

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Marie Ksandrová

**Sledování parametrů imunitní odpovědi u pacientek s karcinomem ovaria léčených  
experimentální aktivní buněčnou imunoterapií DCVAC/OvCa ve fázi II klinického  
hodnocení**

Immune response to experimental active immunotherapy DCVAC/OvCa in patients with  
ovarian carcinoma in phase II clinical trial

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Lenka Sadílková, Ph.D.

Praha, 2017

## Prohlášení

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

V Praze, 2. května 2017

Bc. Marie Ksandrová

.....

## Poděkování

Na tomto místě bych moc ráda poděkovala své školitelce RNDr. Lence Sadílkové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost, rady a čas, který mi v průběhu vypracování diplomové práce věnovala. Velký dík patří také prof. MUDr. Radku Špiškoví, Ph.D., který mi umožnil vypracovat diplomovou práci ve výzkumném oddělení společnosti Sotio, a.s., čehož si velice cením. Děkuji také všem kolegům z výzkumného oddělení za pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí. Poděkování patří také mé rodině a všem, kteří mě v průběhu studia podporovali.

## ABSTRAKT

V rámci klinické studie SOV02 (Eudra CT number: 2013-001323-38) je testován imunoterapeutický přípravek DCVAC/OvCa v léčbě pacientek s karcinomem ovaria. Toto onemocnění se řadí mezi gynekologické malignity s největší mortalitou. Kolem 60% pacientek je diagnostikováno v pokročilých stádiích. Navzdory počáteční úspěšné léčbě, dochází u většiny případů k relapsu a onemocnění se navíc stává často rezistentní k chemoterapii. Účinná léčba pro pacientky s relapsem či metastázami stále chybí. Řešením by mohla být imunoterapeutická léčba. DCVAC je aktivní buněčná imunoterapie založená na autologních dendritických buňkách. Předmětem této diplomové práce bylo sledování imunitních parametrů u vzorků pacientek z klinické studie SOV02 v průběhu časového období definovaného v protokolu studie. Sledovali jsme přítomnost antigeně specifických T lymfocytů, nádorově-specifických protilátek, imunosupresivní populace T regulačních lymfocytů a MDSC buněk a také expresi inhibičních molekul na povrchu T lymfocytů. Zaznamenali jsme vyšší hladiny Her-2, Muc-1 a MAGE-A1 protilátek u skupiny pacientek léčených přípravkem DCVAC/OvCa oproti skupině kontrolní. Významné rozdíly v dalších sledovaných parametrech nebyly oproti očekáváním zaznamenány. Bylo však získáno velké množství dat, která budou dále statisticky analyzována a korelována s daty klinickými, což přispěje k objasnění účinku přípravku DCVAC/OvCa či k nalezení prognostických markerů, které by bylo možno využít např. k identifikaci takových pacientek, pro které bude léčba přínosná.

**Klíčová slova:** imunitní odpověď, imunoterapie, karcinom, klinické hodnocení, ovaria

## ABSTRACT

The immunotherapeutic drug DCVAC/OvCa is being tested in the treatment of ovarian cancer patients within the SOV02 clinical trial (Eudra CT number: 2013-001323-38). Ovarian cancer belongs to gynaecological malignancies with the highest mortality rate. Around 60% of patients are diagnosed at advanced stages. Despite the initial successful treatment, relapses occur in most cases, and the disease often becomes resistant to chemotherapy. Effective therapy for relapsed or metastatic patients is still missing. The solution could be immunotherapeutic treatment. DCVAC is an active cellular immunotherapy based on autologous dendritic cells. The aim of this diploma thesis was monitoring of immune parameters in samples from clinical trial SOV02 patients during the time period defined in the study protocol. We have monitored the presence of antigen specific T lymphocytes, tumor specific antibodies, immunosuppressive populations of regulatory T cells and MDSC cells, and also the expression of inhibitory molecules on the surface of T lymphocytes. We observed higher levels of Her-2, Muc-1 and MAGE-A1 antibodies in the DCVAC/OvCa treated group of patients versus the control group. Significant differences in the other monitored parameters were not observed. However, a large amount of data have been obtained that will be further statistically analysed and correlated with clinical data to help to clarify the effect of DCVAC/OvCa, or to find prognostic markers that could be used, for example, to identify such patients for those the treatment would be beneficial.

**Keywords:** immune response, immunotherapy, carcinoma, clinical trial, ovary

# OBSAH

<b>Abstrakt</b> .....	<b>4</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>5</b>
<b>Obsah</b> .....	<b>6</b>
<b>1. Seznam zkratek</b> .....	<b>8</b>
<b>2. Úvod a cíle práce</b> .....	<b>11</b>
<b>3. Literární přehled</b> .....	<b>13</b>
3.1. <i>Karcinom ovarii</i> .....	13
3.1.1. Rizikové faktory a genetické predispozice .....	13
3.1.2. Symptomy a diagnostika.....	14
3.1.3. Stadia .....	15
3.1.4. Histologie.....	16
3.1.5. Léčba .....	18
3.2. <i>Protinádorová imunita</i> .....	21
3.2.1. Interakce mezi nádorem a imunitním systémem.....	21
3.2.2. Imunogenicita buněk karcinomu ovarii .....	23
3.2.3. Úloha antigen specifických protilátek.....	25
3.2.4. Imunosupresivní populace buněk - MDSC .....	26
3.2.5. Úloha regulačních T lymfocytů .....	28
3.2.6. Význam exprese inhibičních “Immune checkpoint“ molekul.....	29
3.3. <i>Imunoterapeutické přístupy v léčbě karcinomu ovarii</i> .....	31
3.3.1. Imunoterapie založená na protilátkách .....	32
3.3.2. Inhibitory “immune checkpoint ” molekul .....	33
3.3.3. Peptidové vakcíny.....	34
3.3.4. Imunoterapie založená na dendritických buňkách .....	34
3.3.5. PARP inhibitory.....	35
3.3.6. Kombinace imunoterapie a chemoterapie .....	36
3.4. <i>DCVAC</i> .....	37
3.4.1. Aktivní buněčná imunoterapie .....	37
3.4.2. Klinické studie vedené společností Sotio.....	38
3.5. <i>Klinická studie SOV02 (Eudra CT number: 2013-001323-38)</i> .....	40
3.5.1. Pacientky zařazené do klinické studie SOV02.....	40

3.5.2.	Léčba .....	40
3.5.3.	Hodnotící parametry .....	41
<b>4.</b>	<b>Materiály a vybavení.....</b>	<b>43</b>
4.1.	<i>Přístroje.....</i>	43
4.2.	<i>Roztoky a chemikálie .....</i>	43
4.3.	<i>Pepmixy .....</i>	44
4.4.	<i>Rekombinantní proteiny.....</i>	44
4.5.	<i>Protilátky.....</i>	45
4.6.	<i>Software.....</i>	45
4.7.	<i>Měřené vzorky .....</i>	46
<b>5.</b>	<b>Metody.....</b>	<b>47</b>
5.1.	<i>Detekce antigenně specifických T lymfocytů .....</i>	47
5.2.	<i>Detekce antigenně specifických protilátek.....</i>	50
5.3.	<i>Detekce imunosupresivních populací MDSC buněk.....</i>	50
5.4.	<i>Detekce regulačních T lymfocytů (Treg) .....</i>	52
5.5.	<i>Detekce exprese inhibičních “immune checkpoint“ proteinů na povrchu T lymfocytů.....</i>	54
5.6.	<i>Statistická analýza dat .....</i>	57
5.7.	<i>Validace použitých metod.....</i>	57
<b>6.</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>58</b>
6.1.	<i>Detekce antigenně specifických T lymfocytů .....</i>	58
6.2.	<i>Detekce antigenně specifických protilátek.....</i>	62
6.3.	<i>Detekce imunosupresivních populací MDSC buněk.....</i>	64
6.4.	<i>Detekce regulačních T lymfocytů (Treg) .....</i>	66
6.5.	<i>Detekce exprese inhibičních “immune checkpoint“ molekul na povrchu T lymfocytů.....</i>	67
<b>7.</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>69</b>
<b>8.</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>77</b>
<b>9.</b>	<b>Seznam literatury .....</b>	<b>79</b>

# 1. SEZNAM ZKRATEK

ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (antibody-dependent cell cytotoxicity)
APC	antigen-prezentující buňka (antigen presenting cell)
bFGF	základní růstový faktor fibroblastů (basic fibroblast growth factor)
BRAF	B-Raf proto-onkogen, serin/threonin kináza
Bv8	prokineticin 2
CA 125	antigen asociovaný s karcinomem ovarií (cancer antigen 125), jiný název pro Muc-16
CDC	buněčná cytotoxicita závislá na komplementu (complement-dependent cytotoxicity)
CEA	karcinoembryonální antigen (carcinoembryonic antigen)
CT	výpočetní tomografie (computed tomography)
CTLA-4	protein 4 asociovaný s cytotoxickými T lymfocyty (cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4)
CTNNB1	beta-katenin 1 (catenin beta 1)
DAMPs	molekulární struktury asociované s nebezpečím/poškozením (danger/damage-associated molecular patterns)
DC	dendritické buňky (dendritic cells)
DCVAC	imunoterapie na bázi dendritických buněk
DFI	interval bez příznaků recidivy onemocnění (disease-free interval)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
ELISA	imunologická metoda sloužící k detekci protilátek (enzyme-linked immunosorbent assay)
ELISPOT	imunologická metoda sloužící k detekci buněk produkujících vybrané cytokiny (Enzyme-linked immunospot)
EpCAM	epiteliální buněčná adhezivní molekula (epithelial cell adhesion molecule)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (U.S. Food and Drug Administration)
FIGO	mezinárodní gynekologická a porodnická federace (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique)
FMO	kontrola pro správnou analýzu dat z průtokového cytometru (fluorescence minus one)
FOLR1	folátový receptor 1 (folate receptor 1)
FoxP3	transkripční faktor FoxP3 (forkhead box P3)
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a monocytů (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)



GPI	glykosylfosfatidylinositol (glycosylphosphatidylinositol)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxid vodíku
HAVCR2	buněčný receptor pro virus hepatitidy A 2 (hepatitis A virus cellular receptor 2)
HE4	lidský nadvarlatový protein 4 (human epididymis protein 4)
Her-2	receptor lidského epidermálního růstového faktoru 2 (human epidermal growth factor receptor 2)
HGSC	high-grade serózní karcinom (high-grade serous carcinoma)
HMGB1	protein HMGB1 (high mobility group box 1)
iDC	nezralé dendritické buňky (immature dendritic cells)
IDO	indolamin -2,3- dioxygenáza (indoleamine -2,3- ioxigenase)
IFN $\gamma$	interferon $\gamma$
IL4-R $\alpha$	$\alpha$ podjednotka receptoru pro interleukin 4
kDa	kilodalton
KRAS	KRAS proto-onkogen, GTPáza
LAG-3	protein 3 aktivující lymfocyty (lymphocyte activating protein 3)
LGSC	low-grade serózní karcinom (low-grade serous carcinoma)
Lin	směs protilátek pro značení linií imunitních buněk zahrnující CD3, CD14, CD19, CD56, případně dalších (lineage)
MAGE-A1	antigen 1 asociovaný s melanomem (melanoma associated antigen 1)
MAGE-A3	antigen 3 asociovaný s melanomem (melanoma associated antigen 3)
MAGE-A4	antigen 4 asociovaný s melanomem (melanoma associated antigen 4)
MDSC	imunosupresivní populace buněk odvozená od myeloidní linie (myeloid derived suppressor cells)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
MICA/B	protein příbuzný MHC I A nebo B (MHC class I polypeptide-related sequence A/B)
MLH	homolog proteinu MutL (MutL homolog)
M-MDSC	monocytární MDSC
MMP9	matrix metaloproteináza 9 (matrix metalloproteinase 9)
MRI	magnetická rezonance (magnetic resonance imaging)
mRNA	messenger ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid)
Muc-1	mucin 1
Muc-16	mucin 16
NADPH	nikotinamidadenin dinukleotidfosfát (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NK	NK buňky (natural killer cells)

NKT	NK T lymfocyty (natural killer T cell)
NO	oxid dusnatý
NY-ESO-1	nádorový testikulární antigen, nazývaný také CTAG1B (New York esophageal squamous cell carcinoma 1, cancer testis antigen 1B)
ORR	míra objektivní odpovědi (objective response rate)
OS	celkové přežití (overall survival)
OV-90	buněčná linie karcinomu ovarií
PAP	kyselá prostatická fosfatáza (prostatic acid phosphatase)
PARP	polymeráza polyADP-ribózy (poly (ADP-ribose) polymerase)
PBMC	mononukleární buňky periferní krve (peripheral blood mononuclear cells)
PD-1	protein 1 programované buněčné smrti (programmed cell death protein 1)
PD-L1/2	ligand 1/2 proteinu 1 programované buněčné smrti (programmed death-ligand 1/2)
PFS	doba přežití bez progresu onemocnění (progression free survival)
PMA	forbol-myristát-acetát (phorbol-12-myristate-13-acetate)
PMN-MDSC	polymorfonukleární MDSC
polyI:C	polyinosinová-polycytidylová kyselina (polyinosinic:polycytidylic acid)
PSA	prostatický specifický antigen (prostate-specific antigen)
PTEN	homolog fosfatázy a tensinu (phosphatase and tensin homolog)
ROS	reaktivní kyslíkové radikály (reactive oxygen species)
SK-OV-3	buněčná linie karcinomu ovarií
TAA	antigeny asociované s nádory (tumor-associated antigens)
TAL	lymfocyty asociované s nádory (tumor-associated lymphocytes)
TAM	makrofágy asociované s nádory (tumor-associated macrophages)
TCR	T buněčný receptor (T cell receptor)
TGF-β	transformující růstový faktor β (transforming growth factor β)
Th1	pomocné T lymfocyty typu 1 (helper T cells type 1)
Th2	pomocné T lymfocyty typu 2 (helper T cells type 2)
TIL	tumor-infiltrující lymfocyty (tumor-infiltrating lymphocytes)
TIL-Treg	tumor infiltrující T regulační lymfocyty
TIM-3	T buněčný imunoglobulin obsahující mucinovou doménu 3 (T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing 3)
TLR-3	Toll-like receptor 3
TRAIL	ligand indukující apoptózu příbuzný TNF (TNF-related apoptosis inducing ligand)
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)

## 2. ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Karcinom ovarií patří mezi gynekologické malignity s nejvyšší mortalitou. Zároveň se řadí na páté místo mezi nádorovými onemocněními způsobujícími nejvíce úmrtí u žen. Množství pacientek, které přežijí déle než 5 let, je v porovnání s dalšími nádorovými onemocněními relativně nízké - pouze 46% (u karcinomu prsu přežije dobu 5 let až 90% pacientek). Vzhledem k tomu, že se karcinom ovarií projevuje značně nespecifickými symptomy a neexistuje zatím žádná spolehlivá screeningová metoda, je karcinom ovarií diagnostikován v pokročilých stádiích až u 60% pacientek. I když zpočátku u těchto pokročilých stádií zabírá chemoterapeutická léčba, u většiny pacientek bohužel dochází k relapsu onemocnění, pro které zatím žádná vhodná a efektivní terapie nebyla nalezena, a proto dobu 5 let přežije pouze 29% pacientek s pokročilými stadii karcinomu ovarií (American Cancer Society, 2017).

Vhodnou terapii by pro pacientky s karcinomem ovarií mohla představovat imunoterapeutická léčba. V současnosti probíhá mnoho klinických studií zaměřených na různé imunoterapeutické přístupy v léčbě karcinomu ovarií. Firma Sotio, a.s. vyvíjí experimentální aktivní buněčnou imunoterapii pod názvem DCVAC. Tento léčivý přípravek je založen na autologních dendritických buňkách pacienta, které jsou *in vitro* kultivovány s buňkami nádorových linií ošetřených vysokým hydrostatickým tlakem. Aktivované dendritické buňky rozpoznávající nádorově-specifické antigeny jsou pak v několika dávkách podávány pacientovi a předpokládá se, že jsou schopné u pacienta aktivovat buňky adaptivní imunitní odpovědi. Firma Sotio, a.s. začala přípravek DCVAC testovat u pacientů s karcinomem prostaty. V současné době probíhá rozsáhlá multicentrická klinická studie fáze III, jejímž cílem je zhodnotit účinek přípravku DCVAC u pacientů s karcinomem prostaty. DCVAC je však vyráběn také pro pacienty s karcinomem ovaria a plic.

SOV02 je klinická studie fáze II, hodnotící podání přípravku DCVAC v kombinaci se standardní chemoterapií u pacientek s platina-senzitivním epiteliálním karcinomem ovarií, s primárním peritoneálním karcinomem nebo s karcinomem vejcovodů. Jedná se o studii nezaslepenou, s paralelními skupinami. Rozdělení do skupin umožňuje sledování účinku DCVAC na základě porovnání pacientek léčených kombinací DCVAC a chemoterapie oproti pacientkám léčených pouze chemoterapií. Náplní této diplomové je sledování vybraných imunitních parametrů u pacientek z klinické studie SOV02.

Mezi cíle této diplomové práce patří:

- Sledování následujících imunitních parametrů u pacientek v klinické studii SOV02 v průběhu terapie a hodnocení rozdílů mezi léčenými skupinami:
  - detekce antigenně specifických T lymfocytů
  - sledování přítomnosti protilátek specifických vůči vybraným nádorovým antigenům
  - zastoupení imunosupresivních populací buněk MDSC a Treg
  - sledování exprese inhibičních “immune checkpoint“ proteinů na povrchu T lymfocytů

## 3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1. KARCINOM OVARIÍ

Karcinom ovarií je druhé nejčastější gynekologické nádorové onemocnění. Americká společnost pro boj s rakovinou (American Cancer Society) očekává, že v roce 2017 bude v USA diagnostikováno 22 440 nových případů a že karcinom ovarií způsobí 14 080 úmrtí, což je nejvíce v rámci gynekologických nádorových onemocnění. Celkově je karcinom ovarií příčinou 5% úmrtí spojených s rakovinou u žen. Statistické údaje ukazují, že až 46% pacientek diagnostikovaných s karcinomem ovarií přežije dobu 5 let. Pokud se karcinom ovarií diagnostikuje v časném stádiu, až 92% pacientek může být vyléčeno. Problémem však je, že u většiny pacientek (až 60%) se onemocnění podaří identifikovat až v pokročilém stádiu, kdy pouze 29% pacientek přežije dobu 5 let (American Cancer Society, 2017).

#### 3.1.1. RIZIKOVÉ FAKTORY A GENETICKÉ PREDISPOZICE

Mezi rizikové faktory se řadí vyšší věk, obezita a výskyt karcinomu ovarií, prsu, či např. dělohy nebo tlustého střeva v rodině. Faktory, které souvisejí s vyšším počtem ovulačních cyklů (např. časný počátek menstruace, pozdní menopauza či neplodnost), jsou spojené rovněž s vyšším rizikem vzniku karcinomu ovarií. Naopak faktory snižující počet ovulačních cyklů jako např. mnohonásobná těhotenství, prodloužená laktace, či užívání hormonální antikoncepce, mají souvislost s nižším rizikem rozvoje karcinomu ovarií během života (Bast Jr., Hennessy and Mills, 2009).

Vyšší riziko vzniku karcinomu ovarií je spojeno také s mutacemi v genech jako je např. *BRCA1*, *BRCA2*, *MLH1*, *MLH2* nebo *TP53*. *BRCA1* a *BRCA2* mají důležitou úlohu při homologních opravách dvouřetězcových zlomů DNA. Zárodečné mutace v těchto genech výrazně zvyšují riziko vzniku karcinomu prsu i karcinomu ovarií. V průměru u 40 % žen s mutací v genu *BRCA2* dojde k rozvoji karcinomu ovarií. V případě žen nesoucích mutaci *BRCA1* se toto riziko pohybuje mezi 11 a 18 %. Riziko vzniku onemocnění se u držitelek těchto mutací navíc zvyšuje s věkem. Karcinom ovarií bývá u těchto pacientek často diagnostikován až v pokročilejších stádiích. Na druhou stranu léčba u nich bývá úspěšnější a doba přežití (OS) delší (Andrews, Med and Mutch, 2017). Mezi nejčastěji mutované geny v rámci nádorových onemocnění vůbec patří tumorový supresor *TP53*. U karcinomu ovarií se mutace genu *TP53* objevuje v 60-80% případů. Tato mutace je navíc asociovaná s rezistencí k chemoterapeutické léčbě na bázi platiny (Bast Jr., Hennessy and Mills, 2009). Mutace

v genech *MLH1* a *MLH2* jsou nejčastěji spojovány s Lynchovým syndromem (dědičné nádorové onemocnění tlustého střeva). Tyto geny se řadí mezi tzv. mismatch repair geny, tedy geny opravující chybné zařazení bazí v DNA. Riziko vzniku karcinomu ovárií u mutací těchto genů se pohybuje mezi 8 až 15% (Bonadona *et al.*, 2013). Dalším příkladem genetických abnormalit vyskytujících se u karcinomu ovárií je zvýšená exprese malého G proteinu RAB25. Ten má významnou roli v regulaci intracelulárního transportu a jeho amplifikace souvisí jak s karcinomem ovárií, tak s karcinomem prsu (Cheng *et al.*, 2005).

### 3.1.2. SYMPTOMY A DIAGNOSTIKA

Efektivní screening, který by včas dokázal odhalit karcinom ovárií, stále chybí. Velké množství pacientek je diagnostikováno až v pokročilých stádiích, kdy je léčba komplikovanější a prognóza horší. Úmrtnost spojená s karcinomem ovárií tak zůstává stále vysoká (69%), v porovnání s karcinomem prsu, kdy onemocnění podlehe pouze 19% pacientek (Das and Bast Jr, 2007). Pozdní diagnóza karcinomu ovárií úzce souvisí s relativně nespecifickými symptomy, které často napodobují jiná gastrointestinální, genitourinární či gynekologická onemocnění. Mezi symptomy popsané u karcinomu ovárií se řadí bolesti břicha, krvácení, náhlá snížení váhy, ztráta chuti k jídlu, změny v zažívání a další (Ebell, Culp and Radke, 2016).

Metody využívající se k diagnostice karcinomu ovárií zahrnují pohmatovou zkoušku, ultrazvuk, magnetickou rezonanci (MRI), počítačovou tomografii (CT), pozitronovou emisní tomografii (PET), či histologickou zkoušku, nebo laboratorní testy nádorových markerů. Tyto metody mají různou senzitivitu a specifitu (Su, Graybill and Zhu, 2013). Pro počáteční vyšetření je asi nejvhodnější zobrazovací metodou ultrazvuk. Na základě tohoto vyšetření se dá vyloučit onemocnění karcinomem ovárií, či charakterizovat jeho benigní nebo maligní charakter. Případně se dá využít ještě více specifického intravaginálního ultrazvuku. Část pacientů (20%) má však na základě vyšetření ultrazvukem hraniční nález a jsou tedy nutná další vyšetření. Přesnější v rozlišování benigních a maligních nádorů je MRI a CT. CT je však méně využívanou zobrazovací metodou. V porovnání s MRI má CT vyšetření nižší schopnost v rozlišování měkkých tkání, je dražší a méně dostupné. Při počátečním hodnocení se tedy CT příliš často nevyužívá, toto vyšetření má však význam při hodnocení pokročilých metastatických fází nemoci. Zde nachází využití také pozitronová emisní tomografie (PET), která podává dostatečné informace o rozsahu onemocnění, a to i z hůře dostupných míst, kde by zobrazování pomocí CT nebo MRI bylo obtížné. Na druhou stranu má PET špatné

prostorové rozlišení a limitovanou senzitivitu. Těmto problémům se však dá do jisté míry vyhnout, pokud se vyšetření PET kombinuje s CT (Bharwani, Reznick and Rockall, 2011).

Zatím není schválený žádný jednoduchý laboratorní test pro časnou diagnostiku či screening karcinomu ovarií. Hledání specifických nádorových markerů, které by dokázaly onemocnění včas zachytit, je však věnována velká pozornost. Nejslibnějším markerem pro diagnostiku karcinomu ovarií je stále CA 125 (Muc-16). Tento glykoprotein, o vysoké molekulární hmotnosti (>200 kDa), byl objeven v roce 1981 a dosud byly jeho zvýšené hodnoty zaznamenány např. u karcinomu plic, prsu, tlustého střeva a slinivky. CA 125 je zvýšený u 83% pacientek s karcinomem ovarií (Nossov *et al.*, 2008). V počátečním stadiu I bývá CA 125 zvýšený v 50% případů, v dalším stadiu II jsou zvýšené hodnoty naměřeny u 90% pacientek a v dalších stádiích (III a IV) se zvýšené hodnoty CA 125 vyskytují ještě častěji. Vzhledem k omezené specificitě není CA 125 vhodným markerem k diagnostickému screeningu. Je však relativně senzitivní, a díky tomu je využíván při sledování úspěšnosti léčby a detekci recidivy onemocnění. Hladina CA 125 po primární terapii může být u pacientek s karcinomem ovarií brána také jako prognostický marker (čím nižší koncentrace CA 125, tím lepší prognóza) (Su, Graybill and Zhu, 2013).

Dalším studovaným nádorovým markerem je v posledních letech HE4. Tento nízkomolekulární glykoprotein je ve zvýšené míře exprimován karcinomem ovarií serózního, endometrioidního a světlobuněčného (clear cell) typu. Podobně jako CA 125 se HE4 dá využít ke sledování odpovědi na primární léčbu. Ukazuje se dokonce, že by HE4 mohl být vhodnější při sledování relapsu karcinomu ovarií než CA 125, protože ke zvýšení hladiny tohoto markeru dochází asi o 5 až 8 měsíců dříve než v případě CA 125 (Su, Graybill and Zhu, 2013).

### 3.1.3. STADIA

Nejrozšířenějším a nejvíce akceptovaným systémem pro klasifikaci různých stádií maligních nádorů obecně je bezpochyby TNM systém. Název je odvozený od třech úrovní, na základě kterých se stádium nádoru klasifikuje: rozsah nádoru (T = tumor), regionální lymfatické uzliny (N = nodes) a vzdálené metastázy (M = metastases). Rozlišení jednotlivých stádií a substádií karcinomu ovarií vede k přesné diagnóze a zvolení vhodné léčby. Pro klasifikaci karcinomu ovarií se však nejčastěji používá systém Mezinárodní federace gynekologie a porodnictví (FIGO - Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique). Oba systémy jsou shrnuty v následující tabulce (Tabulka 1).

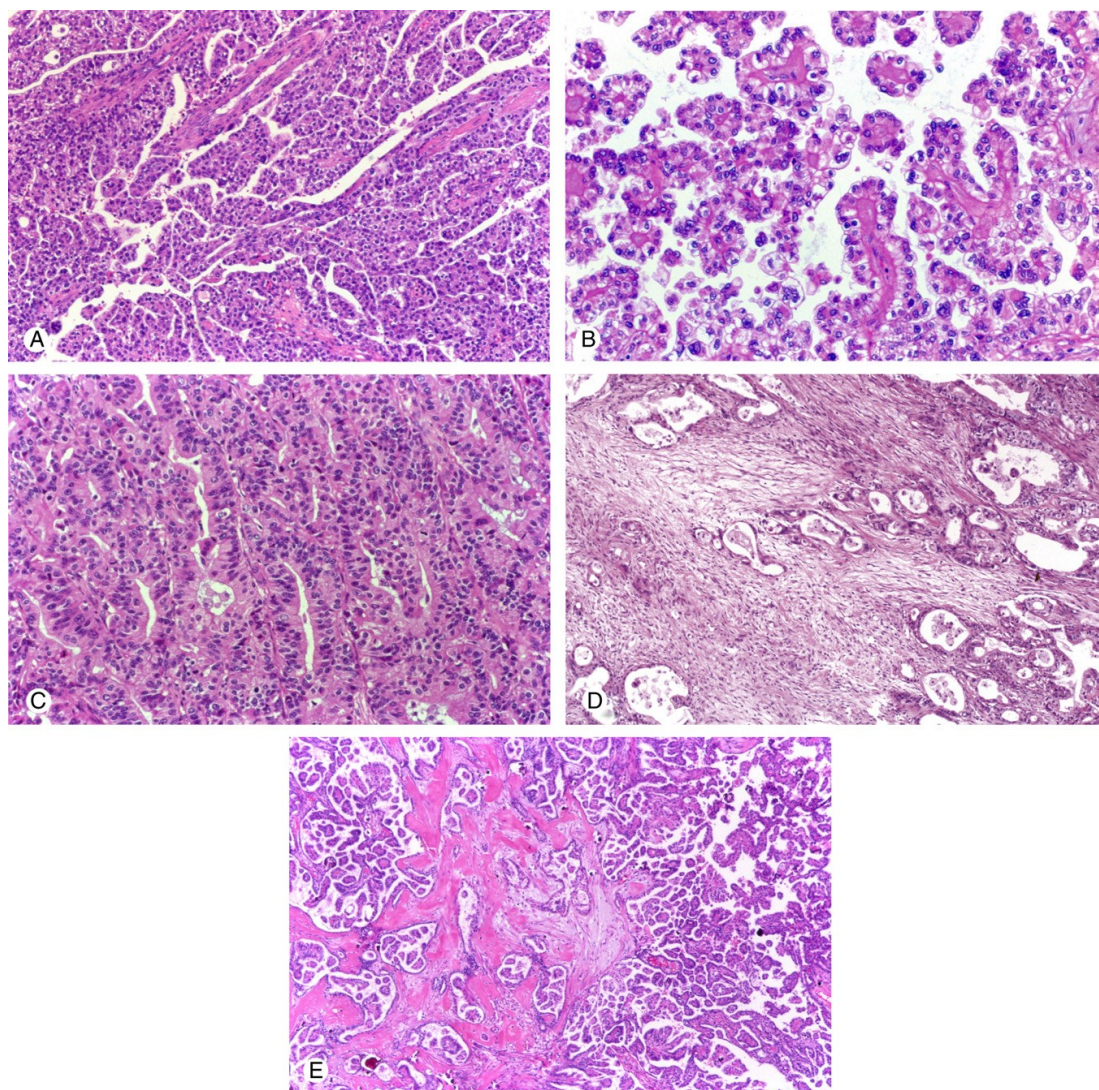
**Tabulka 1:** Stádia karcinomu ovarii podle systému TNM a FIGO (převzato a upraveno podle Greene et al., 2002).

TNM	FIGO	definice
TX		primární nádor nelze hodnotit
T0		bez známek primárního nádoru
T1	I	nádor ohraničen na ovaria
T1a	I A	nádor ohraničen na jedno ovarium, pouzdro intaktní, žádný nádor na povrchu ovaria, v ascites nebo peritoneálním výplachu nejsou maligní buňky
T1b	I B	nádor ohraničen na obě ovaria, pouzdro intaktní, žádné známky nádoru na povrchu ovaria, v ascites nebo peritoneálním výplachu nejsou maligní buňky
T1c	I C	nádor ohraničen na jedno nebo obě ovaria, buď s rupturou pouzdra nebo nádorem na povrchu ovaria nebo maligní buňky v ascites či peritoneálním výplachu
T2	II	nádor postihuje jedno či obě ovaria, šíří se v pánvi
T2a	II A	nádor se šíří na dělohu nebo vejcovody nebo implantáty na děloze nebo vejcovodu, v ascites nebo peritoneálním výplachu nejsou maligní buňky
T2b	II B	nádor se šíří na jiné pánevní tkáně, v ascites nebo peritoneálním výplachu nejsou maligní buňky
T2c	II C	nádor se šíří v pánvi, s maligními buňkami v ascites nebo peritoneálním výplachu
T3	III	nádor postihuje jedno nebo obě ovaria, s mikroskopicky prokázanými peritoneálními metastázami mimo pánev a/nebo metastázy v regionálních mízních uzlinách
T3a	III A	mikroskopické peritoneální metastázy mimo pánev
T3b	III B	makroskopické peritoneální metastázy mimo pánev 2 cm nebo méně v největším rozměru
T3c nebo N1	III C	peritoneální metastázy mimo pánev větší než 2 cm v největším rozměru a/nebo metastázy v regionálních mízních uzlinách
M1	IV	vzdálené metastázy (mimo peritoneální metastázy)

### 3.1.4. HISTOLOGIE

Nádorová onemocnění ovarii zahrnují nádory epiteliální, germinální a mesenchymální. Epiteliální karcinom ovarii je nejčastějším typem, tvoří asi 80% všech ovarialních karcinomů (Lengyel, 2010). Epiteliální karcinom ovarii se na základě histologie dělí na pět typů (Obrázek 1). Toto dělení má velký význam při volbě vhodné léčby. Karcinomy mucinózního a světlouněčného typu mají horší prognózu a hůře odpovídají na chemoterapeutickou léčbu založenou na platině (Gilks and Prat, 2009).





**Obrázek 1:** Pět hlavních histologických subtypů ovariálního karcinomu: A) high-grade serózní karcinom, B) světlobuněčný karcinom, C) endometrioidní karcinom, D) mucinózní karcinom, E) low-grade serózní karcinom (převzato z Gilks & Prat, 2009).

High-grade serózní karcinom (HGSC) je nejčastějším typem epiteliálního karcinomu ovarií. Většina pacientů je diagnostikována v pokročilém stadiu. Časté jsou abnormality v *BRC1*, *BRC2* a *TP53* genech. V důsledku mutací v těchto a dalších genech dochází ke ztrátě schopnosti opravovat dvouvláknové zlomy DNA, což vede k chromozomální nestabilitě. Jedná se o vysoce proliferativní karcinom. Low-grade serózní karcinom (LGSC) představuje pouze asi 5% všech případů ovariálních karcinomů. Prognóza bývá lepší než u HGSC. Po počáteční úspěšné léčbě sice také často dochází k relapsu, avšak po delší době než u HGSC. LGSC je často spojen s mutacemi v genech *BRAF* a *KRAS*, ale na rozdíl od HGSC nebývá asociován s mutacemi *BRC1* a *BRC2* a chromozomální nestabilitou. Mucinózní typ tvoří sice jen 10-15% všech primárních ovariálních tumorů, nicméně ve většině případů (80%) se jedná o benigní nádory. Pouze 3-4% ovariálních karcinomů bývá mucinózního typu.

Co se týče molekulární patologie, častá je mutace v genu *KRAS* a také amplifikace *HER-2*. Častěji bývá zastoupen karcinom endometroidního typu, a to přibližně v 10%. Tento ovariální karcinom je často asociován s endometriózou (ve 42%), či s karcinomem endometria (ve 20% případů), avšak s tím bývá někdy chybně zaměňován. Endometroidní karcinom ovarií se často podaří diagnostikovat již v počátečních stádiích. Nejčastější genetickou abnormalitou je mutace genů *PTEN* a *CTNNB1* (gen pro beta-katenin). Díky včasné diagnostice a dobré odpovědi na chemoterapeutickou léčbu se jedná o karcinom ovarií s nejpříznivější prognózou. V časném stadiu bývá typicky diagnostikován také karcinom světlobuněčného typu, tvořící také přibližně 10% ovariálních karcinomů. Prognóza bohužel nebývá moc příznivá, avšak pokud je tento karcinom asociován s endometriózou, je příznivější. Oproti HGSC je tento typ karcinomu méně proliferativní, geneticky stabilnější a méně senzitivní k chemoterapii na bázi platiny (Gilks and Prat, 2009).

S výše popsaným histologickým dělením souvisí ještě další dělení karcinomů ovarií, a to dělení na dva základní typy podle vývoje nádoru a jeho progresu. Mezi epiteliální karcinomy ovarií typu I se řadí low-grade serózní, mucinózní, endometriodní a světlobuněčný karcinom. Vývoj a progresu karcinomů tohoto typu probíhá postupně, v několika krocích, přes benigní a ohraničené léze až po vznik maligních tumorů. Na molekulární úrovni je pro karcinomy typu I charakteristická mikrosatelitová nestabilita a mutace v genech *KRAS*, *BRAF*, *CTNNB1* a *PTEN*. Početnější jsou ovariální karcinomy typu II, zahrnující nejčastěji high-grade serózní karcinomy. Na rozdíl od prvního typu se tyto karcinomy vyvíjejí velmi rychle a agresivně. Často u nich dochází k vysokému stupni chromozomové nestability a mutacím *p53* a *BRCA1/2* (Ricciardelli and Oehler, 2009).

### 3.1.5. LÉČBA

Volba vhodné terapie se odvíjí od stadia, stupně a histologického typu ovariálního karcinomu. Standardem u většiny pacientek s potvrzenou diagnózou či s podezřením na epiteliální karcinom ovarií je chirurgická léčba. Smyslem tohoto zákroku je kromě zjištění rozsahu a cytoreduktivního odstranění nádoru, také přesné určení patologické diagnózy. Určení přesného stadia podle FIGO kritérií je nezbytné pro výběr správné terapie a stejně tak je kritickým faktorem pro určení další prognózy. V rámci chirurgického zákroku je poměrně často volen radikální postup, který může kromě odstranění vaječníků a vejcovodů zahrnovat i částečné odstranění jater, močového měchýře, dělohy či střeva, aby bylo dosaženo optimální cytoredukce. Množství reziduální nemoci po primárním chirurgickém zákroku nepřímo koreluje s dobou přežití a je tak dalším významným prognostickým faktorem. Kromě toho, že

maximální či optimální cytoreduktivní zákrok před nasazením chemoterapeutické léčby zvyšuje přežití u pacientek s pokročilými stádii (III-IV dle FIGO) karcinomu ovarií, zároveň také přináší zlepšení některých symptomů (zvracení, abdominální distenze nebo bolest břicha). U některých pacientek se zvýšeným rizikem perioperativních komplikací, špatným zdravotním stavem nebo pokročilým stavem onemocnění není možné provést primární chirurgický zákrok a odstranit nádor. V takových případech je přednostně nasazena chemoterapeutická léčba. Po zmenšení nádorové masy je následně proveden chirurgický zákrok. Chirurgické odstranění nádorové masy se může provést i opakovaně. Sekundární cytoredukce má význam u pacientek s dobou bez progresu onemocnění od ukončení chemoterapeutické léčby mezi 12 a 18 měsíci, a potenciálně chemosenzitivním a lokalizovaným rekurentním nádorem (u nějž je možné kompletní odstranění) (Ramirez, Chon and Apte, 2011).

Po primárním chirurgickém zákroku je ve většině případů nasazena chemoterapeutická léčba. Ta může být aplikována intravenózně nebo intraperitoneálně, přičemž druhý způsob podání ukazuje zvýšené celkové přežití i delší dobu přežití bez progresu onemocnění. Na druhou stranu je intraperitoneální podání spojeno s více nežádoucími vedlejšími efekty a léčba musí být častěji přerušena (Ramirez, Chon and Apte, 2011). Ve většině zemí se tak stále nejčastěji využívá intravenózní podání. Volba chemoterapeutické léčby závisí především na přesném určení stádia nádoru po primárním chirurgickém zákroku, jehož součástí jsou také histologické zkoušky odebraných tkání či peritoneální výplach.

V časných stádiích (I- IIa dle FIGO) je karcinom ovarií diagnostikován pouze asi ve 20% případů. Díky tomu, že v těchto stádiích je nádor lokalizovaný a dobře ohraničený, lze dosáhnout kompletní resekce a většinou další léčba již není nutná. To se týká především dobře diferencovaných tumorů stádia IA nebo IB s histologickým nálezem jiným než světlobuněčného typu. V ostatních případech je indikována chemoterapeutická léčba založená na karboplatině, či kombinaci karboplatiny a paclitaxelu. K relapsu dochází asi u 25 % pacientek. U ostatních pokročilých stádií následuje po chirurgickém odstranění nádoru vždy chemoterapeutická léčba. V léčbě epitelálního karcinomu ovarií se standardně využívají deriváty platiny (karboplatina, cisplatina) a taxany (např. paclitaxel). Nejčastěji je využívána kombinace karboplatina-paclitaxel vzhledem k dobrým léčebným výsledkům a zároveň poměrně nižší toxicitě v porovnání s jinými chemoterapeutiky či jejich kombinacemi. Na léčbu odpovídá zhruba 65% pacientek, doba bez progresu onemocnění se pohybuje mezi 16 a 21 měsíci a celková doba přežití je 32-57 měsíců (na základě výsledků nedávných klinických studií) (Pignata *et al.*, 2011).

Od objevu cisplatiny uběhlo již více než padesát let. Carboplatina a oxaliplatina byly objeveny jako méně toxické analogy cisplatiny. O mechanismu protinádorového účinku těchto platinových derivátů toho nebylo dlouho příliš mnoho známo (Muggia *et al.*, 2015). Dnes se má za to, že mechanismy působení derivátů platiny zahrnují nekovalentní DNA interkalace, tvorbu kovalentních aduktů na DNA, tvorbu vazeb mezi řetězci DNA, vytváření zlomů na DNA v důsledku inhibice topoisomerázy II, či účinek volných radikálů (Fong, 2016).

Mezi nejčastěji používané taxany v protinádorové terapii se řadí docetaxel a paclitaxel. Tato chemoterapeutika byla izolována ze stromů Tisu (*Taxus brevifolia* a *Taxus baccata*) v 70. a 80. letech minulého století. Mechanismus jejich protinádorového účinku je založen na interakci s tubulinem. Docetaxel má velmi vysokou afinitu k  $\beta$ -tubulinu, postihuje především organizaci centrozomu a jeho efekt se projevuje v S, G<sub>2</sub> a M fázi buněčného cyklu. Protinádorový efekt paclitaxelu je trochu odlišný – způsobuje především poškození mitotického vřeténka v G<sub>2</sub> a M fázi buněčného cyklu (Gligorov and Lotz, 2004).

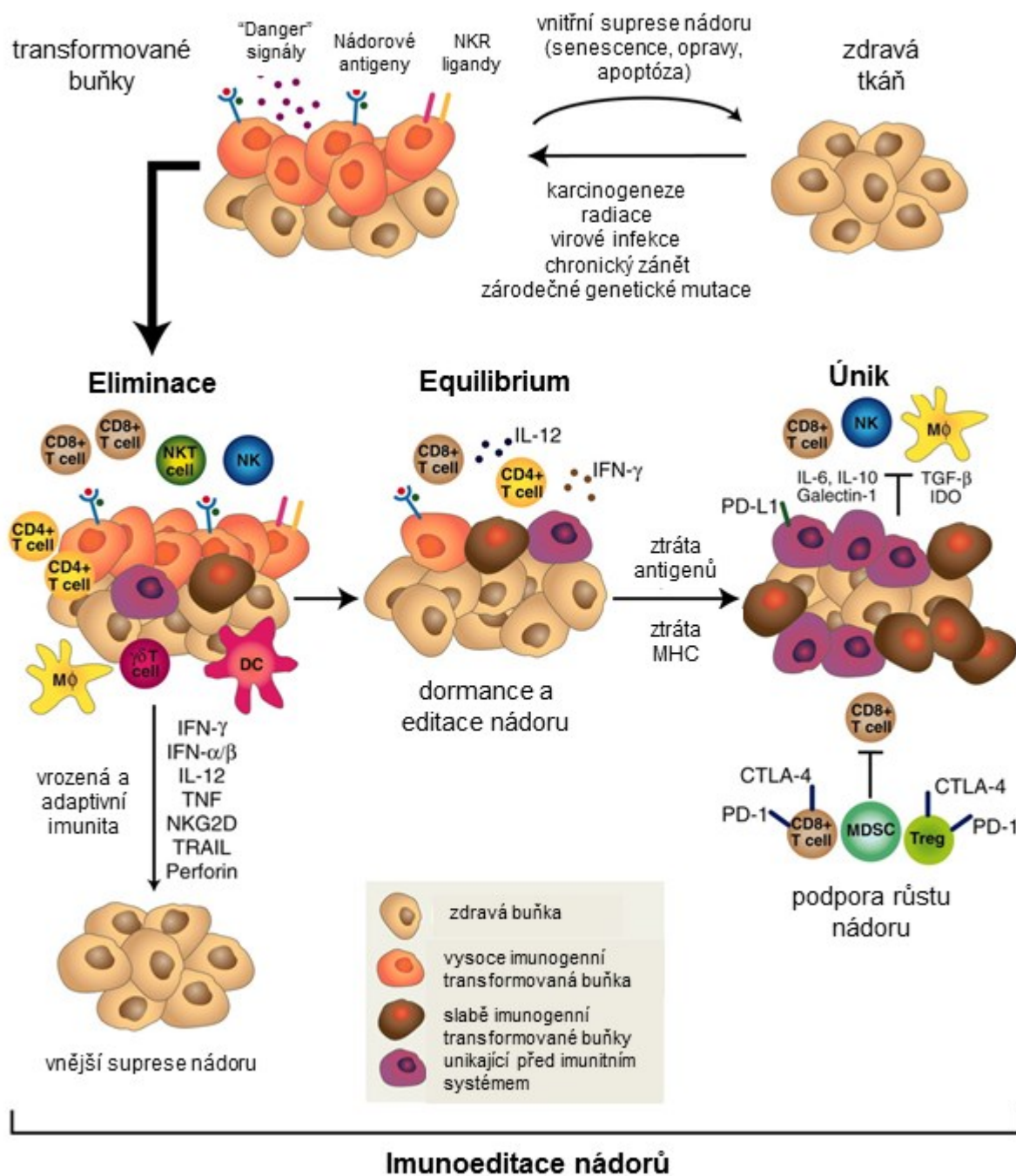
Míra odpovědi na první linii chemoterapeutické léčby dosahuje i více než 80%, je tedy poměrně vysoká. Bohužel u většiny pacientek dochází k relapsu onemocnění. V závislosti na tom, po jak dlouhé době se onemocnění opakuje, dělíme pacientky na platina-refrakterní (k progresi dojde již během první linie léčby), platina-rezistentní (k progresi dojde během 6 měsíců po ukončení první linie léčby) a platina-senzitivní (k progresi dojde po více jak 6 měsících od ukončení primární léčby). Čím je doba bez progresu onemocnění delší, tím větší je šance, že bude mít léčba druhé linie založená na platině klinický přínos. U pacientů s platina-senzitivním relapsem karcinomu ovarií se v druhé linii chemoterapeutické léčby opět využívá kombinace derivátů platiny a taxanů. Při opakované léčbě však dochází ke kumulaci neurotoxických účinků karboplatiny i paclitaxelu. Pro léčbu platina-rezistentních či platina-refrakterních pacientek se nejčastěji využívá monoterapie založená na jiných léčivech než derivátech platiny (které u těchto pacientek již nepřinášejí odpovídající benefity) – např. topotecan, pegylovaný liposomální doxorubicin, nebo gemcitabine. Vzhledem k tomu, že dosud nebyla nalezena vhodná chemoterapeutika k léčbě platina-refrakterních a platina-rezistentních nádorů, jsou tyto pacientky často přednostně zařazovány do klinických studií. V současné době probíhá několik klinických studií fáze II i III zkoumajících nová léčiva (pegylovaný liposomální doxorubicin, inhibitory angiogenese aj.), nové kombinace chemoterapeutik či nové způsoby dávkování (co se frekvence nebo způsobu podání týče) (Pignata *et al.*, 2011; Colombo *et al.*, 2014).

## 3.2. PROTINÁDOROVÁ IMUNITA

### 3.2.1. INTERAKCE MEZI NÁDOREM A IMUNITNÍM SYSTÉMEM

Během tumorigeneze dochází v nádorových buňkách k akumulaci různých mutací a genetických změn, které vedou k poškození a modifikacím buněčných regulačních procesů. Důsledkem je vznik neoantigenů či exprese diferenciačních a testikulárních antigenů v tkáních, kde se fyziologicky nevyskytují. Prezentace těchto neobvyklých antigenů na MHC I nádorové buňky odlišuje od ostatních netransformovaných buněk. Již přes dvacet let je známo, že komplexy MHC I s nádorově-specifickými antigeny jsou spontánně rozpoznávány CD8<sup>+</sup> T lymfocyty (Boon *et al.*, 1994). Interakce nádoru a imunitního systému zahrnuje mnoho různých mechanismů. Tento vztah vysvětluje hypotéza imunoeditace nádorů (cancer immunoditing) a zahrnuje tři fáze - fázi eliminace nádoru, rovnováhy a úniku nádoru před imunitním systémem (Obrázek 2).

V první fázi eliminace má imunitní systém dohled a převahu nad vznikem nádoru. Mechanismy vrozené a adaptivní imunity dokáží zničit a vyhledat vznikající nádor ještě před tím, než dojde k jeho klinickým projevům. Důležitou roli v této fázi mají tzv. DAMPs signály. Můžeme mezi ně zařadit např. interferony typu I, molekuly uvolněné z umírajících buněk (HMGB1) či poškozených tkání (fragmenty hyaluronanu) nebo ligandy stresu (MICA/B). Tyto molekuly jsou rozpoznávány receptory buněk vrozené imunity, které reagují produkcí zánětlivých a imunomodulačních cytokinů a aktivují nádorově-specifickou imunitní odpověď. Dochází také k produkci různých chemokinů (CXCL9, CXCL10, CXCL11), které směřují buňky vrozené imunity (NKT, NK,  $\gamma\delta$  T buňky, makrofágy, dendritické buňky) do místa vznikajícího nádoru. NK buňky a makrofágy produkují IFN $\gamma$  a IL-12 a používají i další mechanismy (TRAIL, perforin, reaktivní kyslíkové či dusíkové radikály) k ničení nádorových buněk. Dendritické buňky, které pohltily nádorové antigeny a byly aktivovány imunogenními signály, putují do lymfatických uzlin, kde indukují vznik IFN $\gamma$ -produkujících Th1 CD4<sup>+</sup> T lymfocytů, které pak přispívají ke vzniku CD8<sup>+</sup> cytotoxických T lymfocytů. Tyto efektorové buňky antigen-specifické imunity následně putují do místa vznikajícího nádoru, kde se podílejí na eliminaci nádorových buněk (produkce IFN $\gamma$ , TRAIL, perforinu, granzymu).



**Obrázek 2:** Hypotéza imunoeditace nádorů zahrnuje tři fáze: fázi eliminace, fázi rovnováhy a fázi úniku nádoru před imunitním systémem (převzato a upraveno dle Schreiber, Old and Smyth, 2011).

Fáze rovnováhy je charakteristická přítomností nádorových buněk, které nebyly zničeny imunitním systémem ve fázi eliminace. Tyto buňky jsou však v latentním stavu a jejich růst a vývoj je stále pod dohledem imunitního systému, především IFN $\gamma^+$ , CD4 $^+$  a CD8 $^+$  T lymfocytů. Zároveň je na nádorové buňky vytvářen selekční tlak. Ten přežijí především ty buňky, které získají imunoinvasivní vlastnosti a mutace umožňující jim uniknout před dohledem imunitního systému. Takto transformované nádorové buňky pak mohou rychle růst,

dělit se a vytvářet tak samotný nádor i vzdálené metastázy. K úniku nádorových buněk před imunitním systémem přispívá několik různých mechanismů. Snížení exprese MHC I proteinů nebo poškození drah, které vedou k prezentaci antigenů na těchto komplexech, což zapříčiní snížené rozpoznávání nádorových buněk imunitním systémem. Nádorové buňky se mohou bránit také spuštěním anti-apoptotických drah, díky kterým jsou pak méně citlivé vůči cytotoxickému působení imunitního systému. Nádorové buňky ovlivňují celé nádorové mikroprostředí a přispívají také ke vzniku imunopresivních populací buněk (Treg a MDSC) či přímo produkují supresivní cytokiny (TGF $\beta$  či VEGF) (Dunn *et al.*, 2002; Schreiber, Old and Smyth, 2011).

### 3.2.2. *IMUNOGENICITA BUNĚK KARCINOMU OVARIÍ*

V důsledku mutací, chromozomálních přestaveb a dalších genetických změn dochází v nádorových buňkách k expresi mutovaných proteinů, proteinů s alternativními posttranslačními modifikacemi, či např. ke zvýšené expresi proteinů ve tkáních, kde se normálně nevyskytují. Tyto změny vedou k rozpoznání nádorově-specifických antigenů imunitním systémem, který vůči abnormálním antigenům může vytvářet imunitní odpověď. Dále jsou uvedeny vybrané nádorové antigeny, které se podílejí na imunogenicitě karcinomu ovarií.

Karcinoembryonální antigen (Carcinoembryogenic antigen, CEA) patřící do superrodiny imunoglobulinů je glykoprotein o molekulové hmotnosti 180 kDa. Přirozeně je exprimován během onkofetálního vývoje a v nízké míře také na sliznici tlustého střeva. Zvýšená exprese CEA se vyskytuje u adenokarcinomu tlustého střeva, plic, prsu, slinivky a dalších. CEA se uplatňuje v buněčné adhezi. Při nádorové transformaci může inhibovat buněčnou smrt způsobenou ztrátou kontaktu s extracelulární matrix (anoikis) (Berinstein, 2002). V rámci dánské studie MALOVA byla provedena imunohistochemická analýza 571 vzorků karcinomů ovarií různých typů. CEA byl exprimován v 17% všech typů nádorů, signifikantně více byl detekován u mucinózního karcinomu, kde byl exprimován ve 33% nádorů (Høgdall *et al.*, 2008).

Her-2 (human epidermal growth factor receptor 2, známý také jako Her2/neu či ERBB2) je transmembránový glykoprotein s tyrozinázovou aktivitou příbuzný receptoru pro epidermální růstový faktor. Podílí se na aktivaci různých signálních drah, které jsou spojené s buněčnou diferenciací, proliferací, migrací či apoptózou. V periferních tkáních je jeho exprese velmi nízká, avšak bývá zvýšena v případě karcinomu ovarií. V různých studiích byla zvýšená exprese Her-2 detekována u 5-66% případů (Preston *et al.*, 2012).

Mezi další glykoproteiny, které jsou u karcinomu ovarií exprimované ve zvýšeném množství, patří transmembránové muciny. Jedná se o značně glykosylované proteiny s velkou molekulovou hmotností, exprimované epiteliálními tkáněmi. Jejich funkcí je především ochrana a lubrikace tkání. V souvislosti s karcinomem ovarií jsou nejvýznamnější Muc-1 a Muc-16 (Preston *et al.*, 2012). Uvádí se, že Muc-1 je ve zvýšené míře exprimován u více než 90% epiteliálního karcinomu ovarií. Muc-1 asociovaný s nádorem se však strukturně liší od Muc-1 fyziologicky exprimovaného epiteliálními tkáněmi. Dochází ke změnám v glykosylaci a také k odhalení nových struktur, které se normálně na povrchu proteinu nevyskytují. Zvýšená exprese Muc-1 přispívá k invazivnímu růstu nádorových buněk a tvorbě metastáz (Deng *et al.*, 2013). Muc-16, známý také jako CA 125, je největším membránově vázaným mucinem. Může být proteolyticky štěpen a uvolňován do krevního oběhu a peritonea. Používá se jako sérový marker při diagnostice karcinomu ovarií. V dánské studii MALOVA byla exprese Muc-16 zjištěna u 70% z 584 případů karcinomu ovarií. Také bylo zjištěno, že zvýšená exprese CA 125 koreluje s vyšším stadiem karcinomu ovarií dle FIGO. Nejvíce byl Muc-16 exprimován u serózního adenokarcinomu (85%), nejméně pak u mucinózního karcinomu ovarií (12%) (Høgdall *et al.*, 2007).

Další skupinou antigenů asociovaných s karcinomem ovaria jsou proteiny patřící mezi nádorové testikulární antigeny. Tyto proteiny se vyskytují v testikulární tkáni a předpokládá se, že jsou exprimovány také během vývoje ovarií. V jiných tkáních se však nevyskytují. Jedná se o velkou skupinu zahrnující mnoho různých proteinů, v souvislosti s karcinomem ovarií jsou zde však pro přehlednost uvedeny pouze NY-ESO-1 (New York esophageal squamous cell carcinoma 1, jiným jménem CTAG1B) a MAGE (melanoma associated antigen) antigeny. Na základě detekce mRNA bylo nalezeno NY-ESO-1 u 30% případů, při imunohistochemické analýze pak u 43% případů karcinomu ovarií (Odunsi *et al.*, 2003). NY-ESO-1 je pravděpodobně jedním z nejvíce imunogenních nádorových testikulárních antigenů (Taherian-esfahani *et al.*, 2016). Další studie ukázala expresi MAGE-A1 u 57% a MAGE-A3 u 37% ovariálních nádorových tkání. Expres těchto antigenů navíc pozitivně korelovala s diferenciací a klinickým stadiem nádoru (Zhang *et al.*, 2010). V rámci všech histologických typů byl MAGE-A4 exprimován u 23% z celkového počtu 150 vzorků karcinomu ovarií. U karcinomu mucinózního typu však exprese MAGE-A4 nebyla detekována (Zimmermann *et al.*, 2013).



### 3.2.3. ÚLOHA ANTIGEN SPECIFICKÝCH PROTILÁTEK

Většina nádorů je asociována se vznikem specifických nádorových protilátek namířených proti antigenům asociovaných s nádory (TAA – tumor associated antigens). Přítomnost těchto protilátek v séru onkologických pacientů se sleduje zejména s cílem objasnit jejich diagnostický či prognostický význam a později je i takto využít. Tato možnost se nabízí, protože na rozdíl od samotných TAA přítomných v séru, jsou protilátky podstatně stabilnější než nádorové proteiny, které mají kratší poločas rozpadu. Navíc jsou protilátky v séru zastoupeny ve větší míře než proteinové biomarkery a jsou často přítomné ještě dříve, než dojde ke klinickým projevům onemocnění (Chatterjee and Tainsky, 2010). Výhodou by mohlo být jejich využití při diagnóze časných stádií nemoci, kdy jsou proteinové markery ještě nedetekovatelné (Luborsky *et al.*, 2005).

V sérech pacientek s karcinomem ovarií byly detekovány autoprottilátky proti mnoha různým nádorovým antigenům zahrnujícím tumor supresorový protein p53 (Gadducci *et al.*, 1999; Vogl *et al.*, 2000), protein teplotního šoku HSP-90 (Luo *et al.*, 2002), testikulární antigeny NY-ESO-1, LAGE-1 (Odunsi *et al.*, 2003) a SPAG9 (Garg *et al.*, 2007), či muciny Muc-1 (Cramer *et al.*, 2005) a Muc-16 (Frietze *et al.*, 2016). Mezi dalšími lze zmínit vápník-vázající signalizační protein psoriasis S100A7 (Gagnon *et al.*, 2008), epiteliální adhezni molekulu Ep-CAM (Kim *et al.*, 2003), transkripční faktory s homeodómnou HOXA7 (Naora, Montz, *et al.*, 2001) a HOXB7 (Naora, Yang, *et al.*, 2001), či lysosomální proteázu Katepsin D (Chinni *et al.*, 1997).

Množství přítomných protilátek pravděpodobně závisí na míře exprese daného proteinu a zároveň může korelovat s antigen specifickou T buněčnou odpovědí (Gnjatic *et al.*, 2003). Přítomnost protilátek v séru onkologických pacientů by se dala chápat jako nepřímý ukazatel funkce imunitního systému, ať už se zaměříme na T buňky nebo B buňky. Protilátky mohou po navázání na antigen vyvolat buněčnou smrt nádorových buněk např. díky cytotoxicitě závislé na protilátkách (ADCC – antibody dependent cell cytotoxicity), nebo na komplementu (CDC – komplement-dependent cytotoxicity). Také mohou blokovat vazbu ligandu na receptor a mít tak vliv na přenos signálu v buňce. Zatím není zcela jasné, jestli se protilátky podílejí na protinádorovém imunitním dohledu, nebo zda přispívají k tumorigennímu zánětu (Järås and Anderson, 2011). Nicméně je jasné, že role B lymfocytů v nádorové imunitě je významná, a tak je poněkud překvapivé, že se výzkum obecně zaměřuje spíše na T lymfocyty a o vztahu B lymfocytů a nádorů toho zatím není příliš známo. Lungren *et al.* se zabýval přítomností B buněk a plazmatických buněk v nádorové tkáni u

pacientek s epiteliálním karcinomem ovarií. Na základě imunohistochemické analýzy vzorků od 154 pacientek bylo zjištěno, že vysoká exprese molekuly CD138 na imunitních buňkách je spojena s kratším přežíváním pacientek. Dříve známá zjištění, že infiltrace high-grade serózního karcinomu ovarií CD20 pozitivními B buňkami je asociována s prodlouženým přežíváním (Stone *et al.*, 2003), se nepodařilo potvrdit (Lundgren *et al.*, 2016). Bylo by přínosné, kdyby se další výzkum zaměřil více na význam B lymfocytů v nádorové imunologii a více tak objasnil, jejich zatím spornou roli v nádorové imunitě. Zajímavé by také bylo zaměřit se na vztah T- a B-buněčných populací a jeho prognostický význam.

Je zajímavé zmínit, že kromě TAA-specifických protilátek, má asi 30% onkologických pacientů v séru přítomné také anti-nukleární protilátky, které jsou charakteristické zejména pro autoimunitní onemocnění. Nabízí se několik různých mechanismů vzniku TAA-specifických autoprotiátek. Poruchy tolerance, únik lymfocytů před klonální delecí či snížení počtu regulačních T lymfocytů patří určitě mezi možné mechanismy. Dalšími jsou například zvýšená exprese daného antigenu, nebo exprese antigenu v tkáni, kde se tento protein fyziologicky nevyskytuje (exprese testikulárních antigenů v somatické tkáni). Ke vzniku nádorově specifických autoprotiátek může vést také alternativní struktura proteinů, spojená se somatickými mutacemi nebo změnami konformace proteinů vedoucích k prezentaci neobvyklých epitopů, na které imunitní systém reaguje. Cílem nádorově specifických autoprotiátek jsou také proteiny s neobvyklými post-translačními modifikacemi, nejčastěji glykosylacemi nebo fosforylacemi, které mohou ovlivnit interakci TCR s komplexem MHC-antigen. Humorální imunitní reakci mohou vyvolat také intracelulární nádorově specifické, či asociované antigeny, které uniknou při buněčné lyzi nebo nekróze. Na závěr je třeba zdůraznit, že význam přítomnosti a množství nádorově specifických protilátek je stále předmětem kontroverzí a pravděpodobně závisí na konkrétní autoprotiátce, zdali má pozitivní či negativní přínos v prognóze onemocnění (Zaenker, Gray and Ziman, 2016).

#### 3.2.4. *IMUNOSUPRESIVNÍ POPULACE BUNĚK - MDSC*

Imunosupresivní populace buněk odvozené od myeloidní linie (MDSC) mají významnou regulační roli jak u nádorových onemocnění, tak i u jiných onemocnění souvisejících s chronickým zánětem, autoimunitními onemocněními, infekcí, či reakcí štetu proti hostiteli. U zdravých jedinců je však jejich výskyt méně častý. Jak lze z názvu odvodit, jsou MDSC blíže příbuzné myeloidním buňkám, avšak mají supresivní vlastnosti. Jedná se o velmi heterogenní populaci buněk, jejichž vývoj je zastaven v různých stádiích diferenciaci. Na základě fenotypu a morfologie lze MDSC buňky rozdělit na ty, které se více podobají

neutrofilům – tzv. polymorfonukleární MDSC (PMN-MDSC), a na buňky odvozené od monocytů – tzv. monocytární MDSC (M-MDSC). U většiny typů nádorů převažuje populace PMN-MDSC buněk. Pro PMN-MDSC buňky je charakteristický fenotyp  $CD14^-CD15^+CD11b^+$ , případně  $CD14^-CD11b^+CD66b^+$ . M-MDSC mohou být definovány jako  $CD14^+CD15^-CD11b^+HLA-DR^{-low}$  (Gabrilovich, 2017). Je třeba podotknout, že jednotný postup pro detekci různých populací lidských MDSC buněk byl navržen teprve nedávno (Damuzzo *et al.*, 2015; Bronte *et al.*, 2016) a různé výzkumné týmy k charakterizaci fenotypu MDSC buněk používaly a používají rozdílné strategie. Dále je nutné poznamenat, že většina studií se zabývá pouze volně cirkulujícími MDSC. MDSC populacím infiltrujícími nádory je věnována mnohem menší pozornost (Solito *et al.*, 2014). Přitom k akumulaci MDSC buněk dochází v nádorové tkáni i v periferních lymfatických orgánech. V nádorové tkáni převládají buňky náležející do populace M-MDSC, které se mohou diferencovat v nádorově-asociované makrofágy (TAM). Naopak PMN-MDSC jsou převažující populací v periferních lymfatických orgánech (Kumar *et al.*, 2016). Ne všechny dosud známé subpopulace MDSC buněk musí být přítomné najednou. Pravděpodobnější je, že v různých typech nádorů dochází k expanzi jedné nebo více subpopulací, zastavených v různých stádiích diferenciaci. Podstatné však je, že všechny tyto buňky působí supresivně na imunitní systém (Damuzzo *et al.*, 2015).

Při definování a charakterizaci MDSC buněk nesmíme opomenout jejich supresivní vlastnosti uplatňující se při regulaci různých imunitních reakcí, týkajících se především T lymfocytů. Jedním z mechanismů imunosupresivního působení MDSC je zvýšená exprese NADPH oxidázy. Působením tohoto enzymu vznikají reaktivní kyslíkové radikály (ROS) – superoxidový anion ( $O_2^-$ ), peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) a peroxynitrit ( $ONOO^-$ ).  $H_2O_2$  potlačuje expresi CD3 $\zeta$  řetězce, a tím působí inhibičně na proliferaci T lymfocytů. Dalším mechanismem imunosupresivního působení je produkce oxidu dusnatého (NO), jejíž příčinou je zvýšená exprese arginázy (arg1) a inducibilní syntázy oxidu dusnatého (iNOS). Oxid dusnatý reaguje s aromatickými jádry některých aminokyselin (např. tyrosinu). To může vést k nitraci receptorů T lymfocytů (TCR), které poté mají sníženou schopnost rozpoznávat komplexy peptid-MHC. Zvýšená exprese indolamin -2, 3- dioxygenázy (IDO) pak má za následek depleci tryptofanu. Působením dalších faktorů (např. již zmíněné arg1) dochází také k lokálnímu snížení hladiny dalších aminokyselin (L-argininu, L-cysteinu nebo L-fenylalaninu) klíčových pro proliferaci T lymfocytů. Nedostatek těchto základních složek v důsledku potlačuje imunitní odpověď založenou na T lymfocytech. K dalším imunosupresivním mechanismům MDSC buněk se řadí sekrece protizánětlivých cytokinů

TGF $\beta$  a IL-10 (Solito *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2016). Mimo to produkují MDSC buňky také další cytokiny (VEGF, bFGF, Bv8 a MMP9) a ovlivňují tak nádorové mikroprostředí, podporují angiogenezi a růst nádorů (Gabrilovich, 2017).

Výskyt a expanze MDSC buněk úzce souvisí s nádorovými onemocněními. V posledních letech se také objevují nové souvislosti mezi akumulací MDSC buněk a klinickým vývojem stavu onkologických pacientů (Gabrilovich, 2017). Do roku 2015 zmiňovalo rozšíření populací MDSC buněk u onkologických pacientů přes 70 odborných článků (Damuzzo *et al.*, 2015). Několik studií ukázalo souvislost mezi expanzí MDSC buněk a celkovou dobou přežití u onkologických pacientů. Vzhledem k tomu, že frekvence přítomných MDSC buněk v krvi klesá po resekci nádoru, je pravděpodobné, že přítomnost a frekvence těchto buněk úzce souvisí s rozsahem a stádiem nádorového onemocnění. Pokud se potvrdí zmíněné souvislosti, nabízí se možnost korelovat frekvence MDSC buněk s klinickými parametry a využívat je jako prognostické markery (Solito *et al.*, 2014).

### 3.2.5. ÚLOHA REGULAČNÍCH T LYMFOCYTŮ

Regulační T lymfocyty (Treg) jsou klíčovými buňkami zajišťující periferní toleranci v organismu. V řadě nádorových onemocnění je však počet těchto buněk zvýšen a navíc se ukazuje, že tyto buňky inhibují specifickou protinádorovou imunitu. Treg jsou významnou součástí supresivního mikroprostředí ovariálního karcinomu. Vyskytují se jak přímo v mikroprostředí solidního nádoru či ascites, tak je lze nalézt také v periferní krvi pacientek s karcinomem ovaria. Treg vyskytující se v těchto různých prostředích se od sebe navzájem liší v míře aktivace. Treg infiltrující nádor mohou proliferovat větší rychlostí, produkovat více IL-10 a exprimovat větší množství aktivačního markeru CD69 než Treg cirkulující v periferní krvi. Mezi mechanismy, kterými Treg inhibují efektorové T lymfocyty, patří především deplece IL-2, pro který mají vyšší aviditu než T lymfocyty, a produkce imunopresivních faktorů jako IL-10 nebo TGF- $\beta$ . Kromě toho, že Treg působí imunopresivně na efektorové mechanismy protinádorové imunity, mohou blokovat také efekt protinádorové imunoterapie. Mimo imunopresivní působení mohou Treg působit také protumorigenně tím, že produkují VEGF a podporují tak angiogenezi. Z důvodu jejich nežádoucího působení jsou některé imunoterapeutické přístupy doplňovány nízkými dávkami cyklofosfamidu, který snižuje počet Treg buněk. Treg jsou nejčastěji charakterizovány jako CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> buněčná populace. CD25 je podjednotka receptoru pro IL-2 (IL-2R $\alpha$ ) s vysokou afinitou k tomuto interleukinu. FoxP3 je významný transkripční faktor regulující vývoj a funkci T lymfocytů.

Někdy se jako další marker pro detekci T lymfocytů přidává ještě nízká exprese podjednotky receptoru pro IL-7 (IL-7R $\alpha$ ) - CD127 (CD127<sup>low</sup>) (Barnett *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2016).

### 3.2.6. VÝZNAM EXPRESE INHIBIČNÍCH “IMMUNE CHECKPOINT“ MOLEKUL

Protein asociovaný s cytotoxickými T lymfocyty – CTLA-4 (CD152) je exprimován T lymfocyty a má důležitou roli v regulaci aktivace těchto buněk. T lymfocyty jsou aktivovány dvěma signály. Prvním je specifická vazba mezi komplexem antigen-MHC s TCR receptorem a druhým je vazba CD80 nebo CD86, vyskytujících se na APC, na molekulu CD28 nacházející se na T lymfocytech. Po aktivaci dochází ke zvýšení exprese CTLA-4 a translokaci této molekuly z intracelulárních vezikulů na buněčný povrch, kde se váže s větší aviditou na CD80/CD86 a na rozdíl od CD28 vysílá do buňky inhibiční signál. Důsledkem je zastavení buněčné proliferace a sekrece cytokinů (Longoria and Eskander, 2015). CTLA-4, imunoglobulin a holomolog CD28, je tak významným faktorem v udržování homeostázy T lymfocytů. CTLA-4 je významně exprimován také Treg a zdá se, že CTLA-4<sup>+</sup> Treg mohou působit supresivně a zamezit hyperaktivaci také CTLA-4<sup>-</sup> buněk (Walker, 2017).

LAG-3 (CD223) patří rovněž do rodiny imunoglobulinů a sdílí 20% homologii s molekulou CD4. Podobně jako CD4, i LAG-3 se na strukturní úrovni skládá ze čtyř IgG domén a váže se na MHC II. K vazbě dochází s větší aviditou než u CD4, ale na jiném místě. Za normálních okolností je velká část LAG-3 lokalizovaná v intracelulárních vezikulech a jeho exprese se zvyšuje po buněčné aktivaci. Na rozdíl od CD4, poskytuje LAG-3 buňce negativní kostimulační signál. LAG-3 je exprimován mnoha různými buněčnými populacemi jako např. aktivovanými T lymfocyty, Treg, TIL, NK, NKT, B buňkami či plasmacytoidními dendritickými buňkami. LAG-3 se podílí na regulaci proliferace a efektorových funkcí T lymfocytů, stejně jako na řízení jejich homeostáze. Po spuštění LAG-3 signalizace na CD4<sup>+</sup> buňkách dochází k zastavení aktivace těchto buněk, snížení produkce IL-2 a cytokinů typu Th1. U CD8<sup>+</sup> buněk slouží LAG-3 také jako negativní regulátor a podílí se na dosažení jejich tolerogenního stavu. Po vazbě na MHC II na povrchu DC, dochází k inhibici maturace těchto antigen-prezentujících buněk. Dále se LAG-3 podílí na supresivní funkci Treg (Sierro, Romero and Speiser, 2011).

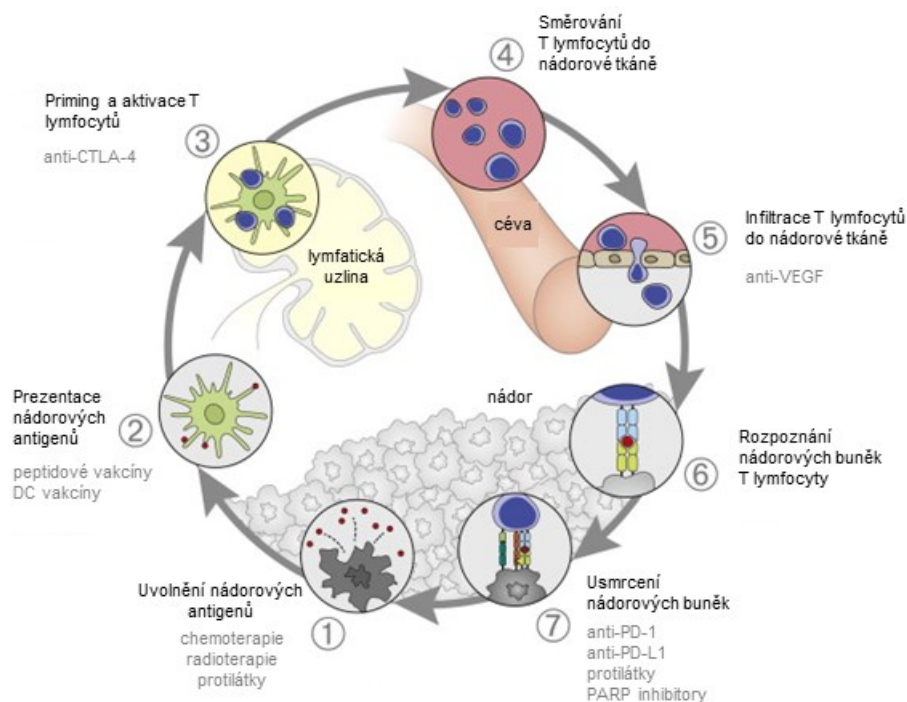
PD-1 (CD279) je podobně jako CTLA-4 další receptor z CD28 rodiny. Funkce PD-1 je podobná CTLA-4. Podílí se na inhibici proliferace T lymfocytů a produkci IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  a IL-2. PD-1 je kromě aktivovaných T lymfocytů exprimován i na B lymfocytech, NK, NKT a myeloidních buňkách. Jeho ligandy jsou PD-L1 a PD-L2. PD-L1 se vyskytuje na lymfocytech, dendritických buňkách, makrofázích, i nehematopoetických buňkách (např. na

astrocytech, keratinocytech či vaskulárních endoteliálních buňkách) a jeho exprese může být vyvolána také na parenchymatických buňkách či nádorech různých typů. Naproti tomu PD-L2 se nachází především na dendritických buňkách, makrofázích a monocytech. Na rozdíl od CTLA-4, který má důležitou roli v primární fázi aktivace T lymfocytů, působí PD-1 během efektorové fáze v periferních tkáních (Keir, Francisco and Sharpe, 2007; Buchbinder and Desai, 2016).

Další inhibiční molekulou, o které je nutno se zmínit je TIM-3 (CD366), známý také pod názvem HAVCR2. Tento protein je exprimován na širokém spektru imunitních buněk zahrnujících Th1 a Th17 buňky, CD8+ lymfocyty, dendritické buňky, monocyty, Treg, NK, TIL či žírné buňky. Nenajdeme ho však na pomocných T lymfocytech typu II (Th2). U některých typů nádorů se můžeme setkat se zvýšenou expresí TIM-3 na buňkách vrozené imunity. Ligandem TIM-3 je galectin-9, který po vazbě přes TIM-3 spouští apoptózu T buněk a tedy negativně reguluje T buněčnou imunitní odpověď (Xu *et al.*, 2017). Další role TIM-3 souvisí s MDSC buňkami. Nárůst populací MDSC buněk je podporován zvýšenou expresí TIM-3 na T lymfocytech (Anderson, 2012).

### 3.3. IMUNOTERAPIE V LÉČBĚ KARCINOMU OVARIÍ

Jak již bylo řečeno, i přes počáteční úspěchy a remisi karcinomu ovarií, dochází často k relapsu a vzniku nádorů rezistentních k chemoterapii. Imunoterapie by mohla být efektivní léčbou těchto nádorů. Jelikož buňky karcinomu ovarií exprimují tumor-asociované molekuly, může docházet ke vzniku specifické imunitní odpovědi. Imunogenicita ovariálního karcinomu je jedním z důvodů vývoje mnoha nových terapií zaměřených na protinádorovou imunitu. Chen a Mellman teoreticky popsali cyklus, kterým vysvětlují, jak vzniká adaptivní imunitní protinádorová odpověď (Obrázek 3). Na počátku zachytí dendritické buňky nádorové neoantigeny uvolněné společně s dalšími imunogenními signály umírajícími nádorovými buňkami do okolního prostředí. Takto aktivované dendritické buňky pak prezentují peptidy ze zachycených neoantigenů na MHC molekulách a aktivují specifické T lymfocyty. Ty dále infiltrují nádorové prostředí, rozeznávají specifické antigeny na nádorových buňkách a takto zacílené nádorové buňky zabíjejí. To vyvolá další uvolnění nádorových antigenů a prohloubení imunitní odpovědi (Chen and Mellman, 2013). V současné době je vyvíjeno a testováno mnoho nových imunoterapeutických přípravků, které jsou zacílené na různé fáze tohoto cyklu a pomáhají vytvářet adaptivní imunitní odpověď.



**Obrázek 3:** Cyklus vzniku adaptivní protinádorové imunitní odpovědi. Uvolněné nádorové antigeny jsou prezentovány dendritickými buňkami T lymfocytům. Aktivované T lymfocyty poté infiltrují nádorovou tkáň, rozpoznávají a usmrcují nádorové buňky. Imunoterapie (vakcíny, protilátky, anti-angiogenní terapie, inhibitory “immune checkpoint” molekul) podporuje vznik adaptivní imunitní odpovědi v různých fázích tohoto cyklu (převzato a upraveno dle Chen and Mellman, 2013).

### 3.3.1. IMUNOTERAPIE ZALOŽENÁ NA PROTILÁTKÁCH

Využití protilátek v imunoterapii přináší několik výhod. Jednak jsou vysoce specifické k vybranému antigenu, jsou stabilní a také je možné je poměrně snadno vyrobit pomocí dostupných biotechnologií. Na základě využitých biotechnologií se protilátky dělí na více typů: myší, chimerické, humanizované a lidské. Dále uvádím přehled vybraných protilátek využívaných v imunoterapeutické léčbě karcinomu ovarií.

Farletuzumab je humanizovaná monoklonální protilátka proti folátovému receptoru 1 (FOLR1). FOLR1 je ve zvýšené míře exprimován většinou typů karcinomu ovarií. Funkcí tohoto membránově vázaného proteinu je vazba a transport folátu do buněk, či regulace proliferace obdobnými signálními drahami jaké využívají proteiny s GPI kotvou (Miotti *et al.*, 2000). Folát hraje důležitou roli v buněčném metabolismu, především při syntéze a opravách DNA. Rychle dělící se buňky tak mají zvýšené nároky na příjem folátů. Nádorové buňky mají často zvýšenou expresi folátového receptoru, což jim poskytuje výhodu oproti zdravým buňkám při vychytávání folátů z vnějšího prostředí (Kelemen, 2006). Farletuzumab neblokuje vazbu folátu ani jeho transport do buňky, ale po vazbě spouští buněčnou cytotoxicitu závislou na protilátkách (Drerup *et al.*, 2015). Farletuzumab byl v klinických studiích testován v kombinaci s karboplatinou a taxany (paclitaxelem nebo docetaxelem). Klinické hodnocení fáze II ukázalo zvýšenou míru objektivní odpovědi v porovnání s historickými daty pouze chemoterapeuticky léčených pacientek (White *et al.*, 2010). Farletuzumab byl dále testován v rozsáhlé klinické studii fáze III, která zahrnovala 1100 pacientek. Primárním cílem studie bylo sledování hodnoty progression-free survival (PFS). Výsledky studie však neukázaly zvýšení PFS pacientek léčených Farletuzumabem oproti kontrolní skupině (Vergote *et al.*, 2016).

Catumaxomab je bispecifická monoklonální protilátka vázající epiteliální adhezni molekulu EpCAM a koreceptor T lymfocytů CD3. Mezi mechanismy protinádorového účinku Catumaxomabu můžeme zahrnout cytotoxicitu závislou na protilátkách, fagocytózu a lyzi buněk zprostředkovanou T lymfocyty. Transmembránový glykoprotein EpCAM je vhodným cílem protinádorové terapie, protože je vysoce exprimován buňkami karcinomu ovarií různých typů, avšak zdravé ovariální epitely exprimují EpCAM velmi málo, nebo téměř vůbec (Tse *et al.*, 2014). Catumaxomab byl klinicky hodnocen v rámci studie CASIMAS fáze III, kdy byl podáván pacientům s maligními ascity formou intraperitoneálních infuzí. Tato studie potvrdila jednak bezpečnost užívání přípravku a také relevantní klinický přínos, jak



ukázalo zvýšení hodnot PFS a OS. Na základě toho byl Catumaxomab schválen Evropskou Unií k léčbě pacientů s maligními ascity (Sehouli *et al.*, 2014).

Abagovomab je anti-idiotipová monoklonální protilátka proti Muc-16 (více o tomto antigenu viz. kapitola 3.2.2). Účinek protilátky Abagovomab je založen na funkční podobnosti s nádorovým antigenem CA 125. V rámci klinické studie fáze III – MIMOSA byl zaznamenán vznik silné protilátkové odpovědi, navzdory tomu však tato studie nepotvrdila žádný významný klinický přínos s ohledem na PFS a OS (Sabbatini *et al.*, 2013). Muc-16 je cílem i další protinádorové terapie založené na protilátkách. Oregovomab je modifikovaná myší IgG1 protilátka s vysokou afinitou k Muc-16, se kterým tvoří komplexy. Tyto komplexy jsou oproti samotnému Muc-16 ve větší míře vázány antigen prezentujícími buňkami, které dále indukují vznik CD4 a CD8 T buněčné imunitní odpovědi. Bohužel ani u této protilátky nebyl v rámci klinického hodnocení fáze III prokázán klinický přínos v léčbě karcinomu ovarií (Berek *et al.*, 2004).

Dalším cílem monoklonálních protilátek využívaných v protinádorové léčbě je vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF). Bevacizumab blokuje vazbu VEGF na receptor a ovlivňuje tak vaskularizaci - Inhibuje formování nových krevních cév, snižuje jejich počet i hustotu. Klinické studie fáze III potvrdily prodloužení PFS u pacientek s primárním karcinomem ovarií v pokročilém stadiu, stejně tak s platinem-senzitivním i platinem-rezistentním relapsem. Oproti PFS se zlepšení celkové doby přežití (OS) neprokázalo, nicméně studie ukázaly, že léčba zvyšuje kvalitu života pacientek s relapsem karcinomu ovarií. Bevacizumab se stal první schválenou anti-angiogenní terapií v onkologii (Rossi *et al.*, 2016).

### 3.3.2. INHIBITORY “IMMUNE CHECKPOINT ” MOLEKUL

Významu exprese “immune checkpoint ” molekul jsem se věnovala v kapitole 3.2.6. Následující vybrané protilátky blokují vazbu CTLA-4 nebo PD-1 s jejich ligandy, které, pokud dojde k vazbě, inhibují proliferaci T lymfocytů a sekreci cytokinů. Ipilimumab představuje plně humanizovanou IgG1 anti-CTLA-4 monoklonální protilátku. V roce 2011 byl Ipilimumab schválen FDA pro léčbu pacientů s metastatickým melanomem. Ipilimumab je v současné době testován v probíhající klinické studii fáze II, hodnotící jeho bezpečnost a účinnost léčby u pacientek s platinem-senzitivním karcinomem ovarií (Wang, Guo and Wu, 2014; *ClinicalTrials.gov*, 2017). Hned v několika klinických studiích fáze II (NCT02766582, NCT02608684, NCT02834975, NCT02674061) je hodnocen Pembrolizumab v léčbě

primárního či rekurentního karcinomu ovarii. Jedná se o anti-PD-1 protilátku, která je již schválená pro léčbu melanomu a nemalobuněčného karcinomu plic (Khoja *et al.*, 2015).

### 3.3.3. PEPTIDOVÉ VAKCÍNY

Účelem peptidových vakcín je aktivace a expanze antigeně specifických T lymfocytů. K tomuto účelu se využívají různé peptidy odvozené od nádorově specifických antigenů. Vakcína obsahující peptidy Her-2 a GM-CSF byla testována u pacientů s nádory prsu, ovaria či nemalobuněčným karcinomem plic, zvýšeně exprimujících Her-2. U většiny pacientů vakcinace vyvolala antigeně specifickou T buněčnou odpověď, která přetrvávala i poté, co byla vakcinace ukončena (Disis *et al.*, 2002). V klinické studii fáze I byla u pacientek s karcinomem ovaria testována vakcína složená z peptidového epitopu NY-ESO-1 v nekompletním Freundově adjuvans. Vakcína byla dobře tolerovaná a indukovala u pacientek vznik  $CD4^+$  a  $CD8^+$  antigeně specifické T buněčné odpovědi (Odunsi *et al.*, 2007). Imunizace syntetickým peptidem p53 byla hodnocena v klinické studii fáze II. Do této studie bylo zahrnuto 20 pacientek s karcinomem ovaria se zvýšenou hladinou CA 125. U všech pacientek byly detekovány  $IFN\gamma$ -produkující T lymfocyty. Dále bylo ukázáno, že vakcínou-indukované p53-specifické T lymfocyty produkovali převážně Th1 a Th2 cytokiny (Leffers *et al.*, 2009). Imunitní odpověď vyvolávala také vakcína peptidu p53 s GM-CSF u pacientek s rekurentním karcinomem ovaria exprimujícím p53 (Rahma *et al.*, 2012).

### 3.3.4. IMUNOTERAPIE ZALOŽENÁ NA DENDRITICKÝCH BUŇKÁCH

První schválenou imunoterapeutickou vakcínou využívající dendritické buňky se stal v roce 2010 Sipuleucel-T, známý také pod názvem Provenge, vyráběný firmou Dendreon. Sipuleucel-T je aktivní buněčná imunoterapie určená pro léčbu pacientů s metastatickým kastročně-rezistentním karcinomem prostaty. Vyrábí se z autologních buněk periferní krve, získaných leukaferetickým odběrem. Tyto buňky jsou inkubovány s PAP-GM-CSF fúzním proteinem, dochází k aktivaci dendritických buněk, které poté stimulují PAP-specifickou imunitní odpověď. PAP je prostatická fosfatáza exprimovaná nádorovými buňkami karcinomu prostaty. Sipuleucel-T byl schválen na základě klinické studie fáze III IMPACT, která ukázala, že střední doba přežití u pacientů léčených touto vakcínou byla o 4,1 měsíce delší než u pacientů léčených placebem (Cheever and Higano, 2011).

Existuje několik způsobů přípravy imunoterapeutických vakcín, které využívají dendritické buňky k prezentaci nádorových antigenů T lymfocytům a následně indukují vznik antigeně specifické imunitní odpovědi. Dendritické buňky, většinou získané z autologních

monocytů stimulací GM-CSF a IL-4, mohou být pulzované peptidy, nukleovými kyselinami, či usmrcenými nádorovými buňkami (Brtnický *et al.*, 2012). Jednou z DC vakcín testovaných v léčbě karcinomu ovaria je Cvac. Tato vakcína je vyráběna z autologních dendritických buněk inkubovaných s manosylovaným Muc-1. Klinická studie fáze II ukázala, že vakcína je dobře tolerovaná. U 4 z 26 pacientek byla pozorována odpověď ve snížení či stabilizaci hladiny tumorového markeru CA125 (Mitchell *et al.*, 2014). Brossart *et al.* sledoval indukci cytotoxické T lymfocytární odpovědi u pacientek s karcinomem prsu a ovaria léčených autologními DC pulzovanými s peptidy odvozenými od Her-2 a Muc-1. V této pilotní studii byly u 5 z 10 pacientek detekovány Her-2- a Muc-1-specifické cytotoxické T lymfocyty (Brossart *et al.*, 2000). Vakcinace dendritickými buňkami pulzovanými s autologními lyzovanými nádorovými buňkami byla hodnocena v klinické studii fáze I/II. Pacientkám s karcinomem ovarií, které podstoupily chirurgické odstranění nádoru a chemoterapeutickou léčbu, byly podány dvě subkutánní dávky DC vakcíny v kombinaci s IL-2. Tři z deseti pacientek dosáhly po vakcinaci kompletní remise na dobu 83, 81 a 38 měsíců bez relapsu onemocnění. U jedné pacientky se stabilním onemocněním došlo po vakcinaci k vymizení nádoru na 51 měsíců. U některých pacientek byly po vakcinaci také zaznamenány signifikantní změny v imunitní odpovědi – zvýšená aktivita NK buněk, zvýšená sekrece stimulačních cytokinů, snížení sekrece supresivních faktorů a množství IFN $\gamma$ -produkcujících T lymfocytů (Baek *et al.*, 2015). DC pulzované s autologními nádorovými buňkami byly testovány také v kombinaci s anti-angiogenní terapií a cyklofosfamidem (Kandalaft, Chiang, *et al.*, 2013). V další klinické studii byla léčba sestávající se z DC vakcíny (DC byly opět pulzované autologními nádorovými lyzovanými buňkami) v kombinaci s anti-angiogenní terapií následována ještě adoptivním transferem *ex vivo* stimulovaných T lymfocytů. U 4 z 6 pacientek byla zaznamenána protinádorová imunitní odpověď a také klinický přínos použité terapie (Kandalaft, Powell, *et al.*, 2013). V současné době probíhá několik dalších klinických studií hodnotících různě připravené DC vakcíny v kombinacích s dalšími terapiemi.

### 3.3.5. PARP INHIBITORY

Tyto inhibitory cílí na poly(ADP-ribose) polymerázu (PARP), která má velmi důležitou úlohu při opravách DNA. Následkem zablokování PARP polymerázy dochází k nahromadění mutací DNA, což se pro buňky stává letálním. Klinické hodnocení fáze II ukázalo signifikantní klinický přínos u pacientek léčených inhibitorem Olaparib oproti placebo. Olaparib má největší účinek u nádorů s mutacemi v genech BRCA1 a BRCA2, tedy genech rovněž zapojených v opravách DNA. V Evropské Unii je Olaparib schválený jako

udržovací léčba pro pacientky s platinem-senzitivním, BRCA-mutovaným relapsem karcinomu ovarií. Olaparib je schválený také v USA, kde se využívá jako monoterapie při léčbě pokročilých stádií BRCA-mutovaného karcinomu ovarií (Ledermann *et al.*, 2016). V poměrně nedávné době byly schváleny další dva PARP inhibitory pro léčbu karcinomu ovarií - Rucaparib a Niraparib. V klinické studii fáze III byla u skupiny pacientek s platinem-senzitivním relapsem karcinomu ovaria léčených Niraparibem zaznamenána delší doba bez progresu onemocnění oproti skupině léčené placebem, a to bez ohledu na přítomnost zárodečných *BRCA* mutací (Mirza *et al.*, 2016).

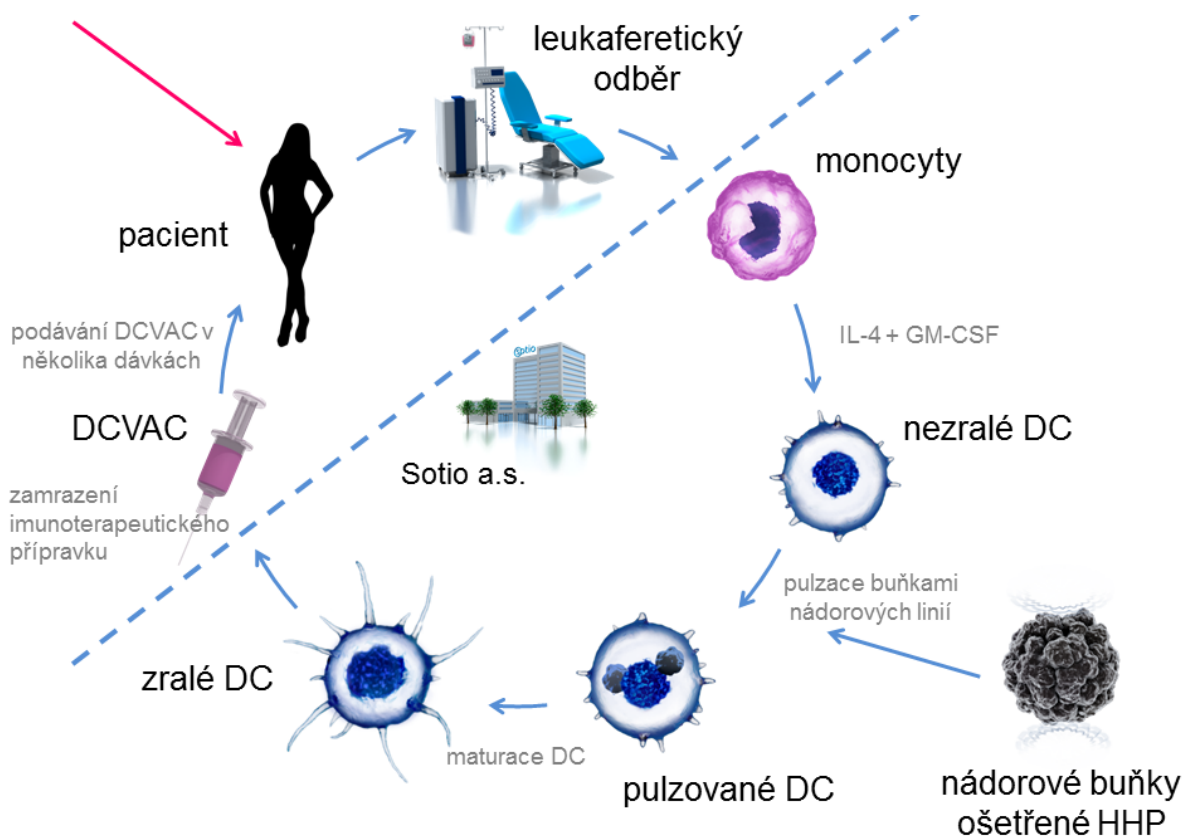
### 3.3.6. KOMBINACE IMUNOTERAPIE A CHEMOTERAPIE

V klinických studiích zaměřených na protinádorovou terapii se stále častěji testuje kombinovaná léčba zahrnující jak imunoterapeutické přípravky, tak cytotoxické chemoterapeutické látky. Nové poznatky naznačují, že některá chemoterapeutická léčiva mohou mít příznivý vliv na protinádorovou imunitu. Fludarabin a cyklofosfamid mohou snižovat zastoupení imunopatogenních regulačních T lymfocytů. 5-fluorouracil má nepříznivý účinek na MDSC populaci buněk potlačujících protinádorovou imunitu. Imunogenicita nádorů může být zvýšena díky účinku antracyklinů (Drerup *et al.*, 2015).

## 3.4. DCVAC

### *3.4.1. AKTIVNÍ BUNĚČNÁ IMUNOTERAPIE*

DCVAC je léčivý přípravek vyráběný a testovaný firmou Sotio, a.s. Jedná se o aktivní autologní imunoterapii na bázi dendritických buněk. DCVAC je vyráběn individuálně pro každého pacienta (Obrázek 4). Prvním krokem při výrobě je leukaferetický odběr, při kterém se pacientovi z periferní krve odebere velké množství mononukleárních buněk (PBMC). Z těchto buněk se po přidání IL-4 a GM-CSF generují nezralé dendritické buňky (iDC) a ty jsou následně pulzovány usmrcenými nádorovými buňkami. Pro výrobu přípravku DCVAC/OvCa pro léčbu pacientek s karcinomem ovarií se používají nádorové buňky buněčných linií SK-OV-3 a OV-90. Tyto buňky jsou před pulzací s iDC ošetřeny vysokým hydrostatickým tlakem (HHP), který vyvolává tzv. imunogenní buněčnou smrt. Takto usmrcené nádorové buňky vystavují na svém povrchu široké spektrum nádorových antigenů. Nezralé dendritické buňky rozpoznávající nádorové antigeny jsou dále aktivovány ligandem TLR-3 receptoru (polyI:C). Takto připravené zralé dendritické buňky jsou poté zamrazeny v několika dávkách v tekutém dusíku a následně podávány pacientovi. Z jednoho leukaferetického odběru se zpravidla připraví 10 dávek DCVAC, které vystačí na léčbu trvající přibližně jeden rok. Léčivý přípravek DCVAC je aplikován subkutánně a předpokládá se, že po aplikaci dochází k migraci dendritických buněk do lymfatických uzlin, prezentaci nádorových antigenů naivním T lymfocytům a následné aktivaci antigen specifických T a B lymfocytů.



**Obrázek 4:** Schéma výroby imunoterapeutického přípravku DCVAC. Nejdříve jsou pacientovi v aferetickém centru odebrány PBMC buňky. Z monocyty přítomných v leukaferetickém odběru se po přidání IL-4 a GM-CSF generují nezralé dendritické buňky. Ty jsou následně pulzovány buňkami nádorových linií ošetřených vysokým hydrostatickým tlakem (HHP) a dozrávají. Zralé DC jsou zamrazené v několika dávkách v tekutém dusíku. Takto vyrobený imunoterapeutický přípravek DCVAC je poté aplikován pacientovi v příslušné nemocnici.

### 3.4.2. KLINICKÉ STUDIE VEDENÉ SPOLEČNOSTÍ SOTIO

Kromě DCVAC/OvCa vyvíjí společnost Sotio, a.s. také léčivý přípravek pro pacienty s karcinomem prostaty (DCVAC/PCa) a plic (DCVAC/LuCa). Testování DCVAC/PCa je již ve fázi III klinického hodnocení. V následující tabulce (Tabulka 2) je uveden přehled všech klinických studií vedených firmou Sotio, a.s. (probíhajících i uzavřených), jejichž cílem je hodnocení léčivého přípravku DCVAC.

**Tabulka 2:** Klinické studie vedené společností Sotio, a.s. (*Sotio.com*, 2017, *ClinicalTrials.gov*, 2017), zabývající se hodnocením léčivého imunoterapeutického přípravku na bázi dendritických buněk DCVAC (SoC chemo = standardní chemoterapie – standard of care chemotherapy, hormon. t. = hormonální terapie, imunomod. = imunomodulační léčba).

Studie	Fáze	Diagnóza	Léčba	Počet zařazených pacientů	Ukončení studie
SP001	II	kastračně-rezistentní karcinom prostaty	DCVAC/PCa SoC chemo	62	03/2017
SP002	II	metastazující karcinom prostaty	DCVAC/PCa hormon. t.	63	01/2017
SP003	II	lokalizovaný karcinom prostaty po primární radikální prostatektomii	DCVAC/PCa	150	06/2017
SP004	II	lokalizovaný karcinom prostaty vysokého rizika po primární radioterapii	DCVAC/PCa radioterapie	62	09/2018
SP010	II	lokalizovaný karcinom prostaty po primární radikální prostatektomii, léčba druhým cyklem DCVAC/PCa	DCVAC/PCa	23	04/2017
VIABLE	III	metastazující kastračně-rezistentní karcinom prostaty s indikací k primární chemoterapii	DCVAC/PCa SoC chemo	1170 (předp.)	06/2018
SOV01	II	nově diagnostikovaný epiteliální karcinom vaječníků, po radikální operaci	DCVAC/OvCa SoC chemo	99	05/2018
SOV02	II	první relaps platina-senzitivního epiteliálního karcinomu vaječníků	DCVAC/OvCa SoC chemo	71	02/2017
SOV03	II	první relaps platina-rezistentního epiteliálního karcinomu vaječníků	DCVAC/OvCa SoC chemo	25	08/2016
SLU01	I/II	nemalobuněčný karcinom plic ve stadiu IV	DCVAC/LuCa SoC chemo imunomod.	105 (předp.)	04/2018

### 3.5. KLINICKÁ STUDIE SOV02 (EUDRA CT NUMBER: 2013-001323-38)

Cílem klinické studie SOV02 je hodnocení účinku a bezpečnosti podání přípravku DCVAC/OvCa v kombinaci se standardní chemoterapií u pacientek s karcinomem ovarií. Jedná se o randomizovanou, multicentrickou, otevřenou klinickou studii s paralelními skupinami. Tato klinická studie fáze II byla zahájena v listopadu 2013 a je vedená a financovaná firmou Sotio, a.s. Klinická studie fáze I (EudraCT: 2010-021462-30) probíhající během let 2011 a 2012 již ukázala bezpečnost experimentální léčby DCVAC/OvCa.

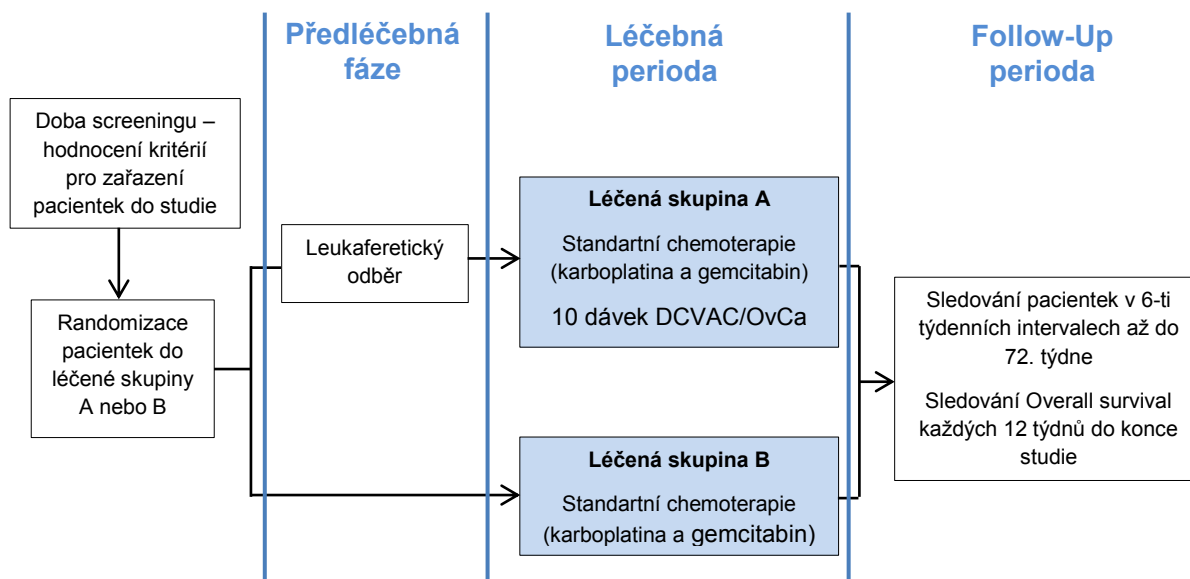
#### 3.5.1. PACIENTKY ZAŘAZENÉ DO KLINICKÉ STUDIE SOV02

V patnácti nemocnicích v České republice, Polsku a Německu bylo do klinické studie SOV02 nabráno celkem 71 pacientek. Do studie byly zařazeny ženy s epiteliálním karcinomem ovarií, s primárním peritoneálním karcinomem nebo s karcinomem vejcovodů a to jak serózního, endometroidního nebo mucinózního typu. Jednalo se o pacientky, které dosáhly kompletní remise po léčbě standardní chemoterapií první linie (na bázi platiny) a u nichž došlo k následnému relapsu po více jak 6 měsících, kdy progresse onemocnění ve stadiu III nebo IV (podle FIGO) byla potvrzená CT nebo MRI vyšetřením.

#### 3.5.2. LÉČBA

Pro zařazení do studie musí pacientky nejprve projít screeningem, kdy se na základě mnoha kritérií ověřuje, zda mohou podstoupit léčbu danou protokolem studie. Dalším krokem je randomizace, kdy jsou pacientky náhodně rozděleny do dvou skupin (Obrázek 5). Následuje fáze léčení. Všechny pacientky podstupují standardní chemoterapeutickou léčbu. V případě této studie, kdy se jedná o pacientky s prvním relapsem platinum-senzitivního epiteliálního karcinomu ovarií, byla jako standardní chemoterapeutická léčba zvolena kombinace karboplatiny a gemcitabinu. Chemoterapie probíhala v 6-10 cyklech dlouhých 21 dní, přičemž počet cyklů závisel na individuálním stavu pacientky. Chemoterapie byla podána dvakrát v rámci každého cyklu, a to první a osmý den.





**Obrázek 5:** Schéma průběhu klinické studie SOV02 u pacientek zařazených v léčené skupině A a B.

V léčené skupině A byl navíc pacientkám podáván DCVAC/OvCa jako přídatek ke standardní chemoterapeutické léčbě (Tabulka 3). Tato léčba zahrnovala celkem 10 dávek imunoterapeutické vakcíny. Prvních pět dávek bylo podáno ve třítydenních intervalech, dalších pět dávek v šestitýdenních intervalech. První dávku pacientky dostaly jeden týden po ukončení druhého cyklu chemoterapie. Po dokončení léčby jsou pacientky nadále sledovány do ukončení klinické studie.

**Tabulka 3:** Časový přehled dávkování léčby u pacientek s karcinomem ovarií dle protokolu klinické studie SOV02.

SOV02	SCR																			Wk24				Wk48	FU72
týden	-4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	24	30	36	42	48	72
Chemoterapie		X	X		X	X		X	X		X	X		X	X		X	X							
Imunoterapie							X			X			X			X			X	X	X	X	X	X	

### 3.5.3. HODNOTÍCÍ PARAMETRY

Primární parametr sledující vliv přídatku DCVAC/OvCa ke standardní chemoterapeutické léčbě je v klinické studii SOV02 tzv. progression free survival (PFS). PFS je doba od randomizace, po kterou nedojde k progresi onemocnění, případně úmrtí pacientky. Progrese onemocnění je hodnocena na základě kritérií RECIST 1.1 (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) (Eisenhauer *et al.*, 2008).

Mezi sekundární hodnotící parametry v klinické studii SOV02 patří následující:

- Overall survival (OS) - celková doba přežití

- Objective response rate (ORR) - celková a částečná odpověď na léčbu měřená dle kritérií RECIST 1.1
- Biological progression free survival - sledování progresu onemocnění na základě zvýšení hladiny tumorového markeru CA 125
- Imunitní odpověď - sledování vybraných parametrů protinádorové imunitní odpovědi
- Bezpečnost
- Změny v kvalitě života - vyhodnocené na základě standardizovaného FACT-O (Functional Assessment of Cancer Therapy–Ovarian) dotazníku

Sledování vybraných parametrů imunitní odpovědi, které je sekundárním hodnotícím parametrem v klinické studii SOV02, je předmětem této diplomové práce.

## 4. MATERIÁLY A VYBAVENÍ

### 4.1. PŘÍSTROJE

- Průtokový cytometr BD Canto (Becton Dickinson)
- Chladnička Lkv 3910 (Liebherr)
- Mrazicí box -20°C GG 5210 (Liebherr)
- Hluboce mrazicí box -86°C MDF-U55V-PE (Panasonic)
- CO2 inkubátor SteriCycle 371 (Thermo Scientific)
- Laminární box HERASAFE KS 12, Biohazard (Thermo Scientific)
- Centrifuga Megafuge 16R (Thermo Scientific)
- Optický mikroskop Nikon E TS 100
- Sunrise – ELISA spektrofotometer TECAN
- Bürkerova komůrka

### 4.2. ROZTOKY A CHEMIKÁLIE

- PBS (Lonza)
- PBS-EDTA (Lonza)
- RPMI 1640 (Gibco)
- MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x) (Gibco)
- 2-Mercaptoethanol (50 mM) (Gibco)
- Sodium Pyruvate 100mM (100x) (Gibco)
- GlutaMAX - I CTS (Gibco)
- Penicillin-Streptomycin Solution (Gibco)
- AB Human Serum – Heat Inactivated (Invitrogen)
- Dimethyl sulfoxide puriss. p.a., ACS reagent,  $\geq 99.9\%$  (GC) (Sigma-Aldrich Co.)
- Human IL-2, 10  $\mu\text{g}$  (PeproTech)
- Brefeldin A Solution (1,000X) (BioLegend)
- Rat serum (Sigma-Aldrich Co.)
- Fixation/Permeabilization diluent (eBioscience)
- Fixation/Permeabilization concentrate (eBioscience)
- Permeabilization buffer (eBioscience)

- Aqua pro injectione (Miniplasco)
- Bovine Serum Albumin (Sigma Aldrich Co.)
- Acetic acid (PENTA)
- Trypan blue stain 0,4% (Gibco)
- Buffer Kit for Antibody Pairs (ThermoFisher Scientific)
- Ionomycin (Sigma Aldrich)
- PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) (Sigma Aldrich)

Kompletní médium s penicilinem: RPMI 1640, 10% AB Human Serum, 1% GlutaMAX, 1% Penicillin-Streptomycin, 1% MEM Non-Essential Amino Acids, 1% Sodium Pyruvate, 0,1% 2-Mercaptoethanol

#### 4.3. PEPMIXY

- Pepmix CEF Pool (extended) (JPT Peptide Technologies)
- Pepmix Human CEA (JPT Peptide Technologies)
- Pepmix Human Ny-ESO-1 (JPT Peptide Technologies)
- Pepmix Human Her2/Neu (Erb-ECD) (JPT Peptide Technologies)
- Pepmix Human Muc-1 (JPT Peptide Technologies)
- Pepmix Human MAGE-A1 (JPT Peptide Technologies)
- Pepmix Human MAGE-A3 (JPT Peptide Technologies)
- Pepmix Human MAGE-A4 (JPT Peptide Technologies)

#### 4.4. REKOMBINANTNÍ PROTEINY

- Tetanus toxoid (recombinant protein) (Abcam)
- ERBB2 (Her-2) (Human) recombinant protein (P01) (Abnova)
- CTAG1B (NY-ESO-1) (Human) recombinant protein (Abnova)
- Muc-1(Human) recombinant protein (Q01) (Abnova)
- Muc-16 (CA 125) (Human) recombinant protein (Q01) (Abnova)
- MAGE-A1 (Human) recombinant protein (P01) (Abnova)
- MAGE-A3 (Human) recombinant protein (P01) (Abnova)

## 4.5. PROTILÁTKY

- Anti-Human CD3 Alexa Fluor 700 (BioLegend)
- Anti-Human Perforin APC (BioLegend)
- Anti-Human IFN gamma PE-Cyanine7 (BioLegend)
- Anti-Human CD4 PerCP-Cyanine5.5 (BioLegend)
- Anti-Human CD8a eFluor 450 (BioLegend)
- Anti-Human Granzyme B PE (BioLegend)
- Anti-Human CD154 (CD40 Ligand) FITC (BioLegend)
- LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit, for 405 nm excitation (Invitrogen)
- Goat Anti-Human IgG antibody (Abcam)
- Anti-Human CD14 eFluor 450 (eBioscience)
- Anti-Human HLA-DR PE-Cy7 (eBioscience)
- Anti-Human CD11b FITC (eBioscience)
- Anti-Human CD33 Alexa700 (eBioscience)
- Anti-Human CD15 APC (eBioscience)
- Anti-Human IL-4R $\alpha$  PE (R&D Systems)
- Anti-Human CD4 PE-Cy7 (eBioscience)
- Anti-Human CD25 PerCP-Cy5.5 (eBioscience)
- Anti-Human CD127 APC (eBioscience)
- Anti-Human FoxP3-AF488 (eBioscience)
- Anti-Human CD3 AF700 (eBioscience)
- Anti-Human CD4 Brilliant violet 510 (Biolegend)
- Anti-Human PD-1 FITC (eBioscience)
- Anti-Human TIM-3 PE (eBioscience)
- Anti-Human LAG-3 PerCP-eFluor 710 (eBioscience)
- Anti-Human CTLA-4 eFluor 660 (eBioscience)

## 4.6. SOFTWARE

- BD FACS Diva Software v8.0.1
- FlowJo 9.7.7
- GraphPad Prism 6

- Magellan
- Microsoft Office 2010

#### 4.7. MĚŘENÉ VZORKY

Měřené vzorky pocházely od pacientek z klinické studie SOV02 (Eudra CT number: 2013-001323-38). Do studie byly zařazeny pacientky starší 18 let s radiologicky potvrzeným epiteliálním karcinomem ovarií, s primárním peritoneálním karcinomem nebo s karcinomem vejcovodů ve stadiu III nebo IV dle FIGO, u nichž nastal relaps po více jak 6 měsících od dosažení remise. Do klinické studie bylo zahrnuto 15 center v České Republice, Polsku a Německu.

Pacientské vzorky pro výzkumné účely byly odebírané v předem určených časových rozmezích definovaných v protokolu studie SOV02. Jedná se o čtyři vzorky od každé pacientky (vzorek z období screeningu před započítáním terapie, vzorek odebraný před šestým cyklem imunoterapie po ukončení chemoterapeutické léčby, vzorek odebraný před desátým cyklem imunoterapie a vzorek odebraný po ukončení léčby v 72. týdnu od jejího zahájení, viz Tabulka 4). Z části odebraného vzorku plné krve byly izolovány mononukleární buňky (PBMC), zamrazeny a dále uchovávány v Dewarových nádobách s tekutým dusíkem. Druhá část odebrané krve se využila k izolaci séra, které bylo dále zamrazeno a uchovávalo v -80°C. Všechny vzorky byly zpracovávány a zamrazovány v centrální laboratoři – firma Synlab (původně Interlab, Mnichov, Německo) a následně převezeny do firmy Sotio a.s. v Praze (Jankovcova 1518/2, Praha 7).

**Tabulka 4:** Časový plán odebírání vzorků pro výzkumné účely v klinické studii SOV02 dle protokolu studie.

SOV02	SCR																				Wk24				Wk48	FU72
týden	-4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	24	30	36	42	48	72	
Chemoterapie		X	X		X	X		X	X		X	X		X	X		X	X								
Imunoterapie							X			X			X			X			X	X	X	X	X	X		
Měřené vzorky	X																			X				X	X	

## 5. METODY

### 5.1. DETEKCE ANTIGENNĚ SPECIFICKÝCH T LYMFOCYTŮ

PBMC vzorky byly rozmrazeny ve vlažné vodní lázni, obsah vialek byl ihned přenesen do 10 ml kompletního média s penicilinem. Buňky byly centrifugovány (1300 rpm, 2 minuty), supernatant byl slit a buňky byly resuspendovány v 1 ml čerstvého média a následně spočítány. 10  $\mu$ l buněčné suspenze bylo smícháno s 10  $\mu$ l Trypanové modři, byl spočítán počet buněk v 16 malých čtvercích v Bürkerově komůrce. Počítány byly všechny živé buňky uvnitř malých čtverců a také ty, které se dotýkaly horní a levé strany čtverce. Počet buněk (x) byl dosazen do Rovnice 1 a byla spočítána koncentrace buněk v 1 ml média (y).

$$y = x / 16 / 0,004 \times 2 \times 1000$$

**Rovnice 1:** Výpočet koncentrace buněk v 1 ml média (y) na základě počtu buněk v 16 malých čtvercích v Bürkerově komůrce (x).

Dále byly buňky napipetovány do 96 jamkové U destičky v minimálním počtu 50 000 buněk na jamku. Každý vzorek byl rozdělen do 9 jamek, objem média byl doplněn na 200  $\mu$ l v každé jamce. Pokud ve vzorku nebyl dostatečný počet buněk, vzorek nebyl k analýze použit. Buňky byly inkubovány při 37°C a 5% CO<sub>2</sub> po dobu 10 dnů (Obrázek 6).

Druhý den byly buňky stimulovány Pepmixy vybraných nádorových antigenů. Jedná se o směsi překrývajících se peptidů pokrývajících celou sekvenci vybraného nádorového antigenu. Buňky byly centrifugovány (1300 rpm, 2 minuty), z každé jamky bylo odebráno 50  $\mu$ l média a následně byly buňky resuspendovány s 50  $\mu$ l směsí čerstvého média s daným pepmixem. První jamka byla označena jako negativní kontrola (NC) a bylo do ní přidáno pouze čerstvé kompletní médium. Do druhé jamky byl přidán pepmix CEF (směs peptidů zahrnující antigeny viru chřipky, CMV a EBV) ve výsledné koncentraci 1,5  $\mu$ g/ml, tato jamka sloužila jako pozitivní kontrola. Další jamky byly označeny podle pepmixu, který byl do nich přidán (CEA, NY-ESO-1, Her-2, Muc-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4), koncentrace pepmixů v těchto jamkách byla 2,5  $\mu$ g/ml.

V průběhu inkubace (4., 6. a 8. den) byl k buňkám přidáván IL-2, aby finální koncentrace v jamkách byla 2  $\mu$ g/ml. 9. den protokolu byly buňky restimulovány pepmixy stejným způsobem jako při počáteční stimulaci druhý den. Po dvou hodinách od stimulace byl ještě přidán Brefeldin A, inhibitor buněčného transportu proteinů. Následující, desátý den

byly buňky stočeny (1300 rpm, 2 minuty) a přepipetovány do 96 jamkové V destičky. Po promytí 200  $\mu$ l PBS byly buňky resuspendovány v 50  $\mu$ l směsi protilátek určené k povrchovému barvení T lymfocytů (Tabulka 5) a inkubovány 20 minut v lednici.

**Tabulka 5:** Směs protilátek na povrchové barvení vzorků PBMC určená pro detekci antigen specifických T lymfocytů metodou průtokové cytometrie.

Protilátka	Objem/ 1 jamka ( $\mu$ l)
LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit	0,25
Anti-Human CD3 Alexa Fluor 700	1,5
Anti-Human CD8a eFluor 450	1,5
PBS	46,75

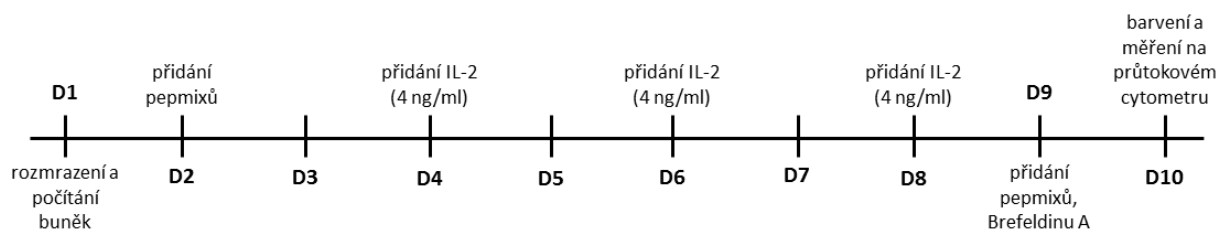
Dále bylo k buňkám přidáno 100  $\mu$ l PBS, buňky byly centrifugovány (1300 rpm, 2 minuty) a po slití supernatantu resuspendovány ve 100  $\mu$ l fixačního/permeabilizačního roztoku (Fixation/permeabilization concentrate: Fixation/permeabilization diluent = 1:3). Buňky byly fixovány a permeabilizovány 30 minut v lednici, poté bylo do každé jamky přidáno 100  $\mu$ l permeabilizačního pufru, destičky byly centrifugovány (2200 rpm, 2 minuty) a promyty dalšími 100  $\mu$ l permeabilizačního pufru. Při intracelulárním barvení byly buňky resuspendovány v 50  $\mu$ l odpovídající směsi protilátek (Tabulka 6) a inkubovány 20 minut v lednici. Na závěr byly buňky dvakrát promyty 200  $\mu$ l PBS. Vzorky resuspendované ve 200  $\mu$ l PBS byly změřeny na průtokovém cytometru BD Canto.

**Tabulka 6:** Směs protilátek na intracelulární barvení antigen specifických T lymfocytů.

Protilátka	Objem/ 1 jamka ( $\mu$ l)
Kryší sérum	2
Anti-Human IFN gamma PE-Cyanine7	1
Anti-Human CD154 (CD40 Ligand) FITC	1,5
Anti-Human Perforin APC	1,5
Anti-Human Granzyme B PE	1,5
Anti Human CD4 PerCP-Cyanine5.5	1,5
Permeabilization buffer	41

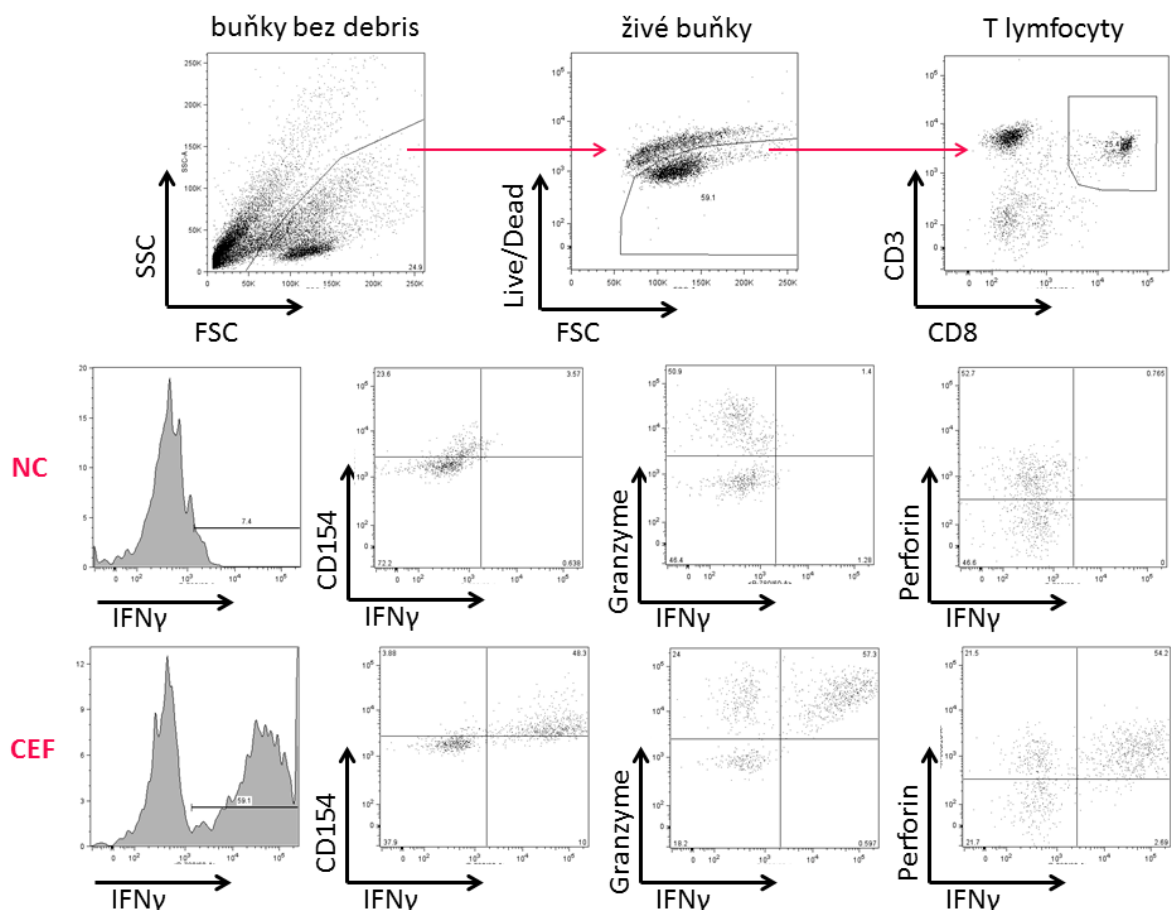
Na Obrázek 6 je uveden přehled celého 10-ti denního protokolu, který zachycuje schéma experimentu detekce T lymfocytů specifických proti vybraným nádorovým antigenům (CEA, NY-ESO-1, Her-2, Muc-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4).





**Obrázek 6:** 10-ti denní protokol stanovení antigen specifických T lymfocytů.

Data z průtokového cytometru byla vyhodnocena v programu FlowJo. Pomocí parametrů SSC a FSC byla nejdříve vybrána předpokládaná populace T lymfocytů bez debrís (Obrázek 7). V dalších krocích byly postupně označeny populace živých buněk (Live/dead negativní), pomocných T lymfocytů ( $CD3^+CD4^+$ ) a cytotoxických T lymfocytů ( $CD3^+CD8^+$ ). U  $CD4^+$  i  $CD8^+$  T lymfocytů bylo vyhodnoceno procentuální zastoupení  $IFN\gamma$  pozitivních buněk a u těchto buněk byly dále ještě blíže specifikovány  $IFN\gamma^+CD154^+$ ,  $IFN\gamma^+$ granzym $^+$  a  $IFN\gamma^+$ perforin $^+$  buněčné populace. Takto získaná data byla následně statisticky vyhodnocena v programu GraphPad.



**Obrázek 7:** Analýza výsledků z průtokového cytometru při detekci antigeně specifických T lymfocytů. Ukázána je analyzační strategie pro  $CD8^+$  T lymfocyty,  $CD4^+$  T lymfocyty byly analyzovány stejným způsobem. (NC = negativní kontrola, CEF = směs běžných virových antigenů sloužící jako pozitivní kontrola).

## 5.2. DETEKCE ANTIGENNĚ SPECIFICKÝCH PROTILÁTEK

K detekci antigenně specifických protilátek v séru pacientek z klinické studie SOV02 byla zvolena metoda ELISA. K provedení této metody byly použity komerčně dostupné rekombinantní proteiny od firmy Abnova, roztoky z kitu Buffer kit for antibody pairs (ThermoFisher Scientific) a 96-ti jamkové destičky MaxiSorp (Nunc). U všech vzorků byly detekovány protilátky proti následujícím šesti nádorově specifickým antigenům: NY-ESO-1, Her-2, Muc-1, Muc-16, MAGE-A1 a MAGE-A3. Tetanus toxoid (rekombinantní protein) byl použit jako pozitivní kontrola.

Nejprve byly proteiny naředěny do koncentrace 0,8 µg/ml v uhličitanovém pufru a následně napipetovány do příslušných jamek na destičce v objemu 50 µl na jamku. Destičky s napipetovanými proteiny byly inkubovány přes noc při 4°C. Následující den byly destičky třikrát promyty promývacím pufrům (Wash buffer) a poté byly 1 hodinu inkubovány s blokovacím pufrům (Assay buffer) při laboratorní teplotě (100 µl blokovacího pufru na jamku). Destičky byly opět třikrát promyty a poté do nich byly v laminárním boxu napipetovány patientské vzorky (sérum). Sérum bylo naředěno 1:100 v blokovacím pufru a každý vzorek byl měřen v duplikátu na každém proteinu. Jako pozitivní kontrola byly použity jamky s navázaným toxinem tetanu inkubované jak se sérem odpovídající pacientky ze screeningové návštěvy, tak se sérem zdravého dárce, u něhož byli přítomné protilátky proti tetanu. Negativními kontrolami u každého proteinu byly jamky inkubované pouze s blokovacím pufrům. Po navázání specifických protilátek byly destičky opět třikrát promyty. Následovala 30-ti minutová inkubace se sekundární protilátkou proti IgG konjugovanou s křenovou peroxidázou. Tato protilátka byla naředěná 1:50 000 v blokovacím pufru a bylo napipetováno 50 µl do každé jamky. Po inkubaci byly destičky třikrát promyty a poté bylo do každé jamky napipetováno 50 µl substrátu pro křenovou peroxidázu – TMB (3, 3', 5, 5' – tetrametylbenzidín). Po 20 minutách bylo do každé jamky přidáno 50 µl roztoku pro zastavení reakce (Stop solution) a destičky byly ihned změřeny na ELISA spektrofotometru při vlnové délce 450 nm.

## 5.3. DETEKCE IMUNOSUPRESIVNÍCH POPULACÍ MDSC BUNĚK

Buňky byly rozmrazeny stejným postupem jako buňky pro detekci antigenně specifických T lymfocytů. Každý vzorek byl rovnoměrně rozdělen do sedmi jamek na 96-jamkové U destičce, v minimálním počtu 50 000 buněk/ 150 µl média/ jamka. Destičky byly inkubovány přes noc při 37°C. Druhý den byly dvě jamky přepipetovány do 96-jamkové

V destičky určené na barvení MDSC buněk, zbytek byl ponechán pro detekci Treg buněk a exprese inhibičních molekul na povrchu T lymfocytů. Vzorky byly dále centrifugovány (1300 rpm, 2 minuty) a promyty 200  $\mu$ l PBS. Jedna jamka byla ponechána jako nebarvená kontrola, druhá byla nabarvená následující směsí protilátek (Tabulka 7). Vzorky byly inkubovány 20 minut v lednici, promyty 200  $\mu$ l PBS a nakonec resuspendovány ve 150  $\mu$ l PBS a změřeny na průtokovém cytometru.

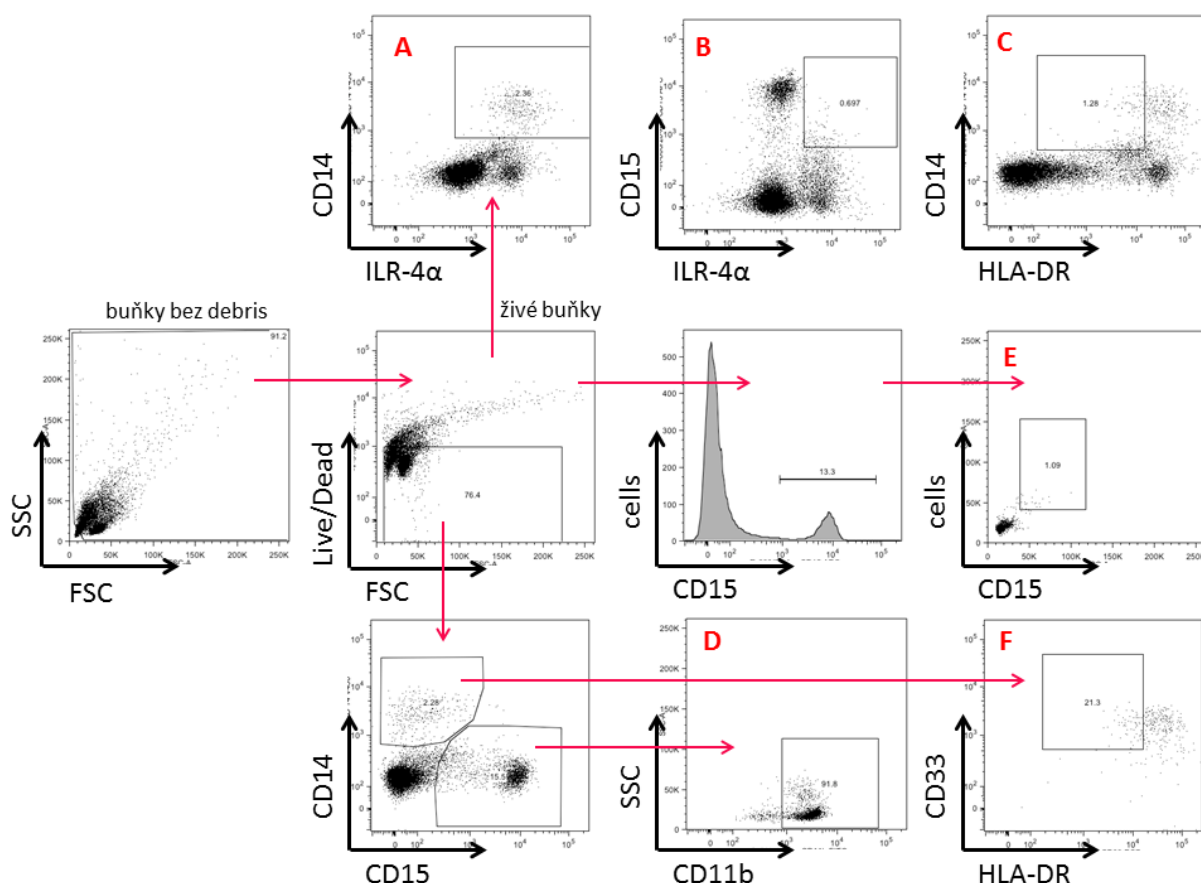
**Tabulka 7:** Směs protilátek na barvení buněk pro detekci různých populací MDSC buněk.

Protilátka	Objem/ 1 jamka ( $\mu$ l)
LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit	0,25
Anti-Human CD14 eFluor 450	1,5
Anti-Human HLA-DR-PE-Cy7	1,5
Anti-Human CD11b-FITC	1,5
Anti-Human CD33-Alexa700	1,5
Anti-Human CD15-APC	1,5
Anti-Human IL-4R $\alpha$ -PE	2
PBS	40,25

Při analýze dat z průtokového cytometru byly na základě parametrů SSC a FSC nejprve vybrány buňky bez debris a z nich živé buňky (Live/dead negativní), následně bylo postupováno podle strategie navržené pro rozlišení šesti různých populací MDSC, polymorfonukleárních i monocytárních (Damuzzo *et al.*, 2015). Přehled fenotypových znaků jednotlivých populací MDSC buněk znázorňuje Tabulka 8, analyzační strategie v programu FlowJo zachycuje Obrázek 8. Poté, co bylo odstraněno debris, byly na základě použitého Live/Dead kitu vybrány živé buňky a z těch pak analyzovány příslušné populace MDSC buněk. M-MDSC populace mají společný marker CD14, naopak PMN-MDSC populace značí molekula CD15.

**Tabulka 8:** Přehled fenotypových znaků jednotlivých populací MDSC buněk vybraných pro analýzu dat z průtokového cytometru.

Monocytární - MDSC	Polymorfonukleární - MDSC
A) CD14 <sup>+</sup> / IL-4R $\alpha$ <sup>+</sup>	B) CD15 <sup>+</sup> / IL-4R $\alpha$ <sup>+</sup>
C) CD14 <sup>+</sup> / HLA-DR <sup>-/low</sup>	D) CD14 <sup>-</sup> / CD15 <sup>+</sup> / CD11b <sup>+</sup>
F) CD14 <sup>+</sup> /CD15 <sup>-</sup> /CD33 <sup>high</sup> /HLA-DR <sup>-/low</sup>	E) CD15 <sup>high</sup> /FSC <sup>low</sup> /SSC <sup>high</sup>



**Obrázek 8:** Strategie analýzy dat v programu FlowJo při detekci populací MDSC buněk.

#### 5.4. DETEKCE REGULAČNÍCH T LYMFOCYTŮ (TREG)

Buňky byly rozmrazeny najednou pro detekci MDSC, Treg a “immune checkpoint” molekul na povrchu T lymfocytů podle postupu v kapitole 5.3. Den po rozmrazení byly dvě jamky buněk v médiu o objemu 150  $\mu$ l přepipetvány do 96- jamkové V destičky, centrifugovány (1300 rpm, 2 minuty) a promyty 200  $\mu$ l PBS. Následně byly buňky resuspendovány v 50  $\mu$ l směsi protilátek na intracelulární barvení (Tabulka 9) a inkubovány v lednici po dobu 20 minut.

**Tabulka 9:** Směs protilátek na extracelulární barvení buněk pro detekci Treg.

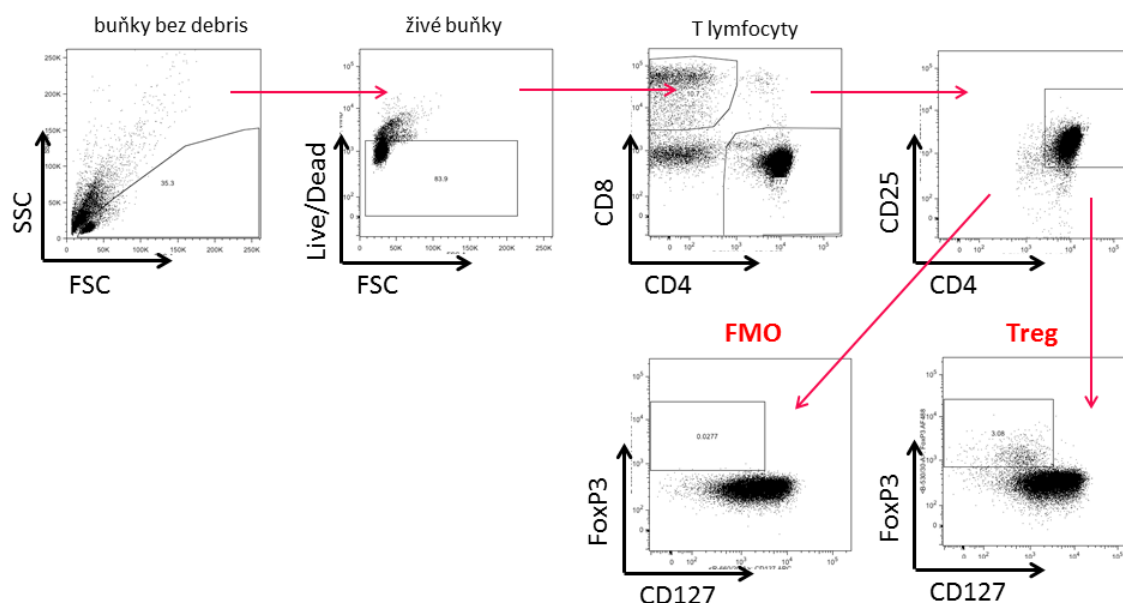
Protilátka	Objem/ 1 jamka ( $\mu$ l)
LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit	0,25
Anti-Human CD4 PE-Cyanine7	1,5
Anti-Human CD8 a eFluor 450	1,5
Anti-Human CD25 PerCP-Cyanine5.5	1,5
Anti-Human CD127 APC	1,5
PBS	43,75

Po inkubaci bylo přidáno 150  $\mu$ l PBS-EDTA a buňky byly opět centrifugovány (1300 rpm, 2 minuty). Dále byly resuspendovány ve 100  $\mu$ l fixačního/permeabilizačního roztoku od eBioscience (Fixation/permabilization concentrate: Fixation/permabilization diluent = 1:3) a inkubovány 30 minut v lednici. Dále bylo přidáno 100  $\mu$ l permeabilizačního pufru, buňky byly centrifugovány (2200 rpm, 2 minuty) a ještě jednou promyty 100  $\mu$ l permeabilizačního pufru. Následovala 30-ti minutová inkubace buněk v lednici v 50  $\mu$ l směsi protilátek na intracelulární barvení (Tabulka 10). Buňky v jedné jamce byly nabarveny touto směsí, druhá jamka sloužila jako FMO kontrola (fluorescence minus one) pro správnou analýzu dat.

**Tabulka 10:** Směs protilátek na intracelulární barvení buněk pro detekci Treg.

Protilátka	Objem/ 1 jamka ( $\mu$ l)
Kryší sérum	2
Anti-Human FoxP3 Alexa Fluor 488	1
Permeabilizační pufr	47

K buňkám bylo přidáno 150  $\mu$ l permeabilizačního pufru a po další centrifugaci (2200 rpm, 2 minuty) byly buňky ještě jednou promyty 200  $\mu$ l PBS. Nakonec byly buňky resuspendovány ve 150  $\mu$ l PBS a změřeny na průtokovém cytometru. Prvním krokem při analýze dat v programu FlowJo bylo vybrání očekávané populace T lymfocytů na základě parametrů SSC a FSC. Dále byly vybrány živé buňky (Live/dead<sup>-</sup>), CD4<sup>+</sup>, následně CD25<sup>+</sup> buňky a v posledním kroku byla určena populace CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup> buněk. Celkový přehled strategie analýzy použité pro detekci CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup> T regulačních T lymfocytů je ukázán na následujícím obrázku (Obrázek 9).



**Obrázek 9:** Strategie analýzy použité pro detekci CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg buněk.

## 5.5. DETEKCE EXPRESE INHIBIČNÍCH “IMMUNE CHECKPOINT” PROTEINŮ NA POVRCHU T LYMFOCYTŮ

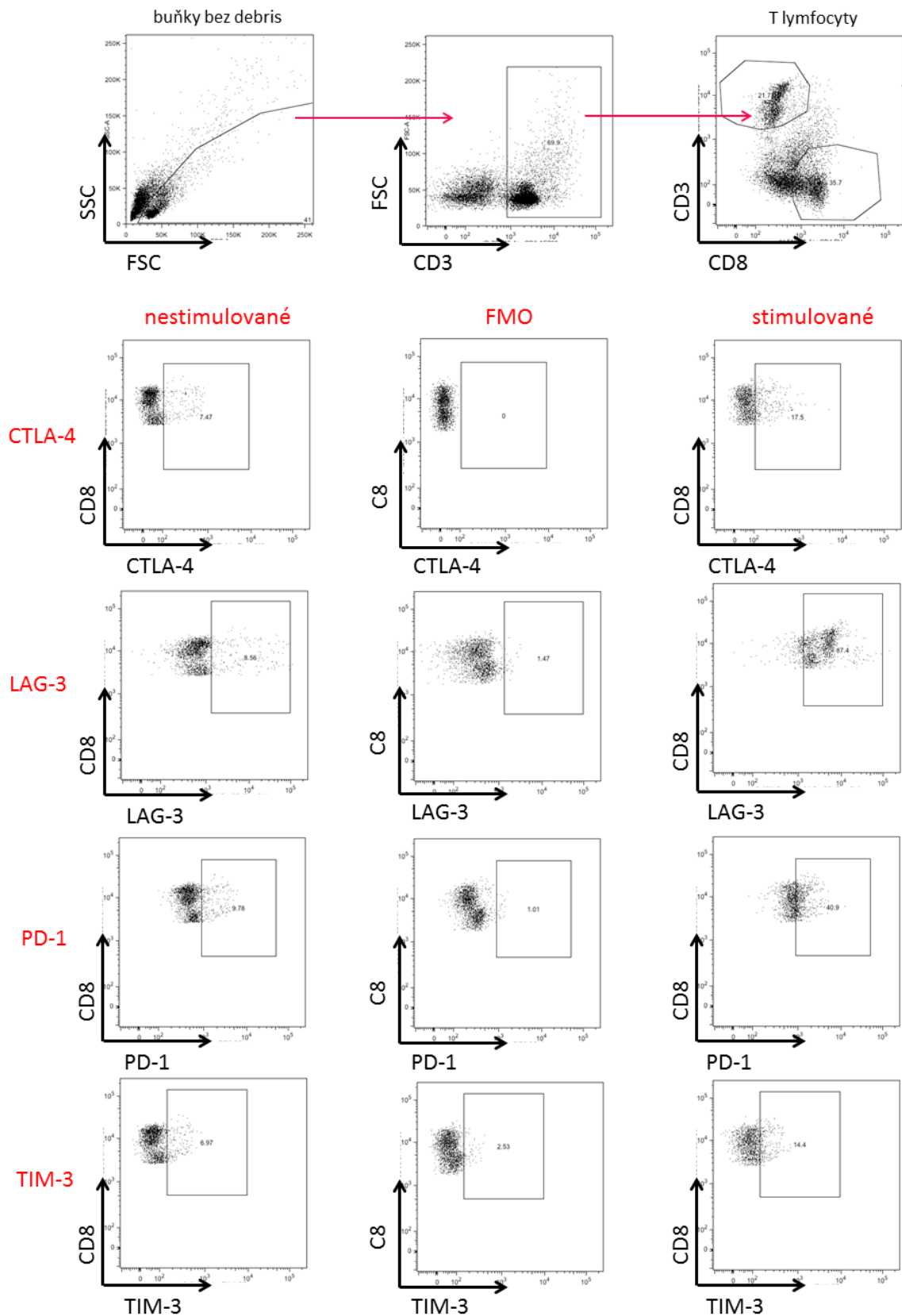
Rozmražené PBMC byly použity jednak na předchozí dvě stanovení (kapitoly 5.3 a 5.4) a zároveň byly tři jamky s buňkami v médiu o objemu 150  $\mu$ l určeny na stanovení exprese tzv. immune checkpoint molekul na povrchu T lymfocytů. Stanovení bylo prováděno den po rozmrazení buněk. Buňky v první jamce nebyly stimulované (NS), buňky ve zbylých dvou jamkách byly stimulovány PMA a ionomycinem v koncentracích 50 ng/ml a 1  $\mu$ g/ml po dobu 4 hodin v inkubátoru (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Po stimulaci bylo provedeno povrchové barvení, fixace a permeabilizace a intracelulární barvení podle stejného protokolu jako barvení Treg buněk (kapitola 5.4) s tím, že byly použity odlišné směsi protilátek (Tabulka 11). Každá ze tří jamek byla barvena jinými protilátkami na extra- a intracelulární barvení, první jamka obsahovala nestimulované buňky (NS), druhá jamka obsahovala buňky stimulované a sloužila jako FMO kontrola (FMO), ve třetí jamce byly opět stimulované buňky, barvené všemi protilátkami (test).

**Tabulka 11:** Směsi protilátky na barvení buněk za účelem detekce “immune checkpoint” molekul na povrchu T lymfocytů. Každá jamka (NS, FMO a test) byla barvena jinými směsmi protilátek, nestimulované buňky (NS) byly při intracelulárním barvení resuspendovány pouze v 50  $\mu$ l permeabilizačního pufru.

Jamka	Protilátka	Objem/ 1 jamka ( $\mu$ l)
Extracelulární barvení  NS a test	Anti-Human CD3 Alexa Fluor 700	1,5
	Anti-Human CD8a eFluor 450	1,5
	Anti-Human CD4 Brilliant violet 510	1,5
	Anti-Human TIM-3 PE	1,5
	Anti-Human LAG-3 PerCP-eFluor 710	1,5
	Anti-Human PD-1 FITC	1,5
	Anti-Human CTLA-4 eFluor 660	1,5
	PBS	39,5
Extracelulární barvení  FMO	Anti-Human CD3 Alexa Fluor 700	1,5
	Anti- Human CD8a eFluor 450	1,5
	Anti-Human CD4 Brilliant Violet 510	1,5
	PBS	45,5
Intracelulární barvení  test	Anti-Human CD3 Alexa Fluor 700	1,5
	Anti-Human CD8a eFluor 450	1,5
	Anti-Human CD4 Brilliant violet 510	1,5
	Anti-Human TIM-3 PE	1,5
	Anti-Human LAG-3 PerCP-eFluor 710	1,5
	Anti-Human PD-1 FITC	1,5

	Anti-Human CTLA-4 eFluor 660	1,5
	Krysí sérum	2
	Permeabilizační pufr	37,5
Intracelulární barvení  <b>FMO</b>	Anti-Human CD3 Alexa Fluor 700	1,5
	Anti- Human CD8a eFluor 450	1,5
	Anti-Human CD4 Brilliant Violet 510	1,5
	Krysí sérum	2
	Permeabilizační pufr	43,5

Vzorky byly změřeny na průtokovém cytometru a data analyzována v programu FlowJo (Obrázek 10). Dle SSC a FSC byla vybrána populace lymfocytů bez debris a z ní pak CD3 pozitivní buňky (T lymfocyty). Dále bylo stanoveno osm různých populací T lymfocytů: CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> lymfocyty exprimující CTLA-4, LAG-3, PD-1, TIM-3 a CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> lymfocyty exprimující CTLA-4, LAG-3, PD-1 a TIM-3. Nestimulované buňky byly analyzovány na základě porovnání s FMO kontrolou a stimulovanými barvenými buňkami téhož vzorku.



**Obrázek 10:** Strategie vyhodnocování T lymfocytů exprimujících inhibiční molekuly CTLA-4, LAG-3, PD-1 a TIM-3 v programu FlowJo.



## 5.6. STATISTICKÁ ANALÝZA DAT

Statistická analýza dat byla provedena v programu GraphPad Prism, verze 6. U jednotlivých měření bylo provedeno porovnání hodnot mezi počáteční návštěvou (SCR) a každou další návštěvou (Wk24, Wk48, FU72) a to v rámci obou léčených skupin zvlášť. K tomuto hodnocení byl použit párový neparametrický Wilcoxonův test, za statisticky významné byly považovány hodnoty  $p < 0,05$ . Dále bylo provedeno porovnání hodnot mezi léčenými skupinami v rámci každé návštěvy. V tomto případě byl použit nepárový neparametrický T-test Mann-Whitney, za statisticky významné byly považovány hodnoty  $p < 0,05$ . V rámci grafů jsou data prezentována jako průměr se standardní odchylkou.

## 5.7. VALIDACE POUŽITÝCH METOD

Všechny použité metody byly v laboratořích firmy Sotio, a.s. validovány a všechny laboratorní práce se řídily pokyny Správné výrobní praxe (Good manufacturing practice). Tyto pokyny jsou zveřejněny Evropskou komisí v Pravidlech pro léčivé přípravky v Evropské Unii, Svazek IV – Pokyny pro správnou výrobní praxi ([http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index_en.htm)). Úplné aktuální znění a český překlad těchto pokynů je možné najít také na webových stránkách Státního ústavu pro kontrolu léčiv (<http://www.sukl.cz/leciva/vyroba-leciv>). U jednotlivých metod bylo validováno několik různých parametrů, přehled vybraných parametrů shrnuje Tabulka 12.

**Tabulka 12:** Přehled vybraných parametrů validovaných u použitých metod.

Parametry	Cíl validace
Specifita	Schopnost jednoznačně detekovat stanovovaný parametr (buňky, protlátky) – specifita reagensů, analytická, klinická
Preciznost - opakovatelnost	Určit přesnost (odchylku) výsledků při opakování metodického postupu za stejných podmínek (měření v duplikátech, triplikátech...)
Mezilehlá preciznost	Určit přesnost (odchylku) výsledků při opakování metodického postupu při různých proměnných v laboratoři (měření v různých dnech, měření prováděné různými osobami)
Přesnost	Shoda mezi naměřenou hodnotou a akceptovanou referenční hodnotou
Mez detekce	Určit nejnížší množství sledovaného parametru, které může být detekováno
Mez stanovitelnosti	Určit nejnížší a nejvyšší koncentraci daného parametru ve vzorku, která může být kvantitativně stanovena
Linearita	Definovat schopnost metody poskytnout výsledky měření přímo úměrné ke koncentraci analytu
Referenční rozsah	Charakterizovat koncentrační rozsah, ve kterém byly validační parametry vyhodnoceny a ověřeny

## 6. VÝSLEDKY

### 6.1. DETEKCE ANTIGENNĚ SPECIFICKÝCH T LYMFOCYTŮ

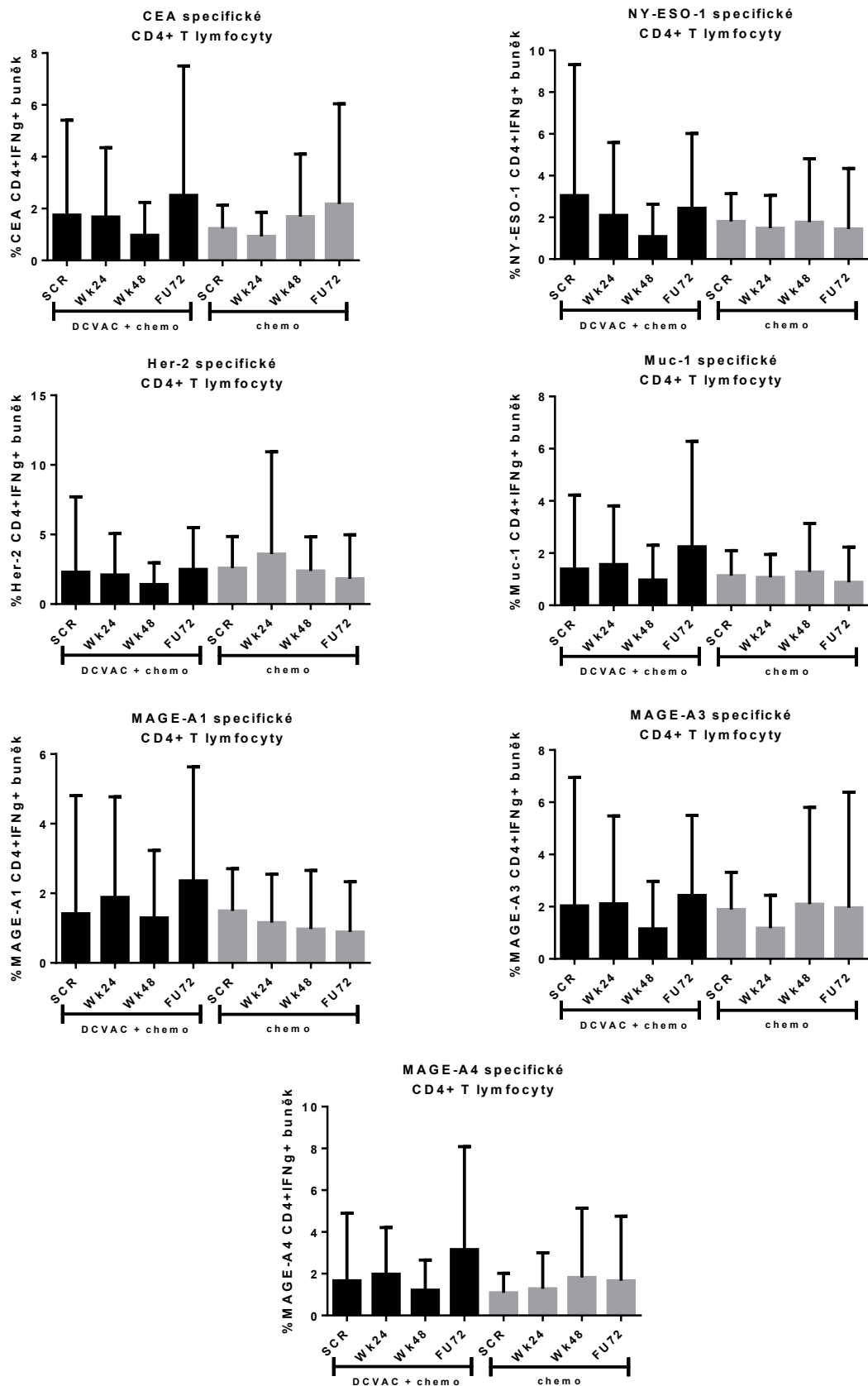
Při sledování účinku imunoterapeutického přípravku DCVAC v léčbě pacientek s karcinomem ovarií, zařazených do klinické studie SOV02, jsme se zaměřili na detekci T lymfocytů specifických vůči nádorovým antigenům CEA, NY-ESO-1, Her-2, Muc-1, MAGE-A1, MAGE-A3 a MAGE-A4. Zajímalo nás, jestli v průběhu léčby a v dalších několika týdnech po jejím ukončení dochází ke změnám v procentuálním zastoupení antigenně specifických T lymfocytů a zda se množství těchto buněk liší mezi skupinou pacientek léčených přípravkem DCVAC v kombinaci s chemoterapií (léčená skupina A) oproti pacientkám léčených pouze chemoterapií (léčená skupina B). K tomuto účelu bylo změřeno celkem 119 vzorků buněk odebraných z periferní krve pacientek v průběhu léčby (SCR, Wk24, Wk48) i po jejím ukončení (FU72). Bohužel ne od každé pacientky jsme měli k dispozici vzorky ze všech čtyř návštěv. Celkem jsme analyzovali vzorky od 39 pacientek, 25 pacientek bylo zařazeno v léčené skupině A, 14 pacientek v léčené skupině B.

K analýze antigen specifických T lymfocytů byla zvolena metoda 10-ti denní kultivace PBMC buněk, stimulace T lymfocytů pepmixy a Il-2 a následného intracelulárního barvení a stanovení IFN $\gamma$  pozitivních T lymfocytů na základě dat získaných měřením vzorků na průtokovém cytometru. Tato metoda byla již dříve použita pro měření vzorků prostatických pacientů z klinické studie SPO02 (Podrazil *et al.*, 2015).

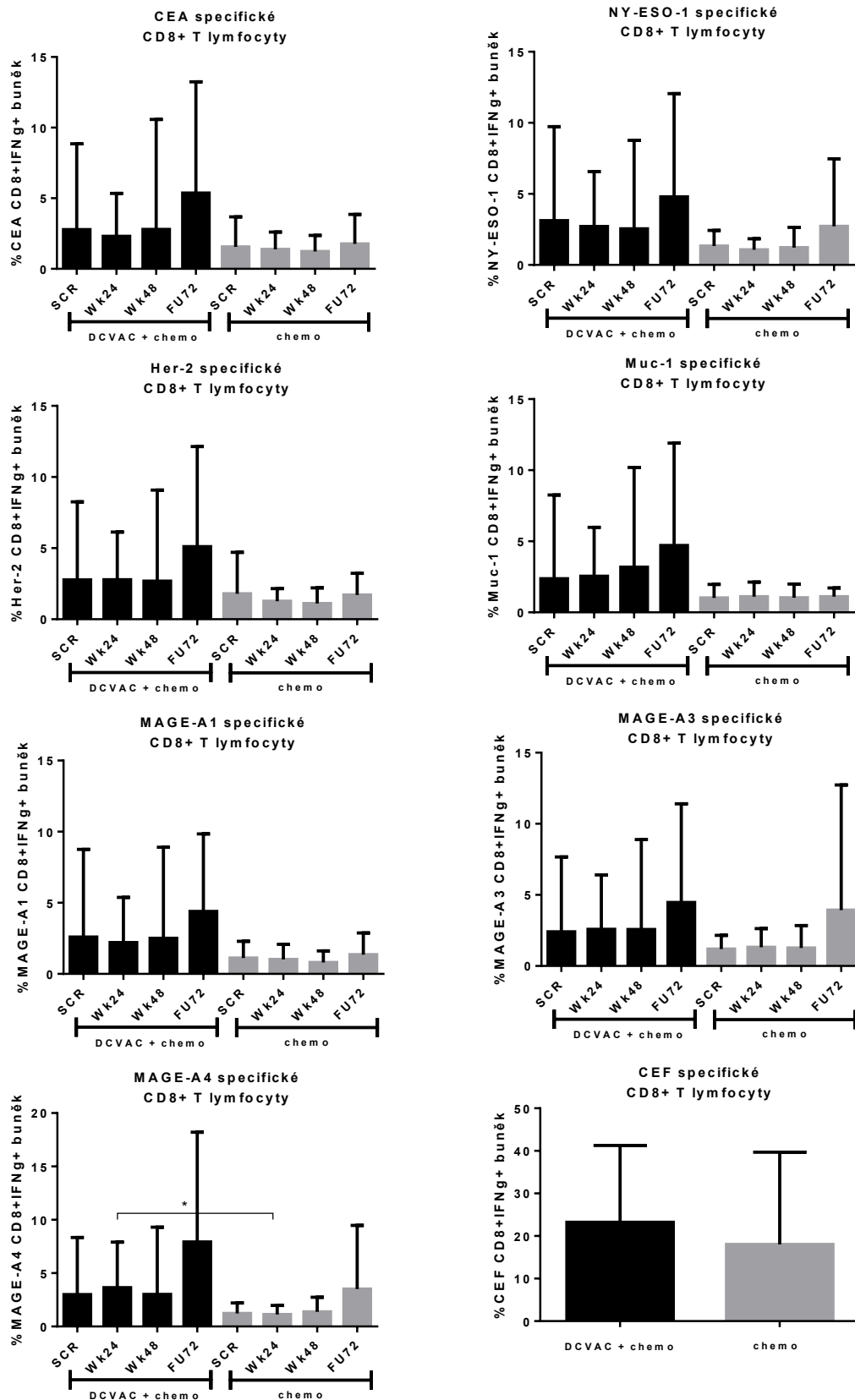
V rámci této analýzy jsme se zaměřili na pomocné CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (Obrázek 11) i cytotoxické (Obrázek 12) CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T lymfocyty. Co se týče CD4<sup>+</sup> T lymfocytů, nedocházelo v průběhu 72 týdnů k žádným signifikantním změnám v zastoupení antigen specifických T lymfocytů ani u jedné ze sledovaných skupin pacientek. U pacientek z léčené skupiny A jsou vidět jemné rozdíly, kdy mezi 48. a 72. týdnem dochází ke zvýšení procentuálního množství CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> antigen specifických buněk, rozdíl však není statisticky významný. Porovnání zastoupení těchto buněk mezi oběma léčenými skupinami pacientek nenaplnilo očekávání a nezaznamenali jsme žádné statisticky významné rozdíly v zastoupení sledovaných buněk na jednotlivých návštěvách u žádného ze sledovaných antigenů.

Podobně jako u pomocných T lymfocytů, ani u cytotoxických T lymfocytů nedocházelo v průběhu léčby ani po léčbě ke statisticky významným změnám v zastoupení antigenně specifických buněk. Je však zajímavé, že obdobně jako CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> buněk, je

u  $CD3^+CD4^+IFN\gamma^+$  T lymfocytů nejvyšší procentuální hodnota zaznamenána také u vzorků ze 72. týdne (FU72), zaměříme-li se na léčenou skupinu A. Dále stojí za pozornost porovnání sledovaných buněk mezi oběma skupinami pacientek, kdy je více antigenně specifických T lymfocytů zaznamenáno u pacientek, kterým byl podáván imunoterapeutický přípravek DCVAC, a to u všech sledovaných nádorových antigenů. Signifikantně vyšší (\* $p < 0,05$ ) procentuální množství buněk se však po statistické analýze ukázalo pouze u antigenu MAGE-A4 u vzorků odebraných při druhé návštěvě ve 24. týdnu. Jiné signifikantní rozdíly nebyly zaznamenány. Vzhledem k tomu, že jsme nezaznamenaly žádné významné změny v procentuálním zastoupení antigenně specifických T lymfocytů v průběhu terapie, ani žádné přesvědčivé signifikantní rozdíly mezi léčenými skupinami pacientek, podrobnější statistickou analýzou hodnotící subpopulace  $IFN\gamma^+CD154^+$ ,  $IFN\gamma^+$ perforin<sup>+</sup> a  $IFN\gamma^+$ granzym<sup>+</sup> buněk jsme se již nezabývali. Tyto výsledky však budou individuálně u každé pacientky korelovány s klinickými daty.



**Obrázek 11:** Graficky znázorněné zastoupení pomocných T lymfocytů specifických vůči vybraným nádorovým antigenům u pacientek z léčené skupiny A (černé sloupce) a léčené skupiny B (šedé sloupce) v klinické studii SOV02.



**Obrázek 12:** Hodnocení přítomnosti CEA, NY-ESO-1, Her-2, Muc-1, MAGE-A1, MAGE-A3 a MAGE-A4 specifických cytotoxických T lymfocytů v periferní krvi pacientek s karcinomem ovaria v klinické studii SOV02. Přítomnost CEF specifických CD8<sup>+</sup> T lymfocytů sloužila jako pozitivní kontrola.

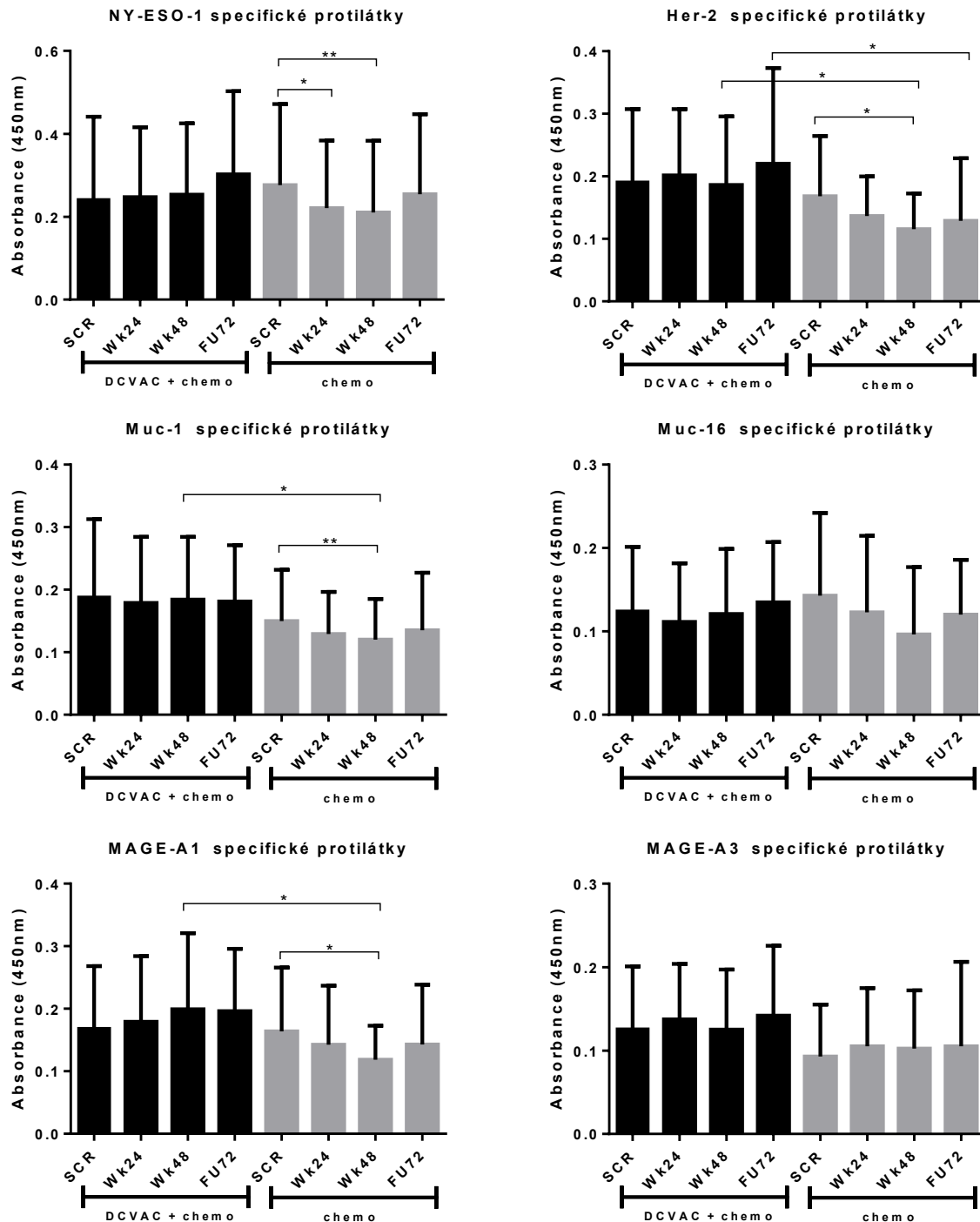
## 6.2. DETEKCE ANTIGENNĚ SPECIFICKÝCH PROTILÁTEK

Pro detekci antigenně specifických protilátek proti antigenům asociovaným s karcinomem ovaria v séru pacientek zařazených do klinické studie SOV02 byla zvolena metoda ELISA. Celkem byly analyzovány vzorky od 32 pacientek léčených standardní chemoterapií v kombinaci s imunoterapeutickou léčbou hodnocenou v rámci studie, a od 19 pacientek z kontrolní skupiny léčených pouze standardní chemoterapií. Od pacientek byly k dispozici vzorky séra ze čtyř různých časových rozmezí definovaných v protokolu studie. Vzorky odebrané v takto předem stanovených časových bodech pokrývaly dobu před zahájením léčby, v jejím průběhu i v časovém odstupu po jejím ukončení. Celkem bylo změřeno a analyzováno 182 vzorků (v některých případech nebyly k dispozici vzorky ze všech čtyř návštěv). U každého vzorku byla analyzována přítomnost specifických protilátek proti NY-ESO-1, Her-2, Muc-1, Muc-16, MAGE-A1 a MAGE-A3 (Obrázek 13). Při vyhodnocování výsledků jsme se zaměřily na hodnocení změn hladiny přítomných protilátek v obou léčených skupinách v průběhu terapie. Dále jsme zkoumaly rozdíly mezi léčenými skupinami na jednotlivých návštěvách.

V průběhu sledování pacientek v klinické studii nebyly u léčené skupiny A zjištěny žádné signifikantní rozdíly v zastoupení všech měřených nádorově specifických protilátek. Naproti tomu u léčené skupiny B byl u NY-ESO-1, Her-2, Muc-1 a MAGE-A1 specifických protilátek zaznamenán signifikantní pokles mezi počáteční návštěvou (SCR) a třetí návštěvou ve 48. týdnu (Wk48) (\* $p < 0,05$ ), v období po ukončení chemoterapeutické léčby. U anti-NY-ESO-1 a anti-Muc-1 protilátek byl tento pokles statisticky velmi významný (\*\* $p < 0,01$ ). Pokles byl zaznamenán také u Muc-16 specifických protilátek, u kterých však nevyšel statisticky významný. U NY-ESO-1 specifických protilátek se ukázal jako signifikantní již pokles mezi první (SCR) a druhou návštěvou (Wk24) (\* $p < 0,05$ ). U pěti z šesti měřených nádorově-specifických protilátek byl v průběhu 48 týdnů zaznamenán trend poklesu hladiny těchto protilátek. Avšak v průběhu dalšího sledování hladina těchto protilátek mírně stoupá a již není patrný statisticky významný rozdíl mezi hladinou protilátek na počáteční (SCR) a poslední návštěvě (FU72). Hladina MAGE-A3 specifických protilátek se v průběhu sledování pacientek v klinické studii nemění.

Porovnání hladiny antigen-specifických protilátek mezi oběma léčenými skupinami na všech návštěvách, ukázalo statisticky významné rozdíly u Her-2, Muc-1 a MAGE-A1 specifických protilátek. Hladiny těchto protilátek na třetí návštěvě (Wk48) jsou signifikantně vyšší (\* $p < 0,05$ ) u skupiny A, léčené kombinací chemo- a imunoterapie. U anti-Her-2

protilátek je obdobný signifikantní rozdíl ( $*p<0,05$ ) zaznamenám také na vzorku z poslední návštěvy (FU72). U dalších měřených protilátek nejsou rozdíly mezi oběma sledovanými skupinami statisticky významné.



**Obrázek 13:** Grafické znázornění přítomnosti nádorově specifických protilátek proti antigenům NY-ESO-1, Her-2, Muc-1, Muc-16, MAGE-A1 a MAGE-A3. Na každém grafu jsou znázorněny hladiny protilátek na jednotlivých návštěvách zahrnující léčené období i období po ukončení terapie a to u léčené skupiny A (černé sloupce), i kontrolní léčené skupiny B (šedé sloupce).

### 6.3. DETEKCE IMUNOSUPRESIVNÍCH POPULACÍ MDSC BUNĚK

V rámci detekce šesti různých populací MDSC buněk bylo analyzováno celkem 148 vzorků PBMC, které pocházely od 29 pacientek z léčené skupiny A (DCVAC + standardní chemoterapie) a 17 pacientek z léčené skupiny B (pouze chemoterapie). Celkem byly analyzovány vzorky od 46 pacientek z klinické studie SOV02 (Obrázek 14). Z důvodu přehlednosti zde opět uvádím přehled jednotlivých analyzovaných populací MDSC a jejich fenotypových markerů (Tabulka 13).

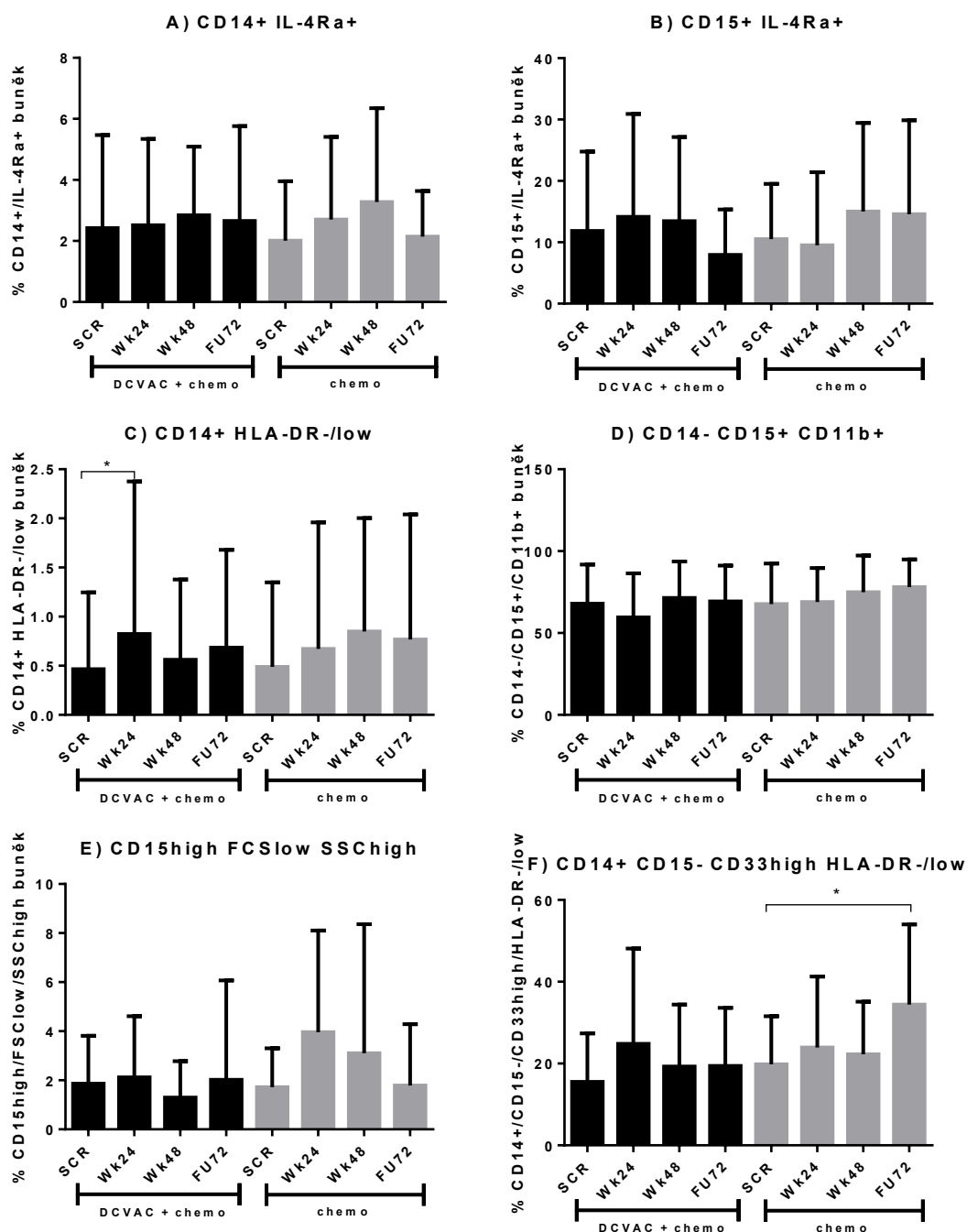
**Tabulka 13:** Přehled fenotypových znaků jednotlivých populací MDSC buněk vybraných pro analýzu dat z průtokového cytometru.

Monocytární - MDSC	Polymorfonukleární - MDSC
A) CD14 <sup>+</sup> / IL-4Rα <sup>+</sup>	B) CD15 <sup>+</sup> / IL-4Rα <sup>+</sup>
C) CD14 <sup>+</sup> / HLA-DR <sup>-/low</sup>	D) CD14 <sup>+</sup> / CD15 <sup>+</sup> / CD11b <sup>+</sup>
F) CD14 <sup>+</sup> /CD15 <sup>-</sup> /CD33 <sup>high</sup> /HLA-DR <sup>-/low</sup>	E) CD15 <sup>high</sup> /FSC <sup>low</sup> /SSC <sup>high</sup>

Populace “A” představuje CD14<sup>+</sup>IL-4Rα<sup>+</sup> subpopulaci monocytárních MDSC. U pacientek léčených kombinací imunoterapie a chemoterapie nedocházelo v průběhu léčby k žádným změnám v procentuálním zastoupení těchto buněk. V kontrolní skupině pacientek léčených pouze chemoterapií docházelo v průběhu léčby k mírnému procentuálnímu nárůstu CD14<sup>+</sup>IL-4Rα<sup>+</sup> buněk, rozdíly však nebyly vyhodnoceny jako statisticky významné. V populaci “B” jsou patrné mírné rozdíly v zastoupení CD14<sup>+</sup>IL-4Rα<sup>+</sup> buněk v průběhu léčby u pacientek z obou léčených skupin. Rozdíly opět nejsou signifikantní, a to ani při porovnání hodnot ze stejných časových bodů mezi oběma skupinami. Analýza CD14<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>-/low</sup> populace buněk ukazuje mírný signifikantní nárůst (\*p<0,05) mezi první a druhou návštěvou (Wk24) u pacientek z léčené skupiny A. U pacientek z léčené skupiny B se také v průběhu terapie zastoupení populace “C” buněk mírně zvyšuje, tento nárůst však není statisticky významný. Z grafu znázorňujícího populaci “D” M-MDSC buněk je zřejmé, že v průběhu léčby nedochází k žádným změnám v procentuálním zastoupení těchto buněk ani u jedné z léčených skupin. Nejsou patrné ani žádné rozdíly mezi těmito skupinami. Analýza další subpopulace PMN-MDSC buněk – populace “E” zachycuje statisticky nevýznamné změny (nárůst a následný pokles) u pacientek z léčené skupiny B. Statisticky významné rozdíly nebyly nalezeny ani při porovnání léčené skupiny A a B. V rámci populace “F” patřící mezi monocytární MDSC dochází po ukončení terapie k signifikantnímu nárůstu (\*p<0,05) těchto buněk v kontrolní skupině pacientek. V porovnání s léčenou skupinou však nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly.



Celkově shrnuto se dá říci, že v analyzovaných subpopulacích MDSC buněk nejsou rozdíly mezi léčenou skupinou A a kontrolní skupinou pacientek B. Nejsou patrné ani žádné jasně prokazatelné trendy v zastoupení jednotlivých subpopulací v průběhu sledování pacientek v léčené skupině A i B v klinické studii SOV02.

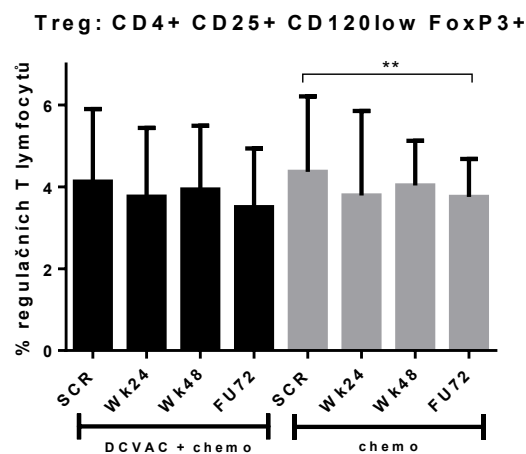


**Obrázek 14:** Grafy znázorňují frekvence šesti různých populací MDSC buněk v průběhu léčby (SCR, Wk24, Wk48) i po jejím ukončení (FU72) u pacientek z léčené skupiny A (černé sloupce) a léčené skupiny B (šedé sloupce). Populace A, B a C představuje procentuální zastoupení z živých PBMC buněk, populace D a E je vybrána z CD15 pozitivních buněk a frekvence populace F pochází z CD14 pozitivních buněk (více viz analyzační strategie - Obrázek 8).

## 6.4. DETEKCE REGULAČNÍCH T LYMFOCYTŮ (TREG)

Analyzovaly jsme PBMC vzorky odebrané u pacientek s karcinomem ovarií v rámci klinické studie SOV02. 148 analyzovaných vzorků zahrnovalo vzorky od 29 pacientek z léčené skupiny A (DCVAC + standardní chemoterapie) a 17 pacientek z léčené skupiny B (pouze chemoterapie). PBMC buňky byly nabarveny podle protokolu určeného k intracelulárnímu barvení T regulačních lymfocytů (kapitola 5.4).

Zajímaly nás změny v procentuálním zastoupení T regulačních buněk v průběhu sledování pacientek v klinické studii. Hodnoty zaznamenané na počáteční návštěvě (SCR) jsme porovnávaly s hodnotami na každé další návštěvě. Jak je vidět na Obrázek 15, dochází ke statisticky velmi významnému poklesu (\*\* $p < 0,01$ ) Treg buněk v periferní krvi pacientek z léčené skupiny B po 72 týdnech od počáteční návštěvy (SCR). Podobné snížení procentuálního zastoupení T regulačních buněk je lehce patrné i u léčené skupiny A, nicméně tento rozdíl není signifikantní. Procentuální zastoupení T regulačních lymfocytů v jednotlivých časových bodech se mezi léčenou skupinou A a kontrolní skupinou B neliší.

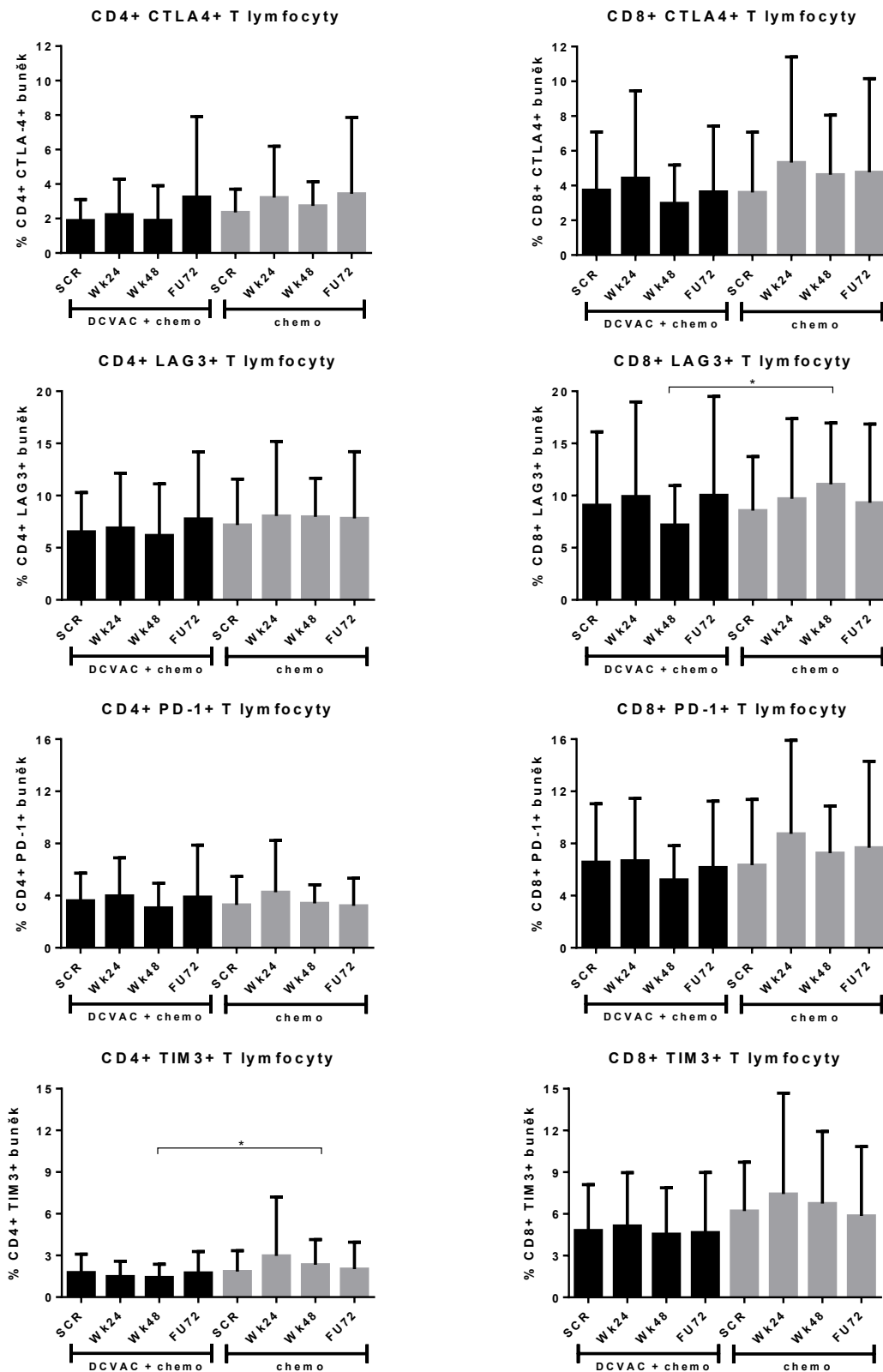


**Obrázek 15:** Detekce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup> T regulačních buněk u pacientek z klinické studie SOV02 léčených kombinací chemo- a imunoterapie (černé sloupce) a pouze standardní chemoterapií (šedé sloupce) v průběhu 72 týdnů, kdy byly pacientky v klinické studii sledovány.

## 6.5. DETEKCE EXPRESE INHIBIČNÍCH “IMMUNE CHECKPOINT“ MOLEKUL NA POVRCHU T LYMFOCYTŮ

Posledním parametrem, kterým jsme se zabývali při sledování změn imunitních parametrů v průběhu léčby pacientek s karcinomem ovarií, bylo sledování exprese inhibičních molekul CTLA-4, LAG-3, PD-1 a TIM-3 na povrchu CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů. K tomuto účelu jsme analyzovaly celkem 148 vzorků PBMC od 46 pacientek z klinické studie SOV02.

Obecně byly studované inhibiční molekuly exprimovány více na CD8<sup>+</sup> T lymfocytech (Obrázek 16). V průběhu 72 dvou týdnů sledování pacientek nedocházelo k žádným signifikantním změnám v expresi těchto molekul na povrchu CD4<sup>+</sup> ani CD8<sup>+</sup> T lymfocytů. Zaznamenány byly signifikantní rozdíly (\*p<0,05) v expresi LAG-3 na CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T lymfocytech u vzorků ze 48. týdne mezi oběma léčenými skupinami pacientek s tím, že LAG-3 byl na těchto buňkách více exprimován u kontrolní léčené skupiny B. U této skupiny pacientek bylo zaznamenáno také více CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> TIM-3<sup>+</sup> T lymfocytů (\*p<0,05) při porovnání vzorků z třetí návštěvy (Wk48) mezi oběma sledovanými skupinami pacientek.



**Obrázek 16:** Výsledky analýzy exprese CTLA-4, LAG-3, PD-1 a TIM-3 inhibičních molekul na povrchu CD4<sup>+</sup> (vlevo) a CD8<sup>+</sup> (vpravo) T lymfocytů u 46 pacientek z klinické studie SOV02. 29 pacientek bylo léčeno hodnoceným přípravkem DCVAC v kombinaci s chemoterapií (černé sloupce), 17 pacientkám v kontrolní skupině (šedé sloupce) byla podávána pouze standardní chemoterapie.

## 7. DISKUZE

Pro sledování účinků imunoterapeutického přípravku DCVAC na imunitní systém jsme monitorovali přítomnost nádorově specifických T lymfocytů u pacientek s karcinomem ovarií v průběhu jejich sledování v klinické studii SOV02. Imunomonitoring a detekce antigen specifických CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T lymfocytů je prováděn ve stále více klinických studiích hodnotících imunoterapeutické přípravky v léčbě nádorů.

Morse *et al.* analyzoval přítomnost CEA-specifických T lymfocytů v periferní krvi pacientů s CEA-exprimujícími malignitami, kteří byli imunizováni dendritickými buňkami modifikovanými virovým vektorem nesoucím *CEA* gen. Na základě analýzy IFN $\gamma$  produkujících CEA-specifických T buněk z periferní krve metodou ELISPOT, byla zaznamenána CEA-specifická imunitní odpověď u 13 ze 14 pacientů. Při detekci CEA-specifických CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů pomocí intracelulárního barvení cytokinů byly tyto buňky nalezeny dokonce u 14 ze 14 pacientů (Morse *et al.*, 2008). NY-ESO-1-specifické T lymfocyty byly sledovány u pacientek s karcinomem ovarií imunizovaných vakcínou obsahující peptidový epitop NY-ESO-1 v nekompletním Freundově adjuvans. U 13 z 16 pacientek byly v průběhu imunizace detekovány reaktivní CD4<sup>+</sup> T lymfocyty proti peptidovému epitopu NY-ESO-1. Na základě IFN $\gamma$  ELISPOT výsledků byla prokázána i významná závislost mezi počtem vakcinací a počtem CD4<sup>+</sup> reaktivních T lymfocytů. Na konci terapie byly u větší části pacientek zaznamenány CD4<sup>+</sup> T buněčné odpovědi proti epitopu NY-ESO-1. Oproti tomu pouze u 3 z 10 pacientek byly zaznamenány NY-ESO-1 specifické CD8<sup>+</sup> T lymfocyty (Odunsi *et al.*, 2007). V následující studii, kdy byly pacientky vakcinovány NY-ESO-1 proteinem s montanidem a GM-CSF, byly nalezeny CD8<sup>+</sup> NY-ESO-1 specifické T lymfocyty (u 2 z 10 pacientek) i CD4<sup>+</sup> NY-ESO-1 specifické T lymfocyty (u 7 z 10 pacientek) ještě před zahájením terapie. Tyto odpovědi přetrvávaly v průběhu terapie a navíc u dvou pacientek byly nově T buněčné odpovědi proti NY-ESO-1 detekovány v průběhu terapie (Odunsi *et al.*, 2014). Tato data však nebyla korelována s daty získanými klinickým hodnocením vývoje onemocnění těchto pacientek. Přítomnost NY-ESO-1 specifických T lymfocytů byla ověřena také pomocí HLA multimerů. Obecně patří právě zmíněné multimery (nejčastěji tetramery) a ELISPOT mezi nejčastěji používané metody pro detekci antigen specifických T lymfocytů. Bohužel však stále není zaveden jednotný přístup pro monitorování antigeně specifických T lymfocytů v klinických studiích hodnotících imunoterapeutické přípravky v léčbě nádorů.

Protokol analýzy antigenně specifických T lymfocytů založený na intracelulárním barvení cytokinů, použitý pro monitorování pacientek z klinické studie SOV02 v rámci této diplomové práce, byl zaveden společností Sotio, a. s. už pro imunomonitoring prostatických pacientů léčených přípravkem DCVAC/PCa v klinické studii SP002. U 11 z 23 pacientů byly detekovány signifikantně vyšší CD8<sup>+</sup> T buněčné odpovědi na PSA antigen oproti zdravým kontrolám. Po ukončení terapie bylo navíc množství detekovaných PSA-specifických buněk signifikantně vyšší než před jejím zahájením. Při sledování imunitní odpovědi proti antigenům MAGE-A1 a MAGE-A3 k signifikantnímu nárůstu antigen-specifických T lymfocytů nedošlo, i tak bylo detekováno 6, resp. 3 z 23 pacientů (pro MAGE-A1 a pro MAGE-A3) majících signifikantně vyšší počet antigenně specifických T lymfocytů oproti zdravým kontrolám. Procentuální zastoupení antigenně specifických T lymfocytů bylo navíc korelováno s IgG protilátkami specifickými vůči těmto antigenům, nebyla však nalezena žádná statisticky významná souvislost (Podrazil *et al.*, 2015). Oproti SP002 bylo v klinické studii SOV02 analyzováno téměř dvakrát více pacientů. Zaměřili jsme se více na sledování imunitních parametrů v průběhu léčby i po jejím ukončení (od každé z pacientek jsme v ideální situaci měli k dispozici vzorky ze čtyř návštěv naplánovaných dle protokolu studie) a na porovnání dosažených výsledků mezi skupinou pacientek léčených přípravkem DCVAC a skupinou pacientek, kterým nebyla podávána imunoterapeutická léčba. Výsledky ukazují zvýšení počtu antigenně specifických CD8<sup>+</sup> T lymfocytů po ukončení imunoterapeutické léčby a obecně větší množství antigen specifických CD8<sup>+</sup> T lymfocytů u skupiny pacientek léčených chemoterapií v kombinaci s DCVAC, oproti skupině kontrolní. Jediný signifikantní rozdíl mezi těmito dvěma skupinami však byl zaznamenán na druhé návštěvě ve 24. týdnu u antigenu MAGE-A4. Tento signifikantní rozdíl však pravděpodobně nemá zásadní význam, vzhledem k tomu, že je zaznamenán pouze při porovnávání vzorků z jedné návštěvy a v dalších časových bodech již signifikantně nevychází. Detekce T lymfocytů specificky rozpoznávajících nádorové antigeny není triviální, svědčí o tom i fakt, že dosud nebyla zavedena žádná jednotná spolehlivá a dostatečně citlivá metoda, která by se standardně používala k imunomonitoringu klinických studií zaměřených na protinádorovou imunoterapii. Nádorově specifické T lymfocyty se vyskytují také přímo v nádorové tkáni (TIL – tumor infiltrující lymfocyty) či ascites. Jejich výskyt zde je navíc několikanásobně vyšší než v periférii (Ayyoub *et al.*, 2013). Detekce antigenně specifických lymfocytů ve vzorcích periferní krve tak nepodává kompletní informaci o protinádorové imunitní reakci. Na druhou stranu nám analýza PBMC vzorků umožňuje sledování změn imunitních parametrů v průběhu terapie v několika časových bodech. Dále je nutné poznamenat, že vzhledem ke komplexitě

nádorového prostředí, změnám spojeným s únikem nádoru před imunitním systémem a přítomnosti různých supresivních populací buněk (Treg, MDSC), nemusí přítomnost nádorově-specifických T lymfocytů znamenat efektivní a funkční protinádorovou imunitní odpověď.

Přítomnost nádorově specifických autoprotilátek u pacientek s karcinomem ovarií dokumentují výsledky několika vědecky zaměřených výzkumů z posledních 10-15 let. Odunsi *et al.* detekoval NY-ESO-1/LAGE-1 specifické protilátky u 30% pacientek s karcinomem ovarií, jejichž nádor exprimoval tyto antigeny. Přítomnost protilátek však neodrážela žádné změny v celkovém přežití (OS) či v délce trvání doby bez příznaků nemoci (disease free survival, DFS) (Odunsi *et al.*, 2003). Přítomnost NY-ESO-1 protilátek byla sledována jako odpověď na vakcinaci NY-ESO-1 peptidem v kombinaci s nekompletním Freundovým adjuvans (Odunsi *et al.*, 2007), či jako odpověď na vakcinaci překrývajícími se dlouhými peptidy nádorových antigenů (Sabbatini *et al.*, 2012). Qian *et al.* blíže specifikoval, že pro indukci NY-ESO-1 specifické buněčné a humorální odpovědi má významnou roli epitop 157-170 proteinu NY-ESO-1. Spontánní NY-ESO-1 specifická protilátková odpověď byla zaznamenána u 10 z 24 (42%) pacientek s epiteliálním karcinomem ovarií (Qian *et al.*, 2004). V další studii byla přítomnost NY-ESO-1 specifických IgG protilátek zjištěna u 26% (9/35) pacientek, přítomnost protilátek navíc korelovala se zvýšenou infiltrací nádoru CD4, CD8 a FoxP3 pozitivními buňkami (Milne *et al.*, 2008). Při charakterizaci vzorků séra 126 EOC pacientek byly NY-ESO-1 protilátky detekovány dokonce u 48% pacientek (Szender *et al.*, 2016).

Protilátky specifické pro Muc-1, především IgM izotypu, byly nalezeny u zdravých žen i u žen s karcinomem ovarií. Navíc koncentrace těchto protilátek byly překvapivě vyšší u zdravých žen. Přítomnost Muc-1 IgM protilátek byla asociována s lepší prognózou u nemocných pacientek. Zajímavá je také negativní korelace mezi přítomností protilátek a hladinou Muc-1 v séru, tato závislost se promítla také do změn množství Muc-1 specifických protilátek v průběhu léčby (Richards *et al.*, 1998). Dále byla objevena souvislost mezi hladinou Muc-1 specifických protilátek u žen mladších 64 let a nižším rizikem vzniku karcinomu ovarií (Pinheiro *et al.*, 2010). Na detekci Muc-1 protilátek izotypů IgM i IgG u žen s platina-rezistentním, či platina-refrakterním karcinomem ovarií, léčených intraperitoneálně podávaným IL-2, se zaměřil Budiu *et al.* Muc-1 specifické protilátky izotypu IgM detekoval v 92% případů, Muc-1 IgG protilátky v 50% případů. Obdobně byla detekována přítomnost Muc-16 protilátek v 60% a 28% pro IgM a IgG izotypy. Během léčby nebyly zaznamenány

žádné signifikantní změny v hladinách těchto protilátek. Pokud se však vzaly v úvahu pouze pacientky odpovídající na léčbu, došlo u nich během léčby ke zvýšení Muc-1 specifických IgM protilátek. Vyšší hladina anti-Muc-1 IgM, nikoli však anti-Muc-16, protilátek měla souvislost s horší prognózou (Budiu *et al.*, 2011). Co se týče Muc-16, Frietze *et al.* také neprokázal žádný signifikantní rozdíl v přežívání patientek s anti-Muc-16 protilátkami, oproti pacientkám, u kterých tyto protilátky nebyly detekovány (Frietze *et al.*, 2016).

Na detekci protilátek specifických pro testikulární antigeny se zaměřil Daudi *et al.* Ze vzorků nádorové tkáně byla stanovena exprese MAGE-A1 u 15% a MAGE-A3 u 36% patientek s EOC. U 9% patientek byla prokázána přítomnost protilátek specifických pro některý z testikulárních antigenů (MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A10 nebo MAGE-C1), která byla zároveň spjata s kratší dobou přežití (OS). Přítomnost nádorově specifických protilátek byla sledována v několika studiích, a to jak u zdravých žen, tak u patientek s karcinomem ovarií. Některé studie se zaměřily také na sledování hladiny protilátek v delším časovém období (Richards *et al.*, 1998; Odunsi *et al.*, 2003, 2007; Budiu *et al.*, 2011; Sabbatini *et al.*, 2012). I my jsme sledovali změny v množství různých nádorově specifických protilátek v průběhu léčby patientek s karcinomem ovarií. Jako zajímavý se ukázal trend poklesu NY-ESO-1, Her-2, Muc-1 a MAGE-A1 specifických protilátek v průběhu 48 týdnů léčby, který jsme zaznamenali pouze u kontrolní léčené skupiny B, nikoli u léčené skupiny A. Vliv na množství přítomných protilátek má jistě mnoho faktorů, mimo jiné např. zkřížená reaktivita s homologními proteiny (např. u mucinů či MAGE) nebo exprese daného antigenu v nádorové tkáni, kterou jsme však nestanovovali. Zaměřili jsme se především na změny v hladinách protilátek přítomných v průběhu léčby a také jsme porovnávali hladiny nádorově specifických protilátek mezi dvěma léčenými skupinami. K vyšším hladinám protilátek u léčené skupiny A může přispívat podávání imunoterapeutické vakcíny DCVAC. Otázkou však zůstává, jestli vyšší hladiny protilátek jsou spíše pozitivním, nebo negativním jevem, vzhledem k tomu že doposud publikované výzkumy dospěly k rozdílným závěrům (Richards *et al.*, 1998; Budiu *et al.*, 2011; Daudi *et al.*, 2014). Proto je také důležité, že data získaná monitorováním hladiny nádorově specifických protilátek v séru patientek v rámci klinické studie SOV02 budou dále korelována s klinickými daty.

Dále se nám podařilo detekovat přítomnost šesti různých populací MDSC buněk v periferní krvi patientek s karcinomem ovarií léčených standardní chemoterapií (léčená skupina B) nebo kombinací chemoterapie a imunoterapie založené na autologních dendritických buňkách (léčená skupina A). Při výběru molekulových markerů pro



charakterizaci vybraných populací jsme se inspirovali navrženou analyzační strategií podle Damuzzo *et al.* Podobným způsobem byla stanovena přítomnost MDSC buněk u pacientů s renálním karcinomem léčených cyklofosfamidem a imunoterapeutickou vakcínou IMA901, skládající se z několika nádorově-asociovaných peptidů (TUMAPs) přirozeně se vyskytujících v nádorové tkáni (Walter *et al.*, 2012). U vzorků 68 pacientů z klinické studie fáze II, odebraných před započítáním léčby, bylo analyzováno následujících šest populací MDSC: MDSC1 (CD14<sup>+</sup>IL-4Rα<sup>+</sup>), MDSC2 (CD15<sup>+</sup>IL-4Rα<sup>+</sup>), MDSC3 (Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD33<sup>+</sup>), MDSC4 (CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-/low</sup>), MDSC5 (CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup>) a MDSC6 (CD15<sup>+</sup>FSC<sup>low</sup>SSC<sup>high</sup>). Mimo MDSC3 bylo zbylých pět populací MDSC analyzováno na základě stejných markerů jako v našem případě (populace A-E). Na základě porovnání výsledků se zdravými kontrolami se zjistilo, že přítomnost MDSC buněk (populací MDSC2-MDSC6) je signifikantně větší u pacientů s renálním karcinomem oproti zdravým kontrolám. Data získaná analýzou jednotlivých MDSC populací byla také korelována s celkovou dobou přežití (OS). Analýza potvrdila, že přítomnost MDSC4 (CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-/low</sup>) a MDSC5 (CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup>) je signifikantně negativně asociována s hodnotou OS (Walter *et al.*, 2012). K podobným závěrům, tedy že počet cirkulujících MDSC buněk souvisí s klinickým stavem onkologických pacientů, dospěla také Solito *et al.* U pacientek s karcinomem prsu byla zvýšená přítomnost MDSC buněk (Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) na počáteční (SCR) i konečné (FU72) návštěvě asociována se signifikantně horší dobou přežití (OS). U pacientů s karcinomem tlustého střeva byla také potvrzena korelace mezi zvýšenou hodnotou MDSC buněk na počáteční návštěvě (SCR) a nižší OS. Na základě těchto výsledků byly vzneseny předpoklady, že hladina MDSC buněk stoupá s progresí onemocnění, koreluje s prognostickými markery a že je asociována s horším přežíváním (Solito *et al.*, 2012). I přes to, že naše data neukázala signifikantní rozdíly v počtu cirkulujících MDSC mezi léčenou skupinou A a B, ani žádné významné trendy ve změnách těchto buněk v průběhu terapie, význam MDSC buněk u pacientek s karcinomem ovarií se může ukázat při korelaci s klinickými daty. Data získaná měřením MDSC populací buněk budou proto s klinickými daty také korelována.

Význam MDSC v léčbě nádorových onemocnění byl objeven relativně nedávno. V důsledku toho, není k dispozici příliš mnoho dat získaných monitorováním MDSC buněk u onkologických pacientů v rámci klinických studií. U pacientek s karcinomem ovarií byly nalezeny MDSC buňky (CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) v nádorovém ascites (Obermajer *et al.*, 2011). Jiná populace MDSC buněk (Lin<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>) byla přítomna v nádorové tkáni a rovněž v periferní krvi pacientek s high-grade serózním karcinomem ovarií. U této populace MDSC

buněk infiltrujících nádor byl navíc prokázán supresivní efekt na proliferaci T lymfocytů a také inhibiční efekt na expresi IL-2, IFN- $\gamma$  a granzymu B u CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> efektorových T buněk. Infiltrace nádoru větším množstvím MDSC buněk korelovala jak s kratší dobou přežití (OS), tak s kratším intervalem bez příznaků recidivy (DFI – disease free interval) (Cui *et al.*, 2013).

Analýza MDSC buněk v PBMC vzorcích z klinické studie SOV02 tak přináší zcela nové informace o přítomnosti MDSC buněk v periferní krve u pacientek s karcinomem ovarií. Navíc se jedná o jedno z prvních sledování vlivu imunoterapie na bázi dendritických buněk na změny v zastoupení šesti definovaných populací MDSC v průběhu léčby pacientek s karcinomem ovarií. Nicméně je třeba zdůraznit, že se jedná o analýzu založenou pouze na sledování přítomnosti předem definovaných fenotypových markerů a supresivní vlastnosti analyzovaných buněk nebyly zkoumány. Jedná se tedy o do jisté míry omezené informace o přítomných MDSC buňkách, vzhledem k tomu, že nemáme ověřeno jejich pravděpodobně supresivní působení na další složky imunitního systému. Na druhou stranu žádná vhodná a obecně přijímaná strategie testování supresivních vlastností MDSC zatím nebyla navržena, což souvisí i s tím, že mechanismy supresivního působení MDSC buněk zatím nebyly dostatečně objasněny. Dalším důvodem, proč jsme supresivní vlastnosti MDSC nezkoumali, byl také nedostatek buněk v patientských vzorcích, které jsme měli k dispozici. Připomenu, že se jednalo o PBMC vzorky odebírané v několika centrech ve střední Evropě, centrálně zpracovávané a zamrazované (viz. kapitola 4.7). Faktory, že se jednalo o analýzu PBMC vzorků, nikoli vzorků plné krve, či buněk infiltrujících nádor, a že se jednalo o zamražené, nikoli čerstvé vzorky, je třeba brát v úvahu při porovnávání výsledků získaných v dalších klinických studiích, vzhledem k tomu že tyto faktory mohou mít vliv na počet buněk i poměr jednotlivých populací MDSC (Damuzzo *et al.*, 2015).

Při hodnocení účinku imunoterapeutické vakcíny DCVAC na imunitní systém nesmíme opomenout významnou supresivní roli T regulačních lymfocytů. Proto se Treg buňky staly jedním z častých sledovaných parametrů při imunomonitoringu v klinických studiích zaměřených na protinádorovou imunoterapii. Změny v procentuálním zastoupením CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> buněk v periferní krvi před a po podání vakcíny s dendritickými buňkami byly signifikantně asociovány s přežitím u pacientů s glioblastomem. Zvýšení frekvence Treg buněk statisticky významně zvyšovalo pravděpodobnost úmrtí (Fong *et al.*, 2012). Klinický význam hladiny Treg v periferní krvi je dokládán i u karcinomu ovarií. Rychlejší kinetika nárůstu hladiny Treg buněk v periferní krvi pacientek s karcinomem ovaria

je signifikantně asociována s časným relapsem. U pacientek s pozdním relapsem však rychlost nárůstu Treg buněk nemá prediktivní hodnotu (Brtnický *et al.*, 2014).

V rámci imunomonitoringu pacientek v klinické studii SOV02 jsme sledovali frekvence Treg buněk, definovaných jako  $CD4^+CD25^+CD127^{low}FoxP3^+$ , ve čtyřech časových bodech určených v protokolu studie. Na základě statistické analýzy procentuálního zastoupení Treg v průběhu sledování pacientek jsme zaznamenali signifikantní pokles Treg buněk mezi počáteční (SCR) a koncovou návštěvou (FU72) u pacientek léčených chemoterapií. Změny ve frekvenci Treg buněk u pacientek s karcinomem ovaria v průběhu chemoterapeutické léčby sledoval také Park *et al.*, avšak dospěl k jinému výsledku. U pěti pacientek, léčených kombinací karboplatiny a paclitaxelu, sledoval přítomnost  $CD3^+CD4^+CD25^{high}CD127^{low/-}FoxP3^+$  buněk v periferní krvi. I přes značné kolísání frekvence Treg buněk v průběhu terapie, nedošlo po ukončení terapie (po 18 týdnech) ke snížení počtu T regulačních lymfocytů (Park *et al.*, 2012). Žádné změny v procentuálním zastoupení  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$  buněk před a po podání vakcíny založené na dendritických buňkách nebyly zaznamenány u pacientů s CEA-exprimujícími nádory (Morse *et al.*, 2008). Ani my jsme nezaznamenali žádné statisticky významné změny v průběhu sledování pacientek, kterým byl podáván imunoterapeutický přípravek DCVAC na bázi dendritických buněk. Po podání stejného imunoterapeutického přípravku DCVAC/PCa byl však u pacientů s karcinomem prostaty zaznamenán signifikantní pokles  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  lymfocytů v periferní krvi (Podrazil *et al.*, 2015).

Na závěr bych chtěla poznamenat, že stejně jako antigenně specifické T lymfocyty i regulační T lymfocyty infiltrují do nádorové tkáně, a tak informace získané jejich detekcí ve vzorcích periferní krve nevypovídají plně o jejich celkovém zastoupení v organismu. Bu *et al.* zaznamenal signifikantně vyšší frekvence  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  mezi tumor-infiltrujícími lymfocyty (TIL) oproti PBMC. Bylo navíc zjištěno, že TIL-Treg buňky silněji suprimují  $CD8^+$  T lymfocyty oproti Treg buňkám z periferní krve (Bu *et al.*, 2016).

Abychom získali komplexnější představu o změnách fungování imunitního systému pacientek léčených hodnocenou imunoterapií, zaměřili jsme se také na analýzu exprese vybraných inhibičních molekul na povrchu T lymfocytů. Celkem u 46 pacientek z klinické studie SOV02 jsme analyzovali přítomnost molekul CTLA-4, LAG-3, PD-1 a TIM-3 na povrchu  $CD4^+$  i  $CD8^+$  T lymfocytů v průběhu klinické studie SOV02. Výsledky této analýzy budou dále korelovány s klinickými daty. Asociace mezi expresí CTLA-4 na leukocytech z periferní krve a přežíváním byla zaznamenána u pacientů s glioblastomem léčených imunoterapií na bázi dendritických buněk. Pokles exprese CTLA-4 na  $CD4^+$  i  $CD8^+$  T

lymfocytech u pacientů po vakcinaci dendritickými buňkami byl asociován s prodlouženým přežíváním. Podobná souvislost nebyla zaznamenána u inhibiční molekuly PD-1 (Fong *et al.*, 2012). Co se týká PD-1, také jsme nezaznamenaly pokles exprese této molekuly u pacientek vakcinovaných dendritickými buňkami. Žádné signifikantní změny v průběhu terapie jsme však nezaznamenaly ani u CTLA-4, stejně tak jako u LAG-3 či TIM-3. Prognostický význam exprese PD-1 a PD-L1 zaznamenal Darb-Esfahani *et al.* u TIL buněk pacientek s high-grade serózním karcinomem ovarií. Tentokrát však vyšší, nikoli nižší, úroveň exprese naznačovala příznivější prognózu. Množství PD-1<sup>+</sup>, ale také PD-L1<sup>+</sup> TIL mělo pozitivní účinek na dobu bez progresu onemocnění (Darb-Esfahani *et al.*, 2015).

Matsuzaki *et al.* sledoval expresi různých inhibičních molekul na tumor-infiltrujících (TIL) a tumor-asociovaných (TAL) lymfocytech u pacientů s NY-ESO-1 pozitivními nádory. Procento CTLA-4<sup>+</sup> a LAG-3<sup>+</sup> buněk negativně korelovalo s frekvencí NY-ESO-1 specifických IFN $\gamma$ <sup>+</sup> buněk. Zajímavé také je, že více LAG-3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T lymfocytů bylo detekováno mezi TIL a TAL ve srovnání s leukocyty v periferní krvi. Většina těchto buněk navíc ještě exprimovala PD-1 a tyto buňky (LAG-3<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>) produkovali nejméně IFN $\gamma$  a TNF $\alpha$  (Matsuzaki *et al.*, 2010). Na TIL buňky se zaměřil také Bu *et al.*, který sledoval expresi TIM-3 na tumor-infiltrujících Treg (TIL-Treg) u ovariálních pacientek. V porovnání s Treg buňkami z periferní krve, exprimovaly TIL-Treg signifikantně větší množství TIM-3 a jejich schopnost potlačovat CD8<sup>+</sup> T buněčnou odpověď byla silnější. Dále byla nalezena pozitivní korelace mezi frekvencí TIL-Treg a velikostí nádoru (Bu *et al.*, 2016). Zmíněné studie ukazují význam sledování exprese inhibičních molekul na imunitních buňkách infiltrujících do nádorové tkáně. My jsme však na základě charakteru dostupných vzorků sledovali expresi těchto molekul u T lymfocytů přítomných v periferní krvi pacientek. Exprese TIM-3 byla už dříve sledována na CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T lymfocytech z periferní krve pacientek s karcinomem ovarií. Výsledky byly srovnávány také s daty získanými na základě měření zdravých kontrol. Bylo zjištěno, že exprese TIM-3 je jak u CD4<sup>+</sup>, tak u CD8<sup>+</sup> T lymfocytů výrazně vyšší u pacientek s karcinomem. Vyšší exprese TIM-3 na CD4<sup>+</sup> T lymfocytech byla zaznamenána u pacientek s relapsem oproti pacientkám s nově diagnostikovaným karcinomem ovarií, a obdobně byla exprese TIM-3 zvýšená u pacientek s pokročilým stádiem karcinomu (III nebo IV dle FIGO) na rozdíl od pacientek s karcinomem ovarií stádia I či II, a také byla nalezena souvislost se stupněm vyžralosti nádoru (grade). Na základě těchto závislostí by se míra exprese TIM-3 na T lymfocytech mohla využít jako prognostický marker pro karcinom ovarií (Wu *et al.*, 2013). Výsledky těchto studií naznačují význam TIM-3 v inhibici T buněčných populací, která přispívá k růstu a progresi karcinomu ovarií.

## 8. ZÁVĚR

Předmětem této práce byl imunomonitoring pacientek s karcinomem ovarií v klinické studii SOV02, která hodnotila účinky léčebného přípravku DCVAC/OvCa vyvíjeného firmou Sotio, a.s. Cílem práce bylo sledování vybraných imunitních parametrů, zhodnocení změn, ke kterým dochází v průběhu léčby, a porovnání výsledků mezi dvěma léčenými skupinami pacientek. Zabývali jsme se jak efektorovými mechanismy protinádorové imunity, tak mechanismy imunosupresivními.

Po dobu 72 týdnů sledování pacientek v klinické studii jsme nezaznamenali žádné signifikantní rozdíly v procentuálním zastoupení  $CD3^+CD4^+IFN\gamma^+$ , ani  $CD3^+CD8^+IFN\gamma^+$  T lymfocytů specifických vůči nádorovým antigenům CEA, NY-ESO-1, Her-2, Muc-1, MAGE-A1, MAGE-A3 a MAGE-A4, a to ani u skupiny kontrolní, ani u skupiny pacientek, kterým byl podáván imunoterapeutický přípravek DCVAC/OvCa. Oproti očekávání nebyly zaznamenány výrazné rozdíly v přítomnosti antigeně specifických T lymfocytů mezi léčenými skupinami. Aktivace a vznik antigeně specifických T lymfocytů není určen pouze přítomností dendritických buněk prezentujících nádorové antigeny, ale je ovlivňován také supresivními mechanismy imunitního systému. Přítomnost imunosupresivních populací MDSC a Treg buněk, které mohou být zodpovědné za inhibici antigeně specifických T lymfocytů, se také nijak statisticky významně nelišila mezi oběma hodnocenými skupinami pacientek. U obou skupin jsme zaznamenaly přítomnost  $CD4^+CD25^+CD127^{low}FoxP3^+$  Treg buněk a také šesti různých populací MDSC buněk, odvozených od monocytárních i polymorfonukleárních buněk. Studovali jsme také přítomnost inhibičních molekul CTLA-4, LAG-3, PD-1 a TIM-3 na povrchu  $CD4^+$  i  $CD8^+$  T lymfocytů. Opět lze obecně říci, že se výskyt těchto inhibičních molekul mezi léčenými skupinami nelišil. Jediné rozdíly jsme zaznamenali u  $CD3^+CD4^+TIM-3^+$  a  $CD3^+CD8^+LAG-3^+$  buněk, ale pouze ve vzorcích odebraných ve 48. týdnu. Dlouhodobější trend, kdy by se exprese vybraných inhibičních molekul mezi léčenými skupinami lišila, nebyl nalezen. Posledním sledovaným parametrem byla přítomnost NY-ESO-1, Her-2, Muc-1, Muc-16, MAGE-A1 a MAGE-A3 specifických protilátek v séru pacientek. Zde jsme u kontrolní skupiny zaznamenali statisticky významný pokles u Her-2, Muc-1 a MAGE-A1 protilátek v prvních 48 týdnech léčby. Tento trend nebyl zaznamenán u skupiny léčené přípravkem DCVAC/OvCa, kde se hladiny protilátek v průběhu sledování neměnily. Rozdíly mezi léčenými skupinami se vyskytly u Her-2, Muc-1 a MAGE-A1 specifických protilátek, kdy kontrolní skupina měla ve 48. týdnu odebrání vzorků signifikantně méně těchto protilátek specifických vůči nádorovým antigenům. Význam

nádorově specifických protilátek u onkologických pacientů zatím nebyl objasněn. Zda jsou tyto protilátky pro pacientky přínosem či nikoli, pomůže objasnit korelace naměřených výsledků s klinickými daty.

U 51 pacientek jsme sledovali několik vybraných imunitních parametrů, pokrývajících jak protinádorové efektorové mechanismy adaptivní imunity, tak supresivní mechanismy, které souvisejí s únikem nádoru před imunitním systémem. Pokud nepočítáme vzorky, které v důsledku nedostatku buněk nebyly pro měření použity, analyzovali jsme celkem 745 vzorků v rámci pěti různých metod. Sledovali jsme změny v imunitních parametrech ve čtyřech časových bodech v průběhu 72 týdnů (stanoveno v protokolu studie) a hodnotili jsme rozdíly mezi léčenými skupinami pacientek. Cíle práce byly naplněny.

Sledování parametrů imunitní odpovědi je sekundárním výstupním parametrem klinické studie SOV02. Naměřené výsledky budou korelovány s klinickými daty a pomohou zhodnotit účinky studované experimentální buněčné imunoterapie DCVAC/OvCa, případně mohou pomoci nalézt prognostické biomarkery. Vezmeme-li v potaz množství naměřených vzorků a komplexitu použitých metod, je tato práce nepochybně důležitou součástí klinické studie SOV02. Na práci bude navázáno v imunomonitoringu klinické studie SOV01, hodnotící stejný léčivý přípravek, avšak u pacientek s časně diagnostikovaným karcinomem ovaria.

## 9. SEZNAM LITERATURY

- American Cancer Society (2017) 'Cancer Facts and Figures 2017', pp. 21–22. doi: 10.1101/gad.1593107.
- Anderson, A. C. (2012) 'Tim-3, a negative regulator of anti-tumor immunity', *Current Opinion in Immunology*. Elsevier Ltd, 24(2), pp. 213–216. doi: 10.1016/j.coi.2011.12.005.
- Andrews, L., Med, M. and Mutch, D. G. (2017) 'Hereditary Ovarian Cancer and Risk Reduction', *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. Elsevier Ltd, pp. 1–18. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2016.10.017.
- Ayyoub, M., Pignon, P., Classe, J.-M., Odunsi, K. and Valmori, D. (2013) 'CD4+ T Effectors Specific for the Tumor Antigen NY-ESO-1 Are Highly Enriched at Ovarian Cancer Sites and Coexist with, but Are Distinct from, Tumor-Associated Treg.', *Cancer Immunology Research*, 1(5), pp. 303–8. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0062-T.
- Baek, S., Kim, Y.-M., Kim, S.-B., Kim, C.-S., Kwon, S.-W., Kim, Y., Kim, H. and Lee, H. (2015) 'Therapeutic DC vaccination with IL-2 as a consolidation therapy for ovarian cancer patients: a phase I/II trial.', *Cellular & Molecular Immunology*, 12(1), pp. 87–95. doi: 10.1038/cmi.2014.40.
- Barnett, B., Kryczek, I., Cheng, P., Zou, W. and Curiel, T. J. (2005) 'Regulatory T Cells in Ovarian Cancer: Biology and Therapeutic Potential', *American Journal of Reproductive Immunology*, 54(6), pp. 369–377. doi: 10.1111/j.1600-0897.2005.00330.x.
- Bast Jr., R. C., Hennessy, B. and Mills, G. B. (2009) 'The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation', *Nature Reviews Cancer*, 9(6), pp. 415–428. doi: 10.1038/nrc2644.
- Berek, J. S., Taylor, P. T., Gordon, A., Cunningham, M. J., Finkler, N., Orr, J., Rivkin, S., Schultes, B. C., Whiteside, T. L. and Nicodemus, C. F. (2004) 'Randomized, Placebo-Controlled Study of Oregovomab for Consolidation of Clinical Remission in Patients With Advanced Ovarian Cancer', *Journal of Clinical Oncology*, 22(17), pp. 3507–3516. doi: 10.1200/JCO.2004.09.016.
- Berinstein, N. L. (2002) 'Carcinoembryonic antigen as a target for therapeutic anticancer vaccines: a review', *Journal of Clinical Oncology*, 20(8), pp. 2197–2207. doi: 10.1200/JCO.2002.08.017.
- Bharwani, N., Reznick, R. H. and Rockall, A. G. (2011) 'Ovarian Cancer Management: The role of imaging and diagnostic challenges', *European Journal of Radiology*. Elsevier Ireland Ltd, 78(1), pp. 41–51. doi: 10.1016/j.ejrad.2010.11.039.
- Bonadona, V., Bonaiti, B., Olschwang, S., Grandjouan, S., Huiart, L., Longy, M., Guimbaud, R., Buecher, B., Bignon, Y.-J., Caron, O., Colas, C., Noguès, C., Lejeune-Dumoulin, S., Olivier-Faivre, L., Polycarpe-Osaer, F., Nguyen, T. D., Desseigne, F., Saurin, J.-C., Berthet, P., Leroux, D., Duffour, J., Manouvrier, S., Frébourg, T., Sobol, H., Lasset, C. and Bonaiti-Pellié, C. (2013) 'Cancer Risks Associated With Germline Mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 Genes in Lynch Syndrome', *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 305(22), pp. 2304–10.
- Boon, T., Cerottini, J. C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P. and Van Pel, A. (1994) 'Tumor antigens recognized by T lymphocytes.', *Annual review of immunology*, 12(1), pp. 337–65. doi: 10.1146/annurev.iy.12.040194.002005.
- Bronte, V., Brandau, S., Chen, S.-H., Colombo, M. P., Frey, A. B., Greten, T. F., Mandruzzato, S., Murray, P. J., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., Rodriguez, P. C., Sica, A., Umansky, V.,

- Vonderheide, R. H. and Gabrilovich, D. I. (2016) 'Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards.', *Nature communications*. Nature Publishing Group, 7, p. 12150. doi: 10.1038/ncomms12150.
- Brossart, P., Wirths, S., Stuhler, G., Reichardt, V. L., Kanz, L. and Brugger, W. (2000) 'Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells', *Blood*, 96(9), pp. 3102–3108. Available at: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/96/9/3102.full.pdf>.
- Brtnický, T., Fialová, A., Laštovička, J., Rob, L. and Špišek, R. (2014) 'Clinical relevance of regulatory T cells monitoring in the peripheral blood of ovarian cancer patients.', *Human Immunology*, 76, pp. 187–191. doi: 10.1016/j.humimm.2014.12.004.
- Brtnický, T., Podrazil, M., Bartůňková, J., Špišek, R. and Rob, L. (2012) 'Aktivní buněčná imunoterapie karcinomu ovaria pomocí dendritických buněk', *Česká Gynekologie*, 77(3), pp. 215–220.
- Bu, M., Shen, Y., Seeger, W. L., An, S., Qi, R., Sanderson, J. A. and Cai, Y. (2016) 'Ovarian carcinoma-infiltrating regulatory T cells were more potent suppressors of CD8+ T cell inflammation than their peripheral counterparts, a function dependent on TIM3 expression', *Tumor Biology*. *Tumor Biology*, 37(3), pp. 3949–3956. doi: 10.1007/s13277-015-4237-x.
- Budiu, R. A., Mantia-Smaldone, G., Elishaev, E., Chu, T., Thaller, J., McCabe, K., Lenzner, D., Edwards, R. P. and Vlad, A. M. (2011) 'Soluble MUC1 and serum MUC1-specific antibodies are potential prognostic biomarkers for platinum-resistant ovarian cancer', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 60(7), pp. 975–984. doi: 10.1007/s00262-011-1010-x.
- Buchbinder, E. I. and Desai, A. (2016) 'CTLA-4 and PD-1 Pathways', *American Journal of Clinical Oncology*, 39(1), pp. 98–106. doi: 10.1097/COC.0000000000000239.
- ClinicalTrials.gov* (2017). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=sotio&Search=Search> (Accessed: 23 March 2017).
- Colombo, P.-E., Fabbro, M., Theillet, C., Bibeau, F., Rouanet, P. and Ray-Coquard, I. (2014) 'Sensitivity and resistance to treatment in the primary management of epithelial ovarian cancer.', *Critical reviews in oncology/hematology*. Elsevier Ireland Ltd, 89(2), pp. 207–16. doi: 10.1016/j.critrevonc.2013.08.017.
- Cramer, D. W., Titus-ernstoff, L., Mckolanis, J. R., Cramer, D. W., Titus-ernstoff, L., Mckolanis, J. R., Welch, W. R., Vitonis, A. F., Berkowitz, R. S. and Finn, O. J. (2005) 'Conditions Associated with Antibodies Against the Tumor-Associated Antigen MUC1 and Their Relationship to Risk for Ovarian Cancer', *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 14(May), pp. 1125–1132. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-05-0035.
- Cui, T. X., Kryczek, I., Zhao, L., Zhao, E., Kuick, R., Roh, M. H., Vatan, L., Szeliga, W., Mao, Y., Thomas, D. G., Kotarski, J., Tarkowski, R., Wicha, M., Cho, K., Giordano, T., Liu, R. and Zou, W. (2013) 'Myeloid-derived suppressor cells enhance stemness of cancer cells by inducing microRNA101 and suppressing the corepressor CTBP2', *Immunity*, 39(3), pp. 611–621. doi: 10.1016/j.immuni.2013.08.025.
- Damuzzo, V., Pinton, L., Desantis, G., Solito, S., Marigo, I., Bronte, V. and Mandruzzato, S. (2015) 'Complexity and Challenges in Defining Myeloid-Derived Suppressor Cells', *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 88(2), pp. 77–91. doi: 10.1002/cyto.b.21206.
- Darb-Esfahani, S., Kunze, C. A., Kulbe, H., Sehouli, J., Wienert, S., Lindner, J., Budczies, J.,



- Bockmayr, M., Dietel, M., Denkert, C., Braicu, I. and Jöhrens, K. (2015) 'Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian high grade serous carcinoma', *Oncotarget*, 7(2), pp. 1486–1499. doi: 10.18632/oncotarget.6429.
- Das, P. M. and Bast Jr, R. C. (2007) 'Early detection of ovarian cancer', *Disease markers*, 2(3), pp. 291–303. doi: 10.2217/17520363.2.3.291.Early.
- Daudi, S., Eng, K. H., Mhawech-Fauceglia, P., Morrison, C., Miliotto, A., Beck, A., Matsuzaki, J., Tsuji, T., Groman, A., Gnjatic, S., Spagnoli, G., Lele, S. and Odunsi, K. (2014) 'Expression and Immune Responses to MAGE Antigens Predict Survival in Epithelial Ovarian Cancer', *PLoS ONE*, 9(8). doi: 10.1371/journal.pone.0104099.
- Deng, J., Wang, L., Chen, H., Li, L., Ma, Y., Ni, J. and Li, Y. (2013) 'The role of tumour-associated MUC1 in epithelial ovarian cancer metastasis and progression', *Cancer and Metastasis Reviews*, 32(3–4), pp. 535–551. doi: 10.1007/s10555-013-9423-y.
- Disis, M. L., Gooley, T. A., Rinn, K., Davis, D., Piepkorn, M., Cheever, M. A., Knutson, K. L. and Schiffman, K. (2002) 'Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines', *Journal of Clinical Oncology*, 20(11), pp. 2624–2632. doi: 10.1200/JCO.2002.06.171.
- Drerup, J. M., Liu, Y., Padron, A. S., Murthy, K., Hurez, V., Zhang, B. and Curiel, T. J. (2015) 'Immunotherapy for Ovarian Cancer', *Current Treatment Options in Oncology*, 16(1), pp. 1–20. doi: 10.1007/s11864-014-0317-1.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. and Schreiber, R. D. (2002) 'Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape', *Nature*, 415(1), pp. 1–14. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x.
- Ebell, M. H., Culp, M. B. and Radke, T. J. (2016) 'A Systematic Review of Symptoms for the Diagnosis of Ovarian Cancer', *American Journal of Preventive Medicine*. Elsevier, 50(3), pp. 384–394. doi: 10.1016/j.amepre.2015.09.023.
- Eisenhauer, E. A., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L. H., Sargent, D., Ford, R., Dancey, J., Arbuck, S., Gwyther, S., Mooney, M., Rubinstein, L., Shankar, L., Dodd, L., Kaplan, R., Lacombe, D. and Verweij, J. (2008) 'New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1)', *European Journal of Cancer*. Elsevier Ltd, 45(2), pp. 228–247. doi: 10.1016/j.ejca.2008.10.026.
- Fong, B., Jin, R., Wang, X., Safaee, M., Lisiero, D. N., Yang, I., Li, G., Liao, L. M. and Prins, R. M. (2012) 'Monitoring of regulatory t cell frequencies and expression of ctla-4 on t cells, before and after dc vaccination, can predict survival in gbm patients', *PLoS ONE*, 7(4), pp. 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0032614.
- Fong, C. W. (2016) 'Platinum anti-cancer drugs: Free radical mechanism of Pt-DNA adduct formation and anti-neoplastic effect', *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier, 95, pp. 216–229. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.006.
- Frietze, K. M., Roden, R. B. S., Lee, J.-H., Shi, Y., Peabody, D. S. and Chackerian, B. (2016) 'Identification of Anti-CA125 Antibody Responses in Ovarian Cancer Patients by a Novel Deep Sequence-Coupled Biopanning Platform', *Cancer Immunology Research*, 4(2), pp. 157–164. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0165.
- Gabrilovich, D. I. (2017) 'Myeloid-Derived Suppressor Cells', *Cancer Immunology Research*, 5(1),

pp. 3–8. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0297.

- Gadducci, A., Ferdeghini, M., Buttitta, F., Cosio, S., Fanucchi, A., Annicchiarico, C., Galletti, O., Bevilacqua, G. and Genazzani, A. R. (1999) 'Assessment of the prognostic relevance of serum anti-p53 antibodies in epithelial ovarian cancer.', *Gynecologic oncology*, 72(1), pp. 76–81. doi: 10.1006/gyno.1998.5101.
- Gagnon, A., Kim, J. H., Schorge, J. O., Ye, B., Liu, B., Hasselblatt, K., Welch, W. R., Bandera, C. A. and Mok, S. C. (2008) 'Use of a combination of approaches to identify and validate relevant tumor-associated antigens and their corresponding autoantibodies in ovarian cancer patients', *Clinical Cancer Research*, 14(3), pp. 764–771. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0856.
- Garg, M., Chaurasiya, D., Rana, R., Jagadish, N., Kanojia, D., Dudha, N., Kamran, N., Salhan, S., Bhatnagar, A., Suri, S., Gupta, A. and Suri, A. (2007) 'Sperm-associated antigen 9, a novel cancer testis antigen, is a potential target for immunotherapy in epithelial ovarian cancer', *Clinical Cancer Research*, 13(5), pp. 1421–1428. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2340.
- Gilks, C. B. and Prat, J. (2009) 'Ovarian carcinoma pathology and genetics: recent advances', *Human Pathology*. Elsevier Inc., 40(9), pp. 1213–1223. doi: 10.1016/j.humpath.2009.04.017.
- Gligorov, J. and Lotz, J. P. (2004) 'Preclinical pharmacology of the taxanes: implications of the differences.', *The Oncologist*, 9 Suppl 2(suppl 2), pp. 3–8. doi: 10.1634/theoncologist.9-suppl\_2-3.
- Gnjatic, S., Atanackovic, D., Jäger, E., Matsuo, M., Selvakumar, A., Altorki, N. K., Maki, R. G., Dupont, B., Ritter, G., Chen, Y.-T., Knuth, A. and Old, L. J. (2003) 'Survey of naturally occurring CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: correlation with antibody responses.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(15), pp. 8862–7. doi: 10.1073/pnas.1133324100.
- Høgdall, E. V. S., Christensen, L., Kjaer, S. K., Blaakaer, J., Jarle Christensen, I., Gayther, S., Jacobs, I. J. and Høgdall, C. K. (2008) 'Protein expression levels of carcinoembryonic antigen (CEA) in Danish ovarian cancer patients: from the Danish "MALOVA" ovarian cancer study.', *Pathology*, 40(5), pp. 487–92. doi: 10.1080/00313020802197889.
- Høgdall, E. V. S., Christensen, L., Kjaer, S. K., Blaakaer, J., Kjærbye-Thygesen, A., Gayther, S., Jacobs, I. J. and Høgdall, C. K. (2007) 'CA125 expression pattern, prognosis and correlation with serum CA125 in ovarian tumor patients. From The Danish "MALOVA" Ovarian Cancer Study', *Gynecologic Oncology*, 104(3), pp. 508–515. doi: 10.1016/j.ygyno.2006.09.028.
- Chatterjee, M. and Tainsky, M. A. (2010) 'Autoantibodies as biomarkers for ovarian cancer', *Cancer Biomarkers*, 8(4–5), pp. 187–201. doi: 10.3233/CBM-2011-0213.
- Cheever, M. A. and Higano, C. S. (2011) 'PROVENGE (sipuleucel-T) in prostate cancer: The first FDA-approved therapeutic cancer vaccine', *Clinical Cancer Research*, 17(11), pp. 3520–3526. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-3126.
- Chen, D. S. and Mellman, I. (2013) 'Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle', *Immunity*, 39(1), pp. 1–10. doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.012.
- Cheng, K. W., Lahad, J. P., Gray, J. W. and Mills, G. B. (2005) 'Emerging Role of RAB GTPases in Cancer and Human Disease', *Cancer Research*, 65(7), pp. 2516–2519. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0573.
- Chinni, S. R., Falchetto, R., Gercel-Taylor, C., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. and Taylor, D. D. (1997) 'Humoral immune responses to cathepsin D and glucose-regulated protein 78 in ovarian cancer

- patients', *Clinical Cancer Research*, 3(9), pp. 1557–1564.
- Järås, K. and Anderson, K. (2011) 'Autoantibodies in cancer: Prognostic biomarkers and immune activation', *Expert Review of Proteomics*, 8(5), pp. 577–589. Available at: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L362765189%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1586/epr.11.48%5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&isn=14789450&id=doi:10.1586/epr.11.48&atitle=Autoantibodies+in+cancer:+Prognostic+bi>.
- Kandalaft, L. E., Chiang, C. L., Tanyi, J., Motz, G., Balint, K., Mick, R. and Coukos, G. (2013) 'A Phase I vaccine trial using dendritic cells pulsed with autologous oxidized lysate for recurrent ovarian cancer.', *Journal of translational medicine*, 11(1), p. 149. doi: 10.1186/1479-5876-11-149.
- Kandalaft, L. E., Powell, D. J., Chiang, C. L., Tanyi, J., Kim, S., Bosch, M., Montone, K., Mick, R., Levine, B. L., Torigian, D. A., June, C. H. and Coukos, G. (2013) 'Autologous lysate-pulsed dendritic cell vaccination followed by adoptive transfer of vaccine-primed ex vivo co-stimulated T cells in recurrent ovarian cancer.', *Oncoimmunology*, 2(1), p. e22664. doi: 10.4161/onci.22664.
- Keir, M. E., Francisco, L. M. and Sharpe, A. H. (2007) 'PD-1 and its ligands in T-cell immunity', *Current Opinion in Immunology*, 19(3), pp. 309–314. doi: 10.1016/j.coi.2007.04.012.
- Kelemen, L. E. (2006) 'The role of folate receptor alpha in cancer development, progression and treatment: Cause, consequence or innocent bystander?', *International Journal of Cancer*, 119(2), pp. 243–250. doi: 10.1002/ijc.21712.
- Khoja, L., Butler, M. O., Kang, S. P., Ebbinghaus, S. and Joshua, A. M. (2015) 'Pembrolizumab', *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 3(1), p. 36. doi: 10.1186/s40425-015-0078-9.
- Kim, J. H., Herlyn, D., Wong, K. K., Park, D. C., Schorge, J. O., Lu, K. H., Skates, S. J., Cramer, D. W., Berkowitz, R. S. and Mok, S. C. (2003) 'Identification of epithelial cell adhesion molecule autoantibody in patients with ovarian cancer.', *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 9(13), pp. 4782–4791.
- Kumar, V., Patel, S., Tcyganov, E. and Gaborilovich, D. I. (2016) 'The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment', *Trends in Immunology*. Elsevier Ltd, 37(3), pp. 208–220. doi: 10.1016/j.it.2016.01.004.
- Ledermann, J. A., Harter, P., Gourley, C., Friedlander, M., Vergote, I., Rustin, G. J. S., Scott, C. L., Meier, W., Shapira-Frommer, R., Safra, T., Matei, D. E., Fielding, A., Spencer, S., Rowe, P., Lowe, E. S. and Matulonis, U. A. (2016) 'Overall survival in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer receiving olaparib maintenance monotherapy: An updated analysis from a randomized, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial', *ASCO Annual Meeting*. Elsevier Ltd, 17(11), p. Abstract number 5501. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30376-X.
- Leffers, N., Lambeck, A. J. A., Gooden, M. J. M., Hoogeboom, B. N., Wolf, R., Hamming, I. E., Hepkema, B. G., Willemse, P. H. B., Molmans, B. H. W., Hollema, H., Drijfhout, J. W., Sluiter, W. J., Valentijn, A. R. P. M., Fathors, L. M., Oostendorp, J., Van Der Zee, A. G. J., Melief, C. J., Van Der Burg, S. H., Daemen, T. and Nijman, H. W. (2009) 'Immunization with a P53 synthetic long peptide vaccine induces P53-specific immune responses in ovarian cancer patients, a phase II trial', *International Journal of Cancer*, 125(9), pp. 2104–2113. doi: 10.1002/ijc.24597.
- Lengyel, E. (2010) 'Ovarian cancer development and metastasis.', *The American journal of pathology*. American Society for Investigative Pathology, 177(3), pp. 1053–64. doi:

10.2353/ajpath.2010.100105.

- Longoria, T. C. and Eskander, R. (2015) 'Immune Checkpoint Inhibition: Therapeutic Implications in Epithelial Ovarian Cancer', *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 10(May 2015), pp. 133–144. doi: 10.2174/1574892810666150504121000.
- Luborsky, J. L., Barua, A., Shatavi, S. V., Kebede, T., Abramowicz, J. and Rotmensch, J. (2005) 'Anti-tumor antibodies in ovarian cancer', *American Journal of Reproductive Immunology*, 54(2), pp. 55–62. doi: 10.1111/j.1600-0897.2005.00287.x.
- Lundgren, S., Berntsson, J., Nodin, B., Micke, P. and Jirstrom, K. (2016) 'Prognostic impact of tumour-associated B cells and plasma cells in epithelial ovarian cancer', *Journal of Ovarian Research*. *Journal of Ovarian Research*, 139(5), pp. 1129–1139. doi: 10.1002/ijc.30138.
- Luo, L.-Y., Herrera, I., Soosaipillai, a and Diamandis, E. P. (2002) 'Identification of heat shock protein 90 and other proteins as tumour antigens by serological screening of an ovarian carcinoma expression library.', *British journal of cancer*, 87(3), pp. 339–43. doi: 10.1038/sj.bjc.6600439.
- Matsuzaki, J., Gnjatic, S., Mhawech-Fauceglia, P., Beck, A., Miller, A., Tsuji, T., Eppolito, C., Qian, F., Lele, S., Shrikant, P., Old, L. J. and Odunsi, K. (2010) 'Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8+ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(17), pp. 7875–7880. doi: 10.1073/pnas.1003345107.
- Milne, K., Barnes, R. O., Girardin, A., Mawer, M. A., Nesslinger, N. J., Ng, A., Nielsen, J. S., Sahota, R., Tran, E., Webb, J. R., Wong, M. Q., Wick, D. A., Wray, A., McMurtrie, E., Köbel, M., Kalloger, S. E., Gilks, C. B., Watson, P. H. and Nelson, B. H. (2008) 'Tumor-infiltrating T cells correlate with NY-ESO-1-specific autoantibodies in ovarian cancer', *PLoS ONE*, 3(10). doi: 10.1371/journal.pone.0003409.
- Miotti, S., Bagnoli, M., Tomassetti, A., Colnaghi, M. I. and Canevari, S. (2000) 'Interaction of folate receptor with signaling molecules lyn and G(alpha)(i-3) in detergent-resistant complexes from the ovary carcinoma cell line IGROV1.', *Journal of Cell Science*, 113 Pt 2, pp. 349–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10633085>.
- Mirza, M. R., Monk, B. J., Herrstedt, J., Oza, A. M., Mahner, S., Redondo, A., Fabbro, M., Ledermann, J. A., Lorusso, D., Vergote, I., Ben-Baruch, N. E., Marth, C., Mądry, R., Christensen, R. D., Berek, J. S., Dørum, A., Tinker, A. V., du Bois, A., González-Martín, A., Follana, P., Benigno, B., Rosenberg, P., Gilbert, L., Rimel, B. J., Buscema, J., Balsler, J. P., Agarwal, S. and Matulonis, U. A. (2016) 'Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer.', *The New England journal of medicine*, 375(22). doi: 10.1056/NEJMoa1611310.
- Mitchell, P. L. R., Quinn, M. A., Grant, P. T., Allen, D. G., Jobling, T. W., White, S. C., Zhao, A., Karanikas, V., Vaughan, H., Pietersz, G., McKenzie, I. F. C., Gargosky, S. E. and Loveland, B. E. (2014) 'A phase 2, single-arm study of an autologous dendritic cell treatment against mucin 1 in patients with advanced epithelial ovarian cancer', *Journal Immunotherapy of Cancer*, 2(16).
- Morse, M. A., Hobeika, A. C., Osada, T., Serra, D., Niedzwiecki, D., Lyerly, H. K. and Clay, T. M. (2008) 'Depletion of human regulatory T cells specifically enhances antigen specific immune responses to cancer vaccines', *Blood*, 112(3), pp. 2–4. doi: 10.1182/blood-2008-01-135319.The.
- Muggia, F. M., Bonetti, A., Hoeschele, J. D., Rozencweig, M. and Howell, S. B. (2015) 'Platinum antitumor complexes: 50 Years since Barnett Rosenberg's discovery', *Journal of Clinical*

*Oncology*, 33(35), pp. 4219–4226. doi: 10.1200/JCO.2015.60.7481.

- Naora, H., Montz, F. J., Chai, C. Y. and Roden, R. B. (2001) ‘Aberrant expression of homeobox gene HOXA7 is associated with müllerian-like differentiation of epithelial ovarian tumors and the generation of a specific autologous antibody response.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(26), pp. 15209–15214. doi: 10.1073/pnas.011503998.
- Naora, H., Yang, Y. Q., Montz, F. J., Seidman, J. D., Kurman, R. J. and Roden, R. B. (2001) ‘A serologically identified tumor antigen encoded by a homeobox gene promotes growth of ovarian epithelial cells.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(7), pp. 4060–5. doi: 10.1073/pnas.071594398.
- Nossov, V., Amneus, M., Su, F., Lang, J., Janco, J. M. T., Reddy, S. T. and Farias-Eisner, R. (2008) ‘The early detection of ovarian cancer: from traditional methods to proteomics. Can we really do better than serum CA-125?’, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 199(3), pp. 215–223. doi: 10.1016/j.ajog.2008.04.009.
- Obermajer, N., Muthuswamy, R., Odunsi, K., Edwards, R. P. and Kalinski, P. (2011) ‘PGE 2-induced CXCL12 production and CXCR4 expression controls the accumulation of human MDSCs in ovarian cancer environment’, *Cancer Research*, 71(24), pp. 7463–7470. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2449.
- Odunsi, K., Jungbluth, A. A., Stockert, E., Qian, F., Gnjatic, S., Tammela, J., Intengan, M., Beck, A., Keitz, B., Santiago, D., Williamson, B., Scanlan, M. J., Ritter, G., Chen, Y., Driscoll, D., Sood, A., Lele, S. and Old, L. J. (2003) ‘NY-ESO-1 and LAGE-1 Cancer-Testis Antigens Are Potential Targets for Immunotherapy in Epithelial Ovarian Cancer NY-ESO-1 and LAGE-1 Cancer-Testis Antigens Are Potential Targets for Immunotherapy in Epithelial Ovarian Cancer’, *Cancer Research*, 63, pp. 6076–6083.
- Odunsi, K., Matsuzaki, J., James, S. R., Mhawech-Fauceglia, P., Tsuji, T., Miller, A., Zhang, W., Akers, S. N., Griffiths, E. a, Miliotto, A., Beck, A., Batt, C. a, Ritter, G., Lele, S., Gnjatic, S. and Karpf, A. R. (2014) ‘Epigenetic potentiation of NY-ESO-1 vaccine therapy in human ovarian cancer.’, *Cancer Immunology Research*, 2(1), pp. 37–49. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0126.
- Odunsi, K., Qian, F., Matsuzaki, J., Mhawech-Fauceglia, P., Andrews, C., Hoffman, E. W., Pan, L., Ritter, G., Vilella, J., Thomas, B., Rodabaugh, K., Lele, S., Shrikant, P., Old, L. J. and Gnjatic, S. (2007) ‘Vaccination with an NY-ESO-1 peptide of HLA class I/II specificities induces integrated humoral and T cell responses in ovarian cancer.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(31), pp. 12837–42. doi: 10.1073/pnas.0703342104.
- Park, A., Govindaraj, C., Xiang, S. D., Halo, J., Quinn, M., Scalzo-Inguanti, K. and Plebanski, M. (2012) ‘Substantially modified ratios of effector to regulatory T cells during chemotherapy in ovarian cancer patients return to pre-treatment levels at completion: Implications for immunotherapy’, *Cancers*, 4(2), pp. 581–600. doi: 10.3390/cancers4020581.
- Pignata, S., Cannella, L., Leopardo, D., Pisano, C., Bruni, G. S. and Facchini, G. (2011) ‘Chemotherapy in epithelial ovarian cancer’, *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 303(2), pp. 73–83. doi: 10.1016/j.canlet.2011.01.026.
- Pinheiro, S. P., Hankinson, S. E., Tworoger, S. S., Rosner, B. A., McKolanis, J. R., Finn, O. J. and Cramer, D. W. (2010) ‘Anti-MUC1 antibodies and ovarian cancer risk: Prospective data from the nurses’ health studies’, *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 19(6), pp. 1595–

1601. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0068.

- Podrazil, M., Horvath, R., Becht, E., Rozkova, D., Bilkova, P., Sochorova, K., Hromadkova, H., Kayserova, J., Vavrova, K., Lastovicka, J., Vrabcova, P., Kubackova, K., Gasova, Z., Jarolim, L., Babjuk, M., Spisek, R., Bartunkova, J. and Fucikova, J. (2015) 'Phase I/II clinical trial of dendritic-cell based immunotherapy (DCVAC/PCa) combined with chemotherapy in patients with metastatic, castration-resistant prostate cancer.', *Oncotarget*, 6(20), pp. 18192–205. doi: 10.18632/oncotarget.4145.
- Preston, C. C., Goode, E. L., Hartmann, L. C., Kalli, K. R. and Keith, L. (2012) 'Immunity and immune suppression in human ovarian cancer', *Immunotherapy*, 3(4), pp. 539–556. doi: 10.2217/imt.11.20.Immunity.
- Qian, F., Gnjjatic, S., Jäger, E., Santiago, D., Jungbluth, A., Grande, C., Schneider, S., Keitz, B., Driscoll, D., Ritter, G., Lele, S., Sood, A., Old, L. J. and Odunsi, K. (2004) 'Th1/Th2 CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in HLA-DPBI\*0401/0402 patients with epithelial ovarian cancer.', *Cancer immunity: a journal of the Academy of Cancer Immunology*, 4(July), p. 12. doi: 040914 [pii].
- Rahma, O. E., Ashtar, E., Czystowska, M., Szajnik, M. E., Wieckowski, E., Bernstein, S., Herrin, V. E., Shams, M. A., Steinberg, S. M., Merino, M., Gooding, W., Visus, C., DeLeo, A. B., Wolf, J. K., Bell, J. G., Berzofsky, J. A., Whiteside, T. L. and Khleif, S. N. (2012) 'A gynecologic oncology group phase II trial of two p53 peptide vaccine approaches: Subcutaneous injection and intravenous pulsed dendritic cells in high recurrence risk ovarian cancer patients', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61(3), pp. 373–384. doi: 10.1007/s00262-011-1100-9.
- Ramirez, I., Chon, H. S. and Apte, S. M. (2011) 'The role of surgery in the management of epithelial ovarian cancer.', *Cancer control: journal of the Moffitt Cancer Center*, 18(1), pp. 22–30. doi: 10.1002/lary.25647.
- Ricciardelli, C. and Oehler, M. K. (2009) 'Diverse molecular pathways in ovarian cancer and their clinical significance', *Maturitas*, 62(3), pp. 270–275. doi: 10.1016/j.maturitas.2009.01.001.
- Richards, E. R., Devine, P. L., Quin, R. J., Fontenot, J. D., Ward, B. G. and McGuckin, M. A. (1998) 'Antibodies reactive with the protein core of MUC1 mucin are present in ovarian cancer patients and healthy women', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 46(5), pp. 245–252. doi: 10.1007/s002620050484.
- Rossi, L., Verrico, M., Zaccarelli, E., Papa, A., Colonna, M., Strudel, M., Vici, P., Bianco, V. and Tomao, F. (2016) 'Bevacizumab in ovarian cancer: A critical review of phase III studies.', *Oncotarget*, 8(7), pp. 12389–12405. doi: 10.18632/oncotarget.13310.
- Sabbatini, P., Harter, P., Scambia, G., Sehouli, J., Meier, W., Wimberger, P., Baumann, K. H., Kurzeder, C., Schmalfeldt, B., Cibula, D., Bidzinski, M., Casado, A., Martoni, A., Colombo, N., Holloway, R. W., Selvaggi, L., Li, A., Campo, J. Del, Karel Cwierka, Tamas Pinter, Jan, B. V., Eric Pujade-Lauraine, Simona Scartoni, Monica Bertolotti, Cecilia Simonelli, Angela Capriati, Carlo Alberto Maggi, Jonathan, S. B. and Jacobus Pfisterer (2013) 'Abagovomab as maintenance therapy in patients with epithelial ovarian cancer: A phase III trial of the AGO OVAR, COGI, GINECO, and GEICO-the MIMOSA study', *Journal of Clinical Oncology*, 31(12), pp. 1554–1561. doi: 10.1200/JCO.2012.46.4057.
- Sabbatini, P., Tsuji, T., Ferran, L., Ritter, E., Sedrak, C., Tuballes, K., Jungbluth, A. A., Ritter, G., Aghajanian, C., Bell-McGuinn, K., Hensley, M. L., Konner, J., Tew, W., Spriggs, D. R., Hoffman, E. W., Venhaus, R., Pan, L., Salazar, A. M., Diefenbach, C. M., Old, L. J. and Gnjjatic, S. (2012) 'Phase I trial of overlapping long peptides from a tumor self-antigen and

- poly-ICLC shows rapid induction of integrated immune response in ovarian cancer patients', *Clinical Cancer Research*, 18(23), pp. 6497–6508. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2189.
- Sehouli, J., Pietzner, K., Wimberger, P., Vergote, I., Rosenberg, P., Schneeweiss, A., Bokemeyer, C., Salat, C., Scambia, G., Berton-Rigaud, D., Santoro, A., Cervantes, A., Trédan, O., Tournigand, C., Colombo, N., Dudnichenko, A. S., Westermann, A., Friccius-Quecke, H. and Lordick, F. (2014) 'Catumaxomab with and without prednisolone premedication for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer: Results of the randomised phase IIIb CASIMAS study', *Medical Oncology*, 31(8). doi: 10.1007/s12032-014-0076-7.
- Schreiber, R. D., Old, L. J. and Smyth, M. J. (2011) 'Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion', *Science*, 331(6024), pp. 1565–1570. doi: 10.1126/science.1203486.
- Sierro, S., Romero, P. and Speiser, D. E. (2011) 'The CD4-like molecule LAG-3, biology and therapeutic applications.', *Expert opinion on therapeutic targets*, 15(1), pp. 91–101. doi: 10.1517/14712598.2011.540563.
- Singh, M., Loftus, T., Webb, E. and Benencia, F. (2016) 'Minireview: Regulatory T Cells and Ovarian Cancer.', *Immunological Investigations*. Taylor & Francis, 139(July), pp. 1–9. doi: 10.1080/08820139.2016.1186689.
- Solito, S., Falisi, E., Diaz-montero, C. M., Doni, A., Pinton, L., Francescato, S., Basso, G., Zanovello, P., Onicescu, G., Montero, A. J., Bronte, V., Mandruzzato, S., Rosato, A. and Garrett-mayer, E. (2012) 'A human promyelocytic-like population is responsible for the immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells', *Blood*, 118(8), pp. 2254–2265. doi: 10.1182/blood-2010-12-325753.
- Solito, S., Marigo, I., Pinton, L., Damuzzo, V., Mandruzzato, S. and Bronte, V. (2014) 'Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1319(1), pp. 47–65. doi: 10.1111/nyas.12469.
- Sotio.com* (2017). Available at: <http://www.sotio.com/klinicke-studie/o-klinickyh-studiich> (Accessed: 23 March 2017).
- Stone, B., Schummer, M., Paley, P. J., Thompson, L., Stewart, J., Ford, M., Crawford, M., Urban, N., O'Briant, K. and Nelson, B. H. (2003) 'Serologic analysis of ovarian tumor antigens reveals a bias toward antigens encoded on 17q', *International Journal of Cancer*, 104(1), pp. 73–84. doi: 10.1002/ijc.10900.
- Su, Z., Graybill, W. S. and Zhu, Y. (2013) 'Detection and monitoring of ovarian cancer', *Clinica Chimica Acta*. Elsevier B.V., 415, pp. 341–345. doi: 10.1016/j.cca.2012.10.058.
- Szender, J. B., Eng, K. H., Matsuzaki, J., Miliotto, A., Gnjjatic, S., Tsuji, T. and Odunsi, K. (2016) 'HLA superfamily assignment is a predictor of immune response to cancer testis antigens and survival in ovarian cancer', *Gynecologic Oncology*. Elsevier Inc., 142(1), pp. 158–162. doi: 10.1016/j.ygyno.2016.04.017.
- Taherian-esfahani, Z., Abedin-do, A., Nikpayam, E., Tasharofi, B., Nezamabadi, G. and Ghafourifard, S. (2016) 'Cancer-Testis Antigens: A Novel Group of Tumor Biomarkers in Ovarian Cancers', *Iranian Journal of Cancer Prevention*, 9(6). doi: 10.17795/ijcp-4993.Review.
- Tse, B. W. C., Collins, A., Oehler, M. K., Zippelius, A. and Heinzelmann-Schwarz, V. A. (2014) 'Antibody-based immunotherapy for ovarian cancer: Where are we at?', *Annals of Oncology*, 25(2), pp. 322–331. doi: 10.1093/annonc/mdt405.

- Vergote, I., Armstrong, D., Scambia, G., Teneriello, M., Sehouli, J., Schweizer, C., Weil, S. C., Bamias, A., Fujiwara, K., Ochiai, K., Poole, C., Gorbunova, V., Wang, W., OShannessy, D. and Herzog, T. J. (2016) 'A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase III Study to Assess Efficacy and Safety of Weekly Farletuzumab in Combination With Carboplatin and Taxane in Patients With Ovarian Cancer in First Platinum-Sensitive Relapse', *Journal of Clinical Oncology*, 34(19), pp. 1–9. doi: 10.1200/JCO.2015.63.2596.
- Vogl, F. D., Frey, M., Kreienberg, R. and Runnebaum, I. B. (2000) 'Autoimmunity against p53 predicts invasive cancer with poor survival in patients with an ovarian mass.', *British journal of cancer*, 83(10), pp. 1338–43. doi: 10.1054/bjoc.2000.1446.
- Walker, L. S. K. (2017) 'EFIS Lecture: Understanding the CTLA-4 checkpoint in the maintenance of immune homeostasis', *Immunology Letters*. Elsevier B.V., 184, pp. 43–50. doi: 10.1016/j.imlet.2017.02.007.
- Walter, S., Weinschenk, T., Stenzl, A., Zdrojowy, R., Pluzanska, A., Szczylik, C., Staehler, M., Brugger, W., Dietrich, P.-Y., Mendrzyk, R., Hilf, N., Schoor, O., Fritsche, J., Mahr, A., Maurer, D., Vass, V., Trautwein, C., Lewandrowski, P., Flohr, C., Pohla, H., Stanczak, J. J., Bronte, V., Mandruzzato, S., Biedermann, T., Pawelec, G., Derhovanessian, E., Yamagishi, H., Miki, T., Hongo, F., Takaha, N., Hirakawa, K., Tanaka, H., Stevanovic, S., Frisch, J., Mayer-Mokler, A., Kirner, A., Rammensee, H.-G., Reinhardt, C. and Singh-Jasuja, H. (2012) 'Mulleptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival.', *Nature medicine*, 18(8), pp. 1254–61. doi: 10.1038/nm.2883.
- Wang, D. hui, Guo, L. and Wu, X. hua (2014) 'Checkpoint inhibitors in immunotherapy of ovarian cancer', *Tumor Biology*, 36(1), pp. 33–39. doi: 10.1007/s13277-014-2848-2.
- White, A. J., Coleman, R. L., Armstrong, D. K., Glenn, D., Bicher, A., Richards, D. A., Schneeweiss, A., Old, L. J., Schweizer, C. and Weil, S. (2010) 'Efficacy and safety of farletuzumab, a humanized monoclonal antibody to folate receptor alpha, in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer subjects: Final data from a multicenter phase II study.', *Journal of Clinical Oncology*. American Society of Clinical Oncology, 28(15\_suppl), p. 5001. doi: 10.1200/jco.2010.28.15\_suppl.5001.
- Wu, J., Liu, C., Qian, S. and Hou, H. (2013) 'The expression of Tim-3 in peripheral blood of ovarian cancer.', *DNA and Cell Biology*, 32(11), pp. 648–53. doi: 10.1089/dna.2013.2116.
- Xu, Y., Zhang, H., Huang, Y., Rui, X. and Zheng, F. (2017) 'Role of TIM-3 in ovarian cancer', *Clinical and Translational Oncology*, pp. 8–12. doi: 10.1007/s12094-017-1656-8.
- Zaenker, P., Gray, E. S. and Ziman, M. R. (2016) 'Autoantibody Production in Cancer-The Humoral Immune Response toward Autologous Antigens in Cancer Patients', *Autoimmunity Reviews*. The Authors, 15(5), pp. 477–483. doi: 10.1016/j.autrev.2016.01.017.
- Zhang, S., Zhou, X., Yu, H. and Yu, Y. (2010) 'Expression of tumor-specific antigen MAGE, GAGE and BAGE in ovarian cancer tissues and cell lines.', *BMC cancer*, 10, p. 163. doi: 10.1186/1471-2407-10-163.
- Zimmermann, A. K., Imig, J., Klar, A., Renner, C., Korol, D., Fink, D., Stadlmann, S., Singer, G., Knuth, A., Moch, H. and Caduff, R. (2013) 'Expression of MAGE-C1/CT7 and selected cancer/testis antigens in ovarian borderline tumours and primary and recurrent ovarian carcinomas', *Virchows Archiv*, 462(5), pp. 565–574. doi: 10.1007/s00428-013-1395-3.