Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Analýza imunitních procesů při nádorové imunoterapii založené na synergii agonistů TLR a ligandů stimulujících fagocytózu

Diplomová práce

Bc. Ondřej Uher

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2018

Uher, O., 2018: Analýza imunitních procesů při nádorové imunoterapii založené na synergii agonistů TLR a ligandů stimulujících fagocytózu. [The analysis of immune processes during cancer immunotherapy based on synergy between TLR agonists and phagocytosis stimulating ligands. Mgr. Thesis, in Czech] – 62 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

ANNOTATION:
This thesis is focused on analysis of immune processes during cancer immunotherapy which is based on synergistic combination of TLR agonists and phagocytosis stimulating ligands anchored into the tumour cell membrane. This immunotherapy was tested in murine melanoma B16-F10 and murine pancreatic adenocarcinoma Panc02 models. The aims of this thesis were to analyse the tumor infiltration, elucidate the role of innate immunity in this immunotherapy, and study the possibility of strengthening immunotherapeutic effect using anti-CD40 and anti-CTLA-4.

PROHLÁŠENÍ:
Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 diplomové 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. 4. 2018

……..

Bc. Ondřej Uher

Poděkování:

Rád bych poděkoval svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za vynikající odborné vedení práce a nespočet diskuzí, které mi pomohly lépe pochopit problematiku imunoterapie. Dále bych rád poděkoval všem kolegyním z našeho týmu za pomoc během experimentů a spolupracovníkům z Katedry medicínské biologie za bezchybné pracovní prostředí.

Největší poděkování si však zaslouží má rodina za neutuchající podporu během celé doby mého studia. Jejich otázka „Tak co myši?“ mě vždycky pobavila.

1 ÚVOD 1
1.1 Imunitní systém a nádory 2
1.2 Imunoeditace nádorů 3
1.2.1 Eliminace 4
1.2.2 Rovnováha 6
1.2.3 Únik imunitnímu systému 6
1.3 Vybrané přístupy v imunoterapii nádorových onemocnění 8
1.3.1 Inhibitory imunologických checkpointů 8
1.3.2 Buněčná imunoterapie 9
1.3.3 Imunoterapie cílená na vrozenou imunitu 10
1.3.3.1 Imunoterapie založená na kombinaci TLR ligandů a ligandů fagocytárních receptorů 12
2 CÍLE PRÁCE 14
3 MATERIÁL A METODY 15
3.1 Chemikálie 15
3.2 Laboratorní myši 16
3.3 Buněčné linie – kultivace 17
3.4 Příprava buněk B16-F10 a Panc02 pro *in vivo* experimenty 17
3.5 Transplantace buněk B16-F10 a Panc02 17
3.6 Příprava terapeutických látek 18
3.7 Měření velikosti nádoru 18
3.8 Analýza dat 19
3.9 Experimenty 20
3.9.1 Stanovení nádorové infiltrace u melanomu B16-F10 v průběhu terapie založené na kombinaci TLR ligandů a kotveného mannanu 20
3.9.2 Detekce IFN-gamma v supernatantech z nádorového infiltrátu u melanomu B16-F10 pomocí ELISA v průběhu terapie založené na kombinaci TLR ligandů a kotveného mannanu 23
3.9.3 Vliv terapie založené na kombinaci TLR ligandů a kotveného mannanu na růst melanomu B16-F10 u SCID myší 24
3.9.4 Vliv terapie založené na kombinaci TLR ligandů a kotveného mannanu na růst melanomu B16-F10 u *knockout* CD4 myší 25
3.9.5 Vliv i.t. aplikace anti-CTLA-4 v kombinaci s TLR ligandy a kotveným mannanem na růst myšího pankreatického adenokarcinomu Panc02 26
3.9.6 Vliv i.t. aplikace IL-12-DOPE spolu s TLR agonisty a kotveným mannanem na růst myšího pankreatického adenokarcinomu Panc02 27
3.9.7 Vliv i.t. aplikace anti-CD40 v kombinacích s TLR ligandy nebo kotveným mannanem na růst myšího pankreatického adenokarcinomu Panc02 28
3.9.8 Srovnání dvou různých režimů aplikace anti-CD40 spolu s TLR agonisty a kotveným mannanem 29
4 VÝSLEDKY 30
4.1 Stanovení nádorové infiltrace u melanomu B16-F10 v průběhu terapie založené na kombinaci TLR ligandů a kotveného mannanu 30
4.2 Detekce IFN-gamma v supernatantech z nádorového infiltrátu u melanomu B16-F10 pomocí ELISA v průběhu terapie založené na kombinaci TLR ligandů a kotveného mannanu 33
4.3 Vliv terapie založené na kombinaci TLR ligandů a kotveného mannanu na růst melanomu B16-F10 u SCID myší 34
4.4 Vliv terapie založené na kombinaci TLR ligandů a kotveného mannanu na růst melanomu B16-F10 u *knockout* CD4 myší 36
4.5 Vliv i.t. aplikace samotné anti-CTLA-4 nebo v kombinaci s TLR ligandy a kotveným mannanem na růst myšího pankreatického adenokarcinomu Panc02 38
4.6 Vliv i.t. aplikace IL-12-DOPE spolu s TLR agonisty a kotveným mannanem na růst myšího pankreatického adenokarcinomu Panc02 40
4.7 Vliv i.t. aplikace anti-CD40 v kombinacích s TLR ligandy nebo kotveným mannanem na růst myšího pankreatického adenokarcinomu Panc02 42

4.8 Srovnání dvou různých režimů aplikace anti-CD40 spolu s TLR agonisty a kotveným mannanem 44
5 DISKUZE 46
6 ZÁVĚR 52
7 SEZNAM ZKRATEK 53
8 POUŽITÁ LITERATURA 56

1 ÚVOD

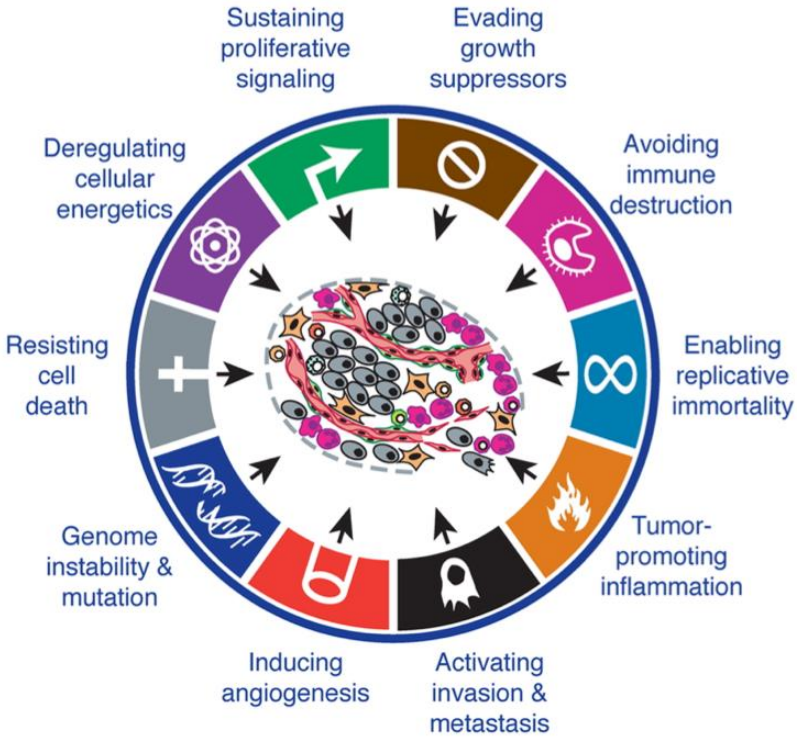
Imunoterapie je v dnešní době označována jako jeden z nejvýznamnějších pokroků v oblasti léčby nádorů. Rychle se rozvíjející základní výzkum v oblasti nádorové imunoterapie pomáhá lépe pochopit vzájemný vliv mezi imunitním systémem a nádorem, což vede k lepším postupům, které cílí na určité struktury a mechanismy účastnících se kancerogeneze. Díky probíhajícím klinickým studiím se imunoterapie více stává součástí klasické onkologické léčby. Stále je ale třeba najít odpovědi na otázky týkající se vhodného načasování imunoterapie nebo vhodné terapeutické kombinace.

Imunoterapie používaná týmem pod vedením RNDr. Jana Ženky, CSc. je založena na kombinaci ligandů stimulujících fagocytózu a TLR (*toll-like receptor*) agonistů. I.t. (intratumorální) aplikace této imunoterapie vede k mohutné zánětlivé infiltraci nádoru a jeho následné eliminaci (Janotová a kol., 2014; Caisová a kol., 2016; Waldmannová a kol., 2016). Tato diplomová práce se soustředí na analýzu nádorového prostředí během této terapie, zjišťuje příspěvek získané imunity v redukci nádorového růstu u myšího melanomu B16-F10 a hledá možnosti, jak posílit účinek této terapie u myšího pankreatického adenokarcinomu Panc02.

1.1 Imunitní systém a nádory

Ačkoliv jsou nádorové buňky z různých tkání odlišné, spojuje je několik společných znaků, které získávají během maligní transformace z původně zdravé buňky. Tyto znaky sumarizovali v roce 2000 Hanahan s Weibergerem. Nádorové buňky jsou schopny neomezené replikace, mají rezistenci k programované buněčné smrti, jsou schopny invaze a tvorby metastáz, dokážou indukovat angiogenezi, mají necitlivost k růstovým inhibitorům a jsou schopny autonomní stimulace růstu (Hanahan a Weinberg, 2000). Avšak s přibývajícími výsledky byly tyto znaky v roce 2011 rozšířeny o další čtyři. Jedná se o schopnost modifikovat nebo reprogramovat buněčný metabolismus, genomová nestabilita a mutace v buňce, zánětlivý stav v nádoru a v neposlední řadě únik imunitnímu systému (Obr. 1) (Hanahan a Weinberg, 2011).

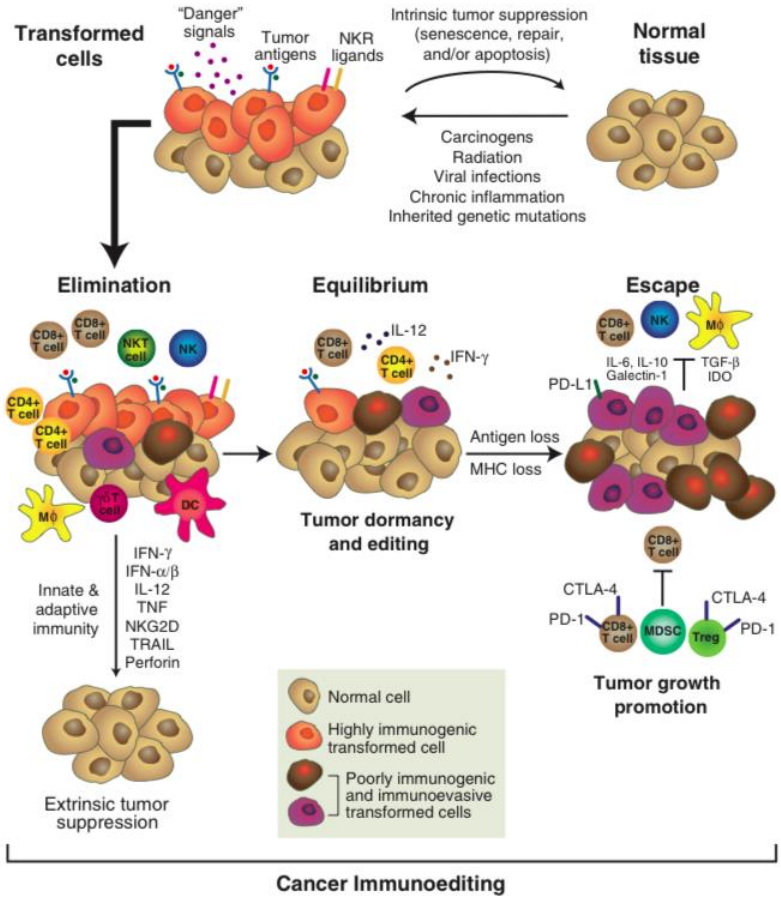
A právě imunitní systém ovlivňuje různé fáze nádorového vývoje u většiny nádorů. Imunita organismu funguje na základě vzájemné spolupráce vrozeného (antigen nespecifického) a získaného (antigen specifického) imunitního systému. Ačkoli je hlavní úkol imunitního systému ochraňovat organizmus před potencionálně nebezpečnými patogeny (viry, bakterie, parazité) a cizorodými antigenními látkami, dokáže také detekovat a eliminovat nádorové buňky (Finn, 2012).



Obr. 1: Charakteristické znaky nádorů (převzato z Hanahan a Weinberg, 2011)**.**

1.2 Imunoeditace nádorů

Potlačení růstu nádorů imunitním systémem poprvé předpověděl v roce 1909 Paul Ehrlich (Ehrlich, 1909). Po téměř padesáti letech, kdy došlo k lepšímu pochopení transplantace, nádorové imunobiologie a imunogenetiky, Burnet a Thomas předpokládali, že specifické nádorové neoantigeny mohou vyvolat účinnou imunitní reakci, která by eliminovala vznik nádorů (*immunosurveillance*) (Burnet 1957, Burnet 1971). Tato hypotéza byla poté v následujících letech potvrzena například důkazem existence nádorových antigenů u myší (Old a Boyse, 1964) nebo vyšším výskytem nádorových onemocnění u imunodeficientních myší a imunosuprimovaných lidí. (Bui a Schreiber, 2007). Avšak po zjištění, že imunitní systém může také podporovat vznik nádorů se sníženou imunogenicitou a tím uniknout imunitní detekci a eliminaci (Shankaran a kol., 2001), došlo k rozvoji hypotézy tvz. imunoeditace nádorů (*cancer immunoediting*). Imunoeditace nádorů se skládá ze tří částí (Obr. 2): eliminace (*elimination*), ustanovení rovnováhy (*equilibrium*) a únik imunitnímu systému (*escape*) (Dunn a kol., 2002).



Obr. 2: Jednotlivé fáze imunoeditace nádorů (převzato z Schreiber a kol., 2011).

1.2.1 Eliminace

V první fázi dochází k výše zmíněnému rozpoznání nádorových buněk vrozeným a získaným imunitním systémem a následné eliminaci těchto buněk (*immunosurveillance*) (Dunn a kol., 2006). Aby došlo k rozpoznání nádorových buněk buňkami imunitního systému, musí nádorové buňky exprimovat nádorové antigeny. Tyto antigeny můžeme rozdělit na dvě skupiny. První skupina, tumor specifické antigeny (**TSA**), se vyskytují pouze na nádorových buňkách. Druhá skupina, tumor asociované antigeny (**TAA**), se vyskytuje nejen na nádorových buňkách, ale i na buňkách zdravých (Neville a kol., 1975).

Evolučně nejstarší část imunitního systému, vrozená imunita, je schopna rozpoznávat cizorodé struktury a spustit okamžitou reakci. Buňky vrozené imunity využívají receptory **PRRs** (*pattern recognition receptors*) pro rozpoznání určitých struktur na povrchu patogenů tzv. **PAMPs** (*pathogen associated molecular patterns*). Tyto buňky jsou však schopny rozpoznat i endogenní molekuly tzv. **DAMPs** (*damage associated molecular patterns*), které jsou uvolňovány z buněk během poškození tkáně (nádory, virové infekce, autoimunitní onemocnění) a následné nekrózy. Jedná se tedy většinou o proteiny pocházející z jader nebo cytosolu buněk (Rubartelli a Lotze, 2007).

PRRs lze rozdělit do tří tříd: (i) membránové, (ii) cytoplazmatické a (iii) sekretované (Abouelmaatti a kol. 2013). Rozpoznání PAMPs nebo DAMPs vede u různých buněk k různé odpovědi.

Makrofágy a **neutrofily** jsou po rozpoznání nádorové buňky schopny fagocytózy a buněčné cytotoxicity závislé na protilátkách (ADCC) proti těmto buňkám. Dále mohou produkovat několik cytokinů s přímou (TNF, TRAIL) a nepřímou (IL-12, IL-18) protinádorovou aktivitou (Jakóbisiak a kol., 2003).

NK (*natural killer*) buňky hrají jednu z nejdůležitějších rolí v eliminaci nádorů. Na rozdíl od T a B lymfocytů, které potřebují proliferační fázi pro vybrání efektorové populace, NK buňky jsou schopny reagovat téměř okamžitě. Předpokládalo se, že NK buňky rozpoznávají nádorové buňky jen díky snížené expresi MHC I molekul (*major histocompatibility complex*). Bylo však prokázáno, že NK buňky eliminují nádorové buňky i přes jejich vyšší hladiny MHC molekul. Aktivace NK buněk je tedy dána i rozpoznáním struktur cílových buněk (Jakóbisiak a kol., 2003). Jedním z mechanismů, kterým NK buňky rozlišují normální buňky od buněk transformovaných, zahrnuje interakci NKG2D receptoru (*natural killer group 2D*). Tento receptor rozpoznává

specifické nádorové ligandy na buňkách, které jsou indukovány například genotoxickými kancerogeny nebo virovou infekcí (Dunn a kol., 2006; Gasser a Raulet, 2006). Ligandy NKG2D receptoru lze rozdělit do dvou rodin proteinů, které jsou strukturně podobné MHC I: MIC (*major immunogene complex*) a RAET1 (*retinoic acid early transcript 1*) (Gasser a Raulet, 2006). Mezi další aktivační receptory NK buněk patří TLRs, tedy membránové PRRs. Stimulace těchto receptorů vede k aktivaci NK buněk a k následné exocytóze granul s cytotoxickými látkami (perforiny a granzymy), které vedou k apoptóze cílové buňky (Smyth a kol., 2005). Dále mohou produkovat zánětlivé cytokiny, jako IFN-gamma, který mimo jiné může potlačovat proliferaci nádorových buněk a angiogenezi buď přímo, nebo nepřímo přes stimulaci imunitního systému. NK buňky také mohou exprimovat na svém povrchu TRAIL a FasL, které po navázání na svůj receptor na cílových buňkách spouští apoptózu. Dalším způsobem, kterým mohou NK buňky zabíjet nádorové buňky je ADCC (Smyth a kol., 2005, Kim a kol., 2007).

Eliminace nádorových buněk výše zmíněnými buňkami vrozeného imunitního systému umožnuje uvolnění nádorových antigenů, které potom mohou antigen prezentující buňky (APC), **dendritické buňky a makrofágy**, prezentovat v sekundárních lymfatických orgánech naivním T lymfocytům a tím přispívat k aktivaci imunity získané (Kim a kol., 2007).

Po prezentaci nádorových antigenů ve spojení s MHC II (resp. zkřížené prezentaci s MHC I) antigen prezentujícími buňkami naivním T lymfocytům dochází k aktivaci pomocných T lymfocytů (Th lymfocyty, CD4+ lymfocyty) a tím i k aktivaci cytotoxických T lymfocytů (CTL, CD8+ lymfocyty). Ty poté infiltrují primární nádor a po rozpoznání nádorových buněk pomocí T buněčného receptoru (TCR) eliminují tyto buňky svými efektorovými mechanismy (Janssen a kol., 2003).

CD8+ lymfocyty mají efektorové mechanismy srovnatelné s mechanismy NK buněk. Produkují IFN-gamma, indukují apoptózu nádorových buněk pomocí interakce FasL ligandu s Fas receptorem a interakcí TRAIL receptoru s ligandem TRAIL, nebo mohou sekretovat perforiny a granzimy (Mittal a kol., 2014). Úloha **CD4+ lymfocytů** spočívá v produkci IFN-gamma, regulaci imunitní odpovědi a aktivaci například makrofágů, CD8+ lymfocytů a B lymfocytů (Mittal a kol., 2014; Zhu a Paul, 2008)

Pokud buňky vrozeného a získaného imunitního systému kompletně eliminují všechny nádorové buňky, tak je fáze eliminace koncovým bodem v procesu

imunoeditace nádorů. Některé nádorové buňky se však mohou vyhnout eliminační fázi a tím vstupovat do fáze rovnováhy.

1.2.2 Rovnováha

Fáze rovnováhy patří mezi nejméně pochopenou a prostudovanou fázi imunoeditace nádorů. V této fázi imunitní systém udržuje nádorové buňky v dormanci (nečinnost, „spánek“), pokud se neobnoví růst nádoru. Z experimentů, které byly zatím provedeny, vyplývá, že se fáze rovnováhy účastní nejvíce imunita získaná. Z imunitních buněk byly v nádorovém prostředí ve větší míře detekované CD4+ a CD8+ lymfocyty, naopak NK buňky se v nádorovém prostředí vyskytovaly jen v malé míře.

Dále se předpokládá, že tato fáze se týká rovnováhy mezi protinádorovými cytokiny (IFN-gamma, IL-12) a cytokiny, které podporují nádor (IL-10, IL-23). Ačkoli imunitní systém zabraňuje nádoru v růstu, může docházet k selekci nádorových buněk, které mají nižší imunogenicitu a lepší schopnosti unikat obranným mechanismům imunitního systému. Výše uvedené mechanismy poté rozhodují, zda se po fázi rovnováhy opět začne fáze eliminace, nebo vyselektované nádorové buňky uniknou imunitnímu dohledu a nádor začne nekontrolovatelně růst (Schreiber a kol., 2011; Mittal a kol., 2014).

1.2.3 Únik imunitnímu systému

Nádorové buňky vyskytující se ve fázi úniku tedy získaly schopnost vyhnout se z dohledu imunitního systému. K přesunu buněk z rovnovážné fáze do fáze úniku může nastat buď změnami populace nádorových buněk během eliminační a rovnovážné fáze, anebo změnami imunitního systému, který se mění v důsledku vyšší nádorové imunosuprese nebo v důsledku oslabení imunitního systému (Schreiber a kol., 2011).

Rozlišuje se tedy obrana nádorových buněk na pasivní a aktivní. Mezi pasivní obranu patří nižší exprese nádorového antigenu, ke které může docházet třemi způsoby: (i) vznikem populace nádorových buněk, která má nedostatek silných antigenů, které jsou schopny vyvolat reakci imunitního systému, (ii) ztrátou proteinů MHC I, které umožnují prezentaci nádorových antigenů CD8+ lymfocytům nebo (iii) ztrátou funkcí v buňce, které jsou potřebné pro produkci antigenního peptidového epitopu a k vazbě s MHC I molekulou. (Schreiber a kol., 2011; Šťastný a Říhová, 2015). Vše je

pravděpodobně dáno genetickou nestabilitou nádorových buněk během selekce těchto buněk imunitním systémem v eliminační a rovnovážné fázi (Dunn a kol., 2002).

K aktivní obraně se poté řadí schopnost nádorových buněk využívat i další buněčné systémy (Šťastný a Říhová, 2015). Nádorové buňky mohou rekrutovat regulační imunitní buňky, jako efektory imunosuprese, ale také mohou vytvářet imunosupresivní prostředí několika produkty.

VEGF (*vascular endothelial growth factor*) vede nejen k indukci angiogeneze a tím k lepšímu zásobení nádoru kyslíkem a potřebnými živinami (Levy a kol., 1995), ale také indukuje infiltraci nádoru MDSC (*myeloid derived suppressor cells*) (Horikawa a kol., 2017). **TGF-beta** (*transforming growth factor beta*) mimo jiné inhibuje proliferaci T lymfocytů (Messagué a kol., 2000). **IDO** (indoleamin 2,3-dioxygenáza) katalyzuje rozklad aminokyseliny tryptofanu, který je nezbytný pro správnou funkci T lymfocytů (Pillote a kol., 2012).

Nádory se dále mohou bránit přímo imunitní odpovědi expresí molekul, které přímo cílí na receptory T buněk. T buňky, kromě rozpoznání antigenu na APC buňkách pomocí TCR receptoru, potřebují ještě druhý kostimulační signál (např. CD28, OX40, GITR, CD137) pro aktivaci a následnou proliferaci. Kromě těchto aktivačních receptorů T lymfocyty exprimují i řadu inhibičních receptorů (CTLA-4, PD-1, TIM-3, LAG-3) z důvodu ochrany organismu před nadměrnou reakcí. Některé nádorové buňku mohou na svém povrchu exprimovat například PD-1L, který po navázání na PD-1 exprimovaný T lymfocyty snižuje aktivaci T lymfocytů (Mittal a kol., 2014).

Další možností přímé obrany nádorových buněk je exprese **Fas** ligandu. Tento ligand stimuluje apoptózu buněk po navázání Fas receptor. Nádorové buňky mohou snižovat expresi Fas receptoru, a naopak posilovat expresi FasL. Nádorové buňky jsou poté odolné vůči apoptóze a mohou vyvolávat apoptózu u imunitních buněk, které Fas i FasL exprimují z důvodu zajištění jejich regulace (Chiu a kol., 2013).

Jednou z hlavních populací imunosupresivních leukocytů rekrutovaných nádory jsou **regulační T lymfocyty** (Treg, CD4+CD25+FoxP3+). Produkují řadu inhibičních cytokinů (IL-10, TGF-beta) a exprimují kostimulační molekuly (CTLA-4, PD-1, PD-L1) (Mittal a kol., 2014). Dále odstraňují z nádorového prostředí IL-2, který je nezbytný pro proliferaci CD8+ buněk (Jenkins a Johnson, 1993).

Další hlavní populací regulačních buněk jsou **MDSC** (*myeloid derived suppressor cells*). Tato heterogenní skupina se skládá z nezralých myeloidních prekurzorů, do kterých patří i prekurzory dendritických buněk, neutrofilů a monocytů (Huang a kol.,

2006). MDSC inhibují vrozenou imunitu syntézou IL-10, potlačují T lymfocyty produkcí TGF-beta, indukují vývoj Treg lymfocytů (Schreiber a kol., 2011) a uvolňují volné radikály (IDO, peroxinitril), jimiž také podporují inhibici T buněčné odpovědi. (Šťastný a Říhová, 2015).

Neméně důležitou populací podporující nádorový růst jsou **TAM** (*tumour associated macrophages*). Rozlišují se na dvě skupiny TAM: (i) M1 – klasicky aktivované a (ii) M2 – alternativně aktivované (IL-4, IL-13, IL-10). M2 podporují růst a invazivitu nádoru produkcí VEGF a TGF-beta a inhibují T buněčnou odpověď například produkcí IL-10 (Mantovani a kol., 2002).

1.3 Vybrané přístupy v imunoterapii nádorových onemocnění

Ačkoli se myšlenky o využití imunitního systému datují sto let zpět, reálné využití nachází až v dnešní době. Počáteční přístup v léčbě nádorů intratumorální aplikací bakterií zkoušenou Williamem Coley ke konci devatenáctého století měl sice překvapivé výsledky (Coley, 1891), ale z důvodu nedostatečného vědeckého podložení došlo k pomalému vytěsnění této metody. Na začátku dvacátého století se stále více začínala využívat radioterapie a o pár let poté také chemoterapie. S přibývajícími výsledky v oblasti imunitního systému a nádorových onemocnění se začalo používat lépe cílených metod pro léčbu nádorů. Dřívější klinické přístupy v léčbě nádorových onemocnění spočívaly ve vakcínách, které měly spustit nebo zesílit imunitní reakci proti vznikajícímu nádoru. V dnešní době se imunoterapie soustřeďuje převážně na aktivační a regulační receptory imunitních buněk (Drake a kol., 2014; Říhová a Šťastný, 2015).

1.3.1 Inhibitory imunologických checkpointů

V dnešní době nejvíce studovaným přístupem v imunoterapii nádorových onemocnění je použití monoklonálních protilátek, které blokují regulační receptory T lymfocytů. Nejdále je použití monoklonálních protilátek proti CTLA-4 (Ipilimumab, Tremelimumab) a PD-1 (Pembrolizumab, Nivolumab) (Pardoll, 2016).

Inhibiční **CTLA-4** (*cytotoxic T lymfocyte associated protein 4*)., exprimované T lymfocyty krátce po aktivaci, se váže stejně jako aktivační CD28 na CD80/86 na APC buňkách. CTLA-4 má však vyšší afinitu k těmto molekulám a tím dochází k regulaci imunitní odpovědi. Inhibicí CTLA-4 dochází k aktivaci T lymfocytů a zvýšené

protinádorové aktivitě. Použití anti-CTLA-4 protilátky je spojeno i s deplecí Treg (Peggs a kol., 2009; Swart a kol., 2016), které CTLA-4 exprimují ve vysoké míře kontinuálně, avšak princip působení není dosud zcela objasněn (Pardoll, 2016).

PD-1 (*programmed cell death 1 receptor*), jako jeden z dalších regulačních receptorů T lymfocytů, po vazbě se svými ligandy PD-L1 a PD-L2 vede ke snížení aktivity T lymfocytů a spouští apoptózu. Použití protilátky anti-PD-1 vede také k vyšší aktivaci T lymfocytů a k lepší protinádorové odpovědi (Menon a kol., 2016; Pardoll, 2016). Prokázaná exprese PD-1 na Treg však zastává opačnou funkci, kde navázání ligandu na PD-1 receptor pozitivně stimuluje aktivitu Treg (Francisco a kol., 2009).

1.3.2 Buněčná imunoterapie

Buněčnou imunoterapii lze rozdělit na dvě skupiny: (i) aktivní – protinádorové vakcíny a (ii) pasivní – adoptivní transfer. Pro správnou funkci protinádorových vakcín je potřeba, aby nádorové buňky exprimovaly nádorové antigeny TSA nebo TAA na svém povrchu (Borghaei a kol., 2009). Účinnost těchto vakcín se však snižuje s nižší imunogenicitou nádorových buněk.

Experimentálně jsou testované **DNA vakcíny**, kde je pomocí vektoru (bakterie, vir) přenesen gen, který kóduje nádorový antigen (Fioretti a kol., 2010). Výhodou DNA vakcín je schopnost více aktivovat nejen získanou, ale i vrozenou imunitu (Yang a kol., 2014).

Další skupinou testovaných vakcín jsou **vakcíny z nádorových buněk**, které jsou založeny na přímé imunizaci pacienta nádorovými buňkami. Ty mohou být odebrány přímo z pacientova nádoru (autologní) nebo mohou pocházet z již zavedených lidských nádorových linií (alogenní) (Guo a kol., 2013; Keenan a Jaffee, 2012). Autologní nádorové vakcíny mají výhody ve vysoké pravděpodobnosti, že bude daná vakcína antigenně specifická. Nevýhoda této vakcíny je v často nemožném odebrání nádoru pacienta a v následném zdlouhavém a nákladném procesu. Naproti tomu alogenní vakcíny poskytují větší spektrum nádorových antigenů, jednodušší zpracování a následnou manipulaci, ale nevýhoda spočívá v riziku autoimunních reakcí (de Gruijl a kol., 2008; Guo a kol., 2013).

Velice slibná se zdá **vakcína dendritickými buňkami**. Spočívá v izolaci monocytů z krve pacienta (leukoferéza), ze kterých jsou poté připraveny DC. Dendritické buňky jsou poté kultivovány s nádorovými antigeny (apoptotické nádorové

buňky) a následně injikovány do pacienta. Tím dojde k větší stimulaci T lymfocytů v organismu a lepší protinádorové odpovědi (Gilboa, 2007; Palucka a Banchereau, 2012).

Mezi nejvíce testované adoptivní transfery patří **T buněčná terapie**. Tento přístup spočívá v izolaci T lymfocytů infiltrovaných přímo v nádoru pacienta (*tumor infiltrating lymphocytes* – TIL), které jsou následně *in vitro* aktivovány cytokiny a vráceny zpět do těla pacienta (Rosenberg a Restifo, 2015). Existuje i podobný přístup, kdy se odeberou NK buňky a T lymfocyty z krve pacienta (*lymphokine activated killers* – LAK). Ty jsou také po stimulaci *in vitro* pomocí cytokinů vráceny zpět do krevního oběhu (Davis a kol., 2015). Takto aktivované lymfocyty mají přímý cytotoxický efekt na nádorové buňky a z důvodu vyšší produkce dalších cytokinů lepší schopnost aktivovat další imunitní buňky (Besser a kol., 2010).

Pro léčbu leukemií a lymfomu je zkoušen inovativnější přístup (Brentjens a kol., 2013). Přes virové vektory je do T lymfocytů vnesen genetický konstrukt, který se skládá z DNA kódující antigenně specifické Fc nebo Fab fragmenty monoklonálních protilátek a části genů, které kódují signalizační části vhodných receptorů (transmembránové a intracelulární). Po namnožení T lymfocytů *in vitro* je dosaženo velkého počtu CD8+ lymfocytů, které rozpoznávají zvolený nádorový antigen díky produktu vneseného genetického konstruktu (tzv. **chimérický antigenní receptor – CAR**). CAR fungují na stejném principu jako jiné antigenně specifické receptory, ale jejich signalizační intracelulární části jsou mnohem účinnější než u klasických receptorů (Grupp a kol., 2013; Hořejší, 2015).

1.3.3 Imunoterapie cílená na vrozenou imunitu

Jedním z možných přístupů v aktivaci vrozené imunity spočívá v použití PAMPs nebo DAMPs motivů, které jsou rozpoznávány PRRs exprimované právě buňkami vrozené imunity (Medzhitov a Janeway, 1998). V této oblasti se výzkum nejvíce soustředí na **Toll-like receptory** (TLRs), membránové PRRs, kterých je momentálně u lidí známo 10 (TLR 1-10) a u myší 12 (TLR 1-9 a TLR 11-13). (Takeda a Akira, 2005). Od využití celých bakterií se v dnešní době již ustupuje a začínají se stále více využívat jen bakteriální fragmenty nebo synteticky vyrobené ligandy.

Rozpoznání PAMPs motivu vede k aktivaci signální dráhy a následné imunitní odpovědi. Rozlišují se dvě hlavní dráhy aktivace: (i) dráha závislá na MyD88 (*myeloid differentiation primary response protein 88*) a (ii) dráha nezávislá na MyD88, známá

také jako TRIF (*TIR domain containing adaptor inducing interferon beta*). MyD88 spouští aktivaci u všech TLR kromě TLR 3, který spolu s TLR 4 využívá dráhu TRIF. TLR 4 je tedy jediným Toll-like receptorem, který může aktivovat obě signální dráhy (Hosseini a kol., 2015, Takeda a Akira, 2005). Po aktivaci signální dráhy dochází k následné aktivaci transkripčních faktorů, tvorbě zánětlivých cytokinů (TNF-alfa, IL-6, IL-8, IL-12) (Kawai a Akira, 2007) a k zahájení produkce interferonů typu I (IFN alfa a beta) (Yu a kol., 2010). Dále tyto signální dráhy indukují vyšší expresi kostimulačních molekul u DC a tím k přenosu informace na získanou imunitu (Kawai a Akira, 2007).

V následující tabulce (Tab. I) je uveden přehled Toll-like receptorů, příklady jejich ligandů, lokalizace v buňce a příslušná dráha aktivace.

Tab. I: Přehled Toll-like receptorů – lokalizace, dráha aktivace a příklady ligandů (převzato z Kaczanowska a kol., 2013).

TLR	Lokalizace v buňce	Dráha aktivace	Příklady ligandů
TLR 1-2 heterodimery	membrána	MyD88	LTA, Zymosan, peptidoglykany, triacylované lipoproteiny, Pam_3CSK_4 – syntetický ligand
TLR 2-6 heterodimery	membrána	MyD88	diacylované lipopeptidy, fibronektin, kyselina močová, LTA
TLR 3	endozom	TRIF	ds RNA (viry), Poly (I:C) – syntetický ligand
TLR 4	membrána / endozom	MyD88 / TRIF	LPS, fibronektin
TLR 5	membrána	MyD88	flagelin
TLR 7, 8	endozom	MyD88	ss RNA (viry), CpG DNA, R-848 – syntetický ligand
TLR 9	endozom	MyD88	nemetylované CpG DNA – syntetický ligand
TLR 10	membrána	MyD88	syntetické ligandy (Pam_3CSK_4, $PamCysPamSK_4$)
TLR11	–	–	profilin (*Toxoplasma gondii*)
TLR 12	–	–	neznámé
TLR 13	endozom	MyD88	VSV (*Vesicular stomatitis virus*)

V oblasti imunoterapie, která cílí na vrozenou imunitu, je v dnešní době nejvíce využívaná **BCG vakcína** (oslabená *Mycobacterium bovis*, TLR 2, 4, 9) pro karcinomy močového měchýře (Kawai a kol., 2013). Ve srovnání s cytotoxickými léky je tato vakcína účinnější v redukci recidiv a ve snížení rizika progrese (Matoušková, 2015).

Jako monoterapeutikum se dále klinicky testuje ještě **Imiquimod** (TLR 7) pro léčbu maligního melanomu a **CpG ODN** (oligodeoxynukletid) (TLR9) pro léčbu

několika typů nádorových onemocnění (např: maligní melanom a glioblastomu) (Adams, 2009).

Další využití TLR ligandů je převážně v kombinaci s jinými terapeutickými přístupy. **Poly(I:C)** (polyinosinová-polycytidylová kyselina) a **LPS** (lypopolysacharid) se využívají pro *ex vivo* stimulaci DC buněk (například pro vakcínu DC buňkami) (Palucka a Banchereau, 2012). Často jsou TLR ligandy, z důvodu dobré aktivace DC buněk, využívány jako adjuvancium při nádorových vakcínách – Poly(I:C), Imiquimod, MPL – monofosforyl lipid A, Resiquimod – R-848 (Adams, 2009).

1.3.3.1 Imunoterapie založená na kombinaci TLR ligandů a ligandů fagocytárních receptorů

Náš přístup v oblasti imunoterapie nádorů je založen na intratumorální aplikaci směsi rozpustných TLR ligandů se signalizačním účinkem a ligandů fagocytárních receptorů, které jsou kotvené přímo na nádorové buňky. Tímto terapeutikem je dosaženo zánětlivého stavu v nádoru s nasměrováním fagocytů na nádorové buňky (Janotová a kol., 2014; Caisová a kol., 2016; Waldmannová a kol., 2016).

Jako nejslibnější kombinace TLR ligandů je směs Resiquimodu (R-848), Poly(I:C) a lipoteichové kyseliny (LTA). **R-848** je ligandem pro TLR 7 / 8 (u myší jen TLR 7) a jedná se o syntetický derivát imidazoquinolinu s antivirotickým účinkem (Jurk a kol., 2002). Spouští MyD88 dráhu aktivace s následující produkcí zánětlivých cytokinů (Gibson a kol., 2002; Wagner a kol., 1999). **Poly(I:C)** je syntetický analog ds RNA, který stimuluje antivirovou odpověď. Jeho receptorem je TLR 3 a spouští TRIF dráhu aktivace (Zhou a kol., 2012). **LTA**, jako komponenta buněčných stěn gram-pozitivních bakterií, je rozpoznávána TLR 2 a přes MyD88 dráhu aktivace stimuluje bakteriální infekci (Takeuchi a kol., 1999).

Mannan je využíván jako fagocytární ligand. Tento polysacharid se nachází v buněčných stěnách hub (kvasinek) a gram-negativních bakterií (Lipke a Ovalle, 1998). Je rozpoznáván pomocí manózového receptoru (MR) a lektinem vázající manózu (MBL) (Janeway a Medzhitov, 2002). Rozpoznání mannanu pomocí **MBL** vede k lektinové aktivaci komplementu. Tato cesta, stejně jako klasická cesta aktivace komplementu, vede k produkci C3 a C5 konvertáz, které stimulují opsonizaci a lýzu patogenů (v našem případě nádorové buňky) přes membránový útok komplementu (Dahl a kol., 2001; Jack a kol., 2001). **MR**, který patří mezi fagocytární PRRs, se

nachází na fagocytárních buňkách vrozené imunity. Rozpoznání mannanu pomocí MR dochází k fagocytóze patogenu (nádorové buňky) (Kilpatrick, 2002; Opanasopit, 2001).

Pro kotvení mannanu do membrán nádorových buněk je využívaná **BAM** kotva (*biocompatible anchor for cell membrane)* s jedním alifatickým řetězcem (Kato a kol., 2004).

2 CÍLE PRÁCE

- Analyzovat jednotlivé subpopulace leukocytů v nádoru myšího melanomu B16-F10 během terapie pomocí tří TLR ligandů a kotveného mannanu.

- Detekovat IFN-gamma v prostředí nádoru B16-F10 během terapie pomocí tří TLR ligandů a kotveného mannanu.

- Ověřit zapojení získané imunity v průběhu imunoterapie myšího melanomu B16-F10 založené na aplikaci tří TLR ligandů a kotveného mannanu u SCID a *knockout* CD4 myší.

- Studovat možnosti použití anti-CTLA-4 protilátky a kotveného interleukinu 12 pomocí kotvy DOPE v imunoterapii pankreatického adenokarcinomu Panc02.

- Studovat efekt anti-CD40 protilátky spolu se složkami terapie založené na kombinaci tří TLR ligandů a kotveného mannanu na růst pankreatického adenokarcinomu Pan02.

- Srovnat dva různé režimy aplikace terapie anti-CD40 spolu s třemi TLR ligandy a kotveným mannanem.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Chemikálie

- **Antibiotic-Antimycotic Solution** – Penicilin, Streptomycin, Amfotericin B (Sigma-Aldrich, USA)
- **Anti-Mouse CD3e FITC, clone 145-2C11, 0,5 mg/ml** (eBioscience, USA)
- **Anti-Mouse CD4 APC, clone GK1.5, 0,2 mg/ml** (eBioscience, USA)
- **Anti-Mouse CD8a PE-Cy7, clone 53-6.7, 0,2 mg/ml** (eBioscience, USA)
- **Anti-Mouse CD19 APC, clone eBio1D3, 0,2 mg/ml** (eBioscience, USA)
- **Anti-Mouse CD45 PerCP-Cy5.5, clone 30-F11, 0,2 mg/ml** (eBioscience, USA)
- **Anti-Mouse CD40, clone FGK4.5/FGK45** (BioXCell, USA)
- **Anti-Mouse CTLA-4, clone 9H10** (BioXCell, USA)
- **Anti-Mouse F4/80 Antigen PE-Cy7, clone BM8, 0,2 mg/ml** (eBioscience, USA)
- **Anti-Mouse Ly-6G (Gr-1) Alexa Fluor 700, clone RB6-8C5, 0,2 mg/ml** (eBioscience, USA)
- **Anti-Mouse NK1.1 PE, clone PK136, 0,2 mg/ml** (eBioscience, USA)
- **BAM** – Biocompatible anchor for cell membrane, Mw 4000 (NOW, Belgie)
- **Concanavalin A** (Sigma-Aldrich, USA)
- **Count Bright Absolute Counting Beads** (Life Technologies, USA)
- **DMEM** – Dulbecco's modified eagle medium (VWR, USA)
- **DMSO** – Dimetyl-sulfoxid (Sigma-Aldrich, USA)
- **DNáza I** (Roche Diagnostic, Německo)
- **DOPE** – N-(Succinimidyloxy-glutaryl)-L-α-phosphatidylethanolamine, Dioleoyl (NOF Corporation, Japonsko)
- **EDTA** – Ethylendiamintetraoctová kyselina (Sigma-Aldrich, USA)
- **FCS** – Fetal calf serum (VWR, USA)
- **FoxP3 Staining Buffer Set** (eBioscience, USA)
- **IL-12 Recombinant Murine p70** (PeproTech, USA)
- **Kyanoborohydrid sodný** (Sigma-Aldrich, USA)
- **L-Glutamin** (Sigma-Aldrich, USA)
- **Liberáza DL** (Roche Diagnostic, Německo)
- **LTA** – Lipoteichoic acid, *Bacillus subtilis* (Sigma-Aldrich, USA)

- **Mannan** – *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich, USA)
- **Merkaptoethanol** (Sigma-Aldrich, USA)
- **Monensin** (Sigma-Aldrich, USA)
- **Mouse IFN gamma Platinum ELISA Extra sensitive** (eBioscience, USA)
- **Octan amonný** (Sigma-Aldrich, USA)
- **PBS** – Phosphate-buffered saline (VWR, USA)
- **Poly (I:C)** – Polyinosinic-polycytidylic acid, sodium salt (Sigma-Aldrich, USA)
- **R-848** – Resiquimod (Tocris Bioscience, Velká Británie)
- **RMPI 1640** – Roswell park memory institute medium (VWR, USA)
- **TRIS HCL** (Sigma-Aldrich, USA)
- **Trypanová modř** – 0,5 % vodný roztok (Sigma-Aldrich, USA)
- **Trypsin** (Sigma-Aldrich, USA)

3.2 Laboratorní myši

V experimentech byly použity *wild-type* SPF (*specific pathogen free*) samice typu C57BL/6N z chovu Charles River Laboratories, SCID (C.B17/Icr-scid) a *knockout* SPF samci $CD4^{-/-}$ typu C57BL/6N, oba typy z chovu Parazitologického ústavu, Akademie věd ČR v Českých Budějovicích, staré 8 týdnů a o váze 18-20 g.

Imunokompetentní kmen myší byl chován jednotlivě ve sterilních plastových boxech uzavřených kovovou mříží a s podestýlkou z dřevěné drtě. Myši měly neomezený přístup ke sterilní vodě a ke krmivu ve formě suchých pelet. V místnosti s chovem byla konstantní teplota 22 °C, relativní vlhkost 65 % a fotoperioda byla nastavena na 12/12 hodin (zvěřinec Parazitologického ústavu, Biologické centrum Akademie věd ČR v Českých Budějovicích).

Oba kmeny imunodeficientních myší byly chovány ve sterilních podmínkách v IVC (*individually ventilated cages*) boxech. Myši měly neomezený přístup ke sterilní vodě a ke krmivu ve formě suchých pelet. V boxech byla konstantní teplota 22 °C, relativní vlhkost 65 % a fotoperioda byla nastavena na 12/12 hodin (zvěřinec Katedry medicínské biologie, Přírodovědecká fakulta JU v Českých Budějovicích).

3.3 Buněčné linie – kultivace

Buňky myšího melanomu B16-F10 (ATCC, Virginia, USA) byly kultivovány v RMPI 1640 médiu obohaceném o 10 % FCS, penicilin (100j/ml), streptomycin (100 μg/ml), amfotericin B (0,25 μg/ml), L-glutamin (2,2 nM) a merkaptoethanol (50 μM).

Buňky myšího pankreatického adenokarcinomu Panc02 (daroval prof. Lars Ivo Partecke, Greifswaldská univerzita, Německo) byly kultivovány v DMEM mediu obohaceném o 10 % FCS, penicilin (100j/ml), streptomycin (100 μg/ml), amfotericin B (0,25 μg/ml), L-glutamin (2,2 nM) a merkaptoethanol (50 μM).

Buňky B16-F10 i Panc02 byly uchovávány při teplotě 37 °C v termostatu v 5 % CO_2 atmosféře s nasycenými vodními parami.

3.4 Příprava buněk B16-F10 a Panc02 pro *in vivo* experimenty

Po nárůstu buněk bylo odstraněno kultivační médium a buňky byly třikrát promyty sterilním pufrovaným fyziologickým roztokem (PBS). Po promytí byla k adherovaným buňkám přidána trypsinizační směs (0,02 % trypsin a 0,25 % EDTA v HBSS). Poté byly buňky s trypsinizační směsí vráceny zpět do termostatu (37 °C/5 % CO_2) na pět minut, aby došlo k jejich uvolnění. Trypsinizace byla zastavena přidáním 20 ml příslušného média (B16-F10 – RPMI 1640; Panc02 – DMEM). Buňky byly poté převedeny do zkumavky (50ml), spočítány v Bürkerově komůrce (obarvení buněk trypanovou modří) a následně bylo jejich množství upraveno na požadovanou koncentraci.

3.5 Transplantace buněk B16-F10 a Panc02

Nádorové buňky (B16-F10 nebo Panc02) byly subkutánně (s.c.) transplantovány myším do pravého předem oholeného boku. Aplikováno bylo 100 μl buněčné suspenze (B16-F10 s RPMI 1640 bez FCS; Panc02 s DMEM bez FCS) obsahující $4x10^5$ buněk. U experimentu zaměřující se na vliv anti-CD40 na růst pankreatického adenokarcinomu bylo použito $3x10^5$ buněk.

3.6 Příprava terapeutických látek

Příprava mannan-BAM_{4000}

Roztok mannanu byl při pH 7,5 a 50 °C redukčně aminován po dobu pěti dnů v prostředí octanu amonného a kyanoborohydridu sodného. Poté následovala dialýza výsledného roztoku proti PBS s použitím dialyzační trubice MWCO 3500 (Serva, Německo) při teplotě 4 °C přes noc za stálého míchání. Následně bylo zkontrolováno pH mannanu-NH_2 (požadovaná hodnota pH 7,2 – 8,5). Poté byl připraven roztok BAM_{4000} v DMSO (7,3 nM). 1200 µl BAM_{4000} bylo přidáno ke 24 ml mananu-NH_2 (0,227 mM) a promícháno. Směs byla ponechána 2 hodiny při pokojové teplotě a poté byla reakce zastavena přidáním 1200 µl TRIS HCl (pH 8,0). Následně byla provedena dialýza proti PBS v dialyzační trubici MWCO 3500 při 4 °C přes noc za stálého míchání. Po dialýze byl získán roztok mannan-BAM_{4000} (0,2 mM) v PBS. Výsledný roztok byl potom při teplotě – 20 °C uchováván do doby použití.

Příprava Resiquimodu (Resiquimod.HCl)

Jelikož Resiquimod ve formě báze je ve vodě obtížně rozpustitelný, byl na něj navázán hydrochlorid (HCl). 8 mg Resiquimodu bylo smícháno se 22,4 µl 3,5 % HCl a poté bylo přidáno 200 µl PBS pro rozpuštění. Dále následovalo naředění na požadovaný objem.

Příprava IL-12-DOPE

Příprava interleukinu 12 s DOPE kotvou spočívala ve smíchání 10 µg IL-12, 132 µl PBS a 10 µl DOPE roztoku (6,5 mg DOPE v 500 µl DMSO). Reakce poté probíhala 1 h při pokojové teplotě.

3.7 Měření velikosti nádoru

Velikost nádoru byla měřena pomocí kaliperu. Poté byl spočítán objem nádorové masy pomocí vzorce $V = \pi/6\ AB^2$. Největší rozměr (délka nádoru) představuje A a nejmenší rozměr (výška nádoru od těla) představuje B.

3.8 Analýza dat

Nejdříve byla vypočtena plocha pod křivkou (AUC). Statistická analýza byla poté provedena na hodnotách AUC pomocí jednocestné ANOVY s následným Tukeyho post hoc testem. Kontrola (PBS) byla považována jako 100 %. Pro analýzu přežití byl použit Log-rank test. Statistická analýza u experimentu 4.1. (Stanovení nádorové infiltrace) byla provedena pomocí Studentova t-testu. Data byla zpracována v programu GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, USA). Ve všech uvedených grafech byla použita střední chyba průměru (SEM).

3.9 Experimenty

3.9.1 Stanovení nádorové infiltrace u melanomu B16-F10 v průběhu terapie založené na kombinaci TLR ligandů a kotveného mannanu

V tomto experimentu byla stanovována nádorová infiltrace imunitními buňkami v průběhu terapie melanomu B16-F10 pomocí průtokového cytometru FACS Canto II (BD Biosciences, USA). Bylo stanovováno celkové množství leukocytů (CD45+), granulocytů (GR+), monocytů/makrofágů (F4/80+), T lymfocytů (CD4+, CD8+), B lymfocytů (CD19+) a NK buněk (NK1.1+).

Pro experiment byly použity osmitýdenní samice myší C57BL/6N. Dvanáctý den po s.c. transplantaci $4x10^5$ buněk B16-F10 byly myši randomizovány do dvou skupin po dvaceti čtyřech jedincích. Dále byla v experimentu zařazena třetí skupina o třech myších sloužící jako neléčená kontrola v „den 0“. Každá myš byla samostatně v plastovém boxu.

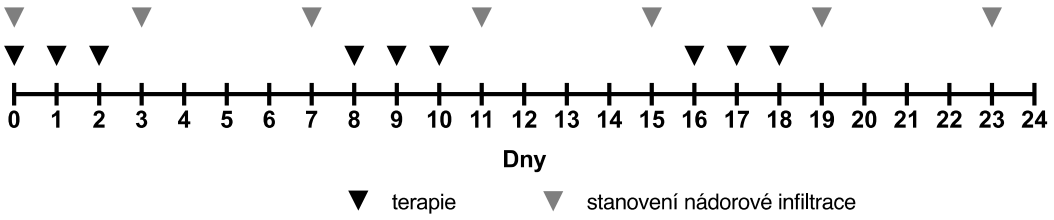
Skupiny myší podle podávané terapeutické látky:

I. 50 µl roztoku 0,5 mg R-848 + 0,5 mg poly(I:C) + 0,5 mg LTA / ml 0,2 mM mannan-BAM v PBS (24 myší).

II. 50 µl roztoku PBS (24 myší).

III. Intaktní myši pro stanovení infiltrace v „den 0“ (3 myši).

Terapeutické látky byly podávány intratumorálně (i.t.) v množství 50 µl ve třech pulzech (0,1,2; 8,9,10; 16,17,18), stanovení infiltrace bylo děláno vždy den před podáním terapeutické látky a den po podání (Obr. 3).



Obr. 3: Časové schéma stanovení nádorové infiltrace u melanomu B16-F10.

V „den 0“ byly všechny myši ze skupiny III usmrceny cervikální dislokací, nádory z těchto myší byly vypitvány a zpracovány na stanovení nádorové infiltrace buňkami imunitního systému. Takto se postupovalo i v dalších dnech, kdy byla stanovována nádorová infiltrace (Obr. 3). Experiment byl ukončen v „den 23“, z důvodu vyléčení ostatních myší v léčené skupině (skupina I). Myši byly vybrány pro analýzu infiltrátu v jednotlivých dnech podle velikosti nádoru. Každý nádor byl vždy změřen kaliperem a poté se z každé skupiny vybraly 3 myši s malým, středním a velkým nádorem (z důvodu zachování srovnatelnosti analýzy).

Příprava nádorů

Po důkladném vypitvání nádorů z myší byly nádory promyty v RPMI (bez FCS). Poté byly nádory nastřihány na menší kousky a umístěny do 2 ml Eppendorf zkumavek se směsí 1 ml RMPI (bez FCS) s 67 µl DNázy I (koncentrace 0,33 mg/ml) a 20 µl Liberázy DL (koncentrace 0,2 mg/ml). Následně se nádory nechaly inkubovat po dobu jedné hodiny za stálého třepání (400 kmitů/min) v termostatu (37 °C). Po uplynutí jedné hodiny byly nádory ve zkumavkách centrifugovány (5 min/4 °C/160 g). Poté byly odebrány supernatanty a uloženy do mrazničky (- 80 °C) (použity v následujícím experimentu 3.9.2 - detekce IFN-gamma). Pelety byly homogenizovány přes sterilní 70 µm sítko (BD Biosciences, USA) do PBS a znovu promyty centrifugací (5 min/4 °C/160 g). Vzorky byly poté naředěny podle hustoty nádorové suspenze do 0,5 ml, 1 ml, 2 ml nebo 3 ml. Ředění se poté vzalo v úvahu v přepočtu pro množství jednotlivých populací. Následovalo převedení vzorků do 96 jamkové destičky s kulatým dnem (Corning Incorporated, USA).

Analýza na průtokovém cytometru

Z každého nádoru byly připraveny 4 vzorky po 10 µl/jamka. První tři vzorky byly značeny fluorescenčně značenými monoklonálními protilátkami (Tab. II), čtvrtá sada sloužila jako nebarvená kontrola. Jako kontrola správné funkce fluorescenčně značených protilátek sloužily splenocyty získané ze slezin myší ze skupiny II. Takto se postupovalo u všech nádorů stejně.

Po přidání značených protilátek byly vzorky inkubovány 20 min ve 4 °C ve tmě a poté promyty 150 µl PBS pro odstranění nenavázaných značených protilátek. Po centrifugaci destičky (2 min/4 °C/180 g) byl odstraněn supernatant a do jamek k peletům bylo přidáno 140 µl PBS a 10 µl kalibračních kuliček. Tyto kuličky slouží

k přepočtu absolutního množství buněk ve vzorku. Takto připravené vzorky byly přeneseny do zkumavek pro analýzu na průtokovém cytometru. Po správném nastavení průtokového cytometru (Tab. III) se mohlo začít se samotným měřením vzorků. Zaznamenáváno bylo 20 000 událostí.

Výsledky z měření byly zpracovány a vyhodnoceny v programu BD FACSDiva verze 6.1.3. Celkové množství buněk bylo přepočteno na 1 mm^3 nádorové masy (Microsoft Excel 365).

Z důvodu použití více fluorescenčně značených protilátek v jednom vzorku (překrývání emisních spekter fluorochromů) byla před experimentem dělána na průtokovém cytometru kompenzace na splenocytech z myší sleziny.

Tab. II: Kombinace fluorescenčně značených protilátek použité u analýzy nádorového infiltrace.

	Název protilátky	Typ buněk, které značí	Ředění
Značení I	**Anti-Mouse CD45** PerCP-Cy5.5, clone 30-F11, 0,2 mg/ml	Leukocyty	200x
	Anti-Mouse CD3e FITC, clone 145-2C11, 0,5 mg/ml	T lymfocyty	100x
	Anti-Mouse CD4 APC, clone GK1.5, 0,2 mg/ml	CD4+ T lymfocyty	100x
	Anti-Mouse CD8a PE-Cy7, clone 53-6.7, 0,2 mg/ml	CD8+ T lymfocyty	100x
	Anti-Mouse NK1.1 PE, clone PK136, 0,2 mg/ml	NK buňky	100x
Značení II	**Anti-Mouse CD45** PerCP-Cy5.5, clone 30-F11, 0,2 mg/ml	Leukocyty	200x
	Anti-Mouse CD3e FITC, clone 145-2C11, 0,5 mg/ml	T lymfocyty	100x
	Anti-Mouse Ly-6G (Gr-1) Alexa Fluor 700, clone RB6-8C5, 0,2 mg/ml	Granulocyty	100x
	Anti-Mouse CD19 APC, clone eBio1D3, 0,2 mg/ml	B lymfocyty	100x
	Anti-Mouse F4/80 Antigen PE-Cy7, clone BM8, 0,2 mg/ml	Monocyty/makrofágy	100x

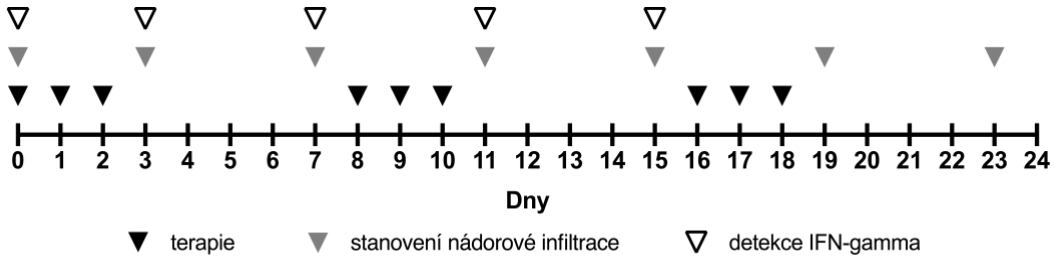
Tab. III: Nastavení laserů při měření na průtokovém cytometru.

Window extention	2,00
FCS Area scaling	0,80
Area scaling blue	0,80
Area scaling red	1,30
Laser Delay blue	0,00
Laser Delay red	30,00

3.9.2 Detekce IFN-gamma v supernatantech z nádorového infiltrátu u melanomu B16-F10 pomocí ELISA v průběhu terapie založené na kombinaci TLR ligandů a kotveného mannanu

V tomto experimentu byla stanovována hladina IFN-gamma v supernatantech z nádorového infiltrátu v průběhu terapie melanomu B16-F10 pomocí ELISA. Supernatanty pro detekci IFN-gamma byly odebírány během předchozího experimentu. Proto rozdělení myší podle skupin a množství podávané terapeutické látky je popsáno jen v předchozím experimentu (kapitola 3.9.1) .

Supernatanty pro detekci IFN-gamma byly odebírány ve dnech 0, 3, 7, 11 a 15 (Obr. 4).

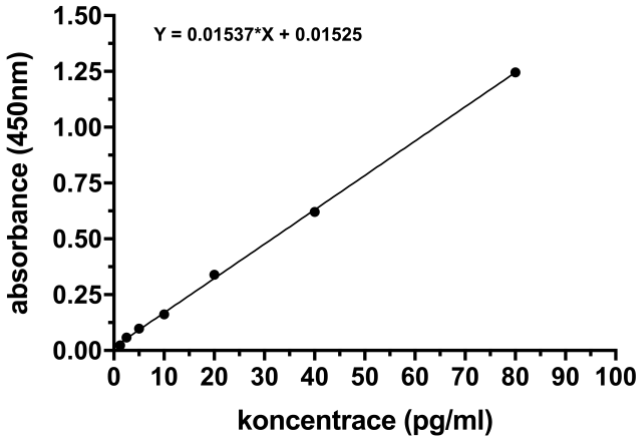


Obr. 4: Časové schéma detekce IFN-gamma u melanomu B16-F10.

ELISA stanovení IFN-gamma

Supernatanty odebírané v předchozím experimentu (po inkubaci v roztoku RPMI s DNázou I a Liberázou DL), které byly uloženy v mrazničce, se před samotnou detekcí šetrně rozmrazily při pokojové teplotě. Pro stanovení IFN-gamma byl použit kit Mouse IFN gamma Platina ELISA Extra sensitive. Samotná detekce se poté prováděla přesně podle instrukcí dodávaných společně s kitem. Nutno dodat, že každý vzorek byl dělán v dubletu. Vzorky byly měřeny na ELISA readeru (SYNERGY H1 microplate reader, BIOTEK).

Pro stanovení hladiny IFN-gamma byla nejdříve sestrojena kalibrační křivka ze známých koncentrací standardů vytvořených dvojkovým ředěním. Z příslušné rovnice regrese (Obr. 5) byly poté vypočteny hledané koncentrace IFN-gamma (Microsoft Excel 365). Stanovené koncentrace v pg/ml byly převedeny na pg/mm^3 nádorové masy.



Obr. 5: Kalibrační přímka a rovnice regrese pro stanovení IFN-gamma.

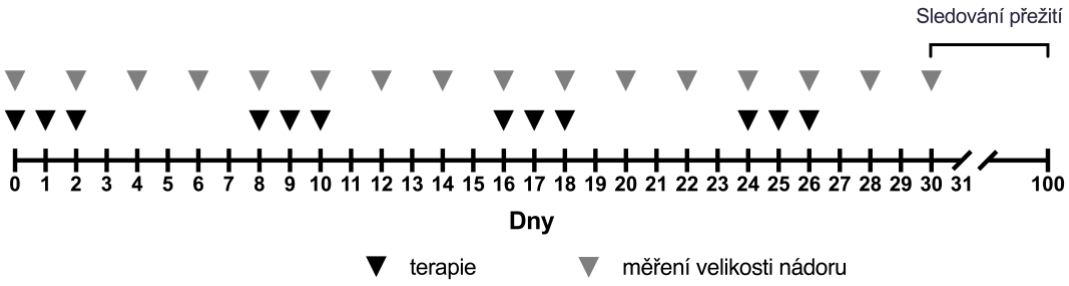
3.9.3 Vliv terapie založené na kombinaci TLR ligandů a kotveného mannanu na růst melanomu B16-F10 u SCID myší

V tomto experimentu bylo použito 6 myších samiček SCID (C.B17/Icr-scid) starých osm týdnů. Dvanáctý den po s.c. transplantaci $4x10^5$ buněk B16-F10 byly myši randomizovány do dvou skupin po třech jedincích. Každá myš byla samostatně v plastovém IVC boxu. Samotná terapie a měření velikosti nádorů začalo v „den 0“. Terapie byla aplikována ve 4 pulzech zahrnující 12 dní a měření velikosti nádorů probíhalo každý druhý den (Obr. 6). Terapie byla podávána i.t..

Skupiny myší podle podávané terapeutické látky:

I. 50 µl roztoku 0,5 mg R-848 + 0,5 mg poly(I:C) + 0,5 mg LTA / ml 0,2 mM mannan-BAM v PBS (3myši).

II. 50 µl roztoku PBS (3 myši).



Obr. 6: Časové schéma průběhu terapie u SCID myší.

V „den 30“ (poslední den měření velikosti nádorů) začalo sledování doby přežití u myší. V „den 100“ bylo sledování přežití ukončeno a zbývající myši byly usmrceny cervikální dislokací.

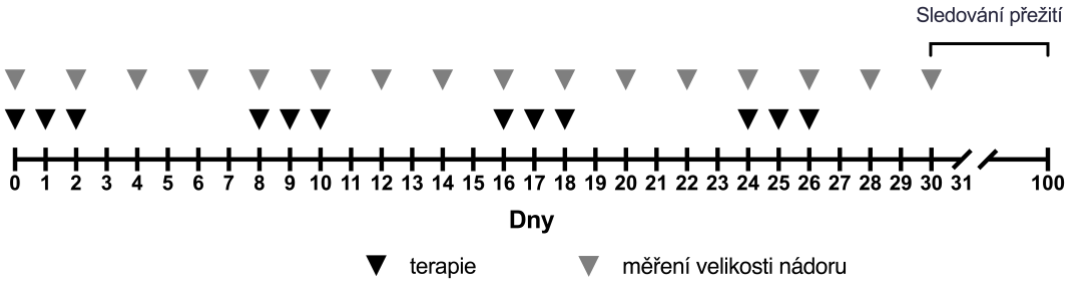
3.9.4 Vliv terapie založené na kombinaci TLR ligandů a kotveného mannanu na růst melanomu B16-F10 u *knockout* CD4 myší

Pro tento experiment bylo použito 12 samců *knockout* SPF $CD4^{-/-}$ typu C57BL/6N starých osm týdnů. Dvanáctý den po s.c. transplantaci $4x10^5$ buněk B16-F10 byly myši randomizovány do dvou skupin po šesti jedincích. Každá myš byla samostatně v plastovém IVC boxu. Samotná terapie a měření velikosti nádorů začalo v „den 0“. Terapie byla aplikována ve 4 pulzech zahrnující 12 dní a měření velikosti nádorů probíhalo každý druhý den (Obr. 7). Terapie byla podávána i.t..

Skupiny myší podle podávané terapeutické látky:

I. 50 µl roztoku 0,5 mg R-848 + 0,5 mg poly(I:C) + 0,5 mg LTA / ml 0,2 mM mannan-BAM v PBS (6 myší).

II. 50 µl roztoku PBS (6 myší).



Obr. 7: Časové schéma průběhu terapie u *knockout* CD4 myší.

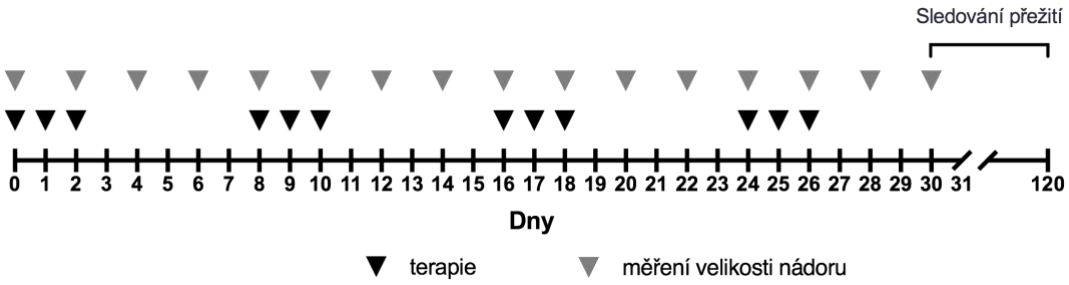
V „den 30“ (poslední den měření velikosti nádorů) začalo sledování doby přežití u myší. V „den 100“ bylo sledování přežití ukončeno a zbývající myši byly usmrceny cervikální dislokací.

3.9.5 Vliv i.t. aplikace anti-CTLA-4 v kombinaci s TLR ligandy a kotveným mannanem na růst myšího pankreatického adenokarcinomu Panc02

Pro tento experiment bylo použito 22 *wild-type* SPF myších samic typu C57BL/6N starých osm týdnů. Dvanáctý den po s.c. transplantaci $4x10^5$ buněk Panc02 byly myši randomizovány do čtyř skupin (skupina I a IV po šesti myších, skupina II a III po pěti myších). Každá myš byla samostatně v plastovém boxu. Samotná terapie a měření velikosti nádorů začalo v „den 0“. Terapie byla aplikována ve 4 pulzech zahrnující 12 dní a měření velikosti nádorů probíhalo každý druhý den (Obr. 8). Terapie byla podávána i.t..

Skupiny myší podle podávané terapeutické látky:

- **I.** 50 µl roztoku 0,5 mg R-848 + 0,5 mg poly(I:C) + 0,5 mg LTA / ml 0,2 mM mannan-BAM v PBS (6 myší).
- **II.** 50 µl roztoku 0,4 mg anti-CTLA-4 / ml PBS (5 myší).
- **III.** 50 µl roztoku 0,4 mg anti-CTLA-4 / ml roztoku 0,5 mg R-848 + 0,5 mg poly(I:C) + 0,5 mg LTA / ml 0,2 mM mannan-BAM v PBS (5 myší).
- **IV.** 50 µl roztoku PBS (6 myší).



Obr. 8: Časové schéma průběhu terapie – anti-CTLA-4.

V „den 30“ (poslední den měření velikosti nádorů) začalo sledování doby přežití u myší. V „den 120“ bylo sledování přežití ukončeno.

3.9.6 Vliv i.t. aplikace IL-12-DOPE spolu s TLR agonisty a kotveným mannanem na růst myšího pankreatického adenokarcinomu Panc02

Pro tento experiment bylo použito 17 *wild-type* SPF myších samic typu C57BL/6N starých osm týdnů. Dvanáctý den po s.c. transplantaci $3x10^5$ buněk Panc02 byly myši randomizovány do čtyř skupin (skupina I a III po šesti myších, skupina II po pěti myších). Každá myš byla samostatně v plastovém boxu. Samotná terapie a měření velikosti nádorů začalo v „den 0“. Terapie byla aplikována ve 4 pulzech zahrnující 12 dní, IL-12-DOPE bylo aplikováno vždy ve druhé injekci každého pulzu. Měření velikosti nádorů probíhalo každý druhý den (Obr. 9). Terapie byla podávána i.t..

Skupiny myší podle podávané terapeutické látky:

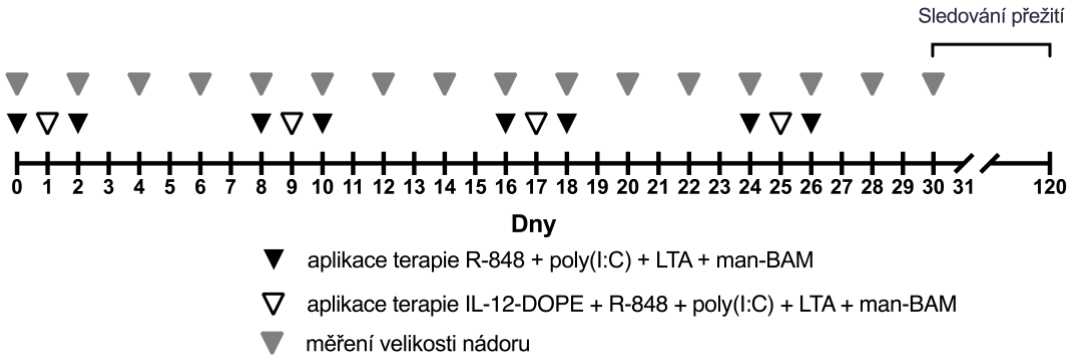
I. 50 µl roztoku 0,5 mg R-848 + 0,5 mg poly(I:C) + 0,5 mg LTA / ml 0,2 mM mannan-BAM v PBS (6 myší).

II. Dny 0, 2, 8, 10, 16, 18, 24, 26: 50 µl roztoku 0,5 mg R-848 + 0,5 mg poly(I:C) + 0,5 mg LTA / ml 0,2 mM mannan-BAM v PBS.

Dny 1, 9, 17, 25: 50 µl roztoku 10 µg IL-12-DOPE + 0,5 mg R-848 + 0,5 mg poly(I:C) + 0,5 mg LTA / ml 0,2 mM mannan-BAM v PBS.

(5 myší)

III. 50 µl roztoku PBS (6 myší).



Obr. 9: Časové schéma průběhu terapie (IL-12-DOPE).

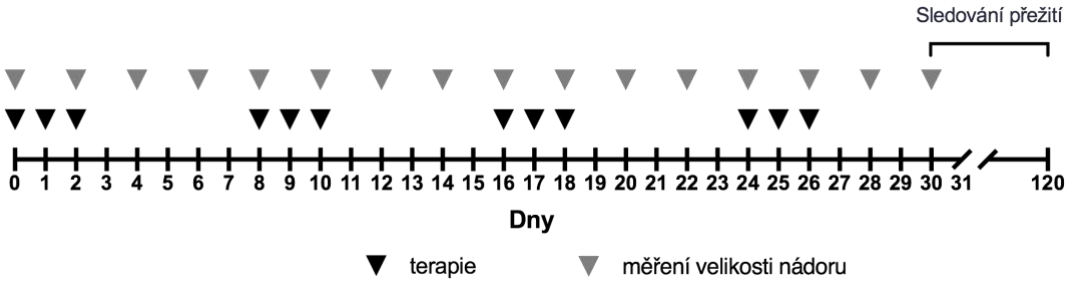
V „den 30“ (poslední den měření velikosti nádorů) začalo sledování doby přežití u myší. V „den 120“ bylo sledování přežití ukončeno.

3.9.7 Vliv i.t. aplikace anti-CD40 v kombinacích s TLR ligandy nebo kotveným mannanem na růst myšího pankreatického adenokarcinomu Panc02

V tomto experimentu bylo použito 36 *wild-type* SPF myších samic typu C57BL/6N starých osm týdnů. Dvanáctý den po s.c. transplantaci $3x10^5$ buněk Panc02 byly myši randomizovány do šesti skupin po šesti myších. Každá myš byla samostatně v plastovém boxu. Samotná terapie a měření velikosti nádorů začalo v „den 0“. Terapie byla aplikována ve 4 pulzech zahrnující 12 dní a měření velikosti nádorů probíhalo každý druhý den (Obr. 10). Terapie byla podávána i.t..

Skupiny myší podle podávané terapeutické látky:

- **I.** 50 µl roztoku 0,5 mg R-848 + 0,5 mg poly(I:C) + 0,5 mg LTA / ml 0,2 mM mannan-BAM v PBS (6 myší).
- **II.** 50 µl roztoku 0,4 mg anti-CD40 / ml PBS (6 myší).
- **III.** 50 µl roztoku 0,4 mg anti-CD40 + 0,5 mg R-848 + 0,5 mg poly(I:C) + 0,5 mg LTA / ml PBS (6 myší).
- **IV.** 50 µl roztoku 0,4 mg anti-CD40 / ml 0,2 mM mannan-BAM v ml PBS (6 myší).
- **V.** 50 µl roztoku 0,4 mg anti-CD40 + 0,5 mg R-848 + 0,5 mg poly(I:C) + 0,5 mg LTA / ml 0,2 mM mannan-BAM v PBS (6 myší).
- **VI.** 50 µl roztoku PBS (6 myší).



Obr. 10: Časové schéma průběhu terapie – anti-CD40.

V „den 30“ (poslední den měření velikosti nádorů) začalo sledování doby přežití u myší. V „den 120“ bylo sledování přežití ukončeno.

3.9.8 Srovnání dvou různých režimů aplikace anti-CD40 spolu s TLR agonisty a kotveným mannanem

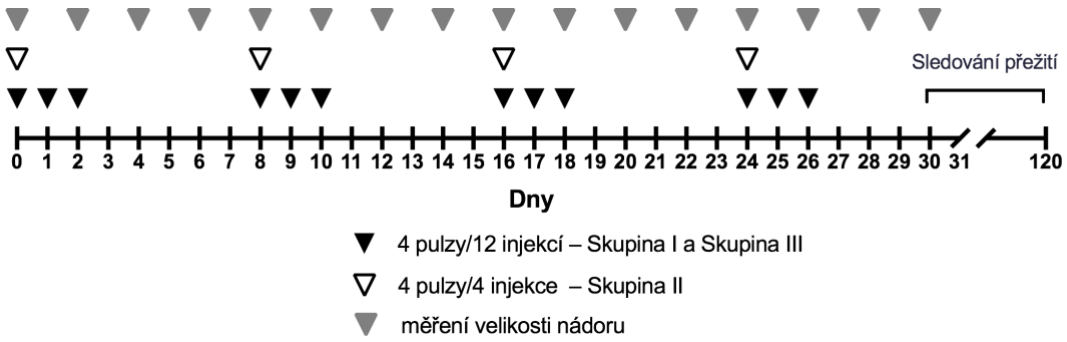
Tento experiment přímo navazuje na předchozí experiment (3.9.7). Použito bylo 18 *wild-type* SPF myších samic typu C57BL/6N starých osm týdnů. Dvanáctý den po s.c. transplantaci $3x10^5$ buněk Panc02 byly myši randomizovány do tří skupin po šesti myších. Každá myš byla samostatně v plastovém boxu. Samotná terapie a měření velikosti nádorů začalo v „den 0“. Terapie byla aplikována ve 4 pulzech. Pro skupinu I a III terapie zahrnovala 12 dní, pro skupinu II terapie zahrnovala pouze 4 dny (Obr. 11).

Skupiny myší podle podávané terapeutické látky:

I. 50 µl roztoku 0,4 mg anti-CD40 + 0,5 mg R-848 + 0,5 mg poly(I:C) + 0,5 mg LTA / ml 0,2 mM mannan-BAM v PBS - 4 pulzy / 12 injekcí (6 myší).

II. 50 µl roztoku 0,4 mg anti-CD40 + 0,5 mg R-848 + 0,5 mg poly(I:C) + 0,5 mg LTA / ml 0,2 mM mannan-BAM v PBS – 4 pulzy / 4 injekce (6 myší).

III. 50 µl roztoku PBS (6 myší).



Obr. 11: Časové schéma pro srovnání dvou režimů aplikace (anti-CD40).

V „den 30“ (poslední den měření velikosti nádorů) začalo sledování doby přežití u myší. V „den 120“ bylo sledování přežití ukončeno.

4 VÝSLEDKY

4.1 Stanovení nádorové infiltrace u melanomu B16-F10 v průběhu terapie založené na kombinaci TLR ligandů a kotveného mannanu

V tomto experimentu byl prováděn rozbor nádorového infiltrátu v průběhu terapie R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM u myšího melanomu B16-F10. Sledována byla infiltrace leukocytů a jejich subpopulací. Sledování nádorové infiltrace bylo ukončeno v „den 23“ z důvodu vyléčení nádorů u léčené skupiny.

Grafy se změnami počtů buněk během terapie jsou uvedeny na obrázku 12. Sledovány byly populace leukocytů (CD45+), granulocytů (CD45+Gr-1+), NK buněk (CD45+NK1.1.+), monocytů/makrofágů (CD45+F4/80+), lymfocytů (CD45+CD3+), Th lymfocytů (CD45+CD3+CD4+), Tc lymfocytů (CD45+CD3+CD8+) a B lymfocytů (CD45+CD19+).

K vyšší leukocytární infiltraci (Obr. 12-A) došlo již v „den 3“, tedy den po prvním pulzu terapie. Infiltrace nádorů leukocyty poté rostla v průběhu celé terapie. K mírnému poklesu došlo v „den 15“, tedy den před posledním pulzem terapie. Nejvyšší infiltrace bylo dosaženo v „den 19“ (den po posledním pulzu terapie), avšak v posledním dni stanovení infiltrace („den 23“) došlo opět k mírnému poklesu počtu leukocytů.

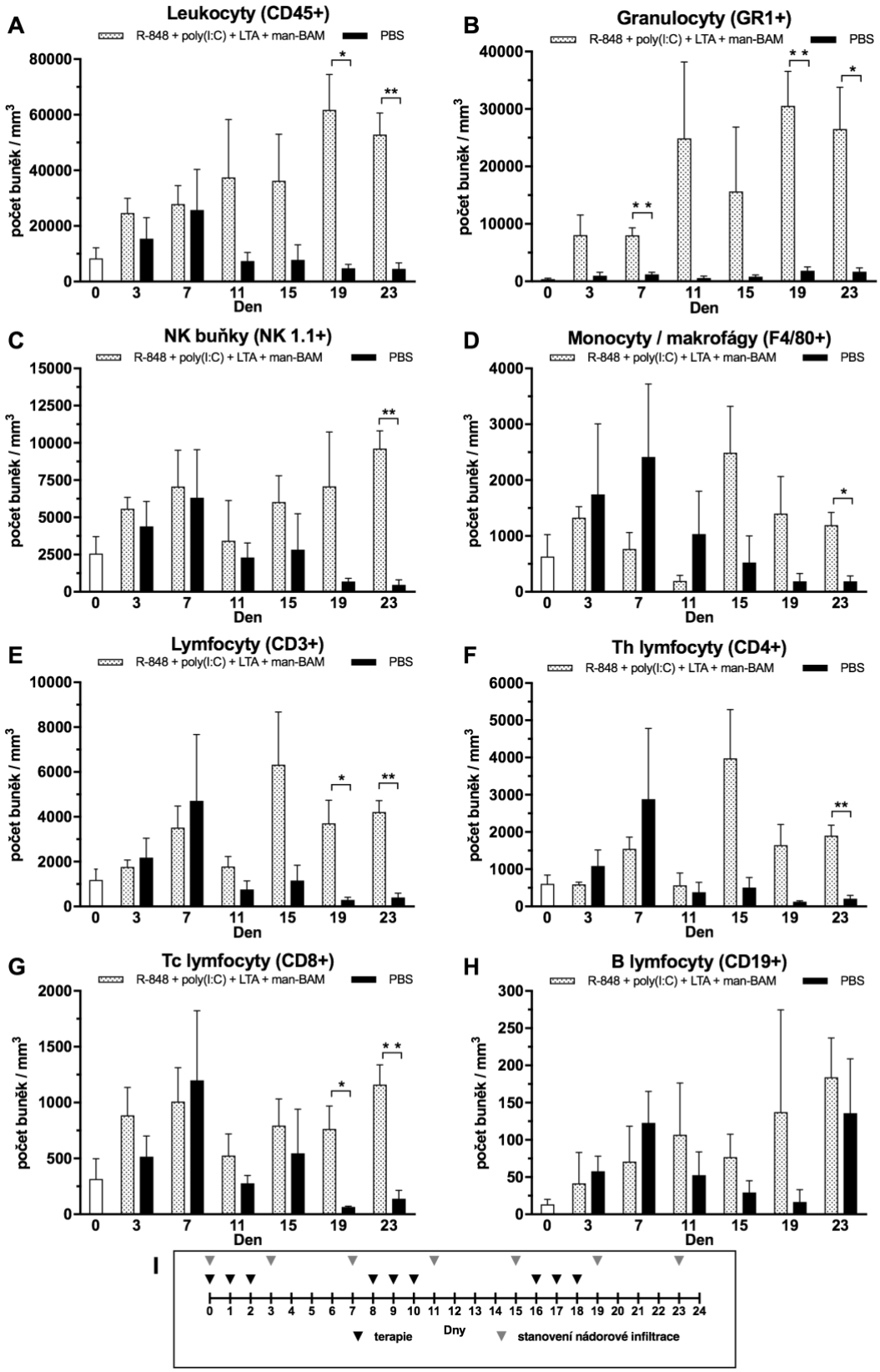
Nejvíce zastoupenými buňkami v leukocytární infiltraci během celé terapie byly granulocyty (Obr. 12-B) a NK buňky (Obr. 12-C). Do „dne 7“ došlo u obou subpopulací k nárůstu počtu buněk v nádoru. V „den 11“ (den po ukončení druhého pulzu terapie) došlo u granulocytů k prudkému nárůstu počtu buněk, avšak u NK buněk byl tento trend v „den 11“ opačný. K nárůstu NK buněk došlo v „den 15“. Tento nárůst, oproti granulocytům, pokračoval až do „dne 23“.

U zbylých subpopulací byly jednotlivé počty buněk, oproti výše uvedeným, nižší. U monocytů a makrofágů (CD45+F4/80+) (došlo po prvním pulzu terapie k nárůstu počtu buněk, který ale do „dne 11“ klesá (Obr. 12-D). Také v první polovině sledování infiltrace byly počty monocytů a makrofágů u kontroly (PBS) vyšší než u léčené skupiny. V druhé polovině sledování infiltrace došlo u léčené skupiny k nárůstu počtu těchto buněk. Poté se do posledního dne počet buněk opět snižoval.

U lymfocytů (Obr. 12-E) došlo k nárůstu počtu buněk vždy před terapeutickým pulzem. K nejvyššímu nárůstu počtu lymfocytů došlo v den před posledním

terapeutickým pulzem („den 15“). Dále lze pozorovat nižší lymfocytární infiltraci do „dne 7“ u léčené skupiny oproti skupině kontrolní (PBS). Nejvíce zastoupenou subpopulací lymfocytů byly Th lymfocyty (Obr. 12-F). Z tohoto důvodu změny v počtu Th lymfocytů během terapie reflektují trend ve změnách počtu celkových lymfocytů. U Tc lymfocytů (Obr. 12-G) bylo nejvyšších hodnot dosaženo den před druhým terapeutickým pulzem a poté poslední den stanovení nádorové infiltrace.

Populace B lymfocytů (Obr. 12-H) se v nádoru vyskytovala nejméně. Největší počet buněk byl naměřen v „den 11“ a v „den 23“.



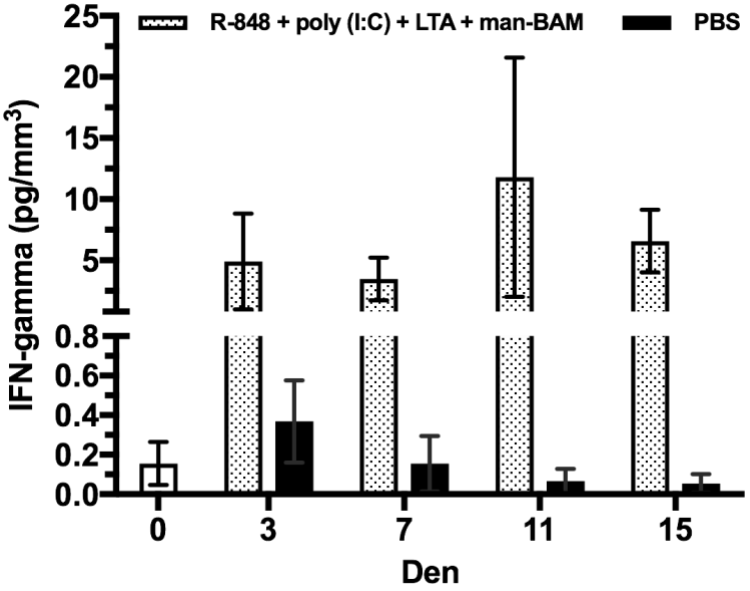
Obr. 12: Nádorová infiltrace melanomu B16-F10 během terapie R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM (A-H) a časové schéma experimentu (I).

Hladiny statistické významnosti proti kontrole (PBS) * = p <0,05, ** = p <0,01.

4.2 Detekce IFN-gamma v supernatantech z nádorového infiltrátu u melanomu B16-F10 pomocí ELISA v průběhu terapie založené na kombinaci TLR ligandů a kotveného mannanu

Tento experiment byl zaměřen na detekci IFN-gamma v supernatantech z nádorového infiltrátu pomocí metody ELISA a přímo navazuje na experiment předešlý. Vzorky pro detekci IFN-gamma byly odebírány během přípravy nádorů pro detekci nádorového infiltrátu.

Z výsledného grafu (Obr. 13) vyplývá, že hladina IFN-gamma u léčené skupiny je mnohonásobně vyšší než u skupiny kontrolní (PBS). Pokud mezi sebou srovnáme množství produkovaného IFN-gamma u léčené skupiny v jednotlivých dnech, vyšší hladiny bylo dosaženo vždy den po pulzu terapie („den 3“ a „den 11“) oproti množství IFN-gamma měřeného před léčebným pulzem („den 0“ a „den 7“).

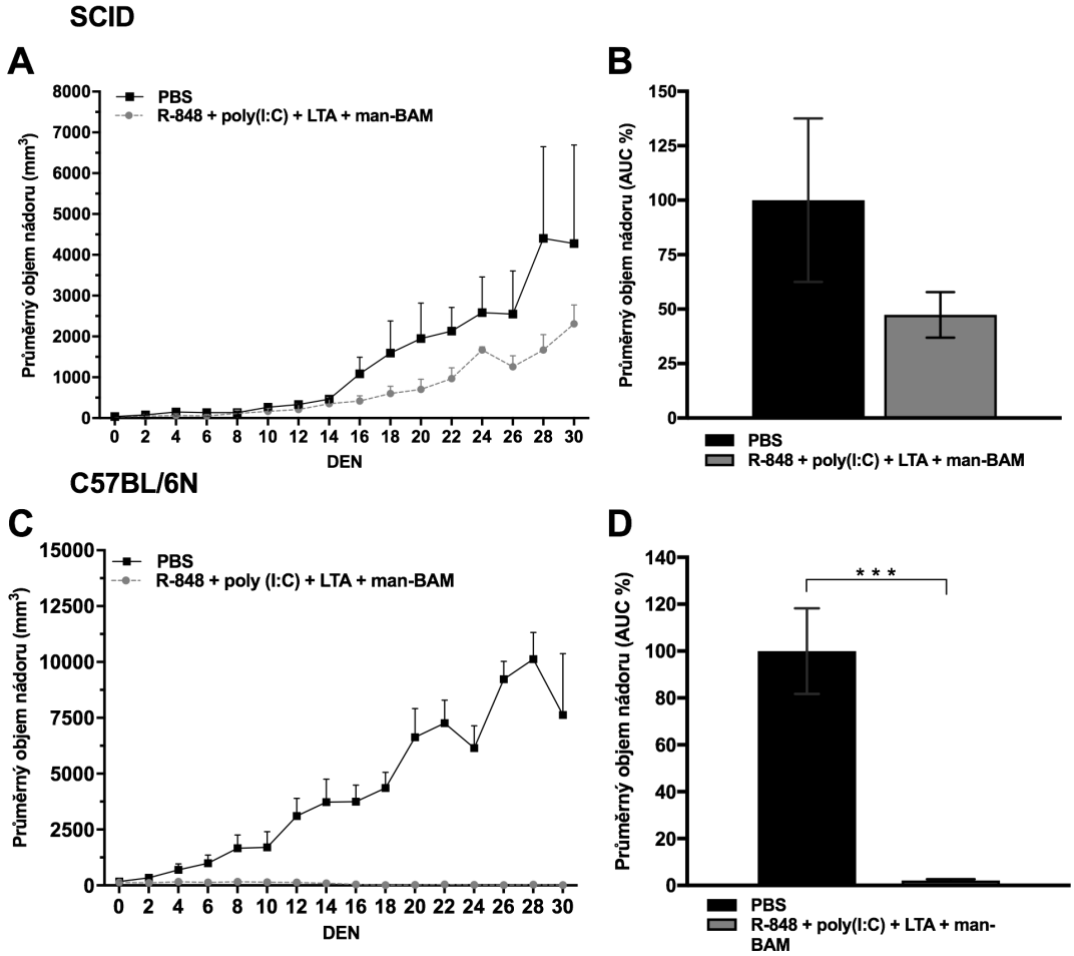


Obr. 13: Stanovení množství IFN-gamma pomocí ELISA během použití terapie R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM u melanomu B16-F10.

4.3 Vliv terapie založené na kombinaci TLR ligandů a kotveného mannanu na růst melanomu B16-F10 u SCID myší

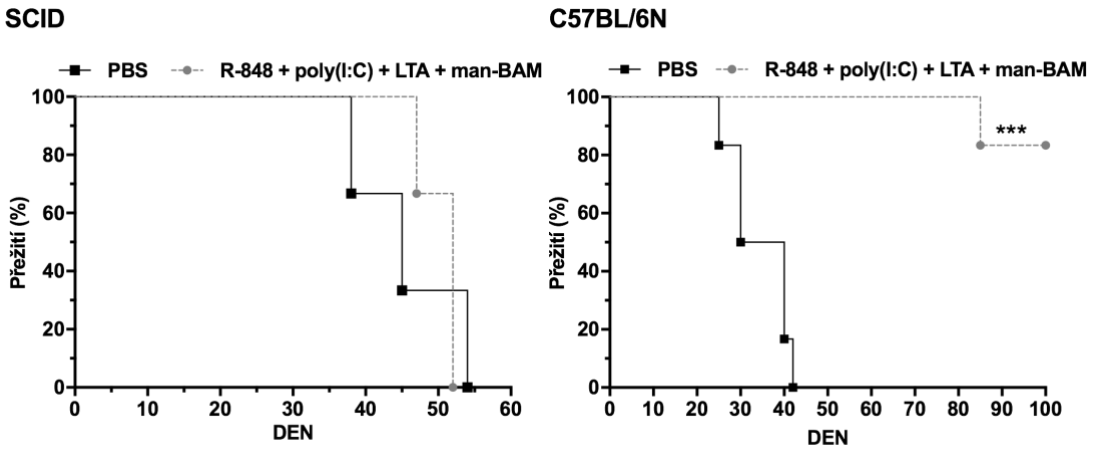
Během tohoto experimentu bylo zjišťováno zapojení získané imunity v redukci nádorového růstu u melanomu B16-F10 a v následné délce přežití u SCID myší během terapie založené na kombinaci R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM.

Redukce nádorového růstu u léčené skupiny byla 53 % (Obr. 14-A, B). Důležité je ale také srovnání s redukcí nádorového růstu u klasických myší C57BL/6N při použití stejné terapie (Obr. 14-C, D). Zde byla redukce nádorového růstu 98 % (Data byla importována z jiného nezávislého experimentu). Lze tedy říci, že získaná imunita se účastní redukce nádorového růstu.



Obr. 14: Vliv terapie R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM na růst nádoru B16-F10 u myší SCID (A, B) a u myší C57BL/6N (C, D). Růst nádorů je vyjádřen křivkami (A, C) s odpovídající plochou pod křivkou (AUC) pro každou skupinu (B, D). Hladina statistické významnosti proti kontrole (PBS) * = p <0,05, *** = p <0,001.

Po ukončení terapie byla sledována doba přežití myší. Z grafu přežití (Obr. 15) je patrné, že je minimální rozdíl mezi léčenou skupinou a skupinou kontrolní. Na druhou stranu u terapie melanomu B16-F10 u myší C57BL/6N je vidět statisticky významné prodloužení přežití oproti kontrole (Data byla importována z jiného nezávislého experimentu). Lze tedy říct, že získaná imunita hraje roli v redukci nádorového růstu a v následném přežití myší u terapie R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM.

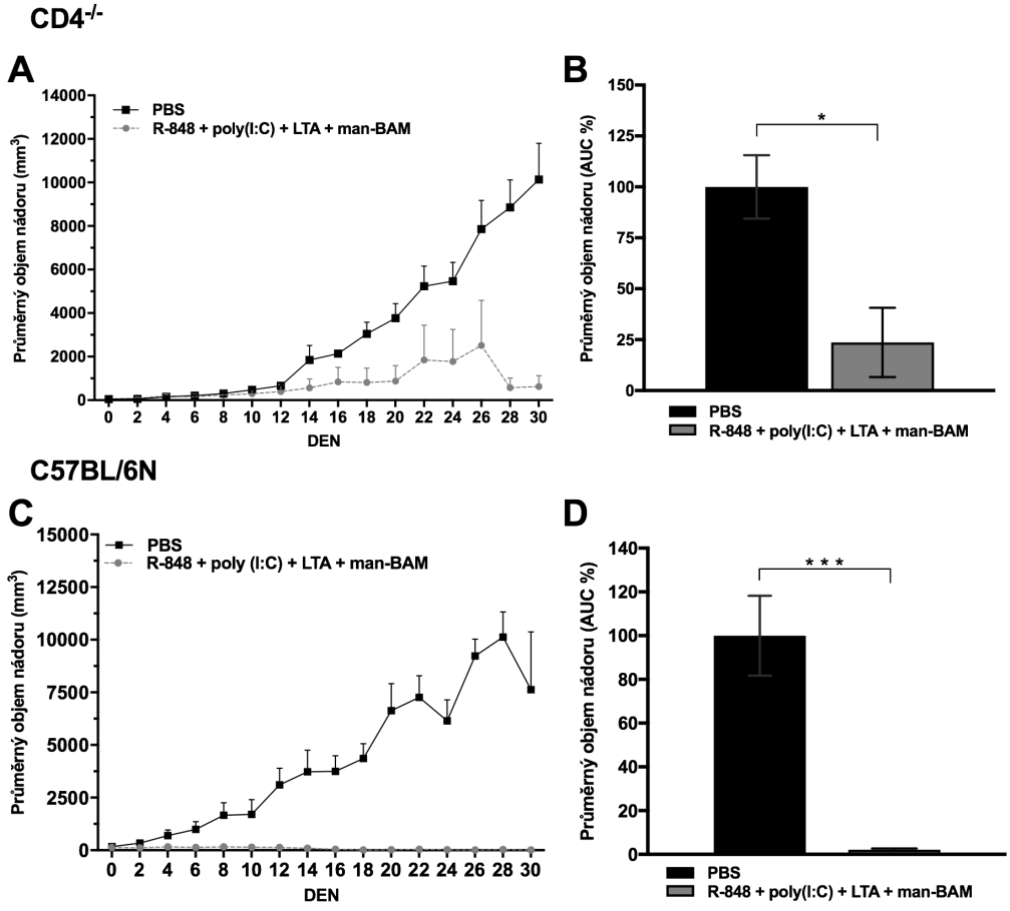


Obr. 15: Analýza přežívání u SCID a C57BL/6N myší. Hladina statistické významnosti proti kontrole (PBS) *** = p <0,001.

4.4 Vliv terapie založené na kombinaci TLR ligandů a kotveného mannanu na růst melanomu B16-F10 u *knockout* CD4 myší

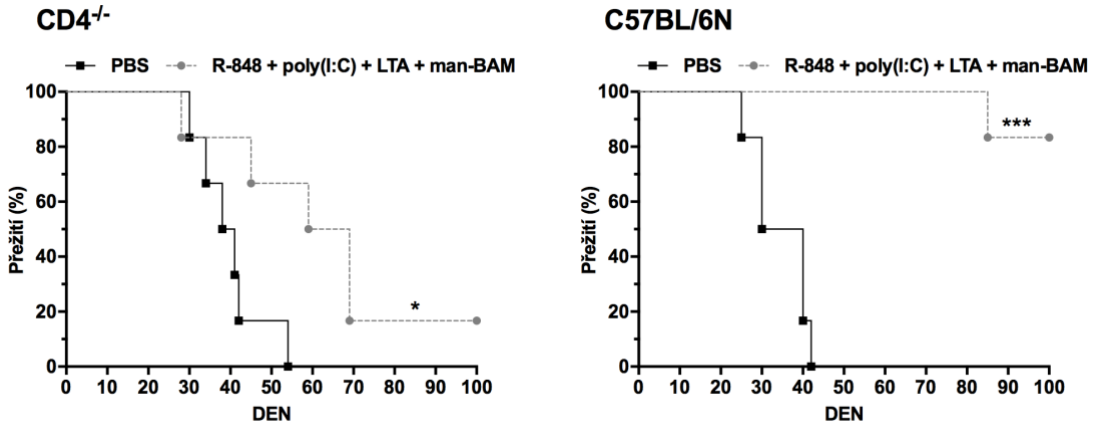
Cílem tohoto experimentu bylo zjistit význam Th lymfocytů v redukci nádorového růstu u melanomu B16-F10 a v následné délce přežití u myší $CD4^{-/-}$ během terapie založené na kombinaci R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM.

Redukce nádorového růstu u léčené skupiny byla 76 % oproti kontrole (PBS) (Obr. 16-A, B). Avšak stejná terapie u myší C57BL/6N vedla k 98 % redukci nádorového růstu (Obr. 16-C, D) (Data byla importována z jiného nezávislého experimentu). Na základě těchto výsledků lze říci, že Th lymfocyty mají vliv na redukci nádoru při použití terapie R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM. Tento vliv však není tak zásadní.



Obr. 16: Srovnání terapie R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM na růst nádoru B16-F10 u myší $CD4^{-/-}$ (A, B) a u myší C57BL/6N (C, D). Růst nádorů je vyjádřen křivkami (A, C) s odpovídající plochou pod křivkou (AUC) pro každou skupinu (B, D). Hladina statistické významnosti proti kontrole (PBS) * = p <0,05, *** = p <0,001.

Po ukončení terapie byla sledována doba přežití myší do „dne 100“ (Obr. 17). U léčené skupiny CD4$^{-/-}$ myší došlo ke statisticky významnému prodloužení přežití, ale ne v takové míře jako u stejné terapie u myší C57BL/6N, kde hranici „dne 100“ přežilo 80 % myší (Data byla importována z jiného nezávislého experimentu). Lze tedy říct, že absence Th lymfocytů nepříznivě ovlivňuje přežití myší.



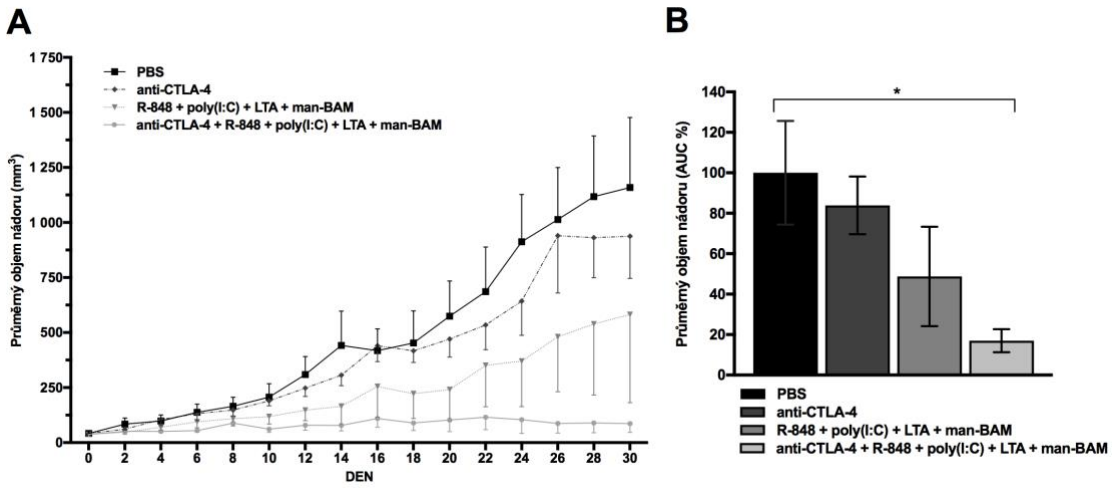
Obr. 17: Analýza přežívání u CD4$^{-/-}$ a C57BL/6N myší. Hladina statistické významnosti proti kontrole (PBS) * = p <0,05, *** = p <0,001.

4.5 Vliv i.t. aplikace samotné anti-CTLA-4 nebo v kombinaci s TLR ligandy a kotveným mannanem na růst myšího pankreatického adenokarcinomu Panc02

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit vliv i.t. podání anti-CTLA-4 na růst pankreatického adenokarcinomu Panc02 a délku přežití myší. Dále byla zkoušena kombinace anti-CTLA-4 spolu s R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM.

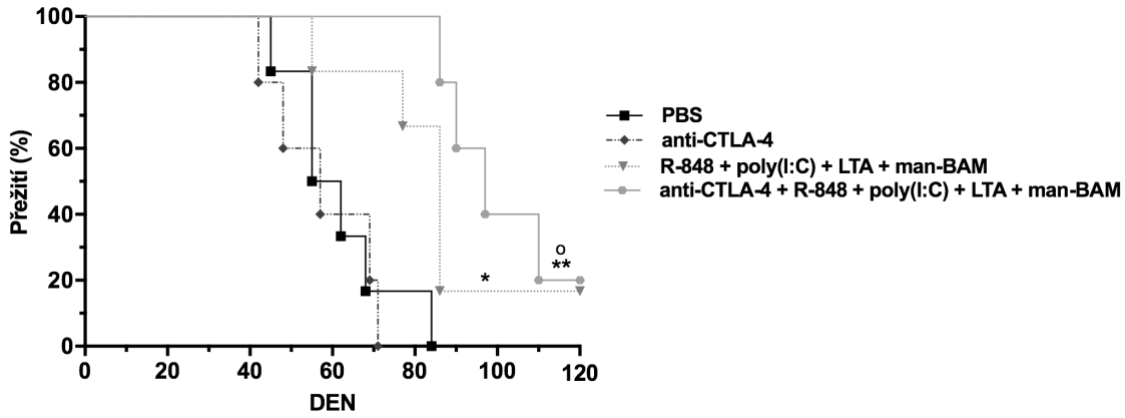
Samotná anti-CTLA-4 vykazovala jen velmi malou účinnost v redukci nádorového růstu (16 %). U skupiny léčené pomocí R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM došlo k 50 % redukci nádorového růstu oproti kontrole (PBS).

Nejlepšího statisticky významného výsledku bylo dosaženo u skupiny léčené kombinací všech těchto látek (anti-CTLA-4 + R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM). Redukce nádorového růstu zde byla 83 % oproti kontrole (PBS) (Obr. 18).



Obr. 18: Vliv i.t. aplikace anti-CTLA-4 v kombinaci s R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM na růst nádoru Panc02. Růst nádorů je vyjádřen křivkami (A) s odpovídající plochou pod křivkou (AUC) pro každou skupinu (B). Hladina statistické významnosti proti kontrole (PBS) * = $p < 0,05$.

Po ukončení terapie byla sledována doba přežití myší do „dne 120“ od zahájení terapie. Z křivek přežití (Obr. 19) je patrné, že myši ve skupině léčené samotnou anti-CTLA-4 nepřežily déle než kontrola (PBS). Nejlepšího výsledku bylo dosaženo u skupiny léčené pomocí anti-CTLA-4 + R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM, kde jedna myš přežila hranici 120 dnů. Nicméně v „den 127“ tato myš uhynula a po následné pitvě byly nalezeny metastáze na plicích. U myší ve skupině léčené kombinací R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM došlo ke statisticky významnému prodloužení přežití a kompletnímu vyléčení jedné myši.

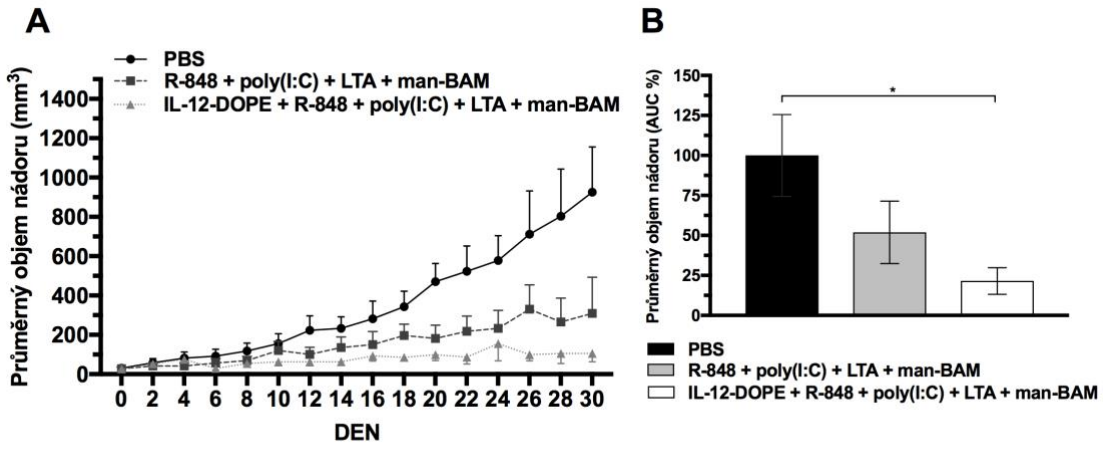


Obr. 19: Analýza přežívání – anti-CTLA-4. Hladina statistické významnosti: * = p <0,05; ** = p <0,01 proti kontrole (PBS), o = p <0,01 proti anti-CTLA-4.

4.6 Vliv i.t. aplikace IL-12-DOPE spolu s TLR agonisty a kotveným mannanem na růst myšího pankreatického adenokarcinomu Panc02

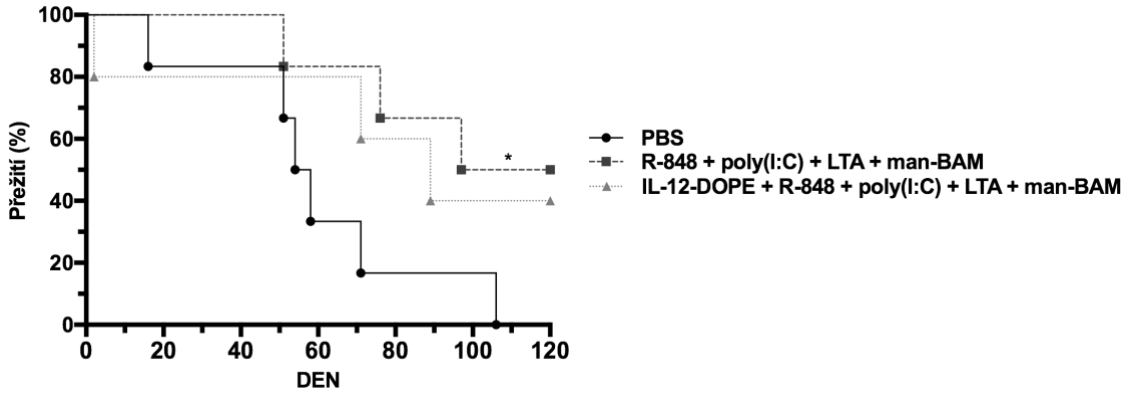
V tomto experimentu byl sledován vliv kotveného IL-12 pomocí kotvy DOPE (IL-12-DOPE) spolu s R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM na růst pankreatického adenokarcinomu Panc02.

Z následujících grafů (Obr. 20) je patrné, že u léčené skupiny pomocí R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM vedla terapie jen k 48 % redukci nádorové masy. Ale u skupiny léčené uvedenou terapií spolu s IL-12-DOPE byla redukce 78 %.



Obr. 20: Vliv i.t. aplikace IL-12-DOPE v kombinaci s R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM na růst nádoru Panc02. Růst nádorů je vyjádřen křivkami (A) s odpovídající plochou pod křivkou (AUC) pro každou skupinu (B). Hladina statistické významnosti proti kontrole (PBS) * = $p < 0,05$.

Po ukončení terapie byla sledována doba přežití myší do „dne 120“ od zahájení terapie. Z křivek přežití (Obr. 21) je patrné, že terapie pomocí IL-12-DOPE vedla k prodloužení přežití myší oproti kontrole (PBS), ale nelze opomenout fakt, že jedna myš uhynula již v „den 2“ terapie. Ze dvou myší, které přežily hranici 120 dní, měla jedna myš (úhyn v „den 122“) několik metastáz na plicích a vnitřní straně žeber. Myš druhá uhynula v „den 135“. Lepšího výsledku bylo dosaženo u skupiny léčené jen pomocí R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM. Zde došlo k úplnému vyléčení dvou myší.



Obr. 21: Analýza přežívání – IL-12-DOPE. Hladina statistické významnosti proti kontrole (PBS) * = p <0,05.

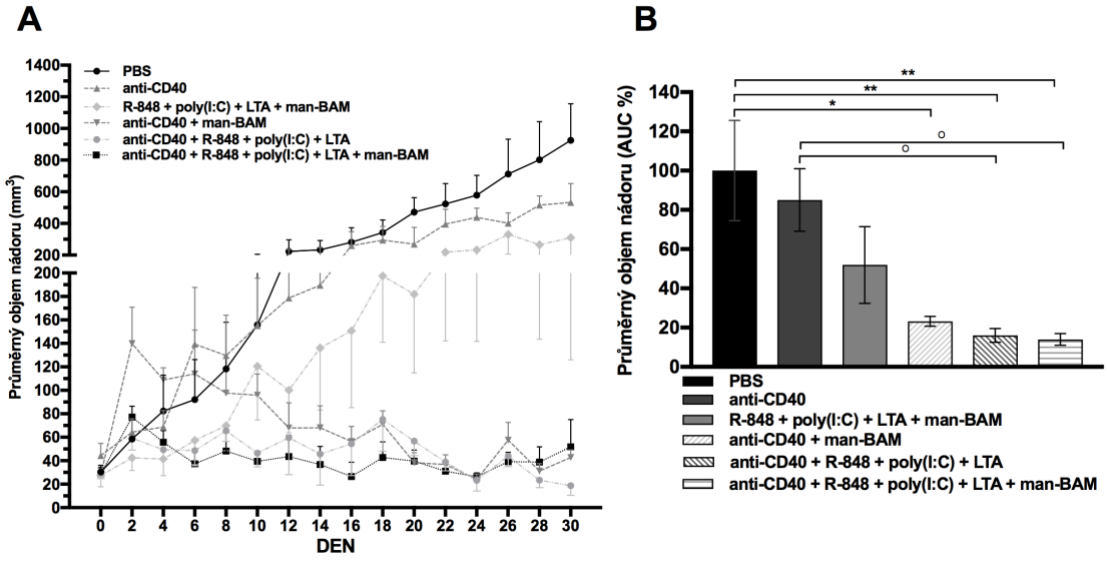
4.7 Vliv i.t. aplikace anti-CD40 v kombinacích s TLR ligandy nebo kotveným mannanem na růst myšího pankreatického adenokarcinomu Panc02

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit vliv i.t. podání anti-CD40 na růst pankreatického adenokarcinomu Panc02 a délku přežití myší. Zkoušena byla samotná aplikace anti-CD40, kombinace s kotveným mannanem, nebo TLR ligandy (R-848, poly(I:C), LTA) a nakonec kombinace všech zmíněných složek dohromady.

Z grafů (Obr. 22) je patrné, že samotná anti-CD40 měla na redukci nádorového růstu jen nepatrný vliv. U kombinace R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM bylo dosaženo 48 % redukce nádorového růstu.

Lepšího výsledku bylo dosaženo při kombinaci anti-CD40 spolu s mannan-BAM, kde byla redukce nádorového růstu 77 %. Kombinace anti-CD40 + R-848 + poly(I:C) + LTA vedla k 84 % redukci nádorové masy.

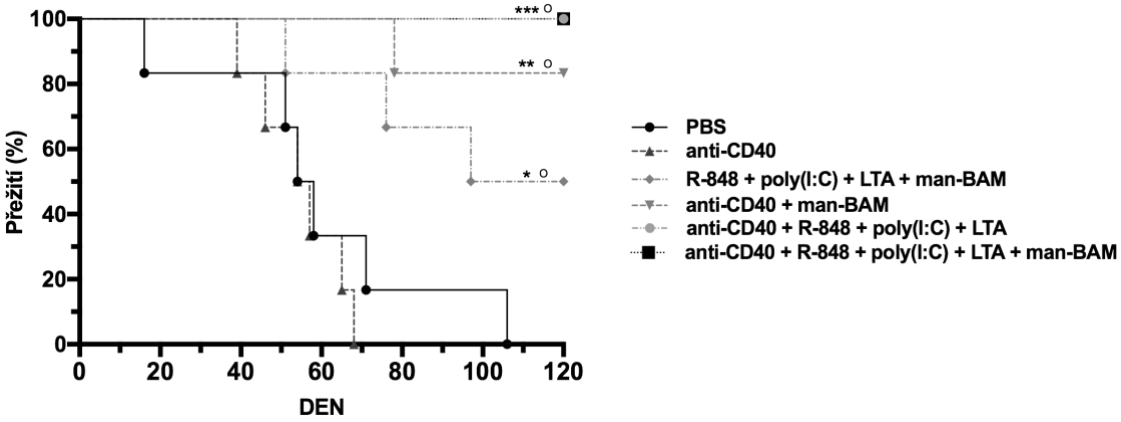
Největší redukce nádorového růstu (86 % oproti kontrole) bylo dosaženo u skupiny léčené kombinací všech složek (anti-CD40 + R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM).



Obr. 22: Vliv i.t. aplikace anti-CD40 v kombinacích s TLR ligandy (R-848 + poly(I:C) + LTA) nebo s mannan-BAM na růst nádoru Panc02. Růst nádorů je vyjádřen křivkami (A) s odpovídající plochou pod křivkou (AUC) pro každou skupinu (B). Hladina statistické významnosti: * = p <0,05; ** = p <0,01 proti kontrole (PBS), o = p <0,05 proti anti-CD40.

Po ukončení terapie byla sledována doba přežití myší do „dne 120“ od zahájení terapie. Z křivek přežití (Obr. 23) je patrné, že použití samotné anti-CD40 nevedlo k prodloužení přežití myší. Avšak pozitivně se v prodloužení přežití projevilo použití této protilátky v kombinaci s mannan-BAM. Kompletně bylo v této skupině vyléčeno pět myší ze šesti.

U skupiny anti-CD40 + R-848 + poly(I:C) + LTA a anti-CD40 + R-848 + poly (I:C) + LTA + mannan-BAM bylo dosaženo stejného výsledku, kde hranici 120 dní přežily všechny myši v dané skupině. Všechny tyto myši byly také kompletně vyléčeny.

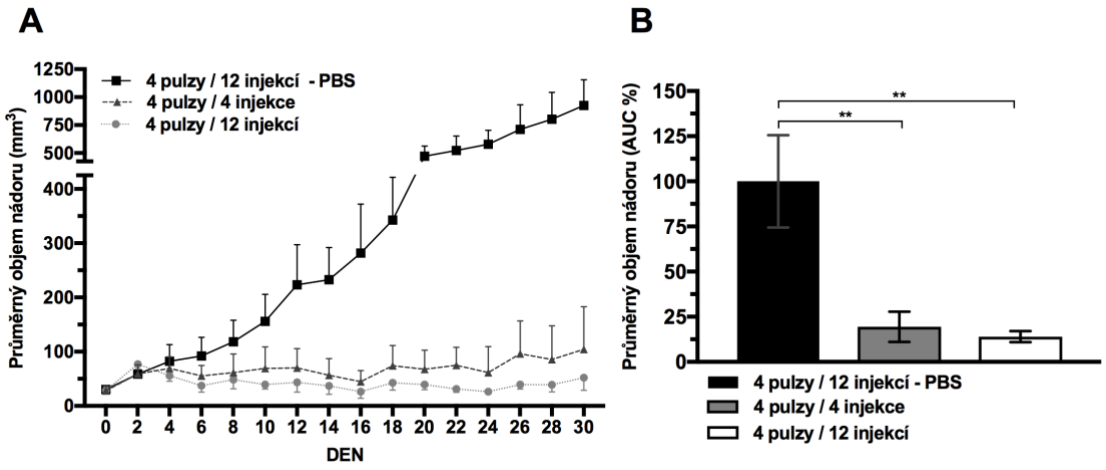


Obr. 23: Analýza přežívání – anti-CD40. Hladina statistické významnosti: * = p <0,05; ** = p <0,01; *** = p <0,001 proti kontrole (PBS), o = p <0,001 proti anti-CD40.

4.8 Srovnání dvou různých režimů aplikace anti-CD40 spolu s TLR agonisty a kotveným mannanem

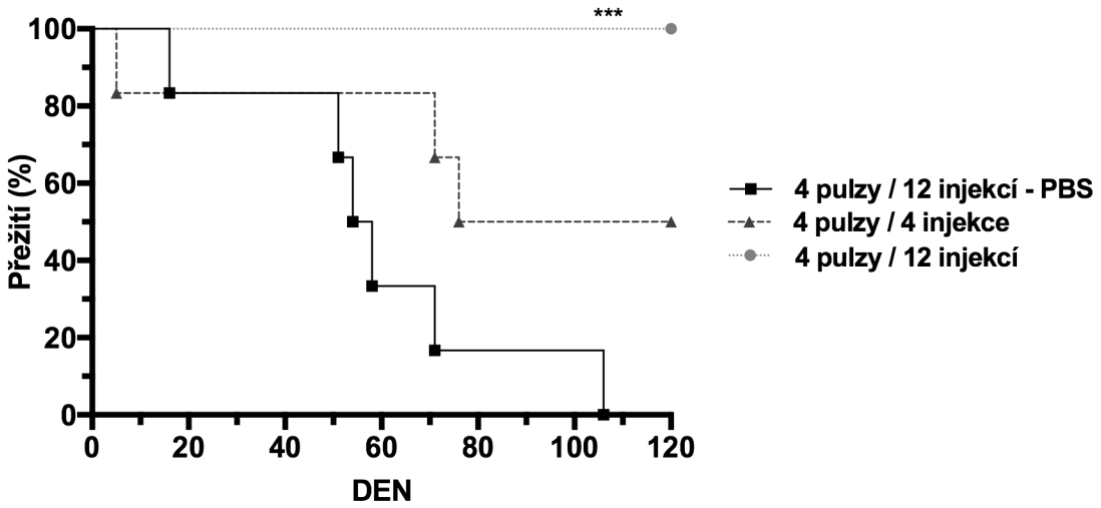
Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda při snížení počtu vpichu do nádoru (4 pulzy/ 4 injekce) zůstane zachován efekt pozorovaný u 4 pulzů se 12 injekcemi u terapie anti-CD40 + R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM.

Z následujících grafů (Obr. 24) vyplývá, že bylo v redukci nádorového růstu při 4 pulzech / 4 injekcích dosaženo podobného efektu jako u 4 pulzů / 12 injekcí. Přesně vedlo omezení terapie na 4 injekce k 81 % redukci nádorového růstu a u 12 injekcí 86 % redukci.



Obr. 24: Srovnání dvou různých režimů aplikace anti-CD40 + R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM na růst nádoru Panc02. Růst nádorů je vyjádřen křivkami (A) s odpovídající plochou pod křivkou (AUC) pro každou skupinu (B). Hladina statistické významnosti proti kontrole (PBS) ** = p <0,01.

Porovnáván byl i vliv na přežití myší do „dne 120“ (Obr.25). U 4 injekcí nebylo dosaženo takového výsledku jako u 12 injekcí. Snížení počtu injekcí s terapií vedlo k přežití a úplnému vyléčení jen u poloviny myší. Kdežto u skupiny léčené 12 injekcemi bylo dosaženo kompletního vyléčení všech myší.



Obr. 25: Analýza přežívání – srovnání dvou různých režimů aplikace anti-CD40 + R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM. Hladina statistické významnosti proti kontrole (PBS) *** = p <0,001.

5 DISKUZE

Nádorovou imunoterapií se náš tým zabývá již několik let. Náš přístup v této problematice je založen na synergickém působení TLR ligandů a ligandů stimulujících fagocytózu (Underhill a Gantner, 2004). I.t. aplikace těchto látek vede k mohutné zánětlivé infiltraci nádoru a k následnému nasměrování fagocytárních buněk na buňky nádorové s kotveným fagocytárním ligandem (Janotová a kol., 2014; Caisová a kol., 2016; Waldmannová a kol., 2016).

Dobrých výsledků při terapii velice agresivního myšího melanomu B16-F10 bylo dosaženo při použití R-848, poly(I:C), bakterie *Listeria monocytogenes* kotvené pomocí kotvy SMCC a kotveného mannanu-SMCC (Caisová a kol., 2016). Nicméně bylo potřeba nahradit tuto bakterii za lépe definovatelnou chemickou látku. Dalším nedostatkem této terapie bylo použití SMCC kotvy, které musí před samotným i.t. podání předcházet ještě i.t. podání redukčního činidla, umožňujícího navázání kotvy do membrán nádorových buněk. Jako nejlepší náhrada za celou bakterii *L. monocytogenes* (TLR2) byla zvolena lipoteichová kyselina (LTA) (TLR2) a SMCC kotva byla nahrazena kotvou BAM, čímž se omezil počet vpichů do nádoru (Masáková, 2016).

Bylo však nutné ověřit, jaké imunitní buňky se účastní redukce růstu melanomu B16-F10 při použití kombinace těchto terapeutik (R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM). To bylo i prvním cílem této diplomové práce.

Nejvíce zastoupenou subpopulací leukocytů v nádoru byly granulocyty a jejich největšího množství bylo dosaženo vždy po pulzu terapie. Tato mohutná zánětlivá infiltrace je dána právě kombinací tří TLR ligandů (LTA – TLR2, poly(I:C) – TLR3, R-848 – TLR7), protože se zapojují obě signální dráhy, dráha MyD88 (TLR2,7) a dráha TRIF (TLR3) (Hosseini a kol., 2015). Dalšími hojně zastoupenými buňkami byly NK buňky. Svými efektorovými mechanismy tyto subpopulace pomáhají v terapii eliminovat nádorové buňky, čímž umožnují uvolňovat nádorové antigeny pro APC, které je poté mohou prezentovat T lymfocytům (Kim a kol., 2007). Tomu by odpovídala i pozdější větší infiltrace monocytů/makrofágů a T lymfocytů, které se vzájemně regulují. Makrofágy potřebují pro svoji aktivaci jako první signál IFN-gamma od T lymfocytů (Mosser, 2003) a jako druhý signál je potřeba navázání CD40 ligandu (CD154 na Th lymfocytech) na CD40 receptor makrofágů a dendritických buněk (Scott

a kol., 2004). Poly(I:C) a R-848 podporují expresi CD40 na APC a podporují také vyzrávání dendritických buněk, což poté umožní lepší prezentaci antigenu (Napolitani a kol., 2005, Macagno a kol., 2007).

Pokud srovnáme tyto výsledky s výsledky infiltrace stanovované během terapie R-848 + poly(I:C) + *L. monocytogenes*-SMCC + mannan-SMCC zjistíme, že trendy ve vyšším počtu buněk oproti kontrole byly stejné (Caisová a kol., 2016). Rozdíl byl však zaznamenán u NK buněk, kdy u terapie pomocí bakterie *L. monocytogenes* nebyly naměřeny rozdílné počty oproti kontrole, ale při použití LTA byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi skupinami. Nutno říci, že u terapie s LTA bylo naměřeno celkově větší množství všech buněk v nádoru než u terapie pomocí celé bakterie. Lze tedy říci, že LTA lépe stimuluje signalizaci než kotvená *L. monocytogenes*.

Druhým cílem této práce byla detekce IFN-gamma v nádoru během terapie 3 TLR a kotveného mannanu. Tento rozpustný cytokin, produkovaný převážně T lymfocyty a v rámci vrozené imunity NK buňkami (Schoenborn a Wilson, 2007), mimo jiné potlačuje proliferaci nádorových buněk a angiogenezi v nádoru (Smyth a kol., 2005, Kim a kol., 2007). Jeho detekce v nádoru pomáhá určit subpopulace CD4+ lymfocytů (Th1 a Th2) podle funkčního působení a produkce cytokinů (Romagnani, 1997). Pomocí ELISA kitu byly naměřeny vysoké hladiny IFN-gamma oproti kontrole po celou dobu terapie. Tato vysoká hodnota IFN-gamma, zřejmě odpovídá nastávající Th1 odpovědi. Th1 prostředí bylo zjištěno i u předešlé terapie s kotvenou bakterií *L. monocytogenes*, kde tomu odpovídaly vysoké hladiny IFN-gamma a nízké hladiny IL-10 (Caisová a kol., 2016). Pokud srovnáme hladiny IFN-gamma obou terapií, u terapie R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM byly hladiny IFN-gamma několikanásobně vyšší než u R-848 + poly(I:C) + *L. monocytogenes*-SMCC + mannan-SMCC. To může být dáno vyšší infiltrací T lymfocytů a NK buněk u terapie s LTA než u terapie s kotvenou bakterií *L. monocytogenes*.

Ačkoli je naše terapie cílená na imunitu vrozenou, její vzájemné propojení s imunitou získanou nelze opomenout. Proto bylo ověřováno zapojení získané imunity v redukci nádorového růstu a vliv této imunity na přežití myší při terapii melanomu B16-F10. Při experimentu na SCID myších bylo zjištěno, že získaná imunita se redukce nádorového růstu účastní a její absence měla negativní vliv na přežití myší. U experimentu s *knockout* CD4 myšmi bylo zjištěno částečné zapojení CD8+ lymfocytů

(CTL) v redukci nádorového růstu i v následném přežití. Pokud se na křivky růstu nádorů podíváme u SCID i *knockout* CD4 myší, lze si povšimnout, že ze začátku nádory rostou přibližně stejně a větší eliminace nádoru nastává u *knockout* CD4 myší až ke konci terapie. Souhlasí to i s výsledky u experimentu s infiltrací, kde byly vyšší počty CD8+ lymfocytů naměřeny až ke konci terapie. CD4+ lymfocyty tedy hrají důležitou roli v redukci nádorového růstu a v následném přežití myší. Tento fakt podporují i výsledky kolegyně Nedbalové, kde u *knockout* CD8 myší byla redukce nádorového růstu srovnatelná s redukcí u klasických myší. Dále všechny léčené *knockout* CD8 myši přežily hranici 100 dní (Nedbalová 2017). Tento efekt si vysvětlujeme větší infiltrací Th lymfocytů v nádoru, zjištěnou během stanovování infiltrace, a s jejich schopností stimulovat dendritické buňky, makrofágy (Scott a kol., 2004) a NK buňky (Kerdiles a kol., 2013).

Optimalizace naší terapie probíhala v předchozích letech na myším melanomu B16-F10. Pro ověření účinnosti terapie na jiné myší nádorové linii byl vybrán také velice agresivní pankreatický adenokarcinom Panc02. Terapie pomocí tří TLR ligandů a kotveného mannanu u této myší nádorové linie sice vedla k redukci nádorového růstu, ale nebylo dosaženo takových výsledků jako u melanomu B16-F10 (Masáková, 2016). Proto se druhá část této práce zabývá možnostmi zesílení naší stávající terapie u Panc02.

Pankreatický adenokarcinom, oproti jiným solidním nádorům, je z imunologického hlediska unikátní. V mikroprostředí nádoru se nachází jen velmi málo efektorových T lymfocytů, ale také je zde popsána větší infiltrace imunosupresivních leukocytů (Ino a kol., 2013). Dále se u adenokarcinomu pankreatu setkáváme s velice silným denzním desmoplastickým stromatem, které slouží jako bariéra pro imunitní buňky a umožnuje nádorovým buňkám progresi a invazivitu do organismu (Kunk a kol., 2016).

Pro posílení efektu byla jako první zkoušena možnost využití inhibitoru imunitního checkpointu, anti-CTLA-4 protilátky. Inhibice CTLA-4 na T lymfocytech pomocí anti-CTLA-4 protilátky vede k aktivaci T lymfocytů a u Treg lymfocytů je spojována s jejich deplecí (Peggs a kol., 2009; Swart a kol., 2016).

Neúčinnost samotné protilátky při našem použití může být dána tím, že více aktivované T lymfocyty nemusí kvůli vysoce denznímu prostředí infiltrovat nádory a deplece Treg lymfocytů nemusí stačit pro efektivní eliminaci nádorových buněk.

Naopak při použití anti-CTLA-4 + R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM může docházet díky zánětlivému prostředí k lepší infiltraci aktivovaných T lymfocytů do nádoru, přičemž vše je podpořeno deplecí Treg lymfocytů. Při použití této kombinace docházelo k lepší redukci nádorového růstu než při použití terapie bez této protilátky, ale je nutno zdůraznit, že na následné pozorování přežití tato kombinace příliš pozitivní dopad. Z tohoto výsledku lze usuzovat, že Treg lymfocyty nemusí hrát takovou roli v mikroprostředí pankreatického adenokarcinomu a imunosuprese může být dána ostatními imunosupresivními leukocyty. Dalším vysvětlením může být vysoká synergická produkce IL-12, která byla pozorována při vzájemném použití R-848 a poly(I:C) (Napolitani a kol., 2005). IL-12, mimo jiné, potlačuje Treg lymfocyty (Zhao a kol., 2012) a MDSC (myeloidní supresorové buňky) (Steding a kol., 2011). Proto následná deplece Treg lymfocytů pomocí anti-CTLA-4 nemusí být natolik účinná při použití naší terapie.

Tato myšlenka nás vedla k následujícímu screeningovému experimentu, použít IL-12 k většímu podpoření naší terapie. IL-12, kromě výše zmíněného potlačení Treg lymfocytů a MDSC, také zvyšuje cytotoxické účinky NK buněk, CD8+ lymfocytů (Perussia a kol., 1992). Použití IL-12-DOPE, bylo inspirováno výsledky vědeckého týmu Zaharoffa, který pro imunoterapii nádoru prsu využíval IL-12/chitosan, čímž dosáhl pomalejšího uvolňování IL-12 v nádoru během terapie (Vo a kol., 2014). Kotva DOPE obsahuje dva alifatické řetězce, kdežto kotva BAM obsahuje jen jeden alifatický řetězec. Proto při použití kotvy DOPE dochází k pozdějšímu uvolňování z membrán buněk, než u kotvy BAM (Kato a kol., 2004).

Výsledky s IL-12-DOPE ukazují částečný vliv na redukci nádorového růstu, avšak na následné přežití tento kotvený interleukin žádný pozitivní efekt neměl. Domníváme se, že vysoké hladiny IL-12, které byly dány vysokou produkcí zmíněnou výše a i.t. podáním, nepříznivě ovlivňují imunitní odpověď. Odpovídalo by to i výsledkům při podávání IL-12 pacientům s renálním karcinomem. Bylo zjištěno, že ze začátku léčby interleukinem 12 došlo k přechodnému zvýšení IFN-gamma, IL-10 a dalších cytokinů. Nicméně opakované podávání IL-12 bylo spojeno se stále zvyšující se hladinou IL-10, přičemž hladiny IFN-gamma a dalších cytokinů již nebyly na takových hodnotách jako na začátku léčby (Portielje a kol., 2003). Při vyšších hladinách IL-12 v organismu tedy může docházet k částečné změně Th1 prostředí na prostředí Th2.

Další experiment navazuje na screeningový pokus kolegyně Paďoukové, která zjistila pozitivní účinky anti-CD40 (Paďouková, ústní sdělení) u Panc02. V této práci byly zkoušeny kombinace anti-CD40 s TLR agonisty a kotveným mannanem. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití anti-CD40 + R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM a při kombinaci těchto složek, ale bez kotveného mannanu.

Pozitivní dopad anti-CD40 spočívá v podpoře vrozené i získané imunity. Jak již bylo zmíněno, fyziologicky je ligandem CD40 receptoru na antigen prezentujících buňkách CD154 exprimovaný Th lymfocyty. Navázáním agonistické anti-CD40 protilátky na receptor CD40 dojde k maturaci antigen prezentujících buněk a k následnému přenosu informace na imunitu získanou a vzniku CD8+ lymfocytů (Eliopoulos a Young, 2004, Scott a kol., 2004). Zmíněná vyšší exprese CD40 při použití R-848 a poly(I:C) je poté podpořena právě anti-CD40, což například umožní u dendritických buněk vyšší expresi MHC molekul a produkci prozánětlivých cytokinů (Kooten, 2000). Účinek terapie je také podpořen vyšší hladinou IL-12, který v mikroprostředí potlačuje Treg lymfocyty a MDSC. Dále bylo zjištěno výzkumným týmem profesora Vonderheida, že makrofágy aktivované přes CD40 silně narušují stroma pankreatického adenokarcinomu a tím pomáhají narušit denzní prostředí v nádoru (Beatty a kol., 2011, Vonderheide a Glennie, 2013).

Stejnou účinnost pozorovanou u kombinace anti-CD40 + 3 TLR a anti-CD40 + 3 TLR + mannan-BAM si vysvětlujeme použitím lipoteichové kyseliny. LTA totiž obsahuje dva řetězce mastných kyselin, a tudíž se i může nespecificky vázat na membránové fosfolipidy buněk (Ginsburg, 2002) a tím může zastávat stejnou funkci jako kotvený mannan. Jediný rozdíl je, že mannan-BAM může spouštět komplement přes MBL, nebo může dojít k opsonizaci nádorové buňky iC3b jednotkou komplementu a poté k fagocytóze buňky (Dahl a kol., 2001; Jack a kol., 2001). Kdežto LTA je, kromě TLR2, rozpoznáván ještě Scavenger („úklidovými“) receptory (Peiser a kol., 2002).

Z výše uvedeného by vyplývalo, že by se terapie mohla aplikovat bez kotveného mannanu, ale je nutno podotknout, že tato kombinace byla později zkoušena i na starších a větších nádorech (16 dní) a absence kotveného mannanu se negativně projevila na růstu nádorů (Ženka, ústní sdělení).

Je potřebné ještě zmínit jeden důvod, proč bylo dosaženo u terapie s anti-CD40 protilátkou takových výsledků. Paměťové T lymfocyty. Bylo zjištěno, že při kombinaci TLR ligandů (2, 3, 4, 7, 9) a agonistů CD40 byla stimulace odpovědi CD8+ lymfocytů

10-20 x větší než při použití samotných látek (Ahonen a kol., 2004). Kombinace TLR a CD40 agonistů vedla k zvýšené expanzi T lymfocytů, větší lytické aktivitě a produkci IFN-gamma a k vývoji funkčních paměťových T lymfocytů. Tento vznik paměťových T lymfocytů je při naší terapii ještě podpořen pulzní aplikací, při které pravděpodobně může mezi pulzy docházet k rychlejší odpovědi T lymfocytů a k vývoji většího počtu paměťových T lymfocytů – vakcinace organismu (Ženka, ústní sdělení).

Částečně by tuto myšlenku podporoval i poslední experiment. Poukázal na to, že důležitější při naší terapii je pravděpodobně pulzní schéma nežli počet injekcí s terapeutikem. Při použití čtyř injekcí ve čtyřech pulzech bylo dosaženo srovnatelné redukce nádorů jako při použití dvanácti injekcí ve čtyřech pulzech. Tento trend se však nepromítl v následné době přežití myší. Nedošlo totiž k úplné eliminaci nádorů u všech myší a po skončení terapie pankreatický adenokarcinom u dvou myší začal zase agresivně růst. Momentálně je naším týmem zkoušena terapie aplikovaná v osmi injekcích během 4 pulzů, při které je podle průběžných výsledků redukce nádorů dosaženo podobného výsledku (Ženka, ústní sdělení).

Tato diplomová práce měla částečně přispět k objasnění imunologických procesů během imunoterapie založené na kombinaci TLR ligandů a ligandů stimulujících fagocytózu a nastiňuje možné cesty, kterými se náš tým může v nejbližší době vydat.

6 ZÁVĚR

- Nejvíce zastoupenou subpopulací leukocytů v nádorovém prostředí melanomu B16-F10 během terapie kombinací R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM byly granulocyty. Největší infiltrace granulocyty byla naměřena vždy na konci pulzu terapie. Další nejvíce zastoupenou subpopulací byly NK buňky.

- Během terapie melanomu B16-F10 kombinací R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM byly naměřeny vysoké hladiny IFN-gamma oproti neléčené kontrole.

- Získaná imunita se účastní eliminace nádorového růstu během terapie melanomu B16-F10 kombinací R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM. Absence buněk získané imunity nepříznivě ovlivňuje celkové vyléčení myší.

- Anti-CTLA-4 protilátka spolu v kombinaci s R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM vedla k částečné redukci růstu pankreatického adenokarcinomu Panc02. Použití této protilátky se však pozitivně neprojevilo při přežívání myší.

- Kombinace IL-12-DOPE + R-848 + poly(I:C) + LTA + mannan-BAM vedla k částečné redukci růstu pankreatického adenokarcinomu Panc02. Lepší účinek se však neprojevil při následném přežití myší.

- U protilátky anti-CD40 bylo nejlepších výsledků dosaženo při kombinaci s R-848 + poly(I:C) + LTA a také při stejné kombinaci spolu s mannan-BAM. Tyto kombinace vedly k úplnému uzdravení všech myší v testované skupině.

- Aplikačním režimem 4 pulzy / 4 injekce bylo dosaženo stejné redukce nádorového růstu pankreatického adenokarcinomu Pan02 jako při použití režimu 4 pulzy / 12 injekcí. Negativně se však menší počet injekcí projevil při následném přežívání myší.

7 SEZNAM ZKRATEK

ADCC – buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (*antibody dependent cellular cytotoxicity*)

APC – antigen prezentující buňky (*antigen presenting cells*)

AUC – plocha pod křivkou (*area under the curve*)

B16-F10 – myší melanom

BAM –*biocompatible anchor for cell membrane*

BCG – *Bacille Calmette Guerin*

C3 a C5 – sérové proteiny komplementu

CAR – *chimeric antigen receptor*

CD – *cluster of differentiation*

CpG – doména bohatá na cystein (*cystein rich domain*)

CpG ODN – CpG oligodeoxynukleotid, systetický TLR 9 agonista

CTL – cytotoxické T lymfocyty (*cytotoxic T lymphocytes*)

CTLA-4 – *cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*

DAMPS – *damage associated molecular patterns*

DC – dendritické buňky (*dendritic cells*)

DMEM – *Dulbecco's modified eagle medium*, určeno pro buňky Panc02

DMSO – dimetyl-sulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)

DOPE – dioleoylphosphatidylethanolamin, kotva

dsRNA – dvouvláknová ribonukleová kyselina (*double-stranded RNA*)

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

ELISA – *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

Fas – *first apoptosis signal receptor*

FasL – *first apoptosis signal ligand*

FCS – *fetal calf serum*, fetální telecí sérum

FoxP3 – *forkhead box P3*

GITR – *glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor*

HBSS – *Hank's balanced salt solution*

IDO – indoleamin 2,4-dioxygenáza

IFN – interferon

IL– interleukin

i.t. – intratumorální

IVC – *individually ventilated cages*

LAG-3 – *lymfocyte-activation gene-3*

LAK – *lymphokine activated killers*

LPS – lipopolysacharid

LTA – lipoteichová kyselina

M1 – podskupina TAM aktivovaná klasicky

M2 – podskupina TAM aktivovaná alternativně

MBL – manózu vázající lektin (*mannan binding lectin*)

MDSC – myeloidní supresorové buňky (*myeloid derived suppressor cells*)

MHC – hlavní histokompatibilní komplex (*major histocompatibility complex*)

MIC – *major immunogene complex*

MPL – monofosforyl lipid A

MR – manózový receptor (*mannose receptor*)

MyD88 – *myeloid differentiation primary response protein 88*

NK – přirození zabíječi (*natural killer*)

NKG2D – *natural killer group 2D*

OX40 – *tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4*

PAMPs – *pathogen associated molecular patterns*

Panc02 – myší pankreatický adenokarcinom

PBS – fosfáty pufrovaný fyziologický roztok (*phosphate-buffered saline*)

PD-1 – *programmed cell death 1 receptor*

PD-1L – *programmed cell death 1 ligand*

POLY(I:C) – polyinosinová-polycytidylová kyselina (*polyinosinic-polycytidylic acid*)

PRRs – *pattern recognition receptors*

RAET1 – *retinoic acid early transcript 1*

R-848 – resiquimod

RPMI – *Roswell park memorial institute medium*, určeno pro buňky B16-F10

s.c. – subkutánní

SCID – *Severe Combined Immunodeficiency Disease*

SEM – střední chyba průměru (*standard error of the mean*)

SMCC – 4-(N-Maleimidomethyl) cyclo-hexanecarboxylic-acid N-hydroxysuccinimide ester

SPF – *specific pathogen free*

ssRNA – jednovláknová RNA (*single-stranded RNA*)

TAA – s nádorem asociované antigeny (*tumour associated antigens*)

TAM – s nádorem asociované makrofágy (*tumour-associated macrophages*)

TGF-beta – *transforming growth factor beta*

Th1 a Th2 – označení subpopulace pomocných T lymfocytů

TIL – tumor infiltrating lymphocytes

TIM-3 – *T-cell immunoglobulin and mucin protein-3*

TLR – *toll-like receptor*

TNF – *tumor necrosis factor*

TCR – T-buněčný receptor (*T-cell receptor*)

TRAIL – *TNF-related apoptosis inducing ligand*

Treg –T regulační lymfocyty (*T regulatory lymphocytes*)

TRIF – *TIR domain containing adaptor inducing interferon beta*

TSA – nádorově specifické antigeny (*tumour specific antigens*)

VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor (*vascular endothelial growth factor*)

VSV – *Vesicular stomatitis virus*

8 POUŽITÁ LITERATURA

Abouelmaatti, R. R., Elfeil, W., Wang, Y., & Liu, S. (2013). Pattern recognition receptors mini review. *Global Animal Science Journal*, *1*, 1118-1127.

Adams, S. (2009). Toll-like receptor agonists in cancer therapy. *Immunotherapy*, *1*(6), 949-964.

Ahonen, C. L., Doxsee, C. L., McGurran, S. M., Riter, T. R., Wade, W. F., Barth, R. J., ... & Kedl, R. M. (2004). Combined TLR and CD40 triggering induces potent CD8+ T cell expansion with variable dependence on type I IFN. *Journal of Experimental Medicine*, *199*(6), 775-784.

Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, *124*(4), 783-801.

Beatty, G. L., Chiorean, E. G., Fishman, M. P., Saboury, B., Teitelbaum, U. R., Sun, W., ... & Vonderheide, R. H. (2011). CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. *Science*, *331*(6024), 1612-1616.

Besser, M. J., Shapira-Frommer, R., Treves, A. J., Zippel, D., Itzhaki, O., Hershkovitz, L., ... & Shalmon, B. (2010). Clinical responses in a phase II study using adoptive transfer of short-term cultured tumor infiltration lymphocytes in metastatic melanoma patients. *Clinical cancer research*, *16*(9), 2646-2655.

Borghaei, H., Smith, M. R., & Campbell, K. S. (2009). Immunotherapy of cancer. *European journal of pharmacology*, *625*(1-3), 41-54.

Brentjens, R. J., Davila, M. L., Riviere, I., Park, J., Wang, X., Cowell, L. G., ... & Borquez-Ojeda, O. (2013). CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Science translational medicine*, *5*(177), 177ra38-177ra38.

Burnet, M. (1957). Cancer—a biological approach: I. The processes of control. II. The significance of somatic mutation. *British medical journal*, *1*(5022), 779

Burnet, F. M. (1971). Immunological surveillance in neoplasia. *Immunological Reviews*, *7*(1), 3-25.

Bui, J. D., & Schreiber, R. D. (2007). Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Current opinion in immunology*, *19*(2), 203-208.

Caisová, V., Vieru, A., Kumžáková, Z., Glaserová, S., Husníková, H., Vácová, N., ... & Ženka, J. (2016). Innate immunity based cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *BMC cancer*, *16*(1), 940.

Coley, W. B. (1891). II. Contribution to the knowledge of sarcoma. *Annals of surgery*, *14*(3), 199.

Dahl, M. R., Thiel, S., Matsushita, M., Fujita, T., Willis, A. C., Christensen, T., ... & Jensenius, J. C. (2001). MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity*, *15*(1), 127-135.

Davis, Z. B., Felices, M., Verneris, M. R., & Miller, J. S. (2015). Natural killer cell adoptive transfer therapy: exploiting the first line of defense against cancer. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, *21*(6), 486.

De Gruijl, T. D., van den Eertwegh, A. J., Pinedo, H. M., & Scheper, R. J. (2008). Whole-cell cancer vaccination: from autologous to allogeneic tumor-and dendritic cell-based vaccines. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *57*(10), 1569.

Drake, C. G., Lipson, E. J., & Brahmer, J. R. (2014). Breathing new life into immunotherapy: review of melanoma, lung and kidney cancer. *Nature reviews Clinical oncology*, *11*(1), 24.

Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology*, *3*(11), 991.

Dunn, G. P., Koebel, C. M., & Schreiber, R. D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews Immunology*, *6*(11), 836.

Ehrlich, P. (1909). Über den jetzigen Stand der Chemotherapie. *European Journal of Inorganic Chemistry*, *42*(1), 17-47.

Eliopoulos, A. G., & Young, L. S. (2004). The role of the CD40 pathway in the pathogenesis and treatment of cancer. *Current opinion in pharmacology*, *4*(4), 360-367.

Finn, O. J. (2012). Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Annals of oncology*, *23*(suppl_8), viii6-viii9.

Fioretti, D., Iurescia, S., Fazio, V. M., & Rinaldi, M. (2010). DNA vaccines: developing new strategies against cancer. *BioMed Research International*, *2010*.

Francisco, L. M., Salinas, V. H., Brown, K. E., Vanguri, V. K., Freeman, G. J., Kuchroo, V. K., & Sharpe, A. H. (2009). PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*, *206*(13), 3015-3029.

Gasser, S., & Raulet, D. H. (2006). Activation and self-tolerance of natural killer cells. *Immunological reviews*, *214*(1), 130-142.

Gibson, S. J., Lindh, J. M., Riter, T. R., Gleason, R. M., Rogers, L. M., Fuller, A. E., ... & Noelle, R. J. (2002). Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cellular immunology*, *218*(1-2), 74-86.

Gilboa, E. (2007). DC-based cancer vaccines. *The Journal of clinical investigation*, *117*(5), 1195-1203.

Ginsburg, I. (2002). Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *The Lancet infectious diseases*, *2*(3), 171-179.

Grupp, S. A., Kalos, M., Barrett, D., Aplenc, R., Porter, D. L., Rheingold, S. R., ... & Milone, M. C. (2013). Chimeric antigen receptor–modified T cells for acute lymphoid leukemia. *New England Journal of Medicine*, *368*(16), 1509-1518.

Guo, C., Manjili, M. H., Subjeck, J. R., Sarkar, D., Fisher, P. B., & Wang, X. Y. (2013). Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future. *Advances in cancer research*, *119*, 421-475.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57-70.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674.

Horikawa, N., Abiko, K., Matsumura, N., Hamanishi, J., Baba, T., Yamaguchi, K., ... & Konishi, I. (2017). Expression of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer inhibits tumor immunity through the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *Clinical Cancer Research*, *23*(2), 587-599.

Hořejší, V. (2015). Protinádorové zbraně imunitního systému. *Klinická onkologie*, 15.

Hosseini, A. M., Majidi, J., Baradaran, B., & Yousefi, M. (2015). Toll-like receptors in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Advanced pharmaceutical bulletin*, *5*(Suppl 1), 605.

Huang, B., Pan, P. Y., Li, Q., Sato, A. I., Levy, D. E., Bromberg, J., ... & Chen, S. H. (2006). Gr-1+ CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer research*, *66*(2), 1123-1131.

Chiu, H. Y., Sun, G. H., Chen, S. Y., Wang, H. H., Ho, M. Y., Chu, C. Y., ... & Sun, K. H. (2013). Pre-existing fas ligand (FasL) in cancer cells elicits tumor-specific protective immunity, but delayed induction of FasL expression after inoculation facilitates tumor formation. *Molecular carcinogenesis*, *52*(9), 705-714.

Ino, Y., Yamazaki-Itoh, R., Shimada, K., Iwasaki, M., Kosuge, T., Kanai, Y., & Hiraoka, N. (2013). Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. *British journal of cancer*, *108*(4), 914.

Jack, D. L., Klein, N. J., & Turner, M. W. (2001). Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. *Immunological reviews*, *180*(1), 86-99.

Jakóbisiak, M., Lasek, W., & Gołąb, J. (2003). Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunology letters*, *90*(2-3), 103-122.

Janeway Jr, C. A., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual review of immunology*, *20*(1), 197-216.

Janotová, T., Jalovecká, M., Auerová, M., Švecová, I., Bruzlová, P., Maierová, V., ... & Ženka, J. (2014). The use of anchored agonists of phagocytic receptors for cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *PloS one*, *9*(1), e85222.

Janssen, E. M., Lemmens, E. E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M. G., & Schoenberger, S. P. (2003). CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature*, *421*(6925), 852.

Jenkins, M. K., & Johnson, J. G. (1993). Molecules involved in T-cell costimulation. *Current opinion in immunology*, *5*(3), 361-367.

Kaczanowska, S., Joseph, A. M., & Davila, E. (2013). TLR agonists: our best frenemy in cancer immunotherapy. *Journal of leukocyte biology*, *93*(6), 847-863.

Kato, K., Itoh, C., Yasukouchi, T., & Nagamune, T. (2004). Rapid protein anchoring into the membranes of mammalian cells using oleyl chain and poly (ethylene glycol) derivatives. *Biotechnology progress*, *20*(3), 897-904.

Kawai, K., Miyazaki, J., Joraku, A., Nishiyama, H., & Akaza, H. (2013). Bacillus Calmette–Guerin (BCG) immunotherapy for bladder cancer: current understanding and perspectives on engineered BCG vaccine. *Cancer science*, *104*(1), 22-27.

Kawai, T., & Akira, S. (2007). TLR signaling. *Seminars in immunology. Elsevier*, *19*, (1), 24-32).

Keenan, B. P., & Jaffee, E. M. (2012). Whole cell vaccines—past progress and future strategies. *Seminars in oncology, Elsevier*, *39* (3), 276-286.

Kerdiles, Y., Ugolini, S., & Vivier, E. (2013). T cell regulation of natural killer cells. *Journal of Experimental Medicine*, *210*(6), 1065-1068.

Kilpatrick, D. C. (2002). Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. *Transfusion Medicine*, *12*(6), 335-352.

Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, *121*(1), 1-14.

Kooten, C., & Banchereau, J. (2000). CD40-CD40 ligand. *Journal of leukocyte biology*, *67*(1), 2-17.

Kunk, P. R., Bauer, T. W., Slingluff, C. L., & Rahma, O. E. (2016). From bench to bedside a comprehensive review of pancreatic cancer immunotherapy. *Journal for immunotherapy of cancer*, *4*(1), 14.

Levy, A. P., Levy, N. S., Wegner, S., & Goldberg, M. A. (1995). Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(22), 13333-13340.

Lipke, P. N., & Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal of bacteriology*, *180*(15), 3735-3740.

Macagno, A., Napolitani, G., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2007). Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation. *Trends in immunology*, *28*(5), 227-233.

Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., & Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology*, *23*(11), 549-555.

Matoušková, M. (2015). Imunoterapie uroteliálního karcinomu močového měchýře–od BCG vakcín k cílené imunoterapii. *Klinická onkologie*, *28*(6).

Masáková, K. (2016). *Nádorová imunoterapie založená na mechanismech vrozené imunity a její optimalizace* (Bakalářská práce). Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

Massagué, J., Blain, S. W., & Lo, R. S. (2000). TGFβ signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*, *103*(2), 295-309.

Medzhitov, R., & Janeway Jr, C. A. (1998, October). Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. In *Seminars in immunology* (Vol. 10, No. 5, pp. 351-353). Academic Press.

Menon, S., Shin, S., & Dy, G. (2016). Advances in cancer immunotherapy in solid tumors. *Cancers*, *8*(12), 106.

Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Current opinion in immunology*, *27*, 16-25.

Mosser, D. M. (2003). The many faces of macrophage activation. *Journal of leukocyte biology*, *73*(2), 209-212.

Napolitani, G., Rinaldi, A., Bertoni, F., Sallusto, F., & Lanzavecchia, A. (2005). Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1–polarizing program in dendritic cells. *Nature immunology*, *6*(8), 769.

Nedbalová, P. (2017). Úloha vrozené a získané imunity v imunoterapii melanomu a pankreatického adenokarcinomu (Diplomová práce). Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

Neville, A. M., Mackay, A. M., Westwood, J., Turberville, C., & Laurence, D. J. (1975). Human tumour-associated and tumour-specific antigens: some concepts in relation to clinical oncology. *Journal of Clinical Pathology*, *1*(1), 102-112.

Old, L. J., & Boyse, E. A. (1964). Immunology of experimental tumors. *Annual review of medicine*, *15*(1), 167-186.

Opanasopit, P., Shirashi, K., Nishikawa, M., Yamashita, F., Takakura, Y., & Hashida, M. (2001). In vivo recognition of mannosylated proteins by hepatic mannose receptors and mannan-binding protein. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *280*(5), G879-G889.

Palucka, K., & Banchereau, J. (2012). Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews Cancer*, *12*(4), 265.

Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, *12*(4), 252.

Peggs, K. S., Quezada, S. A., Chambers, C. A., Korman, A. J., & Allison, J. P. (2009). Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti–CTLA-4 antibodies. *Journal of Experimental Medicine*, *206*(8), 1717-1725.

Peiser, L., Mukhopadhyay, S., & Gordon, S. (2002). Scavenger receptors in innate immunity. *Current opinion in immunology*, *14*(1), 123-128.

Perussia, B., Chan, S. H., D'Andrea, A., Tsuji, K., Santoli, D., Pospisil, M., ... & Trinchieri, G. (1992). Natural killer (NK) cell stimulatory factor or IL-12 has differential effects on the proliferation of TCR-alpha beta+, TCR-gamma delta+ T lymphocytes, and NK cells. *The Journal of Immunology*, *149*(11), 3495-3502.

Pilotte, L., Larrieu, P., Stroobant, V., Colau, D., Dolušić, E., Frédérick, R., ... & Van den Eynde, B. J. (2012). Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2, 3-dioxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(7), 2497-2502.

Portielje, J. E., Lamers, C. H., Kruit, W. H., Sparreboom, A., Bolhuis, R. L., Stoter, G., ... & Gratama, J. W. (2003). Repeated administrations of interleukin (IL)-12 are associated with

persistently elevated plasma levels of IL-10 and declining IFN-γ, tumor necrosis factor-α, IL-6, and IL-8 responses. *Clinical Cancer Research*, *9*(1), 76-83.

Říhová, B., & Šťastný, M. (2015). Historie imunoterapie–od Coley toxinů ke kontrolním bodům imunitní reakce. *Klinická onkologie*, 8.

Romagnani, S. (1997). The th1/th2 paradigm. *Immunology today*, *18*(6), 263-266.

Rosenberg, S. A., & Restifo, N. P. (2015). Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*, *348*(6230), 62-68.

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 Archive*, *12*(1), 14.

Scott, M. J., Hoth, J. J., Stagner, M. K., Gardner, S. A., Peyton, J. C., & Cheadle, W. G. (2004). CD40–CD154 interactions between macrophages and natural killer cells during sepsis are critical for macrophage activation and are not interferon gamma dependent. *Clinical & Experimental Immunology*, *137*(3), 469-477.

Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2001). IFNγ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, *410*(6832), 1107.

Schoenborn, J. R., & Wilson, C. B. (2007). Regulation of interferon-γ during innate and adaptive immune responses. *Advances in immunology*, *96*, 41-101.

Schreiber, R. D., Old, L. J., & Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, *331*(6024), 1565-1570.

Smyth, M. J., Cretney, E., Kelly, J. M., Westwood, J. A., Street, S. E., Yagita, H., ... & Hayakawa, Y. (2005). Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular immunology*, *42*(4), 501-510.

Steding, C. E., Wu, S. T., Zhang, Y., Jeng, M. H., Elzey, B. D., & Kao, C. (2011). The role of interleukin-12 on modulating myeloid-derived suppressor cells, increasing overall survival and reducing metastasis. *Immunology*, *133*(2), 221-238.

Swart, M., Verbrugge, I., & Beltman, J. B. (2016). Combination approaches with immune-checkpoint blockade in cancer therapy. *Frontiers in oncology*, *6*, 233.

Šťastný, M., & Říhová, B. (2015). Únikové strategie nádorů pozornosti imunitního systému. *Klin Onkol*, *28*(Suppl 4), 4S28-4S37.

Takeda, K., & Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology*, *17*(1), 1-14.

Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., ... & Akira, S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, *11*(4), 443-451.

Underhill, D. M., & Gantner, B. (2004). Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes and infection*, *6*(15), 1368-1373.

Vo, J. L., Yang, L., Kurtz, S. L., Smith, S. G., Koppolu, B. P., Ravindranathan, S., & Zaharoff, D. A. (2014). Neoadjuvant immunotherapy with chitosan and interleukin-12 to control breast cancer metastasis. *Oncoimmunology*, *3*(12), e968001.

Vonderheide, R. H., & Glennie, M. J. (2013). Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, *19*(5), 1035-1043.

Wagner, T. L., Ahonen, C. L., Couture, A. M., Gibson, S. J., Miller, R. L., Smith, R. M., ... & Tomai, M. A. (1999). Modulation of TH1 and TH2 cytokine production with the immune response modifiers, R-848 and imiquimod. *Cellular immunology*, *191*(1), 10-19.

Waldmannová, E., Caisová, V., Fáberová, J., Sváčková, P., Kovářová, M., Sváčková, D., ... & Ženka, J. (2016). The use of Zymosan A and bacteria anchored to tumor cells for effective cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *International immunopharmacology*, *39*, 295-306.

Yang, B., Jeang, J., Yang, A., Wu, T. C., & Hung, C. F. (2014). DNA vaccine for cancer immunotherapy. *Human vaccines & immunotherapeutics*, *10*(11), 3153-3164.

Yu, L., Wang, L., & Chen, S. (2010). Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *Journal of cellular and molecular medicine*, *14*(11), 2592-2603.

Zhao, J., Zhao, J., & Perlman, S. (2012). Differential effects of IL-12 on Tregs and non-Treg T cells: roles of IFN-γ, IL-2 and IL-2R. *PloS one*, *7*(9), e46241.

Zhou, Y., Guo, M., Wang, X., Li, J., Wang, Y., Ye, L., ... & Ho, W. (2013). TLR3 activation efficiency by high or low molecular mass poly I: C. *Innate immunity*, *19*(2), 184-192.

Zhu, J., & Paul, W. E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*, *112*(5), 1557-1569.