

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Nádorová imunoterapie založená na použití ligandů
fagocytárních receptorů vázajících se specificky na
nádory.**

Bakalářská práce

Jan Pačes

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2013

Pačes, J., 2013: Nádorová imunoterapie založená na použití ligandů fagocytárních receptorů vázajících se specificky na nádory. Tumor immunotherapy based on the use of specifically binding ligands of phagocytic receptors. Bc. Thesis, in Czech.] – 46 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The aim of the thesis was to verify the therapeutic effect of f-MLF specifically bound to tumor cell membrane. We used LPS and β -glucan to enhance the therapeutic effect of this ligand of phagocytic receptors (FPR). Specific tumor therapy was compared to nonspecific treatment.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 12. 12. 2013

.....

Jan Pačes

Poděkování

Rád bych zde poděkoval panu RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za velkou trpělivost a množství cenných rad, kterými mi byl nápomocen po celou dobu vypracovávání této bakalářské práce. Mé díky patří též panu prof. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. a všem ostatním z Oddělení imunologie parazitů Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za poskytnutí prostředků, zázemí a užitečných rad. Dále bych rád poděkoval kolegyním z týmu, které mi byly nápomocny během přípravy a realizace experimentů a v neposlední řadě také všem svým blízkým za podporu a trpělivost, s jakou snášeli mé pracovní nasazení.

1	Úvod	1
1.1	Nádorová onemocnění	1
1.2	Rozdělení nádorů	1
1.2.1	Dělení nádorů podle histogeneze	2
1.2.2	Melanom	2
1.2.2.1	Melanom B16	3
1.3	Terapie nádorových onemocnění	3
1.4	Imunoterapie	4
1.4.1	Protinádorová imunita	4
1.5	Imunoterapie využívající specifické imunity	7
1.5.1	Peptidové vakcíny	7
1.5.2	DNA vakcíny	8
1.5.3	Využití protilátek	8
1.5.4	In vitro úprava nádorových buněk	11
1.5.5	In vitro stimulace imunitních buněk	11
1.5.6	Využití cytokinů	11
1.5.6.1	Aktivující cytokiny	12
1.5.6.2	Supresivní cytokiny	14
1.6	Imunoterapie využívající nespecifickou imunitu	16
1.6.1	Fagocytóza	18
1.6.2	PAMPs a DAMPs	18
1.6.2.1	f-MLF peptidy v imunoterapii nádorů	22
2	Cíle práce	23
3	Materiál a metody	24
3.1	Materiál	24
3.1.1	Experimentální zvířata	24
3.1.2	Buněčná linie	24

3.1.3	Chemikálie.....	25
3.2	Metody.....	25
3.2.1	Transplantace.....	25
3.2.2	Měření velikosti nádorů.....	25
3.2.3	Vyhodnocení počtu metastáz.....	26
3.2.4	Příprava f-MLFG ₆ -K-DOPE	26
3.2.5	Intraperitoneální aplikace f-MLFG ₅ FNRLKAGAKIRFG	26
3.2.6	Intratumorální aplikace f-MLFG ₅ FNRLKAGAKIRFG a f-MLFG ₆ -K-DOPE 27	
3.2.7	Test cytotoxicity f-MLFG ₅ FNRLKAGAKIRFG	28
3.2.8	Statistické vyhodnocení dat.....	28
4	Výsledky	29
4.1	Intraperitoneální aplikace f-MLFG ₅ FNRLKAGAKIRFG	29
4.1.1	Vliv terapie na velikost nádorů.....	29
4.1.2	Vliv terapie na výskyt metastáz a intenzitu metastázování	30
4.2	Intratumorální aplikace f-MLFG ₅ FNRLKAGAKIRFG.....	32
4.2.1	Vliv terapie na velikost nádorů.....	32
4.2.2	Vliv terapie na přežití	33
4.3	Cytotoxicita f-MLFG ₅ FNRLKAGAKIRFG	34
5	Diskuze.....	36
6	Závěr	38
7	Seznam použité literatury	39

1 Úvod

1.1 Nádorová onemocnění

Jedná se o skupinu chorob narušujících základní funkce převážně somatických buněk, jako jsou: proliferace, diferenciaci, buněčný cyklus, apoptóza a mezibuněčný kontakt. U rakovinných buněk dochází k poškození genů (protoonkogenů) zodpovědných za kontrolu těchto buněčných funkcí. Tím buňky ztrácejí schopnost diferenciaci, nekontrolovatelně se dělí a mohou se šířit po celém těle (Klug a kol. 2006). Nahloučení těchto buněk označujeme jako nádor.

Nádorová onemocnění jsou podle údajů Eurostatu ze září 2012 nejčastější příčinou úmrtí ve všech 27 členských zemích Evropské unie.

1.2 Rozdělení nádorů

Z hlediska biologické podstaty můžeme nádory rozdělit na benigní a maligní.

Benigní nádory – rozrůstají se z jednoho místa, nejsou invazivní a nemetastazují. Ačkoliv mohou svým růstem poškozovat okolní tkáň, často nebývají často životu nebezpečné, protože se většinou dají chirurgicky odstranit (Klug a kol. 2006).

Maligní nádory – jsou invazivní nádory tvořené buňkami, které mají schopnost se od nádoru odtrhnout, vstoupit do krevního řečiště a osidlovat vzdálené tkáně, kde tvoří sekundární nádory (metastázy). Kvůli schopnosti metastázovat mohou být maligní nádory životu nebezpečné (Klug a kol. 2006).

1.2.1 Dělení nádorů podle histogeneze

Epiteliální nádory – nádory odvozené od krycí a výstelkové tkáně. Mezi benigní řadíme papilomy a epitelioomy. Maligními jsou pak karcinomy. Od žláзовého epitelu jsou odvozeny benigní adenomy a maligní adenokarcinomy.

Mezenchymové nádory – nádory odvozené od podpůrných a pojivových tkání. Mezi benigní řadíme lipomy, chondromy, osteomy a myomy. Maligními jsou sarkomy.

Hematopoetické nádory – nádory odvozené od krvetvorných tkání. Patří mezi ně různé typy leukémií a lymfomů.

Germinální nádory – nádory odvozené od embryonálních buněk. Patří mezi ně seminomy, germinální karcinomy a teratomy.

Neuroektodermové nádory – nádory odvozené od buněk nervové tkáně (gliomy, glioblastomy, neorblastomy) a od kožních pigmentových buněk (melanomy)

Smíšené nádory - nádory pocházející z tkání různého původu.

1.2.2 Melanom

Melanomem nazýváme nádory odvozené od melanocytů. Melanocyty jsou pigmentové buňky neuroektodermálního původu obsahující melanin (Alberts a kol. 2002). Nacházejí se v pokožce a vlasových folikulech.

Melanin je hnědý pigment obratlovců. Tvoří ochranu buněk před UV zářením a zbavuje je toxických, reaktivních forem kyslíku a volných radikálů (Horibe a kol. 2012). Množství a distribuce melaninu v melanocytech pokožky určují její barvu a odolnost vůči kancerogennímu vlivu UV záření. (Brenner a kol. 2008).

Ačkoliv mají melanocyty za úkol chránit ostatní buňky před UV zářením, jsou mu též samy vystaveny. To může vést k poškození jejich DNA a v některých případech i ke vzniku maligních nádorů. Melanom je nejzávažnějším typem kožních nádorů. Jeho následkům můžeme přičíst 80 % všech úmrtí na rakovinu kůže (Shore a kol. 2011). Příčinou úmrtí

bývají častěji než primární melanomy metastázy, které se nejčastěji kromě kůže vyskytují v játrech, plicích a mozku (Cummins a kol. 2006). Naděje na přežití při onemocnění melanomem v Evropě činí 81 %, což je dvakrát větší číslo než v rozvojových zemích (Parkin a kol. 2005). V Evropě se incidence melanomů na 100 000 obyvatel pohybuje od 3,3 pro muže a 3,6 pro ženy ve východní Evropě po 8,4 pro muže a 10,0 pro ženy v Evropě severní (Parkin a kol. 2005).

1.2.2.1 Melanom B16

Výzkumy terapie nádorových onemocnění pomocí transplantace nádorových buněk do lidského těla nejsou z pochopitelných důvodů možné. Je proto třeba hledat vhodný savčí model. Tím jsou pro relativně malou nákladnost svého chovu, dobrou znalost genetické informace i krátkou generační dobu myši. Ve výzkumu je využíváno mnoho kmenů rakovinných buněk odvozených od různých myších tkání. Jedním z melanomových modelů je buněčná linie B16.

Buněčná linie B16 je odvozena od melanomu inbredního kmene černých laboratorních myši C57BL/6. Během 5- 10 dnů po subkutánní transplantaci buněk se objeví hmatatelný nádor, který během 2-3 tří týdnů dosáhne rozměrů 1000 mm³ (Overwijk a kol. 2001). V dalších fázích růstu se objevují nekrózy tkáně, často doprovázené hnisáním a krvácením. Linie B16 se též často využívají pro plicní metastázový model. Transplantované buňky putují krevním řečištěm a osidlují plicní tkáň, kde vytvářejí sekundární nádory (Overwijk a kol. 2001). Z původní linie B16-F0 byly odvozeny linie B16-F1 a B16-F10 z té byla později odvozena ještě více metastazující linie B16-BL6 (Nakamura a kol. 2002).

1.3 Terapie nádorových onemocnění

V současné době je uplatňováno několik přístupů k léčbě nádorů. Každý druh terapie má své uplatnění, výhody a nevýhody a často je možné tyto druhy kombinovat.

Nejstarší formou léčby je chirurgické odstranění nádoru. Jeho výhodou je rychlost a možnost odstranění v ideálním případě celého primárního nádoru. Problémem je, že

nejčastější příčinou úmrtí pacientů nejsou primární nádory, ale metastázy (Cummins a kol. 2006). Proto se chirurgická léčba často kombinuje s radioterapií a chemoterapií. Chirurgickou léčbu nelze, vzhledem k umístění a rozsahu nádorů, vždy použít.

Pokud není možné chirurgické řešení, lékaři často přistupují k chemoterapii. Chemoterapie většinou využívá cytostatika, což jsou toxické látky, které škodí zejména rychle proliferujícím buňkám. Její použití je limitováno dopady chemoterapeutik na zdravou tkáň.

Podobně limitována je též radioterapie, při které se k likvidaci buněk používá ionizační záření. Ačkoliv je záření cíleno na nádor, dochází k poškozování okolní tkáně a v krajním případě může jeho vlivem dojít ke vzniku dalšího nádoru.

Další možností léčby je imunoterapie.

1.4 Imunoterapie

Imunoterapie nádorů je princip léčby nádorových onemocnění využívající přirozených mechanismů imunitního systému. Cílem je aktivovat protinádorovou imunitu.

1.4.1 Protinádorová imunita

Přirozeným úkolem imunitního systému je vyrovnávat se s cizorodými patogeny a likvidovat vlastní nepotřebné nebo poškozené buňky, mezi něž patří také buňky nádorové. Lidský organismus je vybaven řadou přirozených mechanismů, které jej chrání před vznikem a rozvojem nádorových onemocnění. O důležité úloze imunitního systému při potlačování rakoviny svědčí vyšší výskyt nádorů u imunodeficientních pacientů a experimenty, ve kterých byly použity kmeny myši s nefunkčními geny pro vytváření efektorových buněk (Hořejší a Bartůňková 2009). Buňkami s velkým významem pro zabránění vzniku nádorů a jejich potlačování jsou:

- a) **Makrofágy** – jsou významnou složkou vrozené protinádorové imunity. Fagocytují patogeny, apoptotické a nádorové buňky. Mají schopnost prezentovat antigeny nádorových buněk na svém povrchu, čímž aktivují ostatní buněčné složky protinádorové imunity, zejména T lymfocyty (Brunda a kol. 1977).
- b) **Dendritické buňky** – jsou antigen prezentující buňky fungující v protinádorové odpovědi obdobně jako makrofágy. Fagocytují nádorové buňky a jejich antigeny prezentují T lymfocytům, které tím aktivují a spouštějí tak jejich boj proti nádoru (Gunzer a kol. 2001).
- c) **NK buňky** – Jsou velké granulární lymfocyty, které nemají antigenně specifické receptory. Mají cytotoxickou aktivitu, která je aktivována kromě nádorových antigenů také nepřítomností MHC I. Kontakt s MHC I inhibuje jejich cytotoxickou reakci. Vzhledem k tomu, že nádorové buňky exprimují MHC I jen velmi omezeně, vede to k jejich zničení. NK buňky vykazují nižší afinitu k MHC I s navázanými abnormálními peptidy, což zvyšuje jejich schopnost odlišit transformované buňky od zdravých (Hořejší a Bartůňková 2009).
- d) **T lymfocyty** – Cytotoxické T lymfocyty rozpoznávají abnormální peptidy prezentované na povrchu buněk v kombinaci s MHC. Jejich prekurzory dozrávají při kontaktu s antigenem na povrchu antigen prezentujících buněk (APC). Poté dojde k množení a dozrávání. Zralé T_c lymfocyty vyhledávají transformované nebo patogeny napadené buňky, které prezentují špatné peptidy, a ty poté zabijí. (Alberts a kol. 2002) Obdobně fungují NKT lymfocyty. Ty rozpoznávají závadné peptidy v kombinaci s CD1d, což je zvláštní druh MHC. Nádorové buňky prezentují abnormální peptidy, proto jsou NKT lymfocyty rozpoznávány a ničeny (Terabe a kol. 2008).

Rakovina se může rozvinout jen v případě, že se nádorovým buňkám podaří uniknout likvidaci imunitním systémem. Mechanismů úniku před imunitním systémem je známo mnoho a jsou stále předmětem výzkumu.

- a) **Selekce** – nádorové buňky podléhají selekčnímu tlaku na vyvolávání co nejmenší imunitní odpovědi.
- b) **Produkce imunosupresivních látek** – nádory produkují látky, které potlačují imunitní odpověď. Například TGF- β má za normálních okolností tumor supresivní účinky. Ovšem když se rakovinná buňka stane proti tomuto cytokinu imunní, napomáhá jejímu uniku před T-lymfocyty (Mantel a kol. 2011). TGF- β totiž působí jako inhibitor proliferace a diferenciací T-lymfocytů (Gorelik a kol. 2002).
- c) **Modulace exprese MHC** – hlavní histokompatibilní komplex prezentuje T-lymfocytům a NK buňkám peptidy tvořené buňkou. Tyto imunitní buňky rozpoznávají produkci chybných peptidů v nádorových buňkách a buňkách napadených patogeny, které pak likvidují. Nádory mají schopnost uniknout pozornosti T lymfocytů snížením exprese MHC molekul na svém povrchu (Chitadze a kol. 2013). Snížená exprese MHC však vyvolává pozornost NK buněk, které nádorové buňky zabíjejí.
- d) **Absence kostimulačních molekul** – T- lymfocyty potřebují ke své stimulaci nejen nádorový antigen, ale také kostimulační molekuly. V případě jejich absence jsou naopak T- lymfocyty tlumeny (Hořejší a Bartůňková 2009). Chybějící kostimulační molekuly CD80 a CD86 u nádorových buněk způsobují potlačení protinádorové imunity (Moeller a kol. 2004).
- e) **Skrytí povrchových antigenů** – nádorové antigeny se na povrchu buněk vyskytují v malé hustotě, která může být tolerována imunitním systémem. Nádorové epitopy jsou též maskovány vlivem sializace povrchu buněk (Hořejší a Bartůňková 2009).

- f) **Produkci Fas ligandu** – Fas ligand spouští apoptózu tumor infiltrujících T-lymfocytů. (Lee a kol. 2012).

1.5 Imunoterapie využívající specifické imunity

Specifická nebo také získaná či adaptivní imunita je souborem mechanismů založených na vysoce specifických molekulách a imunologické paměti. Vyvíjí se až po narození při kontaktu s cizorodými nebo škodlivými strukturami. Má schopnost přizpůsobovat se novým patogenům a zapamatovat si jejich antigeny. Velmi přesně rozlišuje nepřeberné množství antigenů a rozeznává i drobné rozdíly mezi nimi. Má pomalejší nástup než nespecifická imunita. Při opakovaném setkání se však rychlost a průběh reakce mění. Má dvě části – buněčnou a humorální. Buněčná složka specifické imunity zahrnuje působení B lymfocytů a T lymfocytů. Humorální složka zahrnuje působení protilátek a cytokinů. Specifická imunita nemůže fungovat samostatně a je vždy závislá na evolučně starších mechanismech nespecifické imunity. Dnes známe několik imunoterapeutických principů, které cílí na aktivaci protinádorové odpovědi specifické imunity.

1.5.1 Peptidové vakcíny

Tyto vakcíny využívají schopnosti lymfocytů přesně rozpoznávat nádorové antigeny. Pomocí uměle nasyntetizovaných antigenních determinant vyvolávají imunitní odpověď B a T lymfocytů. Tím aktivují mechanismy adaptivní imunity pro boj proti nádorovým buňkám, což může vést k rozsáhlým nekrotickým rakovinné tkáni (Pérez-Torres a kol. 2013). Pro zvýšení účinků se používají přídatné látky zesilující účinek, jako například cytokiny. Přestože peptidové vakcíny musí čelit velkému imunosupresivnímu tlaku rakoviny, mají velký význam jako ochrana pacientů před opětovným růstem nádorů po jejich chirurgickém odstranění.

1.5.2 DNA vakcíny

DNA vakcíny tvoří většinou plazmidy vnášející do organismu genetickou informaci, která pomocí transfekce buněk a produkce antigenů aktivuje specifickou imunitu pacienta. Vakcíny jsou cíleny buď přímo na antigen prezentující buňky (APC), které poté prezentují antigeny lymfocytům, nebo jsou vpraveny do buněk, které jsou následně APC fagocytovány (Stevenson a kol. 2004). Sekvencí kódujících antigeny pro DNA vakcíny je v současnosti využívána celá řada. Vakcíny mají zvrátit toleranci nádoru imunitním systémem a zaměřit na něj CD8⁺ T lymfocyty, které jej ničí. Aplikace probíhá buď injekčně, nebo pomocí „gene gun“. Tato metoda využívá pro transport genetické informace do buněk drobné zlaté projektily obalené DNA (Porgador a kol. 1998). Již od počátku výzkumu se pro posílení účinku DNA vakcín používají různá adjuvans. Ta mají za úkol aktivovat specifickou i nespecifickou imunitu v místě nádoru. Jsou to například cytokiny, heat-shock proteiny (Stevenson a kol. 2004), nebo anorganické soli (Ulmer a kol. 1999).

1.5.3 Využití protilátek

Protilátková terapie je v současné době jednou z neúspěšnějších a nejčastěji využívaných imunoterapeutických metod v boji proti nádorovým onemocněním. Stejně jako terapie pomocí peptidových vakcín využívá znalosti mnoha antigenů spojených převážně s nádory. Nejběžnější antigeny, na něž jsou cíleny protilátky, jsou uvedeny v Tab. I.

Antigen category	Examples of antigens	Tumor types expressing antigen
Cluster of differentiation (CD) antigens	CD20	non-Hodgkin lymphoma
	CD30	Hodgkin lymphoma
	CD33	Acute myelogenous leukemia
	CD52	Chronic lymphocytic leukemia
Glycoproteins	EpCAM	Epithelial tumors (breast, colon, lung)
	CEA	Epithelial tumors (breast, colon, lung)
	gpA33	Colorectal carcinoma
	Mucins	Epithelial tumors (breast, colon, lung, ovarian)
	TAG-72	Epithelial tumors (breast, colon, lung)
	Carbonic anhydrase IX	Renal cell carcinoma
	PSMA	Prostate carcinoma
Glycolipids	Folate binding protein	Ovarian tumors
	Gangliosides (e.g., GD2, GD3, GM2)	Neuroectodermal tumors, some epithelial tumors
Carbohydrates	Lewis-Y ²	Epithelial tumors (breast, colon, lung, prostate)
Vascular targets	VEGF	Tumor vasculature
	VEGFR	Epithelium-derived solid tumors
	$\alpha V\beta 3$	Tumor vasculature
	$\alpha 5\beta 1$	Tumor vasculature
Growth factors	ErbB1/EGFR	Glioma, lung, breast, colon, head and neck tumors
	ErbB2/HER2	Breast, colon, lung, ovarian, prostate tumors
	ErbB3	Breast, colon, lung, ovarian, prostate tumors
	c-MET	Epithelial tumors (breast, ovary, lung)
	IGF1R	Lung, breast, head and neck, prostate, thyroid, glioma
	EphA3	Lung, kidney, colon, melanoma, glioma, hematological malignancies
	TRAIL-R1, TRAIL-R2	Solid tumors (colon, lung, pancreas) and hematological malignancies
	RANKL	Prostate cancer and bone metastases
Stromal and extracellular matrix antigens	FAP	Epithelial tumors (colon, breast, lung, head and neck, pancreas)
	Tenascin	Glioma, epithelial tumors (breast, prostate)

Tab. I: Příklady nádorových antigenů používaných jako cíl pro protilátku (Scott a kol. 2012).

Jednou z cest je použití monoklonálních protilátek. Monoklonální protilátky jsou produktem klonální populace jedné plazmatické buňky, proto mají jednu specifitu a jeden izotyp (Hořejší a Bartůňková 2009).

Pro výběr vhodného antigenu, na který má být cílena protilátka, je nezbytné znát úroveň jeho exprese nejen v rakovinných buňkách, ale i ve zdravé tkáni, aby se předešlo nežádoucím účinkům léčby (Scott a kol. 2012). Způsobů, jak můžeme pomocí protilátek likvidovat nádorové buňky, je celá řada a daly by se rozdělit do dvou skupin.

- a) **Přímé zabití buněk** – to může proběhnout několika způsoby. Protilátka může vést buňku k apoptóze blokadou receptorů, neutralizací povrchových enzymů nebo jako receptorový agonista (Scott a kol. 2012). Další možností přímého zabití buněk je navázání toxinu nebo radioaktivního zářiče na protilátku.
- b) **Vyvolání imunitní odpovědi** – protilátka vyvolává likvidaci buňky imunitním systémem, a to jak imunity specifické, tak nespecifické. Z nespecifických principů jsou to aktivace komplementu, indukce fagocytózy a protilátkou způsobená aktivace NK buněk (Scott a kol. 2012). Specifické imunity se využívá při aktivaci

T lymfocytů, jde například o inhibici antigenů vyvolávajících toleranci nádoru Tc lymfocyty (Hodi a kol. 2010).

V současné době je již celá řada monoklonálních protilátek schválena pro klinické použití. Většinou se jedná o protilátky inhibující buněčnou signalizaci, nebo nosiče radioizotopů a toxinů. Seznam monoklonálních protilátek povolených v roce 2012 pro imunoterapii nádorů v USA, včetně povolených aplikací a mechanismu funkce, je uveden v Tab. II.

Antibody	Target	FDA-Approved indication	Mechanism of action
Trastuzumab (Herceptin [®]) humanized IgG1	HER2 (ErbB2)	HER2-positive breast cancer, as single agent or in combination with chemotherapy for (i) adjuvant or (ii) palliative treatment; HER2-positive gastric or gastroesophageal junction carcinoma, as first-line treatment in combination with cisplatin and capecitabine/5-FU	Inhibition of HER2 signaling; ADCC
Bevacizumab (Avastin [®]) humanized IgG1	VEGF	For the palliative treatment of colorectal cancer, non-squamous non-small cell lung cancer, glioblastoma, or renal cell carcinoma	Inhibition of VEGF signaling
Cetuximab (Erbix [®])* chimeric human/murine IgG1	EGFR (ErbB1)	In combination with radiation therapy for the initial treatment of locally or regionally advanced squamous cell cancer of the head and neck (SCCHN); As a single agent for SCCHN patients with whom prior platinum-based therapy has failed; Palliative treatment of pre-treated metastatic EGFR-positive colorectal cancer	Inhibition of EGFR signaling; ADCC
Panitumumab (Vectibix [®])* human IgG2	EGFR (ErbB1)	As a single agent for the treatment of pre-treated EGFR-expressing, metastatic colorectal carcinoma	Inhibition of EGFR signaling
Ipilimumab (Yervoy [®]) IgG1	CTLA-4	For the treatment of unresectable or metastatic melanoma	Inhibition of CTLA-4 signaling
Rituximab (Rituxan [®] and Mabthera [®]) chimeric human/murine IgG1	CD20	For the treatment of CD20-positive B cell non-Hodgkin lymphoma (NHL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL), and for maintenance therapy for untreated follicular CD20-positive NHL	ADCC; direct induction of apoptosis; CDC
Alemtuzumab (Campath [®]) humanized IgG1	CD52	As a single agent for the treatment of B cell CLL	Direct induction of apoptosis; CDC
Ofatumumab (Arzerra [®]) human IgG1	CD20	Treatment of patients with CLL refractory to fludarabine and alemtuzumab	ADCC; CDC
Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg [®]) humanized IgG4	CD33	For the treatment of patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse who are 60 years of age or older and who are not considered candidates for other cytotoxic chemotherapy (withdrawn from use in June 2010)	Delivery of toxic payload, calicheamicin toxin
Brentuximab vedotin (Adcetris [®]) chimeric IgG1	CD30	For the treatment of relapsed or refractory Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic lymphoma	Delivery of toxic payload, auristatin toxin
⁹⁰ Y-Ibritumomab Tiuxetan (Zevalin [®]) murine IgG1	CD20	Treatment of relapsed or refractory, low-grade, or follicular B cell NHL; Previously untreated follicular NHL in patients who achieve a partial or complete response to first-line chemotherapy	Delivery of the radio-isotope yttrium-90
¹³¹ I-Tositumomab (Bexxar [®]) murine IgG2	CD20	Treatment of patients with CD20 antigen-expressing relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed NHL	Delivery of the radio-isotope iodine-131; ADCC; direct induction of apoptosis

*Not recommended in colorectal cancer patients whose tumors express mutated KRas

Tab. II: Seznam protilátek povolených k onkologickému využití v USA v roce 2012 (Scott a kol. 2012).

Dalším směrem léčby je využití bispecifických protilátek. Tyto protilátky mají dvě různě specifická vazebná místa. Jedno je cíleno na povrch nádorové buňky, druhé na efektorovou buňku imunitního systému (Weiner a kol. 2010).

1.5.4 In vitro úprava nádorových buněk

Tato metoda spočívá v odebrání nádorových buněk a úpravě jejich genetické informace pro lepší rozpoznání imunitním systémem. Těmto buňkám se pomocí cytostatik nebo ozáření zamezí v dělení a jsou vráceny zpět do těla pacienta. Navrácené buňky pak vyvolají protinádorovou odpověď T-lymfocytů (Hořejší a Bartůňková 2009). Nádorové buňky je také možné fúzovat s antigen prezentujícími buňkami (Lazova a kol. 2011). Vzniklé buňky pak prezentují antigeny T lymfocytům.

1.5.5 In vitro stimulace imunitních buněk

Je založena na odebrání imunitních buněk pacienta, jejich stimulaci a následném návratu do těla pacienta. Jsou to tzv. LAK, tedy NK buňky a T lymfocyty aktivované pomocí interleukinu 2 (Chong a kol. 1992). Dalšími imunitními buňkami, které je možné aktivovat, jsou TIL (tumor infiltrující lymfocyty). Ty jsou podobně jako LAK odebrány pacientovi, kultivací s interleukinem 2 aktivovány a vráceny zpět do pacienta. Po navrácení buněk do pacienta dochází k lepšímu rozpoznávání nádorových buněk imunitním systémem (Yamaue a kol. 1990). Oba tyto postupy nejsou v současnosti vzhledem k nízké účinnosti a poměrně velké náročnosti příliš rozšířeny.

1.5.6 Využití cytokinů

Cytokiny jsou malé molekuly proteinové povahy, které mají signální a regulační úlohu v imunitní odpovědi. Velká část komunikace mezi buňkami probíhá prostřednictvím jejich přímého kontaktu, komunikace pomocí cytokinů má však mnohem větší dosah, proto je stěžejní pro rychlou aktivaci a souhru jednotlivých účastníků imunitní odpovědi. Vzhledem k významné úloze cytokinů v imunitním systému je jejich využití pro boj s nádorovými onemocněními předmětem intenzivního výzkumu. Úloha jednotlivých cytokinů v imunitní

odpovědi je různá a jejich působení často pleiotropní (Lee a kol. 2011). Z hlediska funkce v protinádorové imunitě bychom cytokiny mohli rozdělit do dvou skupin. Jsou to cytokiny aktivující a cytokiny supresivní.

1.5.6.1 Aktivující cytokiny

Většina cytokinů má schopnost aktivovat protinádorovou imunitu, jejich podávání má tedy pozitivní vliv na potlačení nádoru. Níže jsou uvedeny ty, které jsou předmětem nejintenzivnějšího výzkumu.

Interleukin 2

Patří mezi růstové faktory T lymfocytů, ale má také velký význam pro jejich regulaci (Thorton a kol. 2004). Účastní se aktivace a proliferace T lymfocytů, NK buněk a B lymfocytů. U NK buněk také vyvolává cytotoxickou aktivitu a sekreci dalších cytokinů účastnících se imunitní odpovědi (Lee a kol. 2011). Je produkován převážně Th1 lymfocyty (Voss a kol. 1989). IL 2 také podporuje účinek protinádorových vakcín a to prostřednictvím zvýšení funkce Tc lymfocytů (Lee a kol. 2011). Klinické uplatnění nachází zejména při léčbě melanomů a rakoviny ledvin (Atkins a kol. 2004). U 6 - 8 % dochází k trvalému vymizení všech metastáz (Schwartzentruber a kol. 2001). Jeho využití však komplikuje celá řada velmi nepříjemných nežádoucích účinků na organismus pacienta. Aplikaci IL-2 doprovází poškození cév, abnormality v srdeční činnosti, otoky, horečky, zvracení, anemie, trombocytopenie a v některých případech může dojít i k dočasnému narušení funkce jater a ledvin (Lee a kol. 2011).

Interleukin 7

IL-7 je cytokin uplatňující se při vývoji B lymfocytů a je nezbytný pro život a funkci T lymfocytů. Myši, které produkují nefunkční IL-7, trpí těžkou kombinovanou imunodeficiencí (SCID), tedy nemají prakticky žádné T lymfocyty (Puel a kol. 1998). Jeho terapeutický význam tkví zejména v podpoře expanze Tc lymfocytů.

Interleukin 12

IL-12 je prozánětlivý cytokin produkovaný převážně fagocytujícími buňkami jako odpověď na stimulaci antigenem. Funguje jako růstový faktor T lymfocytů a NK buněk a vede k produkci dalších cytokinů, zejména IFN- γ (Trinchieri G). IL-12 byl zkoumán zejména pro léčbu melanomů, rakoviny prsu, rakoviny tlustého střeva a sarkomů, účinky léčby jsou však relativně nízké (Lee a kol. 2011). IL-12 by mohl najít uplatnění jako adjuvans pro protinádorové vakcíny.

Interleukin 15

IL-15 je cytokin strukturně podobný IL-2. Stimuluje aktivaci a proliferaci T lymfocytů. Testování klinického využití IL-15 je zatím v počátcích.

Interleukin 21

IL-21 je produkován hlavně Th lymfocyty a v imunitní odpovědi má celou řadu úloh. Zejména stimuluje proliferaci T lymfocytů a podporuje cytotoxicitu NK buněk a Th lymfocytů. Výzkum jeho možného uplatnění v klinické imunoterapii začal teprve nedávno.

GM-CSF

GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) je cytokinem se širokou paletou úloh v imunitním systému. Je mediátorem dozrávání makrofágů, stimuluje protinádorovou aktivitu T lymfocytů, zejména NKT buněk, pomocí spřažených cytokinů se účastní růstu eozinofilů a dozrávání dendritických buněk (Shearer a kol. 2003). Je produkován aktivovanými T lymfocyty, eosinofily, žírnými buňkami, bazofily, makrofágy, endoteliálními buňkami a stromálními buňkami kostní dřeně (Shearer a kol. 2003). Je intenzivně zkoumán pro přímé využití v protinádorové léčbě. Dobré výsledky přináší například genetické pozměnění nádorových buněk za účelem produkce GM-CSF (Gupta a kol. 2010). Nachází uplatnění jako adjuvans pro protinádorové vakcíny (Armitage a kol. 1998).

Interferony

Interferony jsou skupinou cytokinů primárně se účastnící boje s virovou infekcí. Mají však velký potenciál uplatnění imunoterapii nádorů, zejména pak IFN- α a IFN- β . Tyto interferony aktivují Tc lymfocyty, NK buňky a makrofágy a stimulují nádorové buňky k expresi MHC (Lee a kol. 2011). Účastní se také procesu dozrávání dendritických buněk (Trepiaakas a kol. 2009). Mají negativní vliv na angiogenezi uvnitř nádoru a mohou indukovat apoptózu rakovinných buněk (Chawla-Sarkar a kol. 2003). IFN- α je v současné době zkoumán pro využití v léčbě různých druhů nádorů, nejčastěji se však používá při léčbě melanomů. Léčba má však řadu nežádoucích účinků, jako jsou horečka, zvracení, střevní problémy, bolesti svalů a hlavy a poruchy krve tvorby (Lee a kol. 2011). IFN- β má velký potenciál pro imunoterapii nádorů zejména proto, že snižuje proliferaci rakovinných buněk. Protinádorové účinky využitelné pro léčbu má také IFN- γ .

TNF

Tumor necrosis factor je produkován makrofágy, NK buňkami a T lymfocyty. Indukuje apoptózu nádorových buněk a narušuje nádorovou vaskularizaci, s čímž souvisí i velmi výrazné nežádoucí účinky, neboť poškozuje i cévy ve zdravé tkáni (van Horssen a kol. 2006). V klinické terapii se používá pouze lokálně při léčbě sarkomů měkkých tkání a melanomů (van Horssen a kol. 2006).

1.5.6.2 Supresivní cytokiny

Tyto cytokiny potlačují protinádorovou imunitní odpověď, proto je v rámci terapie třeba jejich účinky blokovat.

TGF- β

Transforming growth factor β slouží jako nejvýznamnější imunosupresor z řad cytokinů a podílí se na toleranci nádorů imunitním systémem. Zpočátku sice působí proti proliferaci nádorových buněk, později však jeho pronádorové účinky převáží. V organismu slouží jako

obrana před autoimunitními onemocněními (Wrzesinski a kol. 2007). Inhibuje aktivaci a proliferaci efektorových T lymfocytů a podporuje činnost regulačních buněk (Li a kol. 2006). Omezuje také diferenciaci NK buněk, makrofágů a dendritických buněk (de Visser a kol. 1999). Pro imunoterapii je tedy velice přínosné účinky TGF- β blokovat. To se provádí pomocí monoklonálních protilátek, fúzních proteinů nebo antisense oligonukleotidů (Hahn a kol. 2006). Dalšími možnými cestami jsou inhibitory kináz nebo ex vivo úprava nádorových buněk ke snížení exprese TGF- β (Wrzesinski a kol. 2007). Seznam inhibitorů imunosupresní funkce TGF- β je uveden v Tab. III.

Drug	Type	Target	Stage
AP12009	Oligonucleotide	TGF- β 2	Phase II
AP-11014	Oligonucleotide	TGF- β 1	Preclinical
Lerdelimumab (CAT 152)	Antibody	TGF- β 2	Phase III
Metelimumab (CAT 192)	Antibody	TGF- β 1	Phase II
GC-1008	Antibody	All isoforms of human TGF- β	Phase I
ID11	Antibody	All isoforms of murine TGF- β	Preclinical
Ly550410	Small-molecule inhibitors	TGF- β RI kinase	Preclinical
Ly580276			
Ly364947			
Ly2109761			
Ly573636	Small-molecule inhibitor	TGF- β RI kinase	Phase II
SB-505124	Small-molecule inhibitor	TGF- β RI kinase	Preclinical
SB-431542			
SD-208	Small-molecule inhibitor	TGF- β RI kinase	Preclinical
SD-093			
Ki26894	Small-molecule inhibitor	TGF- β RI kinase	Preclinical
Sm16	Small-molecule inhibitor	TGF- β RI kinase	Preclinical
Trx-xFoxH1b	Interacting peptide aptamers	Smads	Preclinical
Trx-Lef1			
Antisense-transfected tumor cells	Vaccine	TGF- β 2	Phase I and II
Soluble TBR2-Fc	Stabilized soluble protein	TGF- β Rs	Preclinical

Tab. III: Inhibitory účinků TGF- β , jejich rozdělení a fáze klinických testů k roku 2007

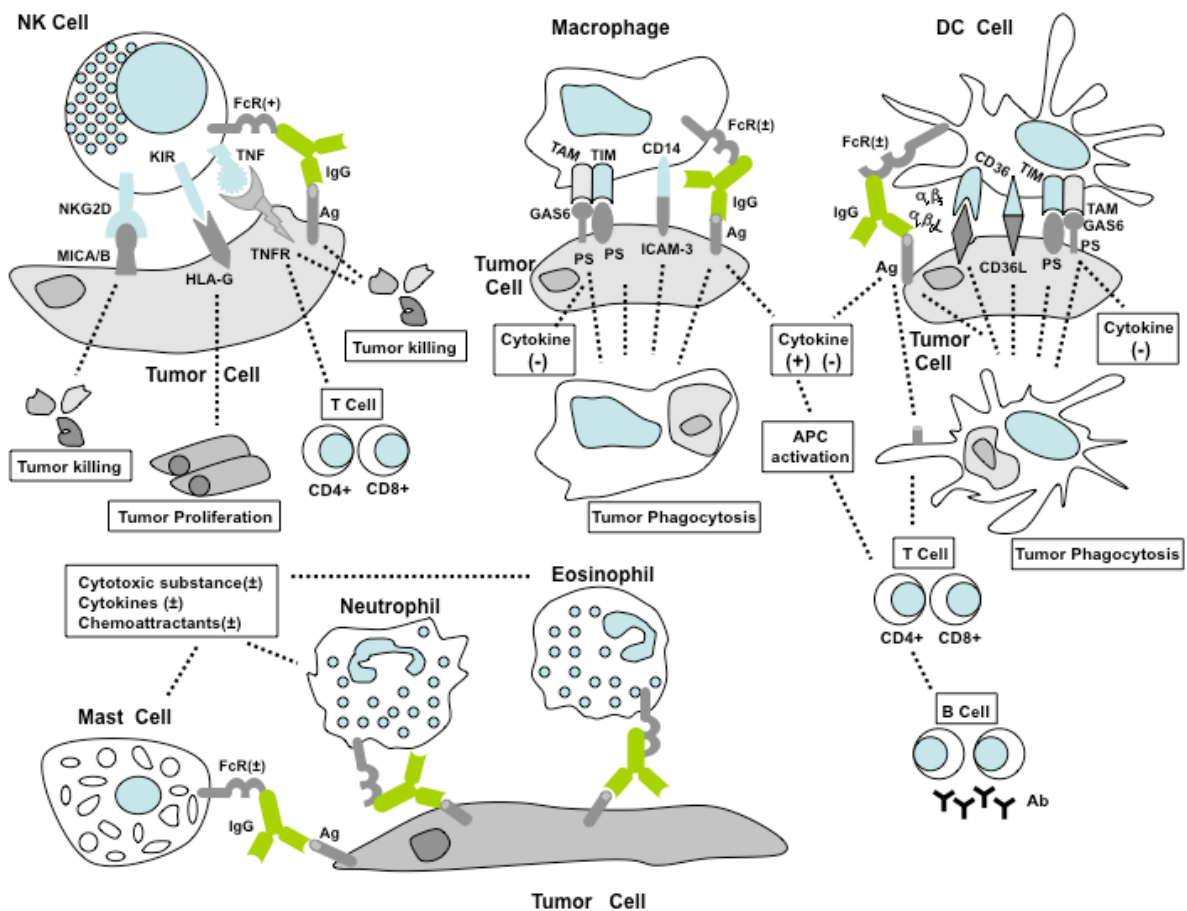
(Wrzesinski a kol. 2007).

Interleukin 10

IL-10 je cytokin, který má schopnost stimulovat i potlačovat protinádorovou imunitu. Stimuluje proliferaci rakovinných buněk a inhibuje jejich apoptózu. Omezuje funkci makrofágů a expresi aktivujících cytokinů Th buňkami (Moore a kol. 2001). Zároveň potlačuje angiogenezi uvnitř nádorů a stimuluje funkci B lymfocytů, proto se názory na zařazení IL-10 mezi supresivní cytokiny a jeho využití různí (Mocellin a kol. 2005). Většina studií však vychází z předpokladu, že IL-10 pomáhá úniku nádorů před imunitním systémem a testuje jeho blokaci antisense oligonukleotidy (Kim a kol. 2000) nebo protilátkami (Vicari a kol. 2002).

1.6 Imunoterapie využívající nespecifickou imunitu

Nespecifická imunita je vývojově starší než imunita specifická. Reaguje rychle, prakticky okamžitě, a nemá paměť. Při setkání s patogenem funguje vždy stejně rychle a na základě stejných principů. Má buněčnou a humorální složku. Humorální část tvoří komplement. Buněčná část je tvořena zejména fagocyty, NK buňkami a antigen prezentujícími buňkami, jejichž prostřednictvím je spojena se specifickou imunitou. Principy fungování buněk nespecifické imunity jsou uvedeny na Obr. 1



Obr. 1: Mechanismy likvidace nádorových buněk prostřednictvím buněk nespecifické imunity (Liu a Zeng 2012).

Komplement

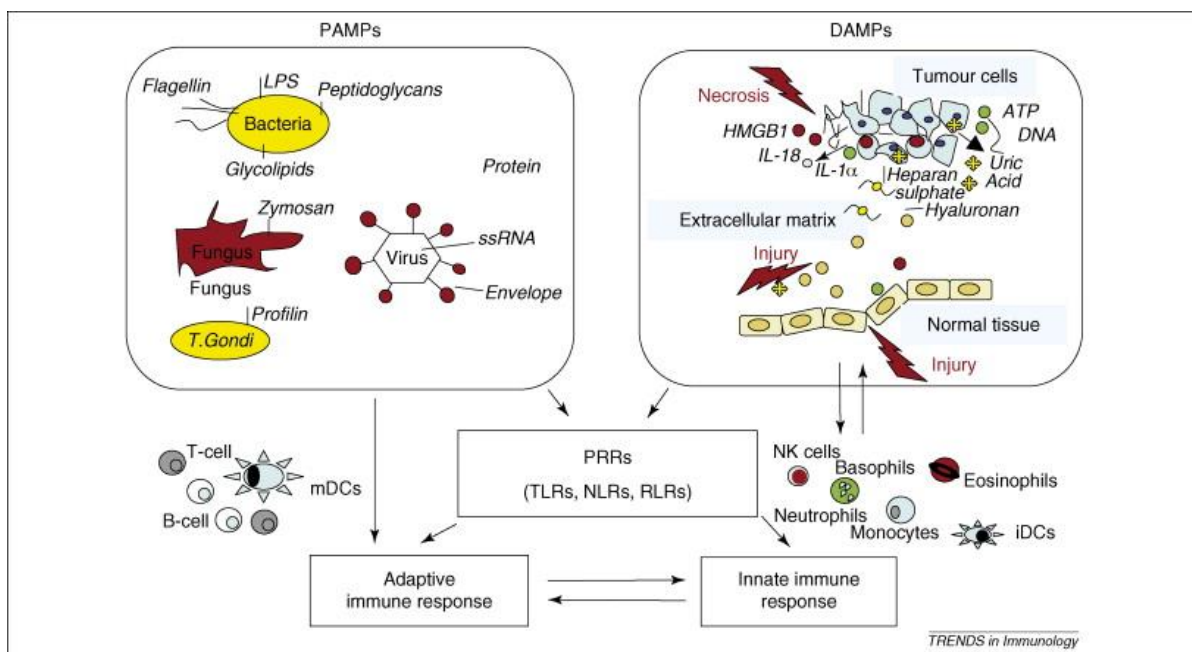
Komplement je soubor sérových a membránových proteinů, které tvoří humorální složku nespecifické imunity. Jednotlivé prvky komplementu kooperují vzájemně mezi sebou i s ostatními složkami imunitního systému (Hořejší a Bartůňková 2009). Komplement má v imunitním systému několik funkcí. Jednou z nich je opsonizace, tedy navázání molekuly na antigen, sloužící k rozpoznání a následnému zničení patogenu fagocytujícími buňkami. Další je chemotaxe, proces, ve kterém proteiny komplementu působí jako atraktanty pro imunitní buňky. Komplement také může ničit patogenní buňky přímo osmotickou lýzou.

1.6.1 Fagocytóza

Fagocytóza je děj, při kterém buňka pohltí částici z okolí. Je evolučně velmi stará, vyskytuje se už u prvoků, kterým slouží k pohlcování potravy. V imunitním systému slouží zejména k likvidaci extracelulárních patogenů a apoptotických buněk. Fagocytující buněk je celá řada. Jsou to neutrofilní, bazofilní a eosinofilní granulocyty, dále dendritické buňky a makrofágy, které fungují jako antigen prezentující buňky. Fagocytující buňky pomocí vlastních receptorů rozpoznávají určité molekulární vzory patogenních organismů a vlastních nefunkčních buněk. Tyto vzory můžeme rozdělit do dvou skupin – DAMPs a PAMPs (Liu a Zeng 2012).

1.6.2 PAMPs a DAMPs

DAMPs, neboli Damage-associated molecular patterns, jsou molekuly typické pro poškozené buňky, které vyvolávají imunitní odpověď. Imunitní buňky jsou vybaveny receptory pro jejich rozpoznávání (Rubartelli a Lotze 2007). Jedná se o strukturní části buněk a metabolity, které se za normálních okolností nacházejí uvnitř, ale v případě poškození nebo zničení buňky se dostanou na povrch nebo do mezibuněčného prostoru (Liu a Zeng 2012). Jedná se například o nukleové kyseliny, HSP, ATP, nebo kyselinu močovou. Další příklady jsou uvedeny na Obr. 2. Řada DAMPs je intenzivně zkoumána pro možné využití jako adjuvans protinádorových vakcín (Liu a Zeng 2012). Některé rozpoznávací receptory imunitních buněk jsou společné pro DAMPs i PAMPs (Adib-Conquy, Cavaillon 2007). Zvláštní skupinou jsou mitochondriální DAMPs. Vzhledem k evoluční historii mitochondrií, které vznikly z bakterií, jsou mitochondriální motivy rozpoznávány stejnými receptory jako motivy patřící prokaryotním patogenům (Liu a Zeng 2012). Jsou to tedy DAMPs, které se však ve vztahu k imunitnímu systému chovají jako PAMPs.



Obr. 2: Rozdělení částic rozpoznávaných pomocí PRRs (Pattern Recognition Receptors) (Liu a Zeng 2012).

PAMPs, neboli Pathogen-associated molecular patterns, jsou molekuly, jejichž prostřednictvím imunitní buňky rozpoznávají patogeny. Tyto molekuly se vyskytují na povrchu patogenních mikroorganismů a odlišují je od vlastních buněk. Přítomnost PAMPs na povrchu buněk je pro imunitní buňky signálem k jejich fagocytóze.

Často se jedná o mikrobiální nukleové kyseliny, lipoproteiny, povrchové glykoproteiny, peptidoglykany, lipoteichoovou kyselinu, LPS a glykosylfosfatidylinositol (Tang a kol. 2012). Tyto molekuly jsou rozpoznávány celou řadou PRRs (Pattern Recognition Receptors). Přehled a rozdělení PRRs je uveden v Tab. IV.

PRRs	PAMPs	Signaling pathway activated
TLRs		
TLR1-TLR2	Triacylated lipopeptide	MyD88-dependent activation of NF-κ B
TLR2-TLR6	Diacylated lipopeptide	MyD88-dependent activation of NF-κ B
TLR4	LPS	MyD88-dependent activation of NF-κ B and TRIF-dependent activation of

PRRs	PAMPs	Signaling pathway activated
		NF-κB and IRF3
TLR3	Poly(I:C)	TRIF-dependent activation of NF-κB and IRF3
TLR7	ssRNA	MyD88-dependent activation of NF-κB and IRFs
TLR9	CpG-DNA	MyD88-dependent activation of NF-κB and IRFs
RLRs		
RIG-I	Paramyxoviridae, short blunt dsRNA bearing a 5' triphosphate (<50 bp), and short poly(I:C) (<300 bp)	IPS-1–dependent activation of NF-κB and IRFs and inflammasome activation
MDA5	Picornaviridae, long dsRNA, and long poly(I:C)	IPS-1–dependent activation of NF-κB and IRFs
LGP2	?	Positively regulating RLR signaling
NLRs		
NOD2	Muramyl dipeptide	RIP2-dependent activation of NF-κB
NALP3	Uric acid crystal, silica, asbestos, hemozoin, zymosan, <i>C albicans</i> , influenza virus, <i>L monocytogenes</i> , <i>S aureus</i>	Inflammasome activation
IPAF	Flagellin, <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Shigella flexneri</i>	Inflammasome activation
AIM2	dsDNA	Inflammasome activation
CLRs		
Mincle	SAP130 nuclear protein, <i>Malassezia</i> species, trehalose dimycolate	Syk-dependent signaling
Clec9a/DNGR-1	Necrotic cells	Syk-dependent signaling

Tab. IV: Přehled a rozdělení PRRs, PAMPs, které rozpoznávají, a signalizační dráhy, které aktivují (Kumagai a Akira 2010).

Historie využití PAMPs pro léčbu nádorových onemocnění sahá až do 19. století. Roku 1891 William B. Coley za účelem zmenšení neoperovatelných nádorů úspěšně injikoval do těla pacientů streptokoky. Později léčbu prováděl pomocí usmrcených bakterií a bakteriálních produktů (McCarthy 2006). Ve 20. století se léčba posunula přes použití PAMPs izolovaných z mikroorganismů až k syntetickým molekulám (Krieg a Wagner 2000).

LPS

LPS neboli lipopolysacharidy jsou povrchové molekuly gramnegativních bakterií. Skládají se z hydrofobní lipidické části a polysacharidového řetězce (Raetz a Whitfield 2002). V savčím organismu vyvolávají silnou imunitní odpověď. Makrofágy, které přijdou do kontaktu s LPS, produkují velké množství cytokinů, jež aktivují další imunitní buňky (Tateda a kol. 1996). LPS jsou imunitními receptory rozpoznávané pomocí receptorů TLR 4 (Lu a kol. 2008). Lidský organismus je na LPS velice citlivý a jeho aplikace do něj je nebezpečná, používá se proto pro stimulaci protinádorové imunity jen u myši, u nichž je letální dávka řádově vyšší (Dinges a Schlievert 2001).

β -glukany

β -glukany jsou polysacharidy tvořené D-glukózovými monomery spojenými β -glykosidickou vazbou. Vyskytují se u bakterií, hub, kvasinek a rostlin. Imunitní systém obratlovců je rozpoznává jako PAMPs. β -glukanů je celá řada a mnohé nacházejí uplatnění v protinádorové léčbě. Jak zjistila Auerová (2012), slibné výsledky přináší například laminarin kotvený pomocí BAM na povrch buněk se současnou aplikací LPS. Dalšími příklady β -glukanů způsobujících potlačení nádorů jsou zymosan A (Waldmannová 2012) a mannan (Bruzlová 2012) a (Maierová 2012).

Formylmethioninové peptidy

Jedná se o peptidy začínající aminokyselinovou sekvencí formylmethioninem, což je typické pro bakterie. U bakterií touto aminokyselinou začíná syntéza proteinů. Formylmethioninové

peptidy se kromě prokaryot vyskytují pouze u mitochondrií, které se za normální okolností nachází uvnitř buněk a nepřicházejí tedy do kontaktu s imunitními buňkami, jsou proto rozpoznávány jako PAMPs. Jsou rozpoznávány receptory FPR1, FPR2 a FRP3. Již bylo dokázáno, že formylmethioninový motiv f-MLF působí jako chemoatraktant pro leukocyty (Hayashi a kol. 2013).

1.6.2.1 f-MLF peptidy v imunoterapii nádorů

Již několik let je znám princip spontánní regrese nádorů (Cui a kol. 2003). Tato regrese je způsobena zvýšenou aktivitou tumor infiltrujících leukocytů, které vyvolají zánět a destrukci nádorové tkáně. Tyto leukocyty jsou schopny odlišit nádorové buňky od vlastních (Hicks 2006). Tato regrese se však vyskytuje pouze u myši s mutací SR/CR (spontaneous regression / cancer resistant). Umělé vyvolání podobného efektu by mohlo znamenat průlom v terapii nádorů. K tomu se nabízí použití peptidového motivu f-MLF. Jak zjistila ve své práci Vácová (2013), f-MLF nespecificky kotvený na povrch buněk způsobuje redukcí nádorového růstu.

Cestou k vyvolání ještě masivnější imunitní odpovědi může být specifické kotvení fagocytárního motivu na nádorové buňky, aby došlo k likvidaci nádorových buněk a zároveň nedocházelo k poškození zdravé tkáně. Proto je třeba hledat struktury odlišující nádorové buňky od zdravých. Dobrým terčem pro cílení protinádorových terapeutik je PS (fosfatidylserin). PS je membránový fosfolipid, který se vyskytuje na povrchu apoptotických a nádorových buněk, zatímco u zdravých buněk se nachází na vnitřní straně plasmatické membrány (Riedl a kol. 2011). Motiv f-MLF lze na povrch nádorových buněk upevnit pomocí peptidické sekvence vázající PS. Peptidy vázající se na PS byly doposud používány k detekci apoptózy (Laumonier a kol. 2006). Tím se zabýval Xiong a kol. (2011), jehož týmu se podařilo najít sekvence s velkou afinitou k PS. Ve své práci vycházel z PS vazebného motivu, který sdílí PS dekarboxyláza a protein kináza C, tedy enzymy se schopností vázat PS. Postupnými záměnami jednotlivých aminokyselin a následným měřením afinity pomocí povrchové plasmonové resonance došel k výsledku, že lepší vazebné vlastnosti než původní motiv (FNFRLKAGQKIRFG) má motiv FNFRLKAGAKIRFG.

2 Cíle práce

- Vyhledání vhodného tumor specifického peptidu, vhodného jako nosič pro ligandy fagocytárních receptorů.
- Testování protinádorového účinku molekul složených z tumor specifického peptidu a fagocytárního ligandu.

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Experimentální zvířata

Myši C57BL/6 (samice):

Původ: Charles River Laboratories,

Stáří: 8 týdnů

Hmotnost: cca 20 g

Fotoperioda: 12/12

Potrava: Neomezený přístup

Voda: Neomezený přístup

3.1.2 Buněčná linie

Použitá buněčná linie myšního melanomu B16-F10 byla darována prof. Říhovou z Mikrobiologického ústavu AV ČR, Praha.

Kultivace probíhala v RPMI 1640 s 10 % FCS, antibiotiky, glutaminem a merkaptoethanolem při teplotě 37° C. Atmosféra s obsahem 5 % CO₂ byla nasycena vodními parami.

3.1.3 Chemikálie

Peptid f-MLFGGGGGFNFRLKAGAKIRFG (Schafer-N, Dánsko)

Peptid f-MLFGGGGGGK (Schafer-N, Dánsko)

DOPE - N-(Succinimidyl-oxy-glutaryl)-L- α -phosphatidylethanolamin, Dioleoyl (NOF Corporation, Japonsko)

RPMI 1640 (Sigma-Aldrich)

LPS z E. coli 0111.B4 (Sigma-Aldrich)

Beta glukan (beta 1,3 D glukan Zdroj: Transfer Point, USA, Původ: Saccharomyces cerevisiae)

3.2 Metody

3.2.1 Transplantace

Transplantace 400 000 buněk v 0,1 ml RPMI 1640 byla provedena subkutánně do předem oholeného pravého boku myši.

3.2.2 Měření velikosti nádorů

Nádory byly měřeny pomocí kaliperu v intervalu 48 hodin. Objem nádoru byl počítán podle vzorce $V = \pi/6 AB^2$. Za A byla dosazena délka nádoru a za B byla dosazena výška nádoru.

3.2.3 Vyhodnocení počtu metastáz

Myši plíce byly po dobu minimálně jednoho týdne naloženy ve 4% formaldehydu, poté byly pod binolupou díky barevnému kontrastu vůči okolní tkáni sečteny metastázy.

3.2.4 Příprava f-MLFG₆-K-DOPE

6 ml 1 mM DOPE v PBS bylo smícháno s 6 ml 1 mM f-MLFGGGGGG-K. Reakce probíhala 1h při pokojové teplotě.

Sterilizace roztoků: všechny roztoky aplikované myším byly sterilizovány filtrací přes filtr s póry 0,22 mikrometrů.

3.2.5 Intraperitoneální aplikace f-MLFG₅FNFRLKAGAKIRFG

V pokusu bylo použito 24 jednotlivě chovaných myší, které byly rozděleny do 4 skupin po 6 kusech. Terapie byla zahájena 12. den po transplantaci. 14. den od začátku terapie byly myši usmrceny a byla na nich provedena analýza výskytu metastáz.

Terapeutika a způsob jejich aplikace:

f-MLFG₅FNFRLKAGAKIRFG: Intraperitoneální aplikace 200 μ l 1mM roztoku peptidu v PBS byla prováděna ve dnech: 0, 2, 4, 6, 8, 10.

β -glukan: 3 mg β -glukanu rozsuspendovaného v 50 μ l vody byly aplikovány perorálně ve dnech: 0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10.

PBS: Intraperitoneální aplikace sterilního PBS byla u kontrolní skupiny prováděna ve dnech: 0, 2, 4, 6, 8, 10.

Schéma léčby jednotlivých skupin:

A: f-MLFG₅FNFRLKAGAKIRFG + β -glukan.

B: β -glukan

C: f-MLFG₅FNFRLKAGAKIRFG

K: PBS

3.2.6 Intratumorální aplikace f-MLFG₅FNFRLKAGAKIRFG a f-MLFG₆-K-DOPE

V pokusu bylo použito 30 jednotlivě chovaných myší, které byly rozděleny do 6 skupin po 5 kusech. Terapie byla zahájena 12. den po transplantaci.

Terapeutika a způsob jejich aplikace:

f-MLFG₅FNFRLKAGAKIRFG: Intratumorální aplikace 50 μ l 0,5 mM roztoku peptidu v PBS byla prováděna ve dnech: 0, 1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 24, 25, 26.

f-MLFG₆-K-DOPE: Intratumorální aplikace 50 μ l 0,5 mM roztoku této látky v PBS byla prováděna ve dnech: 0, 1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 24, 25, 26.

PBS: PBS byl u kontrolní skupiny intratumorálně aplikován ve dnech 0,1,2 8,9,10, 16,17,18, 24,25,26

LPS: Ve vybraných skupinách (B, D) bylo před intratumorální aplikací k roztoku terapeutika přidáno LPS (0,5 mg/ml), intratumorální aplikace získaných roztoků byla provedena rovněž ve dnech 0, 1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 24, 25, 26. Ve stejných dnech byl aplikován roztok LPS (0,5 mg/ml PBS) ve skupině E

Schéma léčby jednotlivých skupin:

A: f-MLFG₆-K-DOPE

B: f-MLFG₆-K-DOPE + LPS

C: f-MLFG₅FNRLKAGAKIRFG

D: f-MLFG₅FNRLKAGAKIRFG + LPS

E: LPS

K: PBS

3.2.7 Test cytotoxicity f-MLFG₅FNRLKAGAKIRFG

Na 96 jamkové kultivační desce bylo v 3 skupinách po 4 jamkách kultivováno vždy 20 000 buněk melanomu B16-F10 ve 200 µl média RPMI 1640 s 10% BOFES. Po 24 hod bylo medium opatrně staženo a nahrazeno mediem novým:

1. skupina byla dalších 24 h kultivována ve 200 µl média RPMI 1640 s 10% BOFES a 2 mM f-MLFG₅FNRLKAGAKIRFG.

2. skupina byla 24 h kultivována ve 200 µl média RPMI 1640 s 10% BOFES a 0,5 mM f-MLFG₅FNRLKAGAKIRFG.

3. (kontrolní) skupina byla 24 h kultivována ve 200 µl média RPMI 1640 s 10% BOFES.

Po uplynutí 24 h byly buňky v jednotlivých jamkách trypsinizovány a sečteny pomocí Bürkerovy komůrky. Následně byl experiment statisticky vyhodnocen.

3.2.8 Statistické vyhodnocení dat

Statistické vyhodnocení výsledků měření objemu nádorů a cytotoxicity bylo provedeno pomocí Studentova t-testu v programu MS Excel.

Analýza přežívání byla vyhodnocena pomocí Kaplan-Meierova testu v programu Statistica 10.

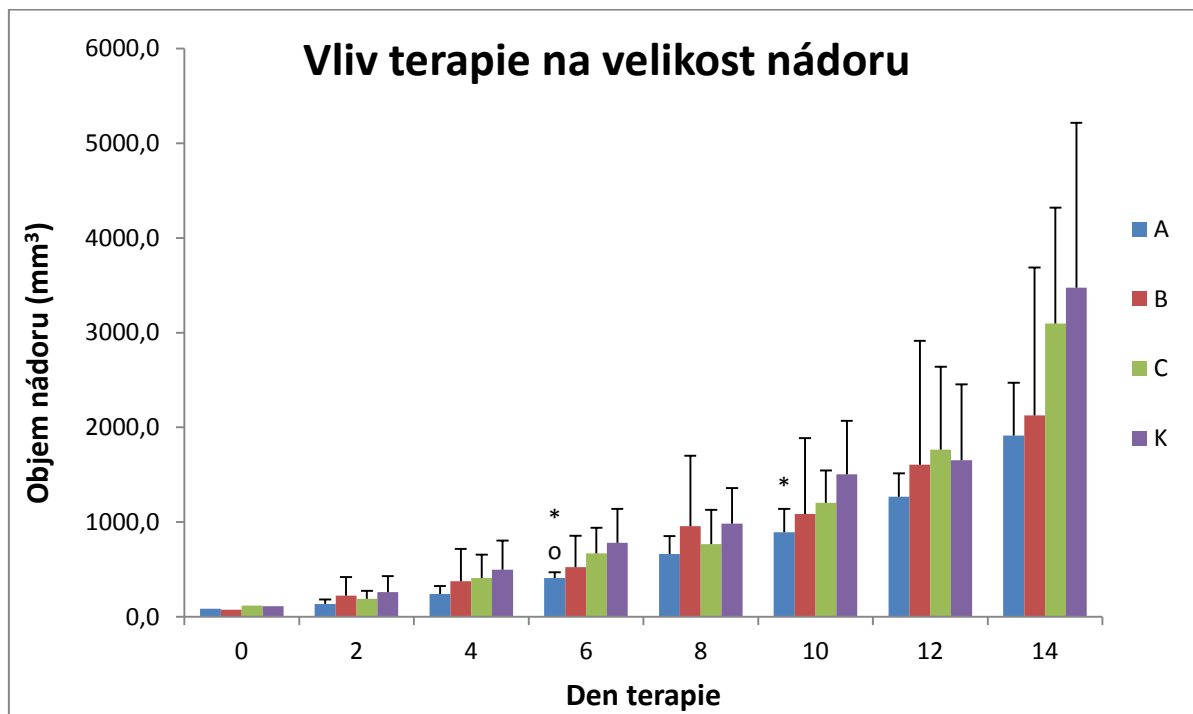
4 Výsledky

4.1 Intraperitoneální aplikace f-MLFG₅FNFRLKAGAKIRFG

4.1.1 Vliv terapie na velikost nádorů

Výsledky experimentu, ve kterém byl zkoumán vliv intraperitoneálně aplikovaného peptidu f-MLFG₅14AK na velikost nádoru, jsou uvedeny v grafu na Obr. 3.

Skupina, již byl aplikován f-MLFG₅14AK i β -glukan, vykazuje opakovaně statisticky významnou redukci nádorového růstu vůči kontrolní skupině, které byl podáván jen PBS. Stejná skupina také v jenom případě vykazuje statisticky významnou redukci nádorového růstu vůči skupině, které byl podáván samotný f-MLFG₅14AK. Z grafu je patrná synergie f-MLFG₅14AK a β -glukanu.



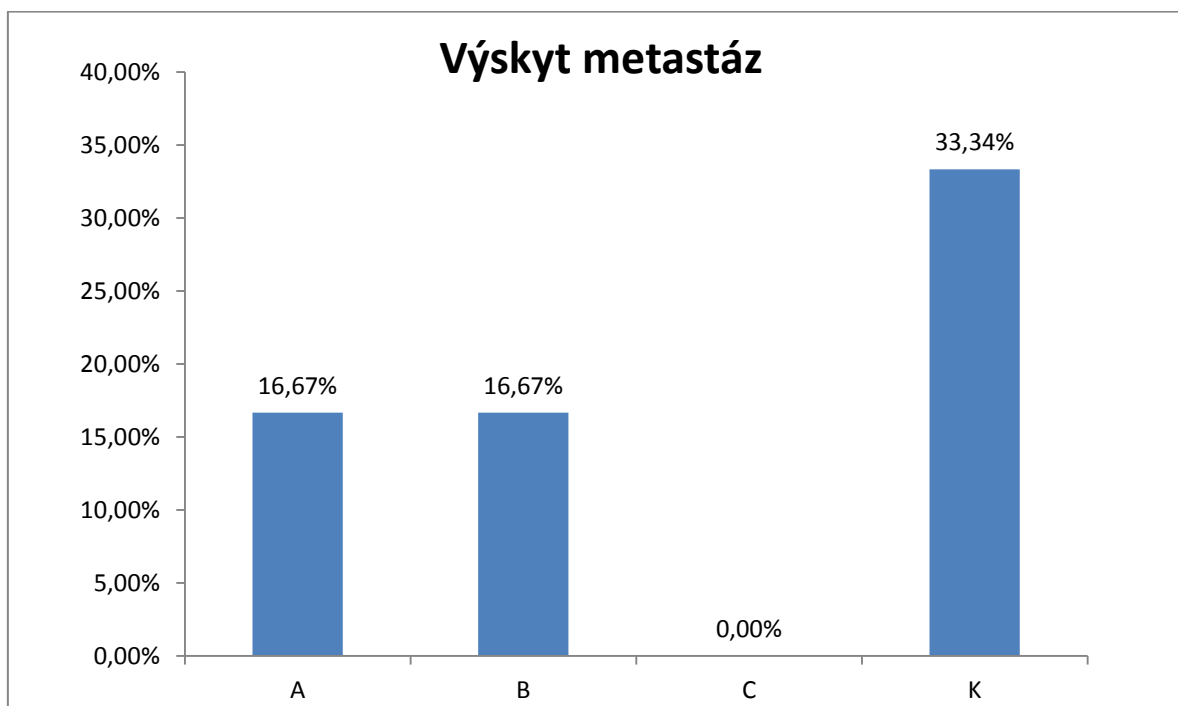
Obr. 3: Vliv terapie na velikost nádoru (skupina A - f-MLFG₅14AK + β -glukan , skupina B - β -glukan, skupina C - f-MLFG₅14AK, skupina K – PBS).

* = $p \leq 0,05$ vztaženo ke K.

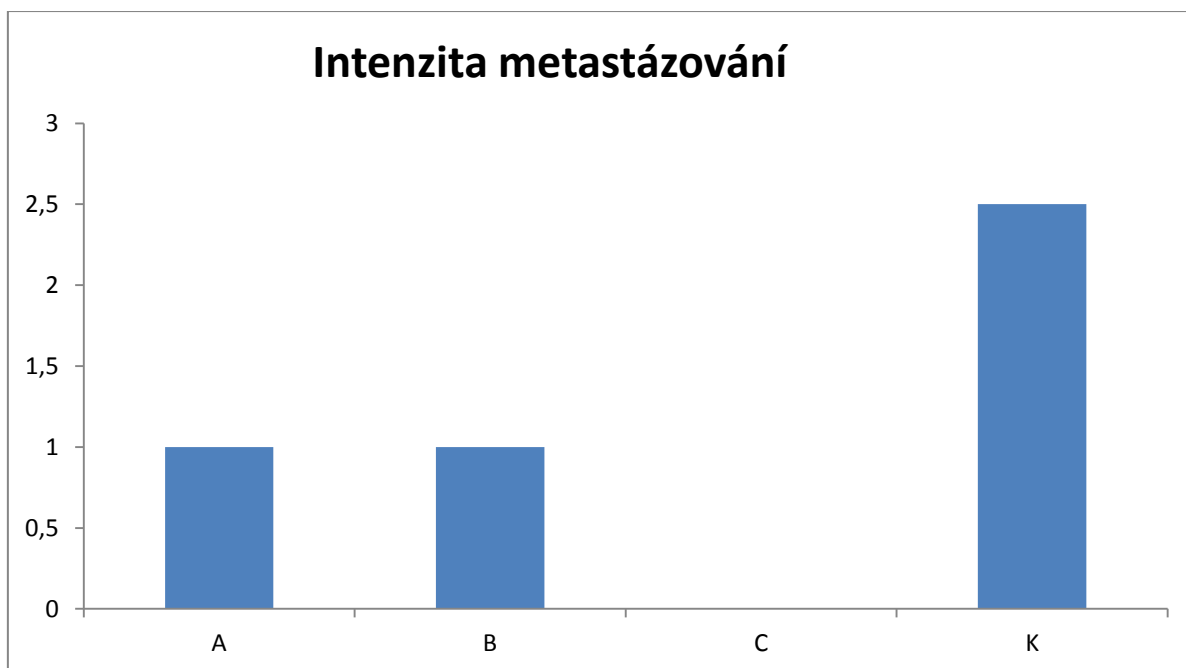
o = $p \leq 0,05$ vztaženo k C.

4.1.2 Vliv terapie na výskyt metastáz a intenzitu metastázování

Výsledky experimentu, ve kterém byl zkoumán vliv intraperitoneální aplikace peptidu f-MLFG₅14AK na výskyt metastáz a intenzitu metastázování, jsou uvedeny v grafech na Obr. 4 a Obr. 5. Z grafů je patrné, že jak samotný β -glukan, tak β -glukan v kombinaci s f-MLFG₅14AK způsobují snížený výskyt metastáz i sníženou intenzitu metastázování oproti kontrole. Ve skupině, která byla léčena samotným f-MLFG₅14AK, se dokonce nevyskytly žádné metastázy.



Obr. 4: Vliv terapie na výskyt metastáz (skupina A - f-MLFG₅14AK + β -glukan, skupina B - β -glukan, skupina C - f-MLFG₅14AK, skupina K - PBS).



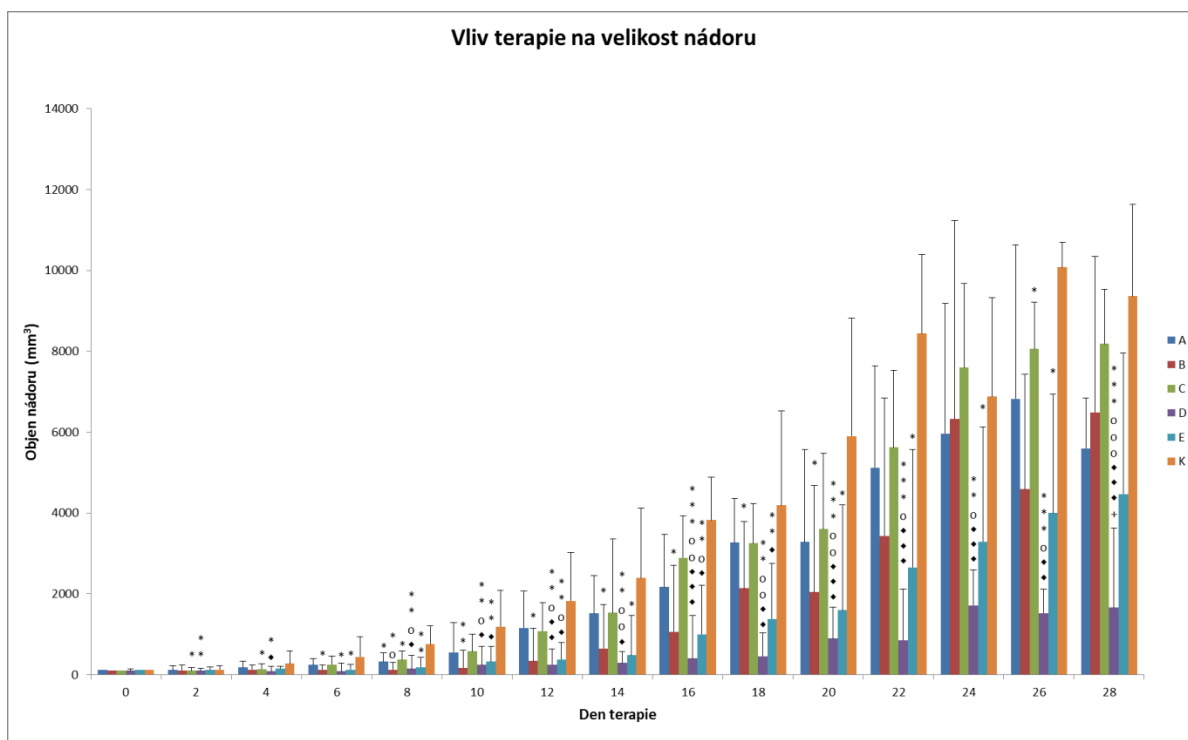
Obr. 5: Vliv terapie na intenzitu metastázování (skupina A - f-MLFG₅14AK + β -glukan, skupina B - β -glukan, skupina C - f-MLFG₅14AK, skupina K – PBS).

4.2 Intratumorální aplikace f-MLFG₅FNFRLKAGAKIRFG

4.2.1 Vliv terapie na velikost nádorů

Výsledky experimentu, v němž byl zkoumán vliv intratumorálně aplikovaného peptidu f-MLFG₅14AK ve srovnání s f-MLFG₆-K-DOPE, jsou vedeny v grafu na Obr. 6.

Současná aplikace samotného LPS a LPS v kombinaci f-MLFG₆-K-DOPE působí opakovaně statisticky významné potlačení nádorového růstu vůči kontrolní skupině. Skupina léčená pomocí samotného f-MLFG₅14AK vykazuje taktéž opakovaně statisticky významné potlačení nádorového růstu vůči kontrolní skupině. Nejlepší výsledky přináší kombinace f-MLFG₅14AK a LPS. Opakovaně vykazuje redukci nádorového růstu vůči kontrolní skupině na hladině významnosti $p \leq 0,001$. Také opakovaně dosahuje redukce růstu na hladině významnosti $p \leq 0,001$ vůči samotnému f-MLFG₅14AK a na hladině významnosti $p \leq 0,01$ vůči f-MLFG₆-K-DOPE. Léčba kombinací synergicky působících f-MLFG₅14AK a LPS přináší významně lepší výsledky než léčba pomocí f-MLFG₆-K-DOPE a LPS. Jednotlivé třídní terapeutické pulzy f-MLFG₅14AK a LPS na rozdíl od f-MLFG₆-K-DOPE a LPS vždy znovu způsobily výraznou redukci nádorového růstu.



Obr. 6: Vliv terapie na velikost nádoru (skupina A - fMLFG₆K-DOPE, skupina B – f-MLFG₆K-DOPE + LPS, skupina C - fMLFG₅14AK, skupina D - fMLFG₅14AK + LPS, skupina E - LPS, skupina K - PBS).

* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$ vztaženo ke K.

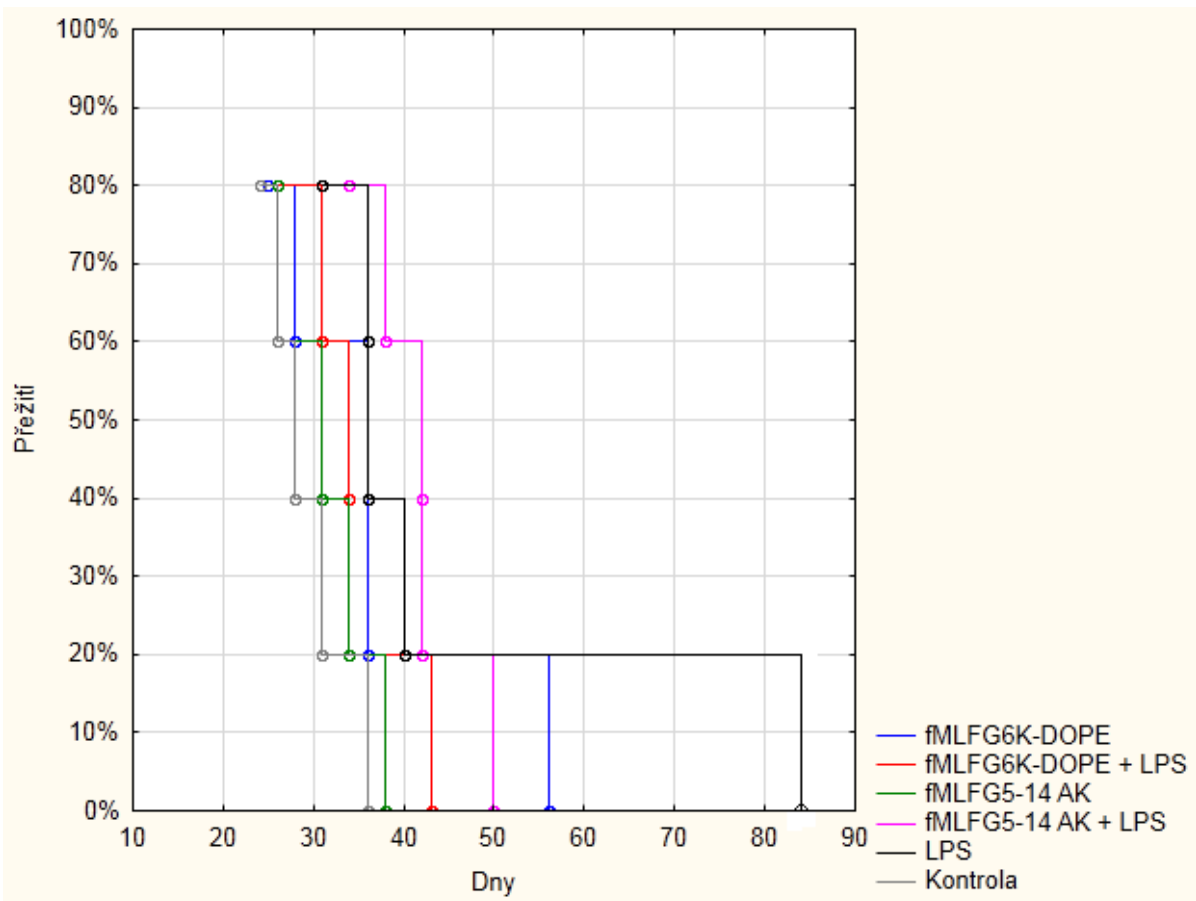
o = $p \leq 0,05$; oo = $p \leq 0,01$; ooo = $p \leq 0,001$ vztaženo k A.

◆ = $p \leq 0,05$; ◆◆ = $p \leq 0,01$; ◆◆◆ = $p \leq 0,001$ vztaženo k C.

+ = $p \leq 0,05$ vztaženo k B.

4.2.2 Vliv terapie na přežití

Analýza přežívání pokusných zvířat je uvedena na Obr. 7. Žádná skupina nevykazuje statisticky významné prodloužení života.

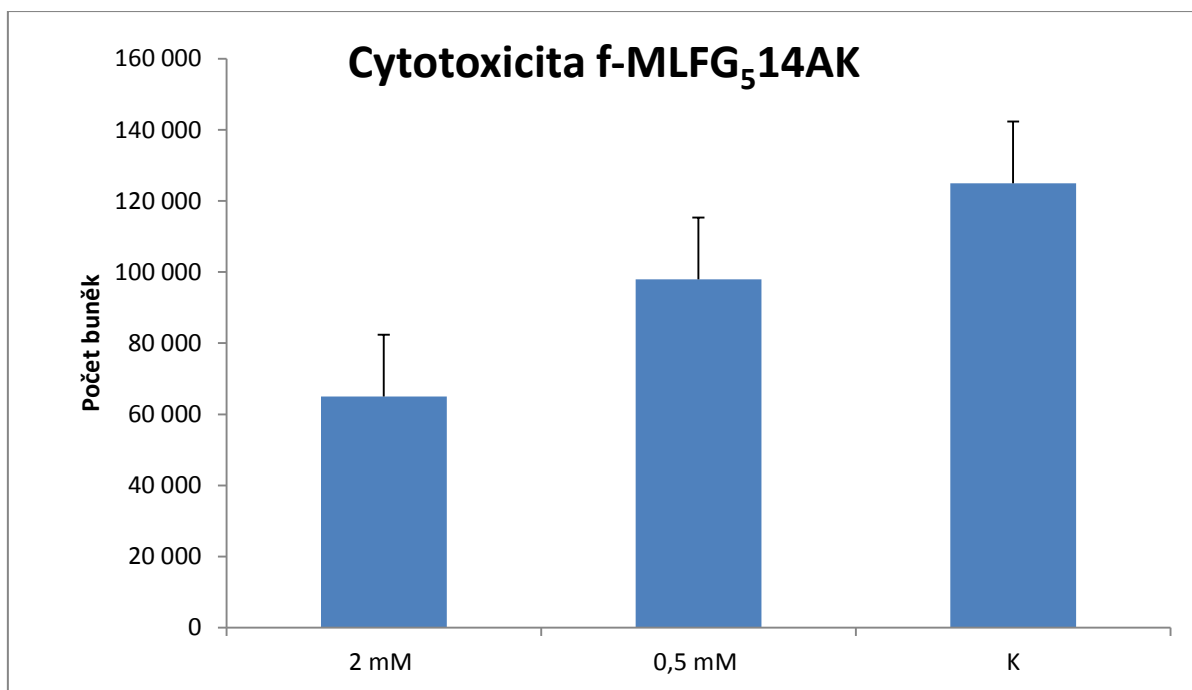


Obr. 7: Vliv terapie na délku života.

4.3 Cytotoxicita f-MLFG₅FNFRLKAGAKIRFG

Výsledky experimentu, v němž byla zkoumána cytotoxicita peptidu f-MLFG₅14AK, jsou uvedeny v grafu na Obr. 8.

Z grafu je patrné, že ani při 2mM koncentraci nedochází k významné redukci růstu buněk.



Obr. 8: Cytotoxicita f-MLFG₅14AK při 2mM o 0,5 mM koncentraci.

5 Diskuze

Jednou z cest vedoucích k účinné léčbě rakoviny může být využití agonistů PRR receptorů, jejichž prostřednictvím je možné aktivovat vrozenou imunitu (Jinushi 2012). Možnost využití jejich nespecifického kotvení do membrány buněk dokázaly ve svých pracích Waldmannová (2012) a Kovářová (2013) na zymosanu A, Auerová (2012) na laminarinu a Bruzlová (2012) a Maierová (2012) na mannanu. Podobně jako β -glukany a manan lze v nádorové terapii využít též peptidické PAMPs, ligandy fagocytárních receptorů. Jak již bylo zmíněno v úvodu, fagocytární motiv f-MLF působí jako chemoatraktant pro imunitní buňky. Čunátová (2012) ve své práci dokázala, že motiv f-MLF nespecificky kotvený na povrch buněk v kombinaci s LPS způsobuje redukci nádorového růstu.

Naším cílem bylo zdokonalit terapii specifickým kotvením fagocytárního motivu na nádorové buňky. K tomu jsme využili vazebnou sekvenci FNFRLKAGAKIRFG s velkou afinitou k PS, kterou ve své práci představil Xiong a kol. (2011). Podařilo se nám dokázat, že fagocytární motiv spojený glycinovým spacerem s vazebnou sekvencí f-MLF působí synergicky s LPS a při intratumorální aplikaci způsobuje velmi výrazné potlačení nádorového růstu. Specifické kotvení fagocytárního motivu se ukázalo ve srovnání s nespecifickým jako efektivnější. U specifického kotvení je na rozdíl od nespecifického patrná reakce na jednotlivé třídní pulzy léčby.

V dalším experimentu jsme testovali intraperitoneální aplikaci zmíněného peptidického terapeutika, která je snáze uplatnitelná v klinické praxi. Vzhledem k toxickým účinkům LPS na lidský organismus jsme jej jako adjuvans nahradili β -glukanem. I při intraperitoneální aplikaci jsme dosáhli výrazné redukce nádorového růstu. β -glukan taktéž vykazuje synergii s terapeutikem. Terapeutikum redukuje výskyt metastáz i intenzitu metastázování.

Terapeutikum bylo také testováno na přímou cytotoxicitu. Ke statisticky významnému omezení růstu nedošlo ani při vystavení 2mM koncentraci po dobu 24 hod. V experimentech byla aplikována 0,5 mM respektive 1 mM koncentrace léčiva a v organismu došlo k jejímu naředění tělními tekutinami, takže lze předpokládat, že koncentrace léčiva působící na buňky

experimentálního organismu byla výrazně nižší. Z těchto výsledků lze soudit, že peptidické terapeutikum působí na základě stimulace fagocytární aktivity buněk vrozené imunity. S tím souhlasí zjištění, že samotná 14 aminokyselinová vazebná sekvence FNFRLKAGAKIRFG nevyvolává in vivo žádnou redukci nádorového růstu (Ženka, ústní sdělení).

Ačkoliv námi testované terapeutikum působí výraznou redukci nádorového růstu, výskytu metastáz i intenzity metastázování, nebyl prokázán jeho vliv na délku přežívání. Proto perspektivu tohoto specifického targetingu spatřujeme především v působení na metastázy, které představují u nádorových onemocnění největší hrozbu.

Použití peptidových nosičů v kombinaci s f-MLF motivem nabízí možnost konstrukce účinného terapeutika o velmi malé molekulové váze, které mají na rozdíl od protilátek velkou schopnost průniku a nemusí se u nich řešit otázka humanizace. Phage display analýzy odhalily řadu dalších peptidů interagujících nejen s PS (Caberoy a kol. 2009), ale i s jinými molekulami, vyskytujícími se na nádorových buňkách a nádorové vaskulatuře (Park 2012 a kol). Tímto směrem bude zaměřen další výzkum.

6 Závěr

- Intratumorální aplikace f-MLFG₅FNFRKAGAKIRFG s LPS způsobuje výraznou redukci nádorového růstu. Látky působí synergicky.
- Intratumorální aplikace f-MLFG₅FNFRKAGAKIRFG s LPS nemá vliv na délku přežívání.
- Intraperitoneální aplikace f-MLFG₅FNFRKAGAKIRFG s perorálně podávaným β -glukanem působí synergicky a snižuje nádorový růst.
- Intraperitoneální aplikace f-MLFG₅FNFRKAGAKIRFG s perorálně podávaným β -glukanem snižuje výskyt metastáz a intenzitu metastázování.
- f-MLFG₅FNFRKAGAKIRFG nemá při aplikovaných koncentracích cytotoxický vliv.

7 Seznam použité literatury

- Alberts B, a kol. (2002): *Molecular Biology of the Cell*. In *Cancer*. pp. 2331. 4th edn. Garland Science, New York, USA.
- Armitage J O (1998): Emerging Applications of Recombinant Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Blood* 92 (12): 4491-4508.
- Atkins M B, Regan M, McDermott D (2004): Update on the role of interleukin 2 and other cytokines in the treatment of patients with stage IV renal carcinoma. *Clinical Cancer Research* 10: 6342-6346.
- Auerová M (2012): Terapie nádorových onemocnění založená na ukotvení laminarinu na povrch nádorových buněk. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice. 42p.
- Brenner M, Hearing V (2008): The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. *Photochemistry and Photobiology* 84(3): 539–549.
- Brunda M J, Raffel S (1977): Macrophage Processing of Antigen for Induction of Tumor Immunity. *Cancer Research* 37:1838-1844.
- BRUZLOVÁ P (2012): Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí instalace mananu na povrch nádorových buněk. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice. 38p.
- Caberoy N B, Zhou Y, Alvarado G, Fan X, Li W (2009): Efficient identification of phosphatidylserine-binding proteins by ORF phage display. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 386(1): 197-201.
- Conquy M, Cavillon J M (2007): Stress molecules in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *FEBS Letters* 58: 3723–3733.
- Cui Z, Willingham M C, Hicks A M, Alexander-Miller M A, Howard T D, Hawkins G A, Miller M S, Weir H M, Du W, DeLong C J (2003): Spontaneous regression of

advanced cancer: Identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice. PNAS 100(11): 6682-6687.

- Cummins D, Cummins J, Pantle H, Silverman A, Leonard L, Chanmugam A. (2006): Cutaneous malignant melanoma. Mayo Clinic Proceedings 81: 500– 507.
- ČUNÁTOVÁ, Š (2012): Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí kotvení formylmethioninových derivátů na povrch nádorových buněk. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice. 38 s.
- Dinges M M, Schlievert P M (2001): Comparative Analysis of Lipopolysaccharide-Induced Tumor Necrosis Factor Alpha Activity in Serum and Lethality in Mice and Rabbits Pretreated with the Staphylococcal Superantigen Toxic Shock Syndrome Toxin 1. Infection and Immunity 69(11): 7169 – 7172.
- De Visser K E, Kast W M (1999): Effects of TGF-beta on the immune system: implications for cancer immunotherapy. Leukemia 13(8):1188-99.
- Gorelik L, Constant S , Flavell R A. (2002): Mechanism of Transforming Growth Factor β -induced Inhibition of T Helper Type 1 Differentiation. The Journal of Experimental Medicine 195 (11): 1499-1505.
- Gunzer M, Jänich S, Varga G, Grabbe S. (2001): Dendritic cells and tumor immunity. Seminars in Immunology 13: 291–302.
- Gupta R, Emens L A (2010): GM-CSF-Secreting Vaccines for Solid Tumors: Moving Forward. Discovery medicine 10(50): 52-60.
- Hayashi R, Miyazaki M, Osada S, Kawasaki H, Fujita I, Hamasaki Y, Kodama H (2013): A formyl peptide substituted with a conformationally constrained phenylalanine residue evokes a selective immune response in human neutrophils. Bioorganic & Medicinal Chemistry 21(3):668-75.
- Hicks A M, Riedlinger G, Willingham M C, Alexander-Miller M A, Von Kap-Herr C, Pettenati M J, Sanders A M, Weir H M, Du W, Kim J, Simpson A J G, Old L J, Cui Z. (2006): Transferable anticancer innate immunity in spontaneous regression/complete resistance mice. PNAS 103(20): 7753-7758.

- Hodi S F, O'Day S J, McDermott D F, Weber R W, Sosman, J A a kol. (2010): Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *The New England Journal of Medicine* 363:711-723.
- Horibe I, Satoh Y, Shiota Y, Kumagai A, Horike N, Takemori H, Uesato S, Sugie S, Obata K, Kawahara H, Nagaoka Y, (2012): Induction of melanogenesis by 4'-O-methylated flavonoids in B16F10 melanoma cells. *Journal of Natural Medicines* 67:705–710.
- Hořejší V, Bartůňková J (2009). *Základy imunologie*. pp. 152, 4th edn. Nakladatelství Triton, 2009, Praha, Czech Republic.
- Hořejší V, Bartůňková J (2009). *Základy imunologie*. pp. 158, 4th edn. Nakladatelství Triton, 2009, Praha, Czech Republic.
- Hořejší V, Bartůňková J (2009). *Základy imunologie*. pp. 190, 4th edn. Nakladatelství Triton, 2009, Praha, Czech Republic.
- Hořejší V, Bartůňková J (2009). *Základy imunologie*. pp. 49, 4th edn. Nakladatelství Triton, 2009, Praha, Czech Republic.
- Hořejší V, Bartůňková J (2009): *Základy imunologie*. pp. 191, 4th edn. Nakladatelství Triton, 2009, Praha, Czech Republic.
- Chawla-Sarkar M, Lindner D J, Liu Y F, Williams B R, Sen G C, Silverman R H, Borden E C (2003): Apoptosis and interferons: Role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis* 2003; 8: 237–249.
- Chitadze G, Lettau I M, Bhat J, Wesch D, Steinle A, Fürst D, Mytilineos J, Kalthoff H, Janssen O, Oberg H H, Kabelitz D. (2013): Shedding of endogenous MHC class I-related chain molecules A and B from different human tumor entities: Heterogeneous involvement of the “a disintegrin and metalloproteases” 10 and 17. *International Journal of Cancer* 133: 1557–1566.
- Chong A S, Boussy I A, Graf L H, Scuderi P (1992): Stimulation of IFN-gamma, TNF-alpha, and TNF-beta secretion in IL-2-activated T cells: costimulatory roles for LFA-1, LFA-2, CD44, and CD45 molecules. *Cellular Immunology* 144(1): 69-79.

- Jinushi M (2012): The role of innate immune signals in antitumor immunity. *Oncoimmunology* (2): 189-194.
- Kim B G, Joo H G, Chung I S, Chung H Y, Woo H J, Yun Y S (2000): Inhibition of interleukin-10 (IL-10) production from MOPC 315 tumor cells by IL-10 antisense oligodeoxynucleotides enhances cell-mediated immune responses. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 49(8): 433-440.
- Klug, Cummings M, Spencer C. (2006): *Concepts of Genetics*. pp. 436 8th edn. Pearson Education, New Jersey, USA.
- Kovářová M (2013): Studium možnosti použití kotveného Zymosanu A pro imunoterapii melanomu. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice. 52p.
- Krieg A M, Wagner H (2000): Causing a commotion in the blood: immunotherapy progresses from bacteria to bacterial DNA. *Immunology Today* 21(10): 521–526.
- Kumagai Y, Akira S (2010): Identification and functions of pattern-recognition receptors. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 25(5):985-92.
- Lazova R, Chakraborty A, Pawelek J M (2011): Leukocyte-Cancer Cell Fusion: Initiator of the Warburg Effect in Malignancy. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 950: 151-172.
- Lee S, Margolin K (2011): Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cancers* 3: 3856-3893.
- Lee Y B, Kim E K, Park H J, Cho B K, Park Y M, Kim J W, Yoo N J, Park Y G, Oh S T (2012): Expression of Fas and Fas ligand in primary cutaneous squamous cell carcinoma in association with grade of tumor differentiation. *International Journal of Dermatology* 52: 1092–1097.
- Li M O, Flavell R A (2006): TGF-beta, T-cell tolerance and immunotherapy of autoimmune diseases and cancer. *Expert Review of Clinical Immunology* 2(2): 257-265.

- Liu Y, Zeng G (2012): Cancer and Innate Immune System Interactions: Translational Potentials for Cancer Immunotherapy. *Journal of Immunotherapy* 35(4): 299–308.
- Lu Y C, Yeh W C, Ohashi P S (2008): LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42(2):145-51.
- Maierová V (2012): Protinádorová imunoterapie založená na instalaci manózy na povrch nádorových buněk. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice. 71p.
- Mantel P Y, Schmidt-Weber C B. (2011): Transforming Growth Factor-Beta: Recent Advances on Its Role in Immune Tolerance. *Suppression and Regulation of Immune Responses* 677: 303-338.
- McCarthy E F (2006): The Toxins of William B. Coley and the Treatment of Bone and Soft-Tissue Sarcomas. *The Iowa Orthopaedic Journal* 26: 254-158.
- Moeller M, Haynes N M, Trapani, J A, Teng M W L, Jackson J T, Tanner J E, Cerutti L, Jane S M, Kershaw M H, Smyth M J, Darcy P K (2004): A functional role for CD28 costimulation in tumor recognition by single-chain receptor-modified T cells. *Cancer Gene Therapy* 11(5): 371-379.
- Moore K W, Malefyt R W, Coffman R L, O'Garra A (2001): Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology* 19: 683-765.
- Nakamura K, Yoshikawa N, Yamaguchi Y, Kagota S, Shinozuka K, Kunitomo M (2002): Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sciences* 70(7):791-8.
- Overwijk W, Restifo N (2001): B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. *Current Protocols in Immunology* 39:20.1.1–20.1.29.
- Park H Y, Lee K J, Lee S J, Yoon M Y (2012): Screening of peptides bound to breast cancer stem cell specific surface marker CD44 by phage display. *Molecular Biotechnology* 51(3):212-20.

- Parkin M, Bray F, Ferlay J, Pisani P. (2005): Global Cancer Statistics, 2002. *Cancer Journal for Clinicians* 55: 74–108.
- Pérez-Torres A, Vera-Aguilera J, Hernaiz-Leonardo J C, Moreno-Aguilera E, Monteverde-Suarez D, Vera-Aguilera C, Estrada-Bárcenas D (2013): The Synthetic Parasite-Derived Peptide GK1 Increases Survival in a Preclinical Mouse Melanoma Model. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*. 28(9): 682-690.
- Porgador A, Irvine K R, Iwasaki A, Barber B H, Restifo N P, Germain R N (1998): Predominant Role for Directly Transfected Dendritic Cells in Antigen Presentation to CD8+ T Cells after Gene Gun Immunization. *The Journal of Experimental Medicine* 188: 1075-1082.
- Puel1 A, Ziegler S F, Buckley R H, Leonard W J (1998): Defective IL7R expression in T-B+NK + severe combined immunodeficiency. *Nature Genetics* 20, 394 – 397.
- Raetz C R H, Whitfield C (2002): Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry* 71: 635-700.
- Riedl S, Rinner B, Asslaber M, Schaidler H, Walzer S, Novak A, Lohner K, Zweitick D (2011): In search of a novel target - phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1808(11-15): 2638–2645.
- Rubartelli A, Lotze M T (2007): Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends in Immunology* 28(10): 429–436.
- Scott A M, Allison J P, Wolchok J D (2012): Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer Immunity* 12: 14.
- Shearer W T, Rosenwasser L J, Bochner B S, Martinez-Moczygemba M, Huston D P (2003): Biology of common β receptor–signaling cytokines : IL-3, IL-5, and GM-CSF. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 112: 653–665.

- Shore, R, Shore, P, Monahan, N, Sundeen, J (2011): Serial Screening for Melanoma: Measures and Strategies That Have Consistently Achieved Early Detection and Cure. *Journal of Drugs in Dermatology* 10: 244 – 252.
- Schwartzenruber D J (2001): Guidelines for the safe administration of high-dose interleukin-2. *Journal of immunotherapy* 24(4): 287-293.
- Stevenson F K, Ottensmeier C H, Johnson P, Zhu D, Buchan S L, McCann K J, Roddick J S, King A T, McNicholl F, Savelyeva N, Rice J (2004): DNA vaccines to attack cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 14646–14652.
- T. Hahn T, Akporiaye E T (2006): Targeting transforming growth factor β to enhance cancer immunotherapy. *Current Oncology* 13(4): 141-143.
- Tang D, Kang R, Coyne C B, Zeh H J, Lotze M T (2012): PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunological Reviews* 249(1): 158–175.
- Tateda K, Matsumoto T, Miyazaki S, Yamaguchi K (1996): Lipopolysaccharide-induced lethality and cytokine production in aged mice. *Infection and immunity* 64(3):769-74.
- Terabe M, Berzofsky J A. (2008): The Role of NKT Cells in Tumor Immunity. *Advances in Cancer Research* 101: 277–348.
- Thornton A M, Donovan E E, Piccirillo C A, Shevach E M (2004): Cutting Edge: IL-2 Is Critically Required for the In Vitro Activation of CD4+CD25+ T Cell Suppressor Function. *The Journal of Immunology* 172(11): 6519-6523.
- Trepikasa R, Pedersen A E, Meta Ö, Svanea I M (2009): Addition of interferon-alpha to a standard maturation cocktail induces CD38 up-regulation and increases dendritic cell function. *Vaccine* 27(16): 2213–2219.
- Trinchieri G (1995): Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annual Review of Immunology* 13:251-76.

- Ulmer J B, DeWitt C M, Chastain M, Friedman A, Donnelly J J, McClements W L, Caulfield M J, Bohannon K E, Volkin D B, Evans R K (1999): Enhancement of DNA vaccine potency using conventional aluminum adjuvants. *Vaccine* (1-2): 18-28.
- Vácová N (2013): Studium možnosti použití formylmethioninových peptidů v protinádorové terapii. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice. 54p.
- Van Horssen R, Hagen T L M, Eggermont A M M. (2006): TNF- α in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility. *The Oncologist* 11 (4): 397-408.
- Vicari A P, Chiodoni C, Vaure C, Ait-Yahia S, Dercamp C, Matsos F, Reynard O, Taverne C, Merle P, Colombo MP, O'Garra A, Trinchieri G, Caux C (2002): Reversal of tumor-induced dendritic cell paralysis by CpG immunostimulatory oligonucleotide and anti-interleukin 10 receptor antibody. *The Journal of Experimental Medicine* 196 (4): 541.
- Voss S D, Hank J A, Nobis C A, Fisch P, Sosman J A, Sondel P M (1989): Serum levels of the low-affinity interleukin-2 receptor molecule (TAC) during IL-2 therapy reflect systemic lymphoid mass activation. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 29(4):261-9.
- Waldmannová E (2012): Studium nádorové terapie pomocí Zymosanu A. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice. 48p.
- Weiner L M, Surana R, Wang S (2010): Antibodies and cancer therapy: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 10: 317-327.
- Wrzesinski S H, Wan Y Y, Flavell R A (2007): Transforming Growth Factor- β and the Immune Response: Implications for Anticancer Therapy. *Clinical Cancer Research* 13: 5262.
- Yamaue H, Tanimura H, Tsunoda T, Iwahashi M, Tani M, Tamai M, Inoue M (1990): Functional and phenotypic analyses of interleukin 2-activated tumor-infiltrating lymphocytes. *Biotherapy* 2(3): 247-259.

