



Prof. RNDr. Blanka Říhová, DrSc.
předseda České imunologické společnosti
Videňská 1083
142 20 Praha 4

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Veroniky Caisové

„The study of cancer immunotherapy based on installation of phagocytosis stimulating ligand on the tumor cells surface and investigation of underlying mechanisms“

Dizertace sestává z pěti článků, z nichž tři jsou publikovány v dobrých časopisech (PloS One IF= 2,806; Int Immunopharmacol IF=2,956 a BMC cancer; IF= 3,288) a dva jsou k publikaci připraveny. V třetí publikaci a obou rukopisech je Mgr. Veronika Caisová první autorkou což vypovídá o jejím výrazném vědeckém vyhrávaní. Dizertace jako taková se vyznačuje pečlivostí, precizností a zejména přehledností. Autorka hned na začátku velmi elegantně seznamuje čtenáře s cíly i se základními výsledky předkládané vědecké práce.

K vlastnímu úvodu mám ale několik kritických připomínek. Za prvé jsou tam relativně často citovány velmi staré práce. Ty jsou sice základem celého odvětví, ale rozhodně by měly být doplněny pracemi novými a nejnovějšími. Druhý problém je, že se autorka snaží na několika stránkách popsat příčiny vzniku nádorů, jejich léčbu a to jak na nádory reaguje imunitní systém jejich nositelů. V důsledku toho se dopouští nepřesností. Například cytokiny nejsou exprimovány ale syntetizovány, exprimovány jsou jejich receptory; úloha protilátek *in vivo* je především opsonizace; protokoly pro DV vakcíny využívají také cytokiny typu IL-4; bispecifické monoklonály většinou přitahují jedním specifickým vazebným centrem nádorovou buňku a druhým cytotoxickou imunitní buňku ale variací je nepřehledné. Některým buněčným subpopulacím není věnována dostatečná pozornost. Příkladem mohou být TAM 1, TAM 2, paměťové buňky, Treg, Th17.

Imunoterapie patří v posledních letech, po relativně dlouhém zpochybňování, k vynikajícím moderním přístupům léčby nádorů, která z imunitního systému dělá účinného spoluvůdce léčby. Její možnosti jsou teprve postupně objevovány. Přístupy uvedené a diskutované v článcích tvořících dizertaci lze bez nadsázky hodnotit jako tvůrčí, moderní a inspirující s budoucím reálným terapeutickým potenciálem.

Jednotlivé publikace a rukopisy na sebe logicky navazují. Následná publikace vždy vychází z výsledků publikace předchozí, které zpřesňuje a rozšiřuje. Samotná myšlenka udělat z nádorové buňky cíl pro potencionovanou fagocytózu je výborná.

V první publikaci vyzkoušel tým kombinaci tří různých fagocytózu-stimulujících ligand (laminarin, mannan a formylpeptid; FMLP) se schopností navázat se na nádorové buňky a LPS (agonista Toll-like 4 receptoru), který navodí rychlou a masivní infiltraci buněk navozujících zánět. Pro účinnou vazbu byly použity komerční produkty BAM (Biocompatible Anchor for cell Membrane) a SMCC (4-(N-Maleimidomethyl) cyclohexane carboxylic-acid-N-hydroxysuccinimide ester). Nádorovým modelem byl obtížně léčitelný B16-F10 model myšího melanomu. Nejlepšího výsledku, a to více než 90% redukce nádorové masy, dosáhli autoři u kombinace laminarin-BAM a LPS. Největší podíl v infiltrujících imunokompetentních buňkách připadl na granulocyty. V druhé práci byly použity jako fagocytózu stimulující ligandy Zymozan A a Gram pozitivní (G^+) *Mycobacterium tuberculosis* a *Listeria monocytogenes* a Gram negativní (G^-) *Serratia marcescens* a *Serratia maltophilia* bakterie. Redukce nádorového růstu B16-F10 byla skoro 100%. Třetí práce detailně analyzovala výsledky získané v druhé práci. Snaha se soustředila na náhradu pro lidi toxického LPS. K tomuto účelu byl testován monophosphoryl lipid A (MPLA), imiquimod (R-837) a resiquimod (B-848). Kombinace B-848, *L. monocytogenes* (TLR2 agonista) a poly(I:C), TLR3 agonista zpomalila růst nádoru u 83% myší a při re-transplantaci stejných nádorových buněk je chránila. Čtvrtá práce byla věnována optimalizaci kombinace mannan-BAM + R-848 + *L. monocytogenes* + poly(I:C) a testování účinku na další nádorový model, pankreatický adenokarcinom. *L. monocytogenes* byla nahrazena lépe definovanou substancí, také TLR2 agonistou a to lipoteicholovou kyselinou (LTA). Kromě zpomalení nádorového růstu byla úspěšná také re-transplantace. K terapii byly použity také anti-CD40 protilátky a check-anti-CTLA-4 a anti-PD 1 blokátory. Poslední práce je věnována studiu kombinační léčby tj. mannan-BAM + R-848 + Poly (I:C) + LTA u myšího neuroendokrinního nádoru. To, že zásadní úlohu má stimulovaná vrozená imunita bylo potvrzeno testováním účinků u SCID myší.

Na autorku mám několik otázek a) úspěšná léčba vyžaduje denní i.t. aplikaci léčby v několika časových intervalech. To lze v experimentu, ale jak by si to autorka představovala u lidí? b) je pro experimentální účely šest myší na skupinu dostatek? Byly pokusy opakovány se stejným výsledkem? c) Pokusy přežilo často jen několik myší. Stačí to k tvrzení, že je re-transplantací potvrzena stoprocentní rezistence na původní nádor? A jak je to s rezistencí na jiné nádory vzhledem k tomu, že zásadní úlohu hraje vrozená imunita? d) Jaký byl zdroj (firma) anti-CTLA 4 a anti-PD-1 protilátek a byla dávka dostatečná k tomu, aby byl prokázán protinádorový efekt? Jak si autorka vysvětluje jejich akutní toxicitu (myši léčené pouze protilátkami umíraly rychleji než kontroly)?

Závěrem konstatuji, že předložená dizertační práce rozvíjí s úspěchem nové a moderní možnosti imunoterapie. Autorka prokázala výborné znalosti problematiky a nepochybnou schopnost samostatně řešit zadaný vědecký úkol. Doporučuji proto odborné komisi, aby ji na základě předložené disertace byl udělen titul Ph.D.

30. 11. 2017



Prof. RNDr. Blanka Říhová, DrSc.

John W. Eaton, Ph.D., M.D.*hc*
James Graham Brown Professor of Cancer Biology
James Graham Brown Cancer Center 502.852.1075
CTR Building, Room 403 502.852.7486
505 S. Hancock St, Louisville, KY 40202 502.852.1125

November 2, 2017

Dr. Jan Zenka
Department of Medical Biology, Faculty of Science
University of South Bohemia
Ceske Budejovice
Czech Republic

Dear Dr. Zenka:

Thank you for the opportunity to read the Ph.D. thesis of Veronika Caisova who is currently enrolled at your university.

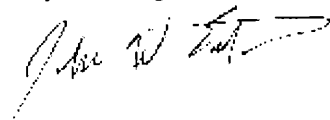
My overall opinion of her body of work is that it satisfies the criteria for the award of a Ph.D. and would at almost all institutions in the United States.

The general thrust of her work, involving a novel approach to the immunotherapy of cancers, is a refreshing return to the very early work of W. B. Coley. His earlier work suggested that activation of the (probably innate) immune system in patients with cancer by bacterial products might lead to the eradication of some kinds of cancer. Ms. Caisova's research greatly strengthens this concept and shows that in three different types of cancer the approach definitely has merit.

Ms. Caisova's use of both phagocytosis stimulating ligands and activators of toll-like receptor agonists seems to be an effective approach. Although the major theme of her work is that this activation of the innate immune system might be beneficial, there is the added attraction that this activation might later lead to an adaptive immune response. This latter would provide a permanent cure for neoplastic disease.

So, my overall view of this work – and of Ms. Caisova's clear grasp of cancer immunobiology – is highly favorable. My vote would approval of her thesis and the award of a doctoral degree.

Very best regards,



John W. Eaton, Ph.D., M.D.*hc*
James Graham Brown Professor of Cancer Biology

Question:

The candidate has shown impressive effects of covalently anchored agonists of phagocyte receptors on B16 melanoma (PLoS One: 9,e85222). These were, disappointingly, not curative.

However, in later work, (manuscript entitled “An effective cancer immunotherapy . . .”) more striking and curative effects were observed, presumably as a result of entraining not only the innate immune system but also the adaptive one.

This implies that the key to applying this to humans might lie in developing a strategy that links these two types of immune responses.

Can the candidate suggest two or three ways in which the innate and adaptive immune responses might be more effectively coupled?

Answer:

The key lies in the effective tumor antigen presentation. If tumor antigens are presented by innate immune cells to adaptive immune cells, adaptive immune cells can respond by a formation of CTL, memory cells as well as by antibody dependent elimination of tumor cells. This can result in metastases elimination and immunity against re-transplantation.

I absolutely agree, that the improvement of the communication between innate immunity and adaptive immunity can significantly increase the treatment efficacy.

There are several ways how to possibly boost this communication between innate immunity and adaptive immunity:

1) Improve the antigen presentation by supporting cells which are involved in this presentation

Since dendritic cells are very important cells involved in antigen presentation, the support of their maturation can be crucial for adaptive immunity response. Combination of our therapeutic mixture with DC - maturation supporting substances such as synthetic derivate of the macrophage-activating lipopeptide (ligand MALP2) or ligand of scavenger receptor class A (SR-A) can have positive effect on tumor antigen presentation.

We are already using in our therapeutic mixture R-848 and POLY(I:C), which have positive effect on dendritic cells maturation and activation. Additionally, the combination of our therapeutic mixture with anti-CD40 (molecule licensing dendritic cells) resulted in increased response of adaptive immunity during the therapy.

2) Inhibition of tumor immune escape mechanisms

Tumors can develop numerous different tumor immune escape mechanism and so inhibit immune recognition and tumor antigen presentation. One strategy how to improve antigen presentation can inhibit these immune escape mechanisms by using for example checkpoint inhibitors.

Modulation of tumor microenvironment can also have crucial effect on function of immune cells, especially on their maturation and activation.

3) Simultaneous supporting of antigen presenting cells and inhibition/modulation of immune escape mechanism

This approach can lead to even more complex antitumor response.

4) Combination of immunotherapy with targeted chemotherapy or radiotherapy

Targeted chemotherapy or radiotherapy can improve the accessibility of tumor antigens. Appropriately used targeted chemotherapy/radiotherapy (targeting prevent inhibition effect on immune system) can destroy relatively big mass of tumor, which can lead to increase of tumor antigens and so support tumor antigen presentation.

5) Simultaneous activation of immune system by using therapeutic tumor vaccines

Our therapy can be combined with simultaneous subcutaneous application of death tumor cells marked with mannan-BAM. This vaccination can improve the adaptive immune activation because of the easier access of antigen presenting cells to tumor antigens.

6) Stimulation of Th1 immune response

TLR agonists included in our therapeutic mixture stimulate IL-12 production which results in Th1 response. Th1 environment, characterized by high IFN-gamma/IL-10 ratio, supports MHC molecules production and so recognition of tumor cells by CTL. Therefore, stimulation of IFN-gamma production or the direct delivery of INF-gamma into the tumor should be considered as possible tool for increase of therapy efficacy.

Response:

Thanks for Veronika's responses to the question. I didn't particularly like response #3 (too vague). Also, I consulted a real immunologist who pointed out that the idea of injecting INF-gamma into the tumor might have the unintended consequence of up-regulating the PD1/PDL1 system (response #6).

However, overall the responses were quite reasonable and showed again that the candidate has an excellent grasp of tumor immunobiology.

I would definitely vote PASS.

Very best, John Eaton