



RNDr. Daniel Smrž, Ph.D.

Ústav imunologie

Univerzita Karlova 2. lékařská fakulta
a Fakultní nemocnice Motol



FN MOTOL

V Úvalu 83

150 06 Praha 5

Email: daniel.smrz@lfmotol.cuni.cz

Tel. 244-43-5968

Posudek oponenta diplomové práce Bc. Ondry Uhra

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

Diplomová práce Bc. Uhra pochází z výzkumné laboratoře vedené RNDr. Janem Ženkou, CSc. (školitel), která se systematicky zabývá výzkumem nádorové imunoterapie. Koncept této imunoterapie je založen na využívání stimulantů imunitního systému v kombinaci se značením nádorových buněk vybranými molekulami z bakterií a hub. Značení nádorových buněk umožňuje imunitnímu systému nádorové buňky rozeznat a stimulace imunitního systému tyto následně efektivně eliminovat. Účinnost tohoto terapeutického přístupu je empiricky testována na etablovaných myších modelech, kde se testuje nejenom vhodná kombinace terapeutických agens, ale i režim jejich aplikace, a to vše za účelem nalezení maximálního terapeutického účinku.

Ve své práci se Bc. Uher zabýval empirickým testováním imunoterapie pomocí vybraných agonistů toll-like receptorů (TLR) v kombinaci s kotveným mananem v nádorových buňkách, kterýžto slouží jako ligand fagocytárních receptorů. Účinnost terapie byla hodnocena stanovením kinetiky růstu nádoru (AUC) a % přežití v časovém období. Testování bylo nejprve prováděno s buněčnou linií agresivního melanomu B16-F10 na modelu bezpatogenních myších C57BL/6N, CD4 *knock out* C57BL/6N a na myších s těžkou kombinovanou imunodeficiencí (SCID). Cílem testování bylo zjištění příspěvku jednotlivých složek imunitního systému na průběh a výsledek imunoterapie. Účinky zvolené imunoterapie byly následně testovány na buněčné linii agresivního adenokarcinomu pankreatu Pan02 na bezpatogenních myších C57BL/6N. U tohoto modelu nádory vytvářejí mikroprostředí, ve kterém se nachází velmi málo protinádorových T lymfocytů a které je infiltrováno imunosupresivními leukocyty. Za účelem snížení vlivu imunosupresivního prostředí a zvýšení léčebného účinku byla testována imunoterapie

kombinována s blokátorem inhibičního receptoru CTLA-4, agonistou receptoru CD40, anti-CD40 protilátkou, a s kotveným IL-12 v nádorových buňkách. V závěru práce se Bc. Uher zabýval optimalizací režimu aplikace terapeutických agens. Výsledky práce ukázaly, že testovaná imunoterapie je schopna stimulovat jak složky vrozené, tak i složky adaptivní imunitní odpovědi. Stimulace obou složek se ukázala být potom nutná k efektivnímu léčebnému účinku. Tento účinek na přežití myši byl u modelu melanomu na myších C57BL/6N nebývale vysoký (>80%). U modelu adenokarcinomu pankreatu Pan02 na myších C57BL/6N se testovaná imunoterapie ukázala být mnohem méně účinná (<50% AUC) a téměř neúčinná, pokud šlo o schopnost myši vyléčit. Ještě slabších výsledků však bylo dosaženo při použití samotného blokátoru CTLA-4 nebo anti-CD40 protilátky. Účinnost léčebného účinku testované imunoterapie se podařilo významně zvýšit pomocí kombinace s blokátorem CTLA-4 nebo kotvením IL-12 v nádorových buňkách. Dané kombinace však stále nedokázaly myši vyléčit. Významného výsledku celé práce bylo dosaženo v kombinaci testované imunoterapie s anti-CD40 protilátkou. Při této kombinaci bylo dosaženo kompletního vyléčení všech testovaných myši. Zásadním poznatkem bylo rovněž i zjištění, že v dané kombinaci bylo velmi podobného výsledku (>80% vyléčení) dosaženo v případě, kdy testovaná imunoterapie byla redukována na pouhé kotvení mananu v nádorových buňkách, tedy bez použití agonistů TLR. Zajímavých výsledků bylo dosaženo také v závěru práce, kdy snížení počtu aplikací léčebných agens se ukázalo mít zásadní vliv na přežívání myši, ne však na redukci nádorového růstu.

Diplomová práce Bc. Uhra je čtivá, zpracována velmi přehledně a její struktura a rozsah splňují standardy diplomové práce. Jednotlivé kapitoly na sebe dobře navazují. Úvod práce je vypracován systematicky a čtenáře srozumitelným způsobem vnese do rozsáhlého tématu nádorové imunologie a imunoterapie s následným zaměřením na imunoterapii cílenou na vrozenou imunitu. Tento způsob podání svědčí o dobré orientaci autora v dané problematice a jeho schopnosti tuto srozumitelně interpretovat. Metodická a experimentální část jsou rovněž systematicky a z velké části dostatečně detailně vypracovány. Design experimentů je prezentován srozumitelně a je snadno pochopitelný. Provedené experimenty byly časově velmi náročné a jejich provedení a řízení vyžadovalo značné experimentální zkušenosti autora práce. K úspěšné realizaci experimentů bylo rovněž nutné velmi dobře fungující zázemí laboratoře a infrastruktura zvěřince. Výsledky jsou členěny dle jednotlivých cílů práce, dobře srozumitelné a interpretované. V diskuzi jsou výsledky začleněny do kontextu stávajících výsledků (publikovaných i nepublikovaných) z vlastní výzkumné laboratoře, a do výsledků publikovaných v odborné literatuře. Závěry diskuze nastiňují vhodnost testovanou imunoterapii dále kombinovat s přístupy, které budou zároveň podporovat i rozvoj/stimulaci adaptivní protinádorové imunitní odpovědi.

K práci a k autorovi práce mám následující dotazy a drobné připomínky:

1/ V úvodu by mohly být uvedeny i jiné podobné strategie založené na označování/modifikaci povrchu nádorových buněk molekulami, které mohou stimulovat imunitní systém a být takto

využity k terapeutickým účelům. Pokud však v práci zvolená strategie je obecně unikátní, bylo by přínosné tento fakt naopak zdůraznit.

2/ Termín buněčná terapie (kap. 1.3.2) se týká terapie založené na využívání živých buněk k terapeutickým účelům.

3/ V některých případech nejsou zkratky, které se prvně objeví v textu, vysvětleny; např. SCID v kapitole 3.2.

4/ V kapitole 3.2. by mělo být pro správné a rychlé pochopení terminologie čtenáři vysvětleno, který kmen je imunokompetentní a který imunodeficientní.

5/ V metodách/výsledcích není vždy zdůvodněno, proč byl zvolen daný model nádorové linie a myši, jako např. protože tvoří dobře lokalizované nádory, které jsou vhodné pro kotvení, studium infiltrace..atd. nebo, že Panc02 je vhodný ke studiu „checkpointů“ z toho a toho důvodu....jak, v tomto případě, uvedeno až v diskuzi na konci práce.

6/ V kapitole 3.6, příprava terapeutických látek, není dostatečně exaktně popsána redukční aminace při přípravě manan-BAM₄₀₀₀, a to přesto, že další postup je již velmi detailně popsán. Pokud se jedná o chráněný postup, je nutno uvést.

7/ V souvislosti s bodem 6, byl výsledný produkt redukční aminace mananu evaluován nějakou analytickou metodou jako HPLC či podobně? A hodnocen např. výtěžek, čistota, přítomnost nečistot, reproducibilita reakce či jiné? A v návaznosti na to, byla pro všechny experimenty použita jedna šarže připraveného manan-BAM₄₀₀₀?

8/ V kapitole „Analýza na průtokovém citometru“ je uvedeno, že byly barveny 3 vzorky a jeden nebarven jako negativní kontrola. Barvicí panely jsou však jenom 2 - Značení I a Značení II. Čím se barvil ten třetí vzorek? Nebyly náhodou 2 nebarvené vzorky - jeden jako neg. kontr. pro Značení I a druhý pro Značení II nebo i jiná možnost?

9/ U některých grafů jsou po vytištění některé popisky těžko čitelné, např. Obr. 18.

10/ Pro bezprostřední představu o robustnosti provedeného experimentu by v legendě obrázků kromě hladiny statistické významnosti měly být uvedeny i počty myši (*n*) pro jednotlivé testované skupiny.

11/ Bylo v rámci projektu testováno, nebo se v budoucnu počítá s testováním toho, jestli vyléčené myši jsou chráněny před opětovným rozvojem nádoru po implantaci stejných nádorových buněk?

12/ Po intratumorální aplikaci terapeutických agens lze očekávat, že i nenádorové buňky mohou být označeny kotveným mananem v přítomnosti TLR agonistů. Je možné, že i tyto vlastní nenádorové buňky se stanou cílem imunitního systému. Nehrozí potom např. rozvoj autoimunity?

Závěrem bych rád uvedl, že práce je velmi zdařilá a přínosná, splňuje odborná kritéria a požadavky kladené na diplomovou práci, a proto doporučuji její přijetí k obhajobě.

V Praze, dne 8.5.2018

RNDr. Daniel Smrž, Ph.D.