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 prostupovat 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 studiích 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, umělá 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 strukturálně odchyluje 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,