

Mechanismy rezistence na imunoterapii melanomu

MUDr. Linda Řandová¹, doc. MUDr. Ondřej Kodet, Ph.D.^{1,2,3}

¹Dermatovenerologická klinika, 1. LF UK a VFN, Praha

²Anatomický ústav, 1. LF UK, Praha

³BIOCEV – Biotechnologické a biomedicínské centrum, Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci u Prahy

Léčba melanomu za posledních 12 let zaznamenala významný pokrok. Jejím základem je imunoterapie pomocí inhibitorů kontrolních bodů imunity, tzv. check-point inhibitorů. Navzdory dlouhodobé terapeutické odpovědi, které lze dosáhnout, se u řady pacientů tato forma léčby potýká s nižší mírou terapeutických odpovědí a selháním i po úvodní dobré léčebné odpovědi. Tyto léčebné komplikace jsou předmětem řady studií, které se snaží zdokumentovat jednotlivé mechanismy jak primární, tak i sekundární rezistence na imunoterapii melanomu. V práci je ucelený popis soudobých znalostí o jednotlivých mechanismech rezistence na tuto formu léčby melanomu.

Klíčová slova: melanom, check-point inhibitory, rezistence primární a sekundární.

Mechanisms of resistance to melanoma immunotherapy

The treatment of melanoma has seen significant progress over the past 12 years. Its basis is immunotherapy using check-point inhibitors. Unfortunately, despite the long-term therapeutic response that can be achieved, many patients experience lower rates of therapeutic responses and failure with this form of treatment even after an initial good treatment response. These treatment complications are the subject of many studies that document individual mechanisms of primary and secondary resistance to melanoma immunotherapy. The study comprehensively describes contemporary knowledge about particular resistance mechanisms to melanoma treatment.

Key words: melanoma, check-point inhibitors, primary and secondary resistance.

Úvod

Imunoterapie melanomu pomocí check-point inhibitorů je základním pilířem jak léčby metastazujícího melanomu, tak i léčby adjuvantní, případně v současné době se rozvíjející i léčby neoadjuvantní. Velkou výhodou imunoterapie je dlouhodobá terapeutická odpověď a možnost použití této terapie i u pacientů, kteří nevykazují nádorovou somatickou mutaci v genu BRAF. Poměrně zásadní nevýhodou je výrazně nižší počet terapeutických odpovědí než u pacientů léčených cílenou terapií BRAF a MEK inhibitory, popřípadě i pomalejší nástup účinku terapie. Terapeutická odpověď se v některých pří-

padech může skrývat i za úvodní progresi onemocnění, kdy tento stav označujeme jako tzv. pseudoprogresi onemocnění (Obr. 1). V některých případech je úvodní progresi výrazná a tento stav je nově označován jako hyperprogrese (1). I když tyto termíny nemají přesnou definici, charakterizují doposud ne zcela pochopené mechanismy terapeutické odpovědi, či jejího selhání. Studium a přesné zmapování nádorové rezistence na imunoterapii bude klíčové pro další rozvoj nádorové imunoonkologie. V základním popisu této problematiky můžeme rozlišit primární formu rezistence a sekundární, neboli získanou formu rezistence na check-point inhibitory (2).

DECLARATIONS:

Declaration of originality:

The manuscript is original and has not been published or submitted elsewhere.

Ethical principles compliance:

The authors attest that their study was approved by the local Ethical Committee and is in compliance with human studies and animal welfare regulations of the authors' institutions as well as with the World Medical Association Declaration of Helsinki on Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects adopted by the 18th WMA General Assembly in Helsinki, Finland, in June 1964, with subsequent amendments, as well as with the ICMJE Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals, updated in December 2018, including patient consent where appropriate.

Conflict of interest and financial disclosures:

None.

Funding/Support:

Práce byla podpořena projektem Cooperatio ONCO UK.

Převzato a aktualizováno z:

Onkologie. 2023;17(1):51-56

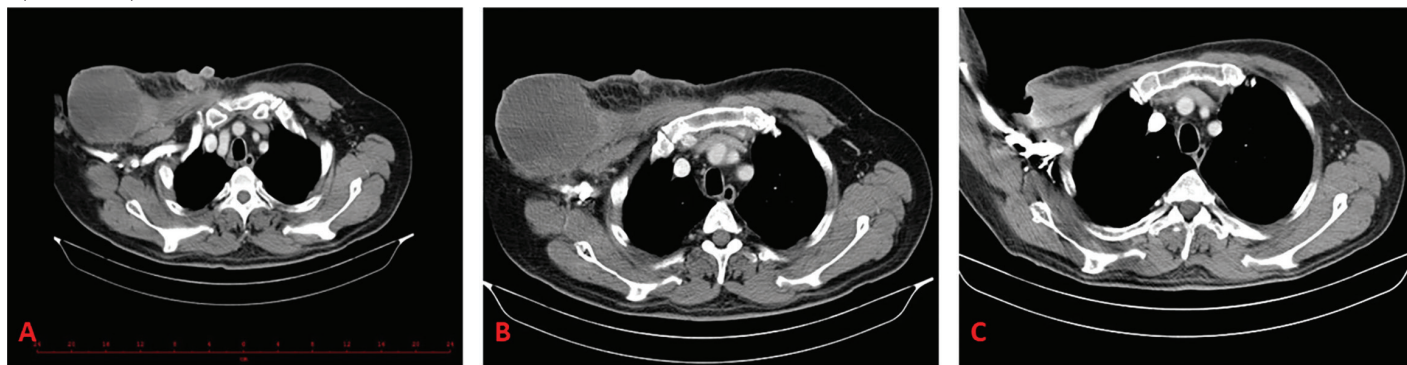
Článek přijat redakcí: 28. 11. 2022

Článek přijat k tisku: 3. 1. 2023

doc. MUDr. Ondřej Kodet, Ph.D.

ondrej.kodet@vfn.cz

Obr. 1. Příklad pseudoprogrese u pacienta (ročník 1969), metastatické postižení pravé axily. A před léčbou, B dva měsíce po zahájení imunoterapie anti-PD-1, C po roce terapie



Primární rezistence na check-point inhibitory

Primární rezistence se vyskytuje u pacientů, kteří na terapii check-point inhibitory neodpovídají již v samotném počátku terapie. V případě anti-CTLA-4 se jedná o poměrně vysoké procento pacientů dosahující až 80–85 %, kteří nevykazují terapeutickou odpověď (hodnoceno dle standardizovaných RECIST kritérií) (3, 4). V případě protilátek anti-PD-1 je procento pacientů bez terapeutické odpovědi okolo 50–60 % (5–7). Nejlepší odpovědi lze dosáhnout při kombinované terapii anti-CTLA-4 a anti-PD-1 (ipilimumab a nivolumab, okolo 65 %), i když je tato kombinovaná terapie zatížena vyšším množstvím nežádoucích účinků 3. a 4. stupně (8). V obou případech se jedná o velkou skupinu pacientů, kteří nevykazují na poměrně nákladná léčebná schémata žádnou, nebo jen minimální, terapeutickou odpověď. Bohužel neexistuje jednoznačný prediktivní biomarker, který by byl schopen stratifikovat pacienty dle potencionální terapeutické odpovědi, navíc i různorodost jednotlivých mechanismů odpovědných za nádorovou rezistenci na imunoterapii je poměrně rozmanitá. Mezi hlavní mechanismy patří (Obr. 2):

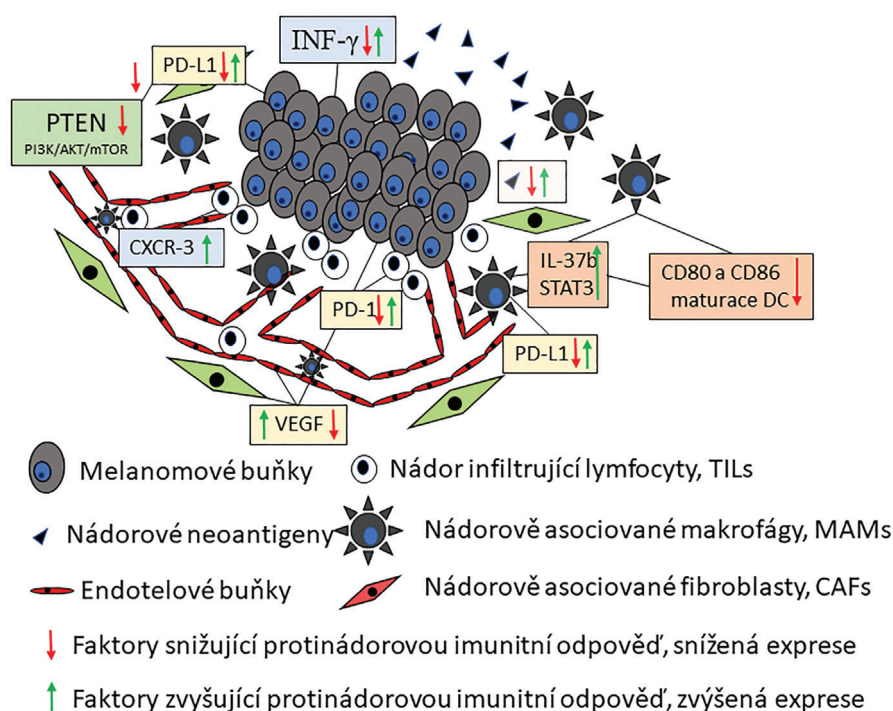
- nedostatečné uvolňování neoantigenů, případně stimulace neoantigeny a nízká mutační zátěž;
- nedostatečná nádorová infiltrace nádorově infiltrujícími lymfocyty (TILs);
- absence T-lymfocytů s expresí PD-1 a nedostatečná infiltrace nádorově asociovanými makrofágy (TAMs) s expresí PD-L1 v biopsiích nádorů v úvodu terapie;
- přítomnost vrozeného transkripčního „podpisu“ rezistence na anti-PD-1 (IPRES – innate PD-1 RESistance);

- nedostatečná signalizace interferonu γ (INF- γ) (9–13).

Základní princip funkce imunitního systému vychází ze schopnosti antigenní stimulace. Melanom patří mezi nádory s nejvyšším mutačním zatížením a možností stimulace imunitního systému. Některé nádory (i melanom) však nejsou schopny dostatečné prezentace antigenu imunitnímu systému, nebo neutváří v dostatečné míře antigeny, které lze rozpoznat jako cizorodé. Pro tyto mechanismy je zcela zásadní proces odlišení nádorových buněk od buněk zdravých tkání a klíčové rozpoznání tzv. nádorově specifických antigenů (TSA, Tumor Specific Antigens) a nádorově asociovaných

antigenů (TAA, Tumor Associated Antigens) T-lymfocyty. I v případě melanomu existují studie s dokumentovanou recidivou onemocnění po aplikaci protinádorové vakcíny u TAA negativních melanomů (14). Naproti tomu u pacientů s melanomem, kde dochází k dostatečnému uvolňování TAA a TSA, je pozorována lepší terapeutická odpověď na imunoterapii (15). Zásadní je dostatečná aktivace CD8⁺ a PD-1⁺ T-lymfocytů v periferní krvi neoantigeny pacienta a následné rozpoznání „vlastní“ nádorové tkáně těmito antigenně stimulovanými T-lymfocyty (16). Jak bylo zmíněno, melanom vykazuje poměrně výrazné mutační zatížení, které koreluje i s expozicí UV záření, a především i s lepší terapeutickou odpovědí na imunoterapii. Některé práce

Obr. 2. Zjednodušené schéma nádorového mikroprostředí melanomu s faktory, které ovlivňují protinádorovou imunitní odpověď



však poukazují na korelaci vyššího mutačního zatížení a infiltrace CD8⁺ T-lymfocyty v nádoru nebo dokonce i se zvýšenou expresí PD-L1 v nádoru. Samotná exprese PD-L1 je v některých nádorech pro následnou terapeutickou odpověď na check-point inhibitory (anti-PD-1) zcela zásadní (17). Nejvýznamnější klinické studie s check-point inhibitory ukazují také daleko lepší terapeutickou odpověď u pacientů s expresí PD-L1 v melanomech a jejich metastázách než u pacientů s nádorem bez exprese. Ve studii s kombinací ipilimumabu a nivolumabu, ale i pouze při monoterapii nivolumabem, bylo pozorováno signifikantně lepší prodloužení přežití do progresu (PFS) u pacientů s expresí PD-L1 než u pacientů bez exprese (5, 8, 18). Ve studii s pembrolizumabem bylo u PD-L1 pozitivních pacientů pozorováno dokonce lepší celkové přežití (OS), PFS a míra terapeutických odpovědí než u PD-L1 negativních (19). Z těchto klinických studií vyplývá, že exprese PD-L1 může být pro následnou terapii melanomu check-point inhibitory zásadní a jedná se tedy o poměrně spolehlivý biomarker. Bohužel celá řada pacientů s dostatečnou expresí PD-L1 ale také nevykazuje terapeutickou odpověď na anti-PD-1 terapii a na druhé straně někteří pacienti bez exprese PD-L1 z této terapie profitují (5, 8, 18, 20). V tomto kontextu se ukazuje, že exprese PD-L1 v melanomu je nápomocný (suboptimální) biomarker predikující terapeutickou odpověď. Pro studium rezistence na imunoterapii jsou zajímavé práce, které se zaměřují na mechanismy, jež mohou ovlivňovat expresi PD-L1. Několik studií i u jiných nádorů prokázalo korelaci mezi ztrátou PTEN genu a upregulací exprese PD-L1 přes aktivaci signalizace PI3K/AKT/mTOR (21). U melanomu a jeho (*in vivo* i *in vitro*) modelů však ztráta exprese PTEN genu vedla ke zmenšení a potlačení TILs infiltrátu a aktivitě T-lymfocytů. Navíc v melanomovém modelu ztráta PTEN genu významně nezměnila expresi PD-L1, což naznačuje, že regulace a snížená exprese PD-L1 nemusí být hlavním mechanismem imunitní rezistence vyplývajícím ze ztráty PTEN genu (22).

Aby bylo možné účinně aktivovat T-lymfocyty, musí antigen prezentující buňky (DC, dendritické buňky) podstoupit proces zvaný maturace. Při tomto procesu zvyšují

DC svou schopnost stimulovat T-lymfocyty posílenou expresí kostimulačních molekul potřebných pro aktivaci T-lymfocytů, jako jsou molekuly MHC I. a II. třídy, CD80, CD86 a CD40 (23). I tento mechanismus aktivace imunitního systému může být narušen. Jedním z mechanismů může být exprese IL-37b, který potlačuje maturaci a funkci DC snížením exprese CD80 a CD86 prostřednictvím signální dráhy ERK/S6K/NF-κB (24). Funkce DC může být potlačena při signalizaci STAT3, jejíž inhibice přispívá k infiltraci nádoru DC a TILs a významně se podílí na komunikaci mezi nádorovými melanocyty a buňkami imunitního systému. Tato komunikace vede k indukci dalších faktorů s imunosupresivním působením na maturaci DC jako je vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), IL-10 a transformující růstový faktor beta (TGF-β) (25, 26).

Nádory mohou používat řadu imunitních úhybných mechanismů včetně zabránění T-lymfocytům infiltrovat nádorovou tkáň. Samotná infiltrace nádoru závisí na předchozí antigenní stimulaci imunitního systému a na schopnosti nádoru atrahovat buňky imunitního systému. V procesu infiltrace nádoru T-lymfocyty byl identifikován chemokinový receptor CXCR-3, který může být v tomto procesu významný stimulátor. V nádorovém myším modelu melanomu byl CXCR-3 silně exprimován v řadě podskupin T-lymfocytů a při následné transfekci jeho ligandem CXCL9, došlo k významnému zvýšení infiltrace CD4⁺ i CD8⁺ T-lymfocytů do melanomu (27). V melanomech s početnějším nádorovým infiltrátem CD8⁺ T-lymfocytů byla navíc prokázána exprese CXCL-9 a CXCL-10 (28). Význam v procesu infiltrace hraje i INF-γ, který zprostředkovává signalizaci mezi Treg lymfocyty, Th-lymfocyty a cytotoxickými T-lymfocyty. STAT3 signalizace inhibuje produkci CXCL-10 nádorově asociovanými myeloidními buňkami a následně dochází i ke snížení exprese INF-γ a infiltraci T-lymfocytů v melanomu. Při inhibici STAT3 dochází ke zvýšené expresi CXCR-3 a následné podpoře infiltrace CD8⁺ T-lymfocytů do nádoru (29).

Další molekulou ovlivňující nádorovou infiltraci TILs je VEGF, jehož exprese i zvýšená sérová koncentrace je spojena s progresí melanomu (30). VEGF snižuje adhezi T-lymfocytů k endotelu kapilár a nově vytvořeným cévám

potlačením exprese mezibuněčné adhezní molekuly 1 (ICAM-1) a vaskulární buněčné adhezní molekuly 1 (VCAM-1) v endotelových buňkách (31). Zvýšená exprese VEGF v nádorech byla spojena s imunosupresivními podmínkami, a dokonce i s nižší nádorovou infiltrací TILs. Cílená inhibice exprese VEGF byla spojena s vyšším TILs infiltrátem v melanomu a byla následována zesílenou expresí CXCL-10 a CXCL-11, které podporují prozánětlivé prostředí nádoru (32). V další studii bylo prokázáno, že VEGF zvyšuje expresi IL-10 a prostaglandinu E2 (PGE2), což vede ke zvýšené hladině Fas ligandů a následné indukci apoptózy CD8⁺ T-lymfocytů. Při cílené inhibici VEGF i v tomto modelu došlo ke zvýšené infiltraci TILs v melanomu (32). V klinických studiích s anti-CTLA-4 a anti-PD-1 byla retrospektivně prokázána vyšší exprese VEGF u pacientů bez terapeutické odpovědi než u pacientů, kteří na terapii odpovídali (33).

Mechanismů primární rezistence je zdokumentována celá řada, některé se navíc potencují a prolínají. Z terapeutických možností se jedná o mechanismy obtížně ovlivnitelné a překonatelné, i když případně poukazují na možnosti např. kombinované terapie cílené terapie a imunoterapie, nebo i kombinace s jinými inhibitory, jako jsou např. inhibitory VEGF, nebo inhibitory PI3K/AKT signalizace (22, 34).

Získaná rezistence na check-point inhibitory

Získaná rezistence se objevuje u pacientů, u kterých dochází k relapsu onemocnění po úvodní terapeutické odpovědi. V současné době jsou mechanismy získané rezistence hůře zmapovány, ale předpokládá se, že mnohé z nich budou pravděpodobně podobné těm, které jsou základem primární rezistence. S mechanismy přirozené selekce se mohou postupně vyvinout (selektovat) nádorové buňky s epigenetickými změnami, které propůjčují schopnost odolávat imunitnímu systému (35). Příkladem takové vlastnosti je ztráta exprese β2-mikroglobulinu, který je součástí molekul MHC I. třídy a přispívá k jejich funkční (správné) expresi. V preklinické studii pacientů s melanomem léčených imunoterapií byla ztráta β2-mikroglobulinu v průběhu léčby spojena s nižší schopností rozpoznávat nádorové antigeny

CD8⁺ T-lymfocyty a také se ztrátou exprese molekul MHC I. třídy (36, 37). Dalším z možných mechanismů získané rezistence je mutace v genu JAK 1/2, která je odpovědná za sníženou citlivost nádorových buněk na signalizaci INF- γ a byla detekována u pacientů, kteří vykazovali selhání imunoterapie po úvodní dobré terapeutické odpovědi (38). Po expozici nádorových buněk INF- γ , který je produkován aktivovanými T-lymfocyty, se aktivuje JAK 1/2 kináza a následně dochází k fosforylaci STAT proteinu. Tato signální dráha JAK/STAT je odpovědná za buněčnou proliferaci, diferenciaci, migraci a apoptotickou buněčnou smrt. Získaná mutace v genu JAK poté tuto signalizaci nekontrolovatelně aktivuje (38, 39). INF- γ však také vede i k up-regulaci exprese PD-L1 na nádorových buňkách, čímž se podílí na senzibilizaci nádoru na terapii check-point inhibitory (40). Získaná rezistence se navíc může vyskytnout na úrovni jednotlivé buňky, přičemž nádorové buňky mění svoji genovou expresi v reakci na signalizaci imunitních buněk z nádorového mikroprostředí (35). Příkladem těchto mechanismů je navození exprese PD-L1 v nádorových buňkách pod vlivem signalizace INF- γ , navíc exprese PD-L1 patří mezi mechanismy jak primární, tak i získané rezistence, což ukazuje na plasticitu nádorových buněk a jejich schopnost unikat obranným mechanismům jedince a léčebné strategii (35, 41).

Další markery kontrolních mechanismů imunitního systému a jejich exprese je spojena se získanou rezistencí na imunoterapii. Jedná se o gen 3 aktivující lymfocyty (LAG-3), imunoglobulin T-lymfocytů a mucinovou doménu 3 obsahující aktivátor lymfocytů (TIM-3), které byly exprimovány u pacientů, u kterých došlo k selhání terapie check-point inhibitory (42). Cílená blokáda TIM-3 v myším melanomovém modelu vede ke zlepšení přežití a expresi INF- γ s následnou proliferací a infiltrací CD8⁺ T-lymfocytů v melanomech. Exprese LAG-3 byla detekována v PD-L1 pozitivních melanomech, což může naznačovat roli LAG-3 při procesech podílejících se na úniku melanomu před imunitním systémem (42, 43).

Střevní mikrobiom – jeden z možných klíčů k rezistenci?

Střevní mikrobiom je stále více uznávaným faktorem, který může ovlivnit imunolo-

gické chování jedince a v kontextu s nádorovou problematikou i terapeutickou odpověď na check-point inhibitory. Vliv mikrobiomu je hojně diskutován v celé řadě odvětví medicíny, ale v léčbě onkologických onemocnění mu byla věnována pozornost až se zavedením terapie check-point inhibitory, a především při hledání mechanismů rezistence na tuto léčbu. Bylo zjištěno, že pacienti s terapeutickou odpovědí na check-point inhibitory mají odlišný střevní mikrobiom od pacientů, kteří terapeutickou odpověď nevykazují. Samotné mechanismy spojující mikrobiom a imunologickou odpověď pacientů jsou zatím ne zcela jednoznačně vysvětlitelné, ale navzdory tomu se jedná o nezanedbatelný faktor, který ovlivňuje imunologické chování a pravděpodobně i terapeutickou odpověď na imunoterapii.

První práce upozorňující na vliv střevního mikrobiomu na terapeutickou odpověď na check-point inhibitory u pacientů s melanomem byla publikována v roce 2015, na základě studie 25 pacientů léčených ipilimumabem. V této práci byla zjištěna lepší protinádorová odpověď u pacientů s přítomnými střevními bakteriemi *Bacteroides* (*B. fragilis* a/nebo *B. thetaiotaomicron*) a *Burkholderiales cepacia* (44). V myším melanomovém modelu bylo dosaženo, po obohacení myši střevní mikroflóry cíleně o druhu *Bifidobacterium*, resp. *B. breve* a *B. longum*, zlepšené terapeutické odpovědi na anti-PD-L1 protilátku, dále došlo k výrazně vyšší infiltraci nádoru CD8⁺ T-lymfocyty (45). V následujících studiích bylo prokázáno celé spektrum bakterií, které se mohou podílet na příznivé střevní mikroflóře pro adekvátní imunologickou odpověď na check-point inhibitory (46). Poměrně revoluční jsou ale práce poukazující na možnost „transplantace stolice“, resp. přenos střevního mikrobiomu od pacientů s dobrou odpovědí na check-point inhibitory pacientům bez terapeutické odpovědi, a tak se pokusit zvrátit nepříznivé imunologické chování těchto pacientů (47). Z klinických a preklinických studií, kde byl hodnocen střevní mikrobiom, vyplývá, že např. terapie širokospektrými antibiotiky před léčbou či v úvodu terapie check-point inhibitory může výrazně nepříznivě ovlivnit jak stav mikrobiomu pacienta, tak i terapeutickou odpověď (48).

Samotný mechanismus funkce a stimula-
ce imunitního systému cestou střevního

mikrobiomu je poměrně komplikovaný a zatím i nedostatečně prostudovaný jev. Práce doposud publikované na toto téma přinášejí poměrně zajímavé informace, které však bude nutné ověřit ve velkých multicentrických studiích. Z prvních experimentálních a preklinických studií vyplývá, že pacienti léčení anti-PD-1, kteří měli přítomné bakterie rodu *Faecalibacterium*, mají větší poměr cirkulujících CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů. U pacientů, kteří terapeutickou odpověď nevykazovali, byly přítomné bakterie rodu *Bacteroidales*, navíc u těchto pacientů byly vyšší hodnoty cirkulujících Treg lymfocytů s méně aktivovanou expresí zánětlivých cytokinů (49). V další práci bylo prokázáno, že skupina pacientů s terapeutickou odpovědí měla opět odlišný mikrobiom (převážně zastoupení *Faecalibacterium*) oproti pacientům bez odpovědi (převážně *Bacteroides*). Navíc pacienti s terapeutickou odpovědí měli vyšší hladinu CD25 (a řetězec receptoru pro IL-2) a nižší zastoupení cirkulujících Treg lymfocytů a nižší zastoupení $\alpha 4\beta 7^+$ T-lymfocytů (50). V myším melanomovém modelu bylo po podání střevního mikrobiomu od pacientů s terapeutickou odpovědí na check-point inhibitory dosaženo vyšší infiltrace TiLs s CD8⁺ T-lymfocyty oproti myším, kde byl podán mikrobiom od pacientů bez terapeutické odpovědi. V myších s mikrobiomem od pacientů s odpovědí bylo prokázáno vyšší zastoupení vrozených efektorových buněk (CD45⁺, CD11b⁺, Ly6G⁺) s odpovídající deplecí v myeloidních buňkách (CD11b⁺, CD11c⁺). V nádorech u myši s mikrobiomem od pacientů bez odpovědi byl vyšší počet Th (pomocných) 17 lymfocytů (49, 51). Poměrně zásadní je práce Tanoue a jeho spolupracovníků, kteří studovali složení střevního mikrobiomu od zdravých jedinců a podařilo se jim identifikovat soubor 11 kmenů (7 *Bacteroidales* a 4 druhů jiných než *Bacteroidales*), které následně naočkovali do myšího modelu. V tomto modelu poté došlo ke zvýšení CD8⁺ T-lymfocytů v epitelu tlustého střeva, ale navíc byla pozorována významná up-regulace genů regulujících INF- γ , konkrétně CXCL9 a CXCL10. Tento střevní mikrobiom byl navíc schopen potencovat efekt anti-PD-1 a anti-CTLA-4 v myším modelu karcinomu tlustého střeva, kde byla patrná exprese INF- γ a infiltrát CD8⁺ T-lymfocytů

s expresí granzymu B v nádorovém stromatu. Granzym B je efektorovou molekulu cytotoxických T-lymfocytů a DC s vysokou expresí HLA molekul I. třídy (52). Tyto práce podporují domněnku, že specifický mikrobiom má schopnost buď imunostimulační nebo imunosupresivní a podílí se na „výchově“ a utváření vrozené i adaptabilní imunity se schopností těchto buněk následně postupovat do mikroprostředí nádoru (52).

Další předpoklad efektu vychází z domněnky, že může existovat podobnost mezi střevním mikrobiomem a nádorovými neoantigeny, kdy střevní mikroflóra stimuluje imunitní systém s podporou usnadněné infiltrace nádoru TILs (53). Jednou z možných hypotéz je i metabolický efekt střevního mikrobiomu, který může ovlivnit protinádorovou imunitní odpověď i v jiných místech než ve stěně střevní. Stimulace imunitního systému vychází z metabolitů specifické střevní mikroflóry. U pacientů s melanomem a s terapeutickou odpovědí byla detekována např. kyselina anakardová (a 82 dalších metabolitů) (54).

I když je studium problematiky střevního mikrobiomu v biologii melanomu relativně novým trendem, jedná se pravděpodobně o významný faktor, který ovlivňuje imunitní systém pacienta i případnou terapeutickou odpověď na check-point inhibitory. Zásadní může být role mikrobiomu v překonání mechanismů rezistence na imunoterapii. Z doposud publikovaných studií bude zásadní a zcela revoluční zvládnutí techniky „transplantace mikrobiomu“, který je spojený s terapeutickou odpovědí pacientům bez terapeutické odpovědi a následnému případnému navození terapeutické odpovědi i u těchto pacientů.

mRNA vakcíny jako další cesta k překonání rezistence imunoterapie melanomu

Již od 80.–90. let se mRNA začala využívat jako silný mediátor genové transkripce, uměle indukce proteinové exprese v buněčných kulturách a myších modelech byla záhy široce používána ve výzkumu nádorů. Během dekády 1990–2000 bylo na preklinické úrovni provedeno několik pokusů o vývoj protinádorové vakcíny založené na mRNA s využitím indukované exprese zavedených nádorových antigenů, jako je karcinoembryonální antigen

(CEA) a glykoprotein 100 (gp100). Nicméně vakcíny na bázi mRNA nebyly do propuknutí pandemie covidu-19 z velké části začleněny do klinické praxe, a to především kvůli nedostatku adekvátních vědeckých a technických prostředků k zajištění jejich imunogenního účinku a stability (55). Během posledních desetiletí se odborné znalosti týkající se výroby vakcín mRNA postupně zvyšovaly, což jim nakonec umožnilo stát se milníkem v primární ochraně proti nedávné pandemii SARS-CoV-2. Samotné protinádorové mRNA vakcíny zprostředkovávají prezentaci antigenu, protože jsou inkorporovány dendritickými buňkami, které následně exprimují na svém povrchu nádorové antigeny kódované specifickou mRNA ve vakcíně, čímž indukují aktivaci cytotoxických CD8+ i pomocných CD4+ T-lymfocytů a zároveň zvyšují uvolňování zánětlivých mediátorů. Představují tedy slibný způsob doručení genetické informace imunitním buňkám bez zásahu do struktury jaderné DNA nebo trvalého ovlivnění exprese buněčného proteinu, protože mRNA neproniká do jádra buňky, což by mohlo vyvolat nebezpečné mutace. Kromě toho může být mRNA přenesena bez virových nebo plazmidových vektorů, je přirozeně rozpuštěna hostitelskou buňkou a její produkce je méně nákladná ve srovnání s terapeutiky obdobnou DNA, což umožňuje ještě bezpečnější podávání a produkci těchto vakcín ve velkém měřítku (56). Jak již bylo zmíněno, stabilita těchto vakcín je klíčem k účinné vakcinaci mRNA, vzhledem ke křehké povaze mRNA a rozsáhlé přítomnosti extracelulárních RNáz. Vytvoření robustní mRNA vakcíny lze dosáhnout začleněním 5' a 3' netranslatovaných oblastí, které zahrnují kódující oblast, čímž se zabrání její degradaci. K další stabilizaci sekvence mRNA se používá překrytí methylací 5' oblasti a připojení poly(A) konce (sekvence více adenosinmonofosfátů) k 3' oblasti (57). Na rozdíl od vakcinace v primární ochraně před infekčním onemocněním, se pomocí protinádorových mRNA vakcín snažíme posílit protinádorovou imunitní reakci.

Cílové proteiny kódované sekvencemi mRNA vakcín zkoumané v oblasti onkologie patří do jedné ze tří hlavních kategorií (58, 59, 60):

i) neoantigeny nebo mutované proteinové formy exprimované výlučně nádorem v důsledku změn DNA, alternativního

sestřihu mRNA nebo posttranskripčních změn. Vyznačují se vysokou a nádorově specifickou imunogenicitou a mohou být spojeny s typem nádoru nebo mohou být dokonce personalizovanými antigeny specifickými pro pacienta;

ii) antigeny asociované s nádorem, které se mohou nacházet na normální tkáni, jejichž exprese se kvantitativně nebo strukturně odchyľuje od normálních vzorců, jako je MAGE-A3 (číslo rodiny MAGE A3), NY-ESO-1 (karcinom dlaždicových buněk jícnu1), tyrosináza, TPTE (transmembránová fosfatáza s homologií tenzinu) a gp100;

iii) zánětlivé mediátory, buď chemokiny extracelulárně vylučované, jako je IL-12 (interleukin-12) a GM-CSF (faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů), nebo exprimované na buněčném povrchu, jako je TLR4 (toll-like receptor 4). Izolace výše uvedených proteinů a sekvencí mRNA a rozpoznání nejvíce imunogenních neoantigenů a odpovídajících změn DNA umožnilo vytvoření vhodných templátů DNA, které lze použít při výrobě různých mRNA vakcín, které lze aplikovat na různé typy malignit.

V terapii melanomu se tyto vakcíny začínají objevovat překvapivě již od roku 2006. mRNA vakcíny byly podávány pacientům s pokročilým melanomem v kontextu několika klinických studií fáze I/II. Již v roce 2006 byla intranodálně nebo intradermálně injikována 22 pacientům s maligním melanomem vakcína sestávající z autologních dendritických buněk derivovaných z monocytů, *ex vivo* stimulovaných autologní nádorovou mRNA. Imunitní reakce specifická pro vakcínu, charakterizovaná expanzí T lymfocytů a produkcí interferonu- γ , byla skutečně pozorována u devíti z 19 pacientů. Intradermální nebo intranodální podání vyvolalo imunitní odpověď u 70% (7/10) a u 25% (3/12) léčených pacientů. Později byly u devíti respondentů hlášeny imunospecifické CD4+ a CD8+ T buněčné reakce proti neoantigenům kódovaným vakcinační mRNA (61).

V roce 2009 byla publikována studie s použitím přímého intradermálního podání protaminem stabilizované mRNA kódující melanomové antigeny (Melan-A, tyrosináza,

gp100, MAGE-A1, MAGE-A3, Survivin) u 21 pacientům s metastazujícím melanomem. Jednalo se o první studii, kde byly použity specifické melanocytární či melanomové antigeny. Vakcinace byla dobře tolerována a nevyvolávala žádné nežádoucí účinky stupně 3–4. U očkováných pacientů byla výrazně omezena cirkulace regulačních a myeloidních supresorových buněk. Specifická imunitní reakce T lymfocytů proti antigenům vakcíny byla zaznamenána u dvou ze čtyř hodnotitelných pacientů a úplná odpověď byla pozorována u jednoho ze sedmi pacientů (62).

Ve snaze rozšířit spektrum neoantigenů spojených s melanomem, které by bylo možné aplikovat na mRNA vakcíny bylo porovnáno 471 vzorků melanomů s 812 vzorky normální kůže. Bylo identifikováno celkem pět potenciálně cílitelných nádorových antigenů (PTPRC, SIGLEC10, CARD11, LILRB1, ADAMDEC1). Vyšší exprese těchto pěti antigenů v melanomu byla spojena s robustnější nádorovou imunitní infiltrací a zlepšeným OS pacienta, zatímco nižší hladiny exprese a kratší doba přežití byly spojeny s imunogenně „chladnými“ melanomy (s malým zánětlivým infiltrátem). Takové studie přispívají k rozpoznání vysoce imunogenních antigenů, které by mohly sloužit jako základ

pro konstrukci nových mRNA vakcín (63). Zatím asi největší studie s použitím mRNA vakcín je KEYNOTE-942 (NCT03897881). Tato studie probíhá ve fázi IIb a první údaje ukazují na povzbuzivé výsledky. V této studii byla pacientům (157 pacientů) s kompletně chirurgicky odstraněným melanomem stadia III/IV podávána kombinace personalizované mRNA vakcíny kódující 20 různých mutovaných neoantigenů a anti-PD-1 protilátky pembrolizumabu, ve srovnání s léčbou pembrolizumabem v monoterapii. Podle údajů z roku 2022 se zdá, že pacienti, kteří dostávají adjuvantní léčbu pembrolizumabem v kombinaci s vakcínou mRNA-4157/V940, mají o 44 % nižší riziko relapsu onemocnění nebo úmrtí ve srovnání s pacienty léčenými jen monoterapií pembrolizumabem (HR = 0,56, 95% CI, 0,31–1,08; p = 0,0266). Závažné nežádoucí účinky související s léčbou byly hlášeny u 14,4 % pacientů na kombinaci a u 10 % pacientů na monoterapii (64). Dosavadní výsledky studie KEYNOTE-942 se podle mnohých odborníků dají přirovnat k „objevení penicilinu“ v terapii melanomu. V roce 2023 se připravuje fáze III této studie. I když jsou tyto výsledky velice slibné, bude nutné vyčkat hodnocení na větším souboru pacientů, a především při dlouhodobém

sledování. Zásadním pokrokem této léčby je možnost personalizované medicíny, a navíc klíč k překonání jednoho mechanismu rezistence na terapii *checkpoint* inhibitory a to nízká schopnost nádoru stimulovat imunitní systém nádorovými neoantigeny (65).

Závěr

Imunoterapie *check-point* inhibitory patří mezi revoluční mezníky terapie onkologických onemocnění a právem byla za jejich objevení v roce 2018 udělena Nobelova cena za medicínu (James P. Allison za CTLA-4 a Tasuku Honzō za PD-1). Terapeutické odpovědi jsou u melanomu poměrně různorodé a nadále je celá řada pacientů, kteří na tato léčiva nevykazují žádnou nebo jen minimální terapeutickou odpověď. Významným problémem je ale i selhání terapie v průběhu léčby po úvodní, mnohdy i velice dobré, terapeutické odpovědi. Studium mechanismů rezistence je klíčové k nalezení nových terapeutických postupů a léčebných kombinací, které by dokázaly tuto formu terapie posílit a ještě více zefektivnit (66). Na druhé straně studium mechanismů rezistence přináší cenné znalosti, které poukazují na molekuly (biomarkery) s prediktivním potenciálem jak terapeutické odpovědi, tak i možné recidivy onemocnění (67).

LITERATURA

1. Frelaut M, du Rusquec P, de Moura A, et al. Pseudoprogression and Hyperprogression as New Forms of Response to Immunotherapy. *BioDrugs*. 2020;34(4):463–476. doi:10.1007/s40259-020-00425-y.
2. Gide TN, Wilmott JS, Scolyer RA, et al. Primary and acquired resistance to immune check-point inhibitors in metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2018;24(6):1260–1270. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-2267.
3. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363(8):711–723. doi:10.1056/NEJMoa1003466.
4. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, et al. Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2517–2526. doi:10.1056/NEJMoa1104621.
5. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Five-year survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med*. 2019;381(16):1535–1546. doi:10.1056/NEJMoa1910836.
6. Robert C, Long GV, Brady B, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med*. 2015;372(4):320–330. doi:10.1056/NEJMoa1412082.
7. Schachter J, Ribas A, Long GV, et al. Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006). *Lancet*. 2017;390(10105):1853–1862. doi:10.1016/S0140-6736(17)31601-X.
8. Hodi FS, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus ipilimumab alone in advanced melanoma (CheckMate 067): 4-year outcomes of a multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018;19(11):1480–1492. doi:10.1016/S1470-2045(18)30700-9.
9. Ayers M, Luncford J, Nebozhyn M, et al. IFN-γ-related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest*. 2017;127(8):2930–2940. doi:10.1172/JCI91190.
10. Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, et al. Genomic and Transcriptional Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell*. 2016;165(1):35–44. doi:10.1016/j.cell.2016.02.065.
11. Vilain RE, Menzies AM, Wilmott JS, et al. Dynamic changes in PD-L1 expression and immune infiltrates early during treatment predict response to PD-1 blockade in Melanoma. *Clin Cancer Res*. 2017;23(17):5024–5033. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0698.
12. Snyder A, Makarov V, Merghoub T, et al. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med*. 2014;371(23):2189–2199. doi:10.1056/NEJMoa1406498.
13. Jiang T, Shi T, Zhang H, et al. Tumor neoantigens: From basic research to clinical applications. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1). doi:10.1186/s13045-019-0787-5.
14. Jäger E, Ringhoffer M, Altmannberger M, et al. Immuno-selection in vivo: Independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. *Int J Cancer*. 1997;71(2):142–147. doi:10.1002/(SICI)-1097-0215(19970410)71:2<142::AID-IJC3>3.0.CO;2-0.
15. McGranahan N, Furness AJS, Rosenthal R, et al. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune check-point blockade. *Science* (80-). 2016;351(6280):1463–1469. doi:10.1126/science.aaf1490.
16. Gros A, Parkhurst MR, Tran E, et al. Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients. *Nat Med*. 2016;22(4):433–438. doi:10.1038/nm.4051.
17. Nowicki TS, Hu-Lieskovan S, Ribas A. Mechanisms of Resistance to PD-1 and PD-L1 Blockade. *Cancer J (United States)*. 2018;24(1):47–53. doi:10.1097/PPO.0000000000000303.
18. Long GV, Larkin J, Ascierto PA, et al. melanoma and other skin tumours 1112PD PD-L1 expression as a biomarker for nivolumab (NIVO) plus ipilimumab (IPI) and NIVO alone in advanced melanoma (MEL): A pooled analysis. *Ann Oncol*. 2016;27:379–400. doi:10.1093/annonc/mdw379.7.
19. Carlino M, Ribas A, Gonzalez R, et al. Abstract CT004: KEYNOTE-006: PD-L1 expression and efficacy in patients (Pts) treated with pembrolizumab (pembro) vs ipilimumab (IPI) for advanced melanoma. In: American Association for Cancer Research (AACR); 2016:CT004-CT004. doi:10.1158/1538-7445.am2016-ct004.
20. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*. 2015;373(1):23–34. doi:10.1056/NEJMoa1504030.
21. Parsa AT, Waldron JS, Panner A, et al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med*. 2007;13(1):84–88. doi:10.1038/nm1517.
22. Peng W, Qing Chen J, Liu C, et al. Loss of PTEN promotes resistance to T cell-mediated immunotherapy Analysis and interpretation of data (statistical analysis and bioinformatic analysis): HHS Public Access. *Cancer Discov*. 2016;6(2):202–216. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0283.

23. Ni K, O'Neill H. The role of dendritic cells in T cell activation. *Immunol Cell Biol.* 1997;75(3):223-230. doi:10.1038/icb.1997.35.
24. Wu W, Wang W, Wang Y, et al. IL-37b suppresses T cell priming by modulating dendritic cell maturation and cytokine production via dampening ERK/NF- κ B/S6K signalings. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2015;47(8):597-603. doi:10.1093/abbs/gmv058.
25. Lindenberg JJ, van de Ven R, Loughheed SM, et al. Functional characterization of a STAT3-dependent dendritic cell-derived CD14 + cell population arising upon IL-10-driven maturation. *Oncimmunology.* 2013;2(4):e23837. doi:10.4161/onci.23837.
26. Emeagi PU, Maenhout S, Dang N, et al. Downregulation of Stat3 in melanoma: Reprogramming the immune microenvironment as an anticancer therapeutic strategy. *Gene Ther.* 2013;20(11):1085-1092. doi:10.1038/gt.2013.35.
27. Hong M, Puaux AL, Huang C, et al. Chemotherapy induces intratumoral expression of chemokines in cutaneous melanoma, favoring T-cell infiltration and tumor control. *Cancer Res.* 2011;71(22):6997-7009. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1466.
28. Harlin H, Meng Y, Peterson AC, et al. Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8 + T-Cell recruitment. *Cancer Res.* 2009;69(7):3077-3085. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2281.
29. Yue C, Shen S, Deng J, et al. STAT3 in CD8+ T cells inhibits their tumor accumulation by downregulating CXCR3/CXCL10 axis. *Cancer Immunol Res.* 2015;3(8):864-870. doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0014.
30. Kučera J, Strnadová K, Dvořánková B, et al. Serum proteomic analysis of melanoma patients with immunohistochemical profiling of primary melanomas and cultured cells: Pilot study. *Oncol Rep.* 2019;42(5):1793-1804. doi:10.3892/or.2019.7319.
31. Bouzin C, Brouet A, De Vriese J, et al O. Effects of Vascular Endothelial Growth Factor on the Lymphocyte-Endothelium Interactions: Identification of Caveolin-1 and Nitric Oxide as Control Points of Endothelial Cell Anergy. *J Immunol.* 2007;178(3):1505-1511. doi:10.4049/jimmunol.178.3.1505.
32. Huang H, Langenkamp E, Georganaki M, et al. VEGF suppresses T-lymphocyte infiltration in the tumor microenvironment through inhibition of NF- κ B-induced endothelial activation. *FASEB J.* 2015;29(1):227-238. doi:10.1096/fj.14-250985.
33. Chen PL, Roh W, Reuben A, et al. Analysis of immune signatures in longitudinal tumor samples yields insight into biomarkers of response and mechanisms of resistance to immune check-point blockade. *Cancer Discov.* 2016;6(8):827-837. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-1545.
34. Ott PA, Stephen Hodi F, Buchbinder EI. Inhibition of immune check-points and vascular endothelial growth factor as combination therapy for metastatic melanoma: An overview of rationale, preclinical evidence, and initial clinical data. *Front Oncol.* 2015;5(SEP). doi:10.3389/fonc.2015.00202.
35. Restifo NP, Smyth MJ, Snyder A. Acquired resistance to immunotherapy and future challenges. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(2):121-126. doi:10.1038/nrc.2016.2.
36. Restifo NP, Marincola FM, Kawakami Y, et al. Loss of functional beta2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88(2):100-108. doi:10.1093/jnci/88.2.100.
37. Del Campo AB, Kyte JA, Carretero J, et al. Immune escape of cancer cells with beta2-microglobulin loss over the course of metastatic melanoma. *Int J Cancer.* 2014;134(1):102-113. doi:10.1002/ijc.28338.
38. Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, et al. Mutations associated with acquired resistance to PD-1 blockade in melanoma. *N Engl J Med.* 2016;375(9):819-829. doi:10.1056/NEJMoa1604958.
39. Jin W. Role of JAK/STAT3 Signaling in the Regulation of Metastasis, the Transition of Cancer Stem Cells, and Chemoresistance of Cancer by Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cells.* 2020;9(1):217. doi:10.3390/cells9010217.
40. Karachaliou N, Gonzalez-Cao M, Crespo G, et al. Interferon gamma, an important marker of response to immune check-point blockade in non-small cell lung cancer and melanoma patients. *Ther Adv Med Oncol.* 2018;10. doi:10.1177/1758834017749748.
41. Kim TK, Herbst RS, Chen L. Defining and Understanding Adaptive Resistance in Cancer Immunotherapy. *Trends Immunol.* 2018;39(8):624-631. doi:10.1016/j.it.2018.05.001.
42. Koyama S, Akbay EA, Li YY, et al. Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune check-points. *Nat Commun.* 2016;7. doi:10.1038/ncomms10501.
43. Taube JM, Young GD, McMiller TL, et al. Differential expression of immune-regulatory genes associated with PD-L1 display in melanoma: Implications for PD-1 pathway blockade. *Clin Cancer Res.* 2015;21(17):3969-3976. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0244.
44. Vézizou M, Pitt JM, Daillière R, et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science (80-).* 2015;350(6264):1079-1084. doi:10.1126/science.aad1329.
45. Sivan A, Corrales L, Hubert N, et al. Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science.* 2015;350(6264):1084-1089. doi:10.1126/science.aac4255.
46. Shaikh FY, Gills JJ, Sears CL. Impact of the microbiome on check-point inhibitor treatment in patients with non-small cell lung cancer and melanoma. *EBioMedicine.* 2019;48:642-647. doi:10.1016/j.ebiom.2019.08.076.
47. McQuade JL, Ologun GO, Arora R, Wargo JA. Gut Microbiome Modulation Via Fecal Microbiota Transplant to Augment Immunotherapy in Patients with Melanoma or Other Cancers. *Curr Oncol Rep.* 2020;22(7). doi:10.1007/s11912-020-00913-y.
48. Yang M, Wang Y, Yuan M, et al. Antibiotic administration shortly before or after immunotherapy initiation is correlated with poor prognosis in solid cancer patients: An up-to-date systematic review and meta-analysis. *Int Immunopharmacol.* 2020;88. doi:10.1016/j.intimp.2020.106876.
49. Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science (80-).* 2018;359(6371):97-103. doi:10.1126/science.aan4236.
50. Chaput N, Lepage P, Coutzac C, et al. Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. *Ann Oncol.* 2017;28(6):1368-1379. doi:10.1093/annonc/mdx108.
51. Matson V, Fessler J, Bao R, et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science (80-).* 2018;359(6371):104-108. doi:10.1126/science.aao3290.
52. Tanoue T, Morita S, Plichta DR, et al. A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity. *Nature.* 2019;565(7741):600-605. doi:10.1038/s41586-019-0878-z.
53. Hegazy AN, West NR, Stubbington MJT, et al. Circulating and Tissue-Resident CD4+ T Cells With Reactivity to Intestinal Microbiota Are Abundant in Healthy Individuals and Function Is Altered During Inflammation. *Gastroenterology.* 2017;153(5):1320-1337.e16. doi:10.1053/j.gastro.2017.07.047.
54. Frankel AE, Coughlin LA, Kim J, et al. Metagenomic Shotgun Sequencing and Unbiased Metabolomic Profiling Identify Specific Human Gut Microbiota and Metabolites Associated with Immune Check-point Therapy Efficacy in Melanoma Patients. *Neoplasia (United States).* 2017;19(10):848-855. doi:10.1016/j.neo.2017.08.004.
55. Payandeh Z, Yarahmadi M, Nariman-Saleh-Fam Z, et al. Immune therapy of melanoma: Overview of therapeutic vaccines. *J Cell Physiol.* 2019;234(9):14612-14621.
56. Van Hoecke L, Verbeke R, Dewitte H, et al. mRNA in cancer immunotherapy: beyond a source of antigen. *Mol Cancer.* 2021;20(1):48.
57. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, et al. mRNA vaccines – a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17(4):261-279. doi: 10.1038/nrd.2017.243. Epub 2018 Jan 12.
58. Gjerstorff MF, Kock K, Nielsen O, et al. MAGE-A1, GAGE and NY-ESO-1 cancer/testis antigen expression during human gonadal development. *Hum Reprod.* 2007;22(4):953-960. doi: 10.1093/humrep/del494. Epub 2007 Jan 5. PMID: 17208940.
59. Niemi JVL, Sokolov AV, Schiöth HB. Neoantigen Vaccines; Clinical Trials, Classes, Indications, Adjuvants and Combinatorial Treatments. *Cancers (Basel).* 2022;14(20):5163.
60. Niemi JVL, Sokolov AV, Schiöth HB. Neoantigen Vaccines; Clinical Trials, Classes, Indications, Adjuvants and Combinatorial Treatments. *Cancers (Basel).* 2022;14(20):5163.
61. Kyte JA, Mu L, Aamdal S, et al. Phase I/II trial of melanoma therapy with dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA. *Cancer Gene Ther.* 2006;13(10):905-918. doi: 10.1038/sj.cgt.7700961. Epub 2006 May 5. PMID: 16710345.
62. Weide B, Pascolo S, Scheel B, et al. Direct injection of protamine-protected mRNA: results of a phase 1/2 vaccination trial in metastatic melanoma patients. *J Immunother.* 2009;32(5):498-507.
63. Ping H, Yu W, Gong X, et al. Analysis of melanoma tumor antigens and immune subtypes for the development of mRNA vaccine. *Invest New Drugs.* 2022;40(6):1173-1184. doi: 10.1007/s10637-022-01290-y. Epub 2022 Aug 13. Erratum in: *Invest New Drugs.* 2022 Aug 27.
64. Weber JS, Carlino MS, Khattak A, et al. Individualised neoantigen therapy mRNA-4157 (V940) plus pembrolizumab versus pembrolizumab monotherapy in resected melanoma (KEYNOTE-942): a randomised, phase 2b study. *Lancet.* 2024 Jan 18;S0140-6736(23)02268-7.
65. Bafaloukos D, Gazouli I, Koutserimpas C, et al. Evolution and Progress of mRNA Vaccines in the Treatment of Melanoma: Future Prospects. *Vaccines (Basel).* 2023;11(3):636.
66. Ralli M, Botticelli A, Visconti IC, et al. Immunotherapy in the Treatment of Metastatic Melanoma: Current Knowledge and Future Directions. *J Immunol Res.* 2020;2020. doi:10.1155/2020/9235638.
67. Kitano S, Nakayama T, Yamashita M. Biomarkers for Immune Check-point Inhibitors in Melanoma. *Front Oncol.* 2018;8(July):1-8. doi:10.3389/fonc.2018.00270.