Drugs, 2009. **18**(7): p. 1001-11.
90. Acres, B., *Cancer immunotherapy: phase II clinical studies with TG4010 (MVA-MUC1-IL2)*. J BUON, 2007. **12** Suppl 1: p. S71-5.
91. Pol, J.G., et al., *Maraba virus as a potent oncolytic vaccine vector*. Mol Ther, 2014. **22**(2): p. 420-429.
92. Andtbacka, R.H., et al., *Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma*. J Clin Oncol, 2015. **33**(25): p. 2780-8.
93. Kalinski, P., et al., *Dendritic cell-based therapeutic cancer vaccines: what we have and what we need*. Future Oncol, 2009. **5**(3): p. 379-90.
94. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 685-711.
95. Martinez-Cingolani, C., et al., *Human blood BDCA-1 dendritic cells differentiate into Langerhans-like cells with thymic stromal lymphopoietin and TGF-beta*. Blood, 2014. **124**(15): p. 2411-20.
96. Sato, K. and S. Fujita, *Dendritic cells: nature and classification*. Allergol Int, 2007. **56**(3): p. 183-91.
97. Tran Janco, J.M., et al., *Tumor-infiltrating dendritic cells in cancer pathogenesis*. J Immunol, 2015. **194**(7): p. 2985-91.
98. Murphy, G., et al., *Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen*. Prostate, 1996. **29**(6): p. 371-80.
99. Schuler, G., *Dendritic cells in cancer immunotherapy*. Eur J Immunol, 2010. **40**(8): p. 2123-30.



100. Rutella, S., S. Danese, and G. Leone, *Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age*. *Blood*, 2006. **108**(5): p. 1435-40.
101. Kantoff, P.W., et al., *Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(5): p. 411-22.
102. Park, J.W., et al., *Treatment with autologous antigen-presenting cells activated with the HER-2 based antigen Lapuleucel-T: results of a phase I study in immunologic and clinical activity in HER-2 overexpressing breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(24): p. 3680-7.
103. Carreno, B.M., et al., *IL-12p70-producing patient DC vaccine elicits Tc1-polarized immunity*. *J Clin Invest*, 2013. **123**(8): p. 3383-94.
104. Li, Y. and R.J. Kurlander, *Comparison of anti-CD3 and anti-CD28-coated beads with soluble anti-CD3 for expanding human T cells: differing impact on CD8 T cell phenotype and responsiveness to restimulation*. *J Transl Med*, 2010. **8**: p. 104.
105. Drobyski, W.R., et al., *Salvage immunotherapy using donor leukocyte infusions as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: efficacy and toxicity of a defined T-cell dose*. *Blood*, 1993. **82**(8): p. 2310-8.
106. Kolb, H.J., et al., *Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients*. *Blood*, 1990. **76**(12): p. 2462-5.
107. Tey, S.K., C.M. Bollard, and H.E. Heslop, *Adoptive T-cell transfer in cancer immunotherapy*. *Immunol Cell Biol*, 2006. **84**(3): p. 281-9.
108. Starr, T.K., S.C. Jameson, and K.A. Hogquist, *Positive and negative selection of T cells*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 139-76.
109. Restifo, N.P., M.E. Dudley, and S.A. Rosenberg, *Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response*. *Nat Rev Immunol*, 2012. **12**(4): p. 269-81.
110. Shilyansky, J., et al., *Identification of a T-cell receptor from a therapeutic murine T-cell clone*. *J Immunother*, 1997. **20**(4): p. 247-55.
111. Ioannidou, K., et al., *Low Avidity T Cells Do Not Hinder High Avidity T Cell Responses Against Melanoma*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 2115.
112. Heslop, H.E., et al., *Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes*. *Nat Med*, 1996. **2**(5): p. 551-5.
113. Wang, Y., et al., *Combination of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1, 3 and lytic antigen BZLF1 peptide pools allows fast and efficient stimulation of Epstein-Barr virus-specific T cells for adoptive immunotherapy*. *Cytotherapy*, 2014. **16**(1): p. 122-34.
114. Clancy, L.E., et al., *Cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes can be efficiently expanded from granulocyte colony-stimulating factor-mobilized hemopoietic progenitor cell products ex vivo and safely transferred to stem cell transplantation recipients to facilitate immune reconstitution*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2013. **19**(5): p. 725-34.
115. Greenberg, P.D., *Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells*. *Adv Immunol*, 1991. **49**: p. 281-355.
116. Kono, K., et al., *Prognostic significance of adoptive immunotherapy with tumor-associated lymphocytes in patients with advanced gastric cancer: a randomized trial*. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(6): p. 1767-71.

117. Khammari, A., et al., *Long-term follow-up of patients treated by adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma*. *Cancer Immunol Immunother*, 2007. **56**(11): p. 1853-60.
118. Nguyen, L.T., et al., *Phase II clinical trial of adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and low-dose interleukin-2*. *Cancer Immunol Immunother*, 2019. **68**(5): p. 773-785.
119. Rosenberg, S.A., et al., *Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(13): p. 4550-7.
120. Besser, M.J., et al., *Adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma: intent-to-treat analysis and efficacy after failure to prior immunotherapies*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(17): p. 4792-800.
121. Radvanyi, L.G., et al., *Specific lymphocyte subsets predict response to adoptive cell therapy using expanded autologous tumor-infiltrating lymphocytes in metastatic melanoma patients*. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(24): p. 6758-70.
122. Dudley, M.E., et al., *A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma*. *J Immunother*, 2002. **25**(3): p. 243-51.
123. Dudley, M.E., et al., *Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(10): p. 2346-57.
124. Saint-Jean, M., et al., *Adoptive Cell Therapy with Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Advanced Melanoma Patients*. *J Immunol Res*, 2018. **2018**: p. 3530148.
125. Ellebaek, E., et al., *Adoptive cell therapy with autologous tumor infiltrating lymphocytes and low-dose Interleukin-2 in metastatic melanoma patients*. *J Transl Med*, 2012. **10**: p. 169.
126. Svane, I.M. and E.M. Verdegaal, *Achievements and challenges of adoptive T cell therapy with tumor-infiltrating or blood-derived lymphocytes for metastatic melanoma: what is needed to achieve standard of care?* *Cancer Immunol Immunother*, 2014. **63**(10): p. 1081-91.
127. Yee, C., et al., *Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(25): p. 16168-73.
128. Takada, K., et al., *Lymphocyte depletion with fludarabine in patients with psoriatic arthritis: clinical and immunological effects*. *Ann Rheum Dis*, 2003. **62**(11): p. 1112-5.
129. Dudley, M.E., et al., *Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients*. *J Immunother*, 2003. **26**(4): p. 332-42.
130. Johnson, L.A., et al., *Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen*. *Blood*, 2009. **114**(3): p. 535-46.
131. Yee, C., et al., *Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo*. *J Exp Med*, 2000. **192**(11): p. 1637-44.
132. Mackensen, A., et al., *Phase I study of adoptive T-cell therapy using antigen-specific CD8+ T cells for the treatment of patients with metastatic melanoma*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(31): p. 5060-9.

133. Robbins, P.F., et al., *Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1*. J Clin Oncol, 2011. **29**(7): p. 917-24.
134. Willemsen, R., et al., *Redirecting human CD4+ T lymphocytes to the MHC class I-restricted melanoma antigen MAGE-A1 by TCR alphabeta gene transfer requires CD8alpha*. Gene Ther, 2005. **12**(2): p. 140-6.
135. Chinnasamy, N., et al., *A TCR targeting the HLA-A\*0201-restricted epitope of MAGE-A3 recognizes multiple epitopes of the MAGE-A antigen superfamily in several types of cancer*. J Immunol, 2011. **186**(2): p. 685-96.
136. Vavrova, K.B., J.; Horvath, R., *Adoptivní buněčná terapie pomocí lymfocytů T v léčbě nádorů*. Onkologie, 2015. **9**(1): p. 7-9.
137. Tokarew, N., et al., *Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells*. Br J Cancer, 2019. **120**(1): p. 26-37.
138. Porter, D.L., et al., *Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia*. N Engl J Med, 2011. **365**(8): p. 725-33.
139. Fraietta, J.A., et al., *Ibrutinib enhances chimeric antigen receptor T-cell engraftment and efficacy in leukemia*. Blood, 2016. **127**(9): p. 1117-27.
140. Li, S., et al., *Treatment of acute lymphoblastic leukaemia with the second generation of CD19 CAR-T containing either CD28 or 4-1BB*. Br J Haematol, 2018. **181**(3): p. 360-371.
141. Salmikangas, P., N. Kinsella, and P. Chamberlain, *Chimeric Antigen Receptor T-Cells (CAR T-Cells) for Cancer Immunotherapy - Moving Target for Industry?* Pharm Res, 2018. **35**(8): p. 152.
142. Enblad, G., et al., *A Phase I/IIa Trial Using CD19-Targeted Third-Generation CAR T Cells for Lymphoma and Leukemia*. Clin Cancer Res, 2018. **24**(24): p. 6185-6194.
143. Idorn, M., et al., *Chemokine receptor engineering of T cells with CXCR2 improves homing towards subcutaneous human melanomas in xenograft mouse model*. Oncoimmunology, 2018. **7**(8): p. e1450715.
144. Reinhard, K., et al., *An RNA vaccine drives expansion and efficacy of claudin-CAR-T cells against solid tumors*. Science, 2020.
145. Zhao, L. and Y.J. Cao, *Engineered T Cell Therapy for Cancer in the Clinic*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2250.
146. Casucci, M. and A. Bondanza, *Suicide gene therapy to increase the safety of chimeric antigen receptor-redirected T lymphocytes*. J Cancer, 2011. **2**: p. 378-82.
147. Teshima, T., et al., *Donor leukocyte infusion from immunized donors increases tumor vaccine efficacy after allogeneic bone marrow transplantation*. Cancer Res, 2002. **62**(3): p. 796-800.
148. Parviz, M., et al., *Successful adoptive immunotherapy with vaccine-sensitized T cells, despite no effect with vaccination alone in a weakly immunogenic tumor model*. Cancer Immunol Immunother, 2003. **52**(12): p. 739-50.
149. Laport, G.G., et al., *Adoptive transfer of costimulated T cells induces lymphocytosis in patients with relapsed/refractory non-Hodgkin lymphoma following CD34+-selected hematopoietic cell transplantation*. Blood, 2003. **102**(6): p. 2004-13.
150. Rapoport, A.P., et al., *Restoration of immunity in lymphopenic individuals with cancer by vaccination and adoptive T-cell transfer*. Nat Med, 2005. **11**(11): p. 1230-7.

151. Chang, A.E., et al., *Adoptive immunotherapy with vaccine-primed lymph node cells secondarily activated with anti-CD3 and interleukin-2*. J Clin Oncol, 1997. **15**(2): p. 796-807.
152. Poschke, I., et al., *A phase I clinical trial combining dendritic cell vaccination with adoptive T cell transfer in patients with stage IV melanoma*. Cancer Immunol Immunother, 2014. **63**(10): p. 1061-71.
153. Kandalaft, L.E., et al., *Autologous lysate-pulsed dendritic cell vaccination followed by adoptive transfer of vaccine-primed ex vivo co-stimulated T cells in recurrent ovarian cancer*. Oncoimmunology, 2013. **2**(1): p. e22664.
154. Chang, A.E., et al., *Phase II trial of autologous tumor vaccination, anti-CD3-activated vaccine-primed lymphocytes, and interleukin-2 in stage IV renal cell cancer*. J Clin Oncol, 2003. **21**(5): p. 884-90.
155. Rosenberg, S.A. and M.E. Dudley, *Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(2): p. 233-40.
156. Dudley, M.E., et al., *Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes*. Science, 2002. **298**(5594): p. 850-4.
157. Gattinoni, L., et al., *Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells*. J Exp Med, 2005. **202**(7): p. 907-12.
158. Klebanoff, C.A., et al., *Sinks, suppressors and antigen presenters: how lymphodepletion enhances T cell-mediated tumor immunotherapy*. Trends Immunol, 2005. **26**(2): p. 111-7.
159. Wang, X., et al., *Autoantibody signatures in prostate cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(12): p. 1224-35.
160. Carosella, E.D., et al., *A Systematic Review of Immunotherapy in Urologic Cancer: Evolving Roles for Targeting of CTLA-4, PD-1/PD-L1, and HLA-G*. Eur Urol, 2015. **68**(2): p. 267-79.
161. Kantoff, P.W., et al., *Overall survival analysis of a phase II randomized controlled trial of a Poxviral-based PSA-targeted immunotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer*. J Clin Oncol, 2010. **28**(7): p. 1099-105.
162. Small, E.J., et al., *A pilot trial of CTLA-4 blockade with human anti-CTLA-4 in patients with hormone-refractory prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(6): p. 1810-5.

## 11. SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ

- Vavrova K, Vrabcova P, Filipp D, Bartunkova J, Horvath R. Generation of T cell effectors using tumor cell-loaded dendritic cells for adoptive T cell therapy. *Medical oncology* 2016, **33**(12): 136.
- Taborska P, Stakheev D, Strizova Z, Vavrova K, Podrazil M, Bartunkova J, *et al.* Personalized ex vivo multiple peptide enrichment and detection of T cells reactive to multiple tumor-associated antigens in prostate cancer patients. *Medical oncology* 2017, **34**(10): 173
- Fucikova J, Podrazil M, Jarolim L, Bilkova P, Hensler M, Becht E, *et al.* Phase I/II trial of dendritic cell-based active cellular immunotherapy with DCVAC/PCa in patients with rising PSA after primary prostatectomy or salvage radiotherapy for the treatment of prostate cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2018, **67**(1): 89-100.
- Podrazil M, Horvath R, Becht E, Rozkova D, Bilkova P, Sochorova K, *et al.* Phase I/II clinical trial of dendritic-cell based immunotherapy (DCVAC/PCa) combined with chemotherapy in patients with metastatic, castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget* 2015, **6**(20): 18192-18205.
- Vavrova K, Bartunkova J, Horvath R. Adoptivní buněčná terapie pomocí lymfocytů T v léčbě nádorů. *Onkologie* 2015 **9**(1): 7-9.