

Adoptivní buněčná terapie pomocí lymfocytů T v léčbě nádorů

Kateřina Vávrová, Jiřina Bartůňková, Rudolf Horváth

Ústav imunologie, Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Fakultní nemocnice Motol, Praha

Cílem imunoterapie je využití imunitních mechanismů k eliminaci nebo ke kontrole růstu maligně transformovaných buněk. Jednou z možností imunoterapie je aplikace adoptivního transferu lymfocytů T, jehož podstatou je infuze *ex vivo* expandovaných tumor specifických lymfocytů, které rozeznávají a ničí neoplastické buňky. Úspěšnost adoptivní T buněčné terapie se významně zlepšila pochopením základních molekulárních mechanismů interakce imunitního systému s nádory. Slibných výsledků bylo dosaženo zejména u maligního melanomu, karcinomu ledviny a lymfatické leukemie. Adoptivní T buněčná terapie se postupně etabluje mezi nadějně imunoterapeutické postupy a rozšiřuje tak portfolio léčebných možností, i když pro svoji metodickou náročnost nenašla dosud velké rozšíření.

Klíčová slova: protinádorová imunita, adoptivní transfer lymfocytů T, tumor – specifické lymfocyty.

Adoptive T cell therapy in cancer treatment

The aim of current immunotherapeutic approaches is to harness the individual's immune system towards a tumor tissue to eliminate or, at least, to control proliferation of the neoplastic cells. Among the cancer treatment strategies, the adoptive T cell transfer is progressively developing method that uses an *ex vivo* modified and expanded tumor-specific T cells as a tool to target and destroy the neoplastic tumor cells. The efficacy of the adoptive T cell therapy has significantly improved in recent years due to a better understanding of the molecular mechanisms that control the interactions of immune system and tumor cells. Promising results have already been achieved within the clinical trials in malignant melanoma, renal cancer and lymphoid leukemia. The adoptive T cell therapy is therefore gradually finding its place among the other immunotherapeutic strategies and expands the spectrum of available treatment options in cancer therapy.

Key words: anti-cancer immunotherapy, adoptive T cell transfer, tumor-specific lymphocytes.

Onkologie 2015; 9(1): 7–9

K pokrokům v oblasti imunoterapie došlo především díky porozumění mechanismu interakcí nádorových buněk s imunitním systémem. Uplatnění imunoterapie jakožto léčebné strategie vychází z předpokladu, že imunitní systém dokáže rozeznat a eliminovat nádorové buňky. Právě buněčná terapie pomocí geneticky modifikovaných lymfocytů T přinesla důkazy (tzv. proof-of-concept) o tom, že tyto buňky jsou opravdu mocným (i když i nebezpečným) nástrojem k eliminaci nádorových buněk. O geneticky modifikovaných lymfocytech T pojednává jiný článek v tomto časopise, zde se zaměříme na „klasickou“ buněčnou terapii lymfocyty T, které nejsou geneticky modifikovány a zmíníme se i o tzv. nádorových vakcínách, které aktivně indukují tvorbu specifických protinádorových T lymfocytů v organizmu pacienta.

Protinádorové vakcíny

Cílem „vakcinace“ je indukce T lymfocytů reagujících s nádorovými antigeny. Tohoto účinku lze dosáhnout několika způsoby, od podání jednoduché peptidové vakcíny až po komplexní buněčné systémy s využitím dendritických buněk (DC) pulzovaných nádorovou RNA (1), lyzáty autologních tumorů (2), nebo nádorovými liniemi (3). Prvním schváleným preparátem americké

kou FDA (Food and Drug Administration) z této oblasti je Sipuleucel-T (Provenge®) (4). Cílovou skupinou registrační studie byli pacienti ve stadiu kastrát rezistentního karcinomu prostaty, kterým byla aplikována tato autologní vakcína připravená *ex vivo* kultivací monocytů s fúzním proteinem prostatické kyselý fosfatázy a faktoru stimulujícího růst granulocytů a makrofágů (granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF). Výsledkem této studie fáze III bylo prodloužení mediánu celkového přežití o 4,1 měsíce (25,8 vs. 21,7 měsíce). Vakcinace je velmi dobře tolerovaná, s mírnými nežádoucími účinky.

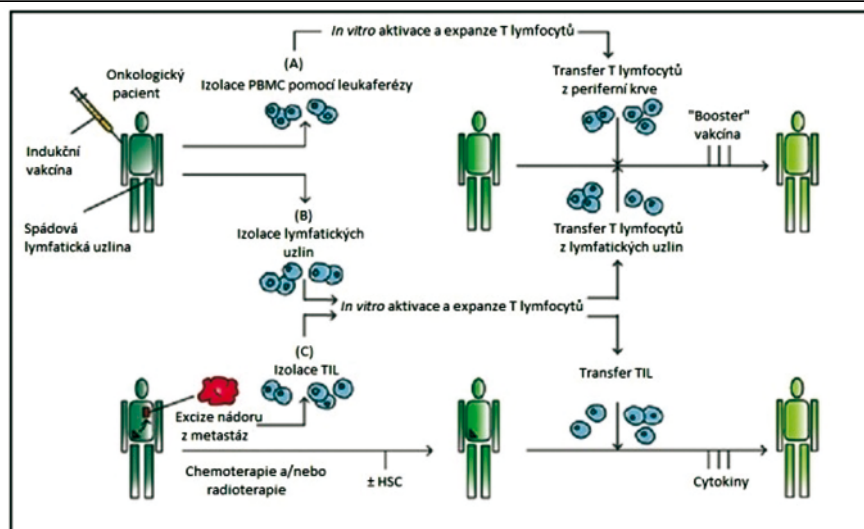
Randomizovaná studie testovala účinky terapeutické vakcíny, která je selektivně cílená na patologické B buňky folikulárního lymfomu (5). Vakcína u pacientů zlepšuje odpověď na konvenční chemoterapii a významně prodlužuje dobu přežívání bez relapsu (disease-free survival). Další slibný výsledek v oblasti protinádorových vakcín přinesla studie, v níž kombinace standardní léčby a terapeutické vakcíny (z peptidu gp100) zdvojnásobila léčebnou odpověď a prodloužila dobu bez progresí onemocnění (progression-free survival) o 2,2 měsíce u pacientů s metastatickým melanomem (6). Dalším příkladem protinádorových vakcín,

které vstoupily do III. fáze klinických studií, je poxvirová vakcína cílená na prostatický specifický antigen (PSA) u pacientů s karcinomem prostaty (4) a český přípravek DCVAC/PCa testovaný u pacientů s kastrát rezistentním karcinomem prostaty (3).

Adoptivní transfer lymfocytů T

Adoptivní buněčný transfer T lymfocytů (Adoptive Cell Transfer, ACT) spočívá v namnožení *ex vivo* efektorových lymfocytů T a jejich zpětná aplikace pacientovi, čímž se potencuje relativně nízká účinnost aktivní imunizace popsané výše. Zdrojem lymfocytů může být přímo nádorová tkáň (tzv. Tumor Infiltrating Lymphocytes – TILs) nebo periferní krev či lymfatické uzliny, zejména po indukční terapii protinádorovými vakcínami (obrázek 1). *In vitro* expanze a polyklonální aktivace tumor specifických lymfocytů se nejčastěji provádí pomocí monoklonální protilátky anti-CD3, která stimuluje antigenní signál přes T buněčný receptor (TCR). Výhodou manipulace s buňkami *ex vivo* je fakt, že umožňuje obejít endogenní regulační mechanismy a vyhnout se možnému supresivnímu vlivu nádorového mikroprostředí. V ACT protokolech jsou nejčastěji generovány vysoké počty (až 10^{11}) cytotoxických T lymfocytů (CTL)

Obrázek 1. Schéma možností adoptivního transferu *in vitro* expandovaných T lymfocytů (upraveno dle (25)). Pacientovi je podána protinádorová vakcína, po níž následuje izolace vakcínou indukovaných lymfocytů. Autologní T lymfocyty izolované z periferní krve (A) nebo ze spádových lymfatických uzlin (B) jsou *in vitro* aktivovány, namnoženy a podány zpět pacientovi. Pro zvýšení účinnosti léčby pacienti podstupují lymfodepleční chemoterapii. T lymfocyty mohou být získány přímo z nádorové tkáně (C). Účinnost TIL transferu může být zvýšena následnou infuzí interleukinu 2, čímž lze prodloužit *in vivo* proliferaci a prodloužit přežití transferovaných buněk.



PBMC, mononukleární buňky periferní krve; HSC, hematopoetická kmenová buňka

nebo TILs buněk. K expanzi buněk se využívají vysoké dávky IL-2 (interleukin 2), která je auto-kriinním růstovým faktorem T lymfocytů a jehož přítomnost prodlužuje délku trvání buněčné odpovědi a zvyšuje tak účinnost ACT terapie. První důkazy o účinnosti adoptivní buněčné terapie byly publikovány v několika klinických studiích již v devadesátých letech 20. století. Jednalo se o podání dárcovských lymfocytů pacientům s relapsem chronické myeloidní leukemie po alogenní transplantaci kostní dřeně, které vedlo u většiny pacientů ke kompletní remisi onemocnění (7). Podobný efekt této metody byl také zaznamenán v léčbě pacientů s EBV-asociovanými malignitami, s relapsem leukemie po transplantaci kmenových buněk a v některých případech v léčbě metastatického melanomu (shrnuje v 8).

Druhy adoptivní buněčné terapie Terapie pomocí expandovaných lymfocytů T periferní krve

Pilotní studie adoptivního buněčného transferu se snažily charakterizovat fenotypové a funkční vlastnosti T lymfocytů, které ovlivňují úspěšnost léčby. Bylo prokázáno, že cytotoxické CD8+ T lymfocyty (CTL) v kooperaci s CD4+ T lymfocyty jsou schopny specificky rozpoznat nádorový antigen, a mohou tak cíleně působit na nádorové buňky. Významný pokrok byl učiněn také díky identifikaci řady nádorových antigenů exprimovaných na lidských tumorech. Experimentální práce poukázaly na významnou asociaci mezi aviditou T lymfocytů k nádorové-

mu antigenu *in vitro* a efektivitou ACT terapie *in vivo*. Při adoptivní terapii cytotoxickými T buňkami jsou lymfocyty senzitivovány daným antigenem *in vitro* nebo *in vivo*. Proces dále pokračuje selekcí antigen-reaktivních CTL a jejich expanzí na terapeuticky významné množství. Nejlepších výsledků adoptivního transferu CTL bylo dosaženo v léčbě a prevenci virem-asociovaných malignit, např. Epstein-Baarové virus-lymfoproliferace po alogenní transplantaci kostní dřeně (9, 10). CTL byly také úspěšně použity v prevenci komplikací způsobených infekcí cytomegalovirem (CMV). Adoptivní transfer CMV-specifických CTL lymfocytů generovaných z buněk dárce transplantátu umožní obnovit imunitu vůči cytomegaloviru (11) a zabráňuje tak posttransplantačním komplikacím.

Vývoj metodických postupů zaměřených na antigeny, které nejsou virového původu, je komplikovanější. Mnohé z těchto antigenů mají nízkou aviditu k TCR, patří mezi autoantigeny přispívající k toleranci imunitního systému a existuje jen malé množství CTL specifických vůči těmto antigenům. Jsou to především studie na metastatickém melanomu, které demonstrovaly vzájemný vztah mezi navozením antigenně specifické odpovědi a klinickou účinností léčby (12). Pozitivní efekt ve smyslu infiltrace transferovaných T buněk do kožní i nádorové tkáně byl pozorován po podání autologních CD8+ lymfocytů cílených na nádorový antigen MART-1 spolu s nízkou dávkou IL-2 (13). Yee a kol. tak přinesli první důkazy o tom, že přenesené CTL se *in vivo* přednostně lokali-

zují do míst s cílovým antigenem v nádorové i normální tkáni. Tento výsledek potvrdila fáze I. klinické studie metastatického melanomu, která detekovala MART-1 reaktivní T lymfocyty v místech nádoru.

Terapie pomocí lymfocytů infiltrujících nádory (TIL)

Zdrojem buněk jsou v tomto případě lymfocyty infiltrující nádor (TILs) izolované přímo z nádorové tkáně, nejčastěji z lymfatických uzlin infiltrovaných nádorovými buňkami. Před reinfuzí pacientovi mohou být TILs *in vitro* dále manipulovány a pomnoženy. Potenciál adoptivního transferu TILs byl v minulosti prokázán na zvířecích modelech, nicméně humánní klinické studie, až na výjimku příliš úspěšné nebyly (14). Otázkou byla diskrepance nálezů a nejvíce diskutovaným důvodem byla krátká doba přežívání transferovaných buněk *in vivo*. Posun nastal až po zavedení lymfodeplečních režimů před samotnou aplikací ACT. Významných úspěchů bylo dosaženo v léčbě pacientů s metastazujícím maligním melanomem. Objektivní klinická odpověď byla zaznamenána u více než 50 % pacientů, kteří před adoptivním transferem podstoupili non-myeoablativní chemoterapii (cyklofosamidem a fludarabinem) a byla jim podána vysoká dávka IL-2. Tento režim u pacientů navodil přechodnou myelosupresi a krátkodobě eliminoval lymfocyty cirkulující v oběhu. Nicméně nutnost současného podání vysokých dávek IL-2 souvisela s řadou nežádoucích účinků. Ty byly odstraněny, jestliže se dávka IL-2 potřebná pro dlouhodobé přežití TILs *in vivo*, snížila na 500–1 000 IU a byla podána subkutánně. Podání autologních TILs bylo úspěšně testováno i u pacientů s renálním karcinomem, kde léčebná odpověď dosahovala až 43 % (15). Příznivý léčebný efekt detekovaný u pacientů s maligním melanomem nebo renálním karcinomem zřejmě souvisí s vyšší imunogenicitou těchto typů nádorů (16). Využití TILs pro adoptivní transfer přináší několik výhod: buňky nepodléhají žádným genetickým změnám během své expanze a zároveň si zachovávají vysoký stupeň specifické protinádorové reaktivity (17). Tato metoda má však i svá technická omezení: od každého typu nádoru nelze získat vzorek tkáně, navíc pouze 30–40 % biopsických vzorků poskytuje T lymfocyty vhodné ke kultivaci (18). Limitujícím faktorem je také dlouhá kultivační doba potřebná pro produkci dostatečného množství TILs. Terapie se tak stává časově a finančně náročná, což lze považovat za hlavní omezení aplikace v širší klinické praxi.

Kombinace ACT a nádorových vakcín

Další možností, jak zvýšit protinádorovou imunitní odpověď, je kombinovaná terapie adoptivního transferu T buněk a protinádorových vakcín. Tato metoda využívá schopnosti vakcín indukovat efektorové antigen specifické T lymfocyty, které mohou být posléze izolovány, *ex vivo* expandovány a následně zpět podány pacientovi. Na myších modelech bylo ukázáno, že adoptivní T buněčná terapie zvyšuje účinek terapeutických vakcín (19, 20).

První humánní testy byly provedeny u hematologických malignit, nikoliv však v indikaci protinádorové imunizace, ale rekonstituce imunity po transplantaci. Pacientům s mnohočetným myelomem byla podána pneumokoková vakcína Prevenar, a poté jim ve dvou intervalech (14 nebo 100 dní) byly odebrány a *ex vivo* expandovány T lymfocyty. Po následné transplantaci kmenových buněk jim byly takto generované autologní T lymfocyty injikovány zpět do těla. Pouze u pacientů, kteří obdrželi *ex vivo*-expandované T lymfocyty v kratším intervalu po transplantaci došlo k rekonstituci lymfocytů. Výstupní data této pilotní studie ukázala, že terapie sestávající se z vakcíny podané před transplantací a časného adoptivního transferu zlepšuje imunodeficitní stav pacienta během jednoho měsíce po transplantaci (21).

Dalším terčem testování se stal renální karcinom. Na základě publikovaných poznatků byla provedena klinická studie, ve které byla pacientům aplikována vakcína z ozářených autologních nádorových buněk s bakteriálním adjuvans (22). Za několik dní byly vakcínou indukované T lymfocyty použity pro adoptivní transfer. Z celkově 34 pacientů s renálním karcinomem byly zaznamenány čtyři kompletní a pět částečných léčebných odpovědí (22). Uvedené výsledky ukazují na možný klinický benefit této strategie.

Možnosti vylepšení ACT

Na úspěšnost adoptivní buněčné terapie má vliv řada faktorů. Byl popsán přímý vztah mezi počtem transferovaných buněk a úspěšností léčby. Důležitý je i fenotyp transferovaných buněk. Bylo prokázáno, že efektorové paměťové T lymfocyty (TEM) mají sice zesílenou efektorovou funkci, ale jsou náchylné k aktivací-indukované buněčné smrti (AICD) a po transferu přežívají jen krátkodobě (13). Experimentální studie prováděné na animálních modelech naopak naznačují, že podání centrálních paměťových T buněk (TCM) vede k rejekci nádoru a zajišťí dlouhodobou imunitní odpověď. Detailnější fenotypová analýza expandovaných lymfocy-

tů se zaměřuje především na znaky spojené s efektorovými funkcemi a schopností přežívání lymfocytů v podmínkách *in vivo*. Z publikovaných dat vyplývá, že žádaná je indukce tzv. early/intermediate lymfocytů, které se vyznačují ko-expresí molekul CD27, CD28 a CD62L a naopak absencí molekuly CD57. Tyto znaky předurčují k nejvyšší účinnosti v cytotoxických funkcích vůči nádorovým buňkám (23).

Zavedení lymfodeplečních režimů předcházejících infuzi expandovaných lymfocytů T vedlo k významnému prodloužení přežívání transferovaných lymfocytů (24). Poskytlo také prostor pro rekonstituci protinádorových efektorových buněk. Tento postup byl úspěšný například při léčbě pacientů s maligním melanomem a lymfomem, ale představuje i možnost léčby dalších typů nádorů. Důležitá bude i manipulace mikroprostředí nádorů, aby v něm nedocházelo k anergizaci přenesených lymfocytů, např. pomocí anti-PD1 protilátek.

Závěr

Imunoterapeutické metody si postupně hledají své místo v léčbě nádorových nemocí. Trendem se stává individualizovaná a více cílená imunoterapie. Dosavadní ojedinělé úspěchy ACT terapie se staly podnětem pro rozvoj tohoto typu léčby, nicméně kromě metodických nejasností zůstává také problémem potenciální autoimunitní toxicita, pokud použité T lymfocyty reagují s antigeny exprimovanými i na zdravých tkáních. Do budoucna se dá předpokládat, že zjednodušením a optimalizací výrobních procesů bude možné širší uplatnění buněčných imunoterapeutických strategií v praxi. Perspektivní možností je pak kombinace standardních léčebných metod a moderní buněčné imunoterapie.

Tato práce byla podpořena granty IGA MZČR NT 11559-5, IGA MZČR NT 12402-5 a MZ ČR – RVO, FN v Motole 00064203, GAUK 960214.

Literatura

1. Su Z, Dannull J, Heiser A, Yancey D, Pruitt S, Madden J, et al. Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer research*. 2003; 63(9): 2127–2133.
2. Thumann P, Moc I, Humrich J, Berger TG, Schultz ES, Schuler G, et al. Antigen loading of dendritic cells with whole tumor cell preparations. *Journal of immunological methods*. 2003; 277(1–2): 1–16.
3. Rozkova D, Tiserova H, Fucikova J, Last'ovicka J, Podrazil M, Ulcova H, et al. FOCUS on FOCIS: combined chemo-immunotherapy for the treatment of hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Clinical immunology*. 2009; 131(1): 1–10.
4. Kantoff PW, Schuetz TJ, Blumenstein BA, Glode LM, Bilhartz DL, Wyand M, et al. Overall survival analysis of a phase II randomized controlled trial of a Poxviral-based PSA-targeted immunotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2010; 28(7): 1099–1105.

5. Schuster SJ, Neelapu SS, Gause BL, Janik JE, Muggia FM, Gockerman JP, et al. Vaccination with patient-specific tumor-derived antigen in first remission improves disease-free survival in follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2011; 29(20): 2787–2794.
6. Schwartzentruber DJ, Lawson DH, Richards JM, Conry RM, Miller DM, Treisman J, et al. gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *N Engl J Med*. 2011; 364 (22): 2119–27.
7. Drobyski WR, Keever CA, Roth MS, Koethe S, Hanson G, McFadden P, et al. Salvage immunotherapy using donor leukocyte infusions as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: efficacy and toxicity of a defined T-cell dose. *Blood*. 1993; 82(8): 2310–2318.
8. Hinrichs Ch, Restifo NP: Reassessing target antigens for adoptive T-cell therapy. *Nature Biotechnology* 2013, doi: 10.1038/nbt.2725, 1–10.
9. Icheva V, Kayser S, Wolff D, Tuve S, Kyzirakos C, Bethge W, et al. Adoptive transfer of epstein-barr virus (EBV) nuclear antigen 1-specific t cells as treatment for EBV reactivation and lymphoproliferative disorders after allogeneic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol*. 2013; 31(1): 39–48.
10. Gerdemann U, Katari UL, Papadopolou A, Keirnan JM, Craddock JA, Liu H, et al. Safety and clinical efficacy of rapidly-generated trivirus-directed T cells as treatment for adenovirus, EBV, and CMV infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2013; 21(11): 2113–2121.
11. Feuchtinger T, Opher K, Bethge WA, Topp MS, Schuster FR, Weissinger EM, et al. Adoptive transfer of pp65-specific T cells for the treatment of chemorefractory cytomegalovirus disease or reactivation after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood*. 2010; 116(20): 4360–4367.
12. Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E, et al. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002; 99(25): 16168–16173.
13. Yee C, Thompson JA, Roche P, Byrd DR, Lee PP, Piepkorn M, et al. Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo. *J Exp Med*. 2000; 192(11): 1637–1644.
14. Dreno B, Nguyen JM, Khammari A, Pandolfino MC, Tessier MH, Bercegeay S, et al. Randomized trial of adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2002; 51(10): 539–546.
15. Figlin RA, Pierce WC, Kaboo R, Tso CL, Moldawer N, Gitlitz B, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with nephrectomy, interleukin-2 and cytokine-primed or CD8 (+) selected tumor infiltrating lymphocytes from primary tumor. *J Urol*. 1997; 158(3 Pt 1): 740–745.
16. Rosenberg SA, Yanneli JR, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Weber JS, et al. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst*. 1994; 86(15): 1159–1166.
17. Dighiero G. Adverse and beneficial immunological effects of purine nucleoside analogues. *Hematol Cell Ther*. 1996; 38 (Suppl 2): S75–81.
18. Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, Even J, Rosenberg SA. Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients. *J Immunother*. 2003; 26(4): 332–342.
19. Teshima T, Liu C, Lowler KP, Dranoff G, Ferrara JL. Donor leukocyte infusion from immunized donors increases tumor vaccine efficacy after allogeneic bone marrow transplantation. *Cancer research*. 2002; 62(3): 796–800.

20. Parviz M, Chin CS, Graham LJ, Miller C, Lee C, George K, et al. Successful adoptive immunotherapy with vaccine-sensitized T cells, despite no effect with vaccination alone in a weakly immunogenic tumor model. *Cancer Immunol Immunother.* 2003; 52(12): 739–750.
21. Rapoport AP, Stadtmauer EA, Aqui N, Badros A, Cotte J, Chrisley L, et al. Restoration of immunity in lymphopenic individuals with cancer by vaccination and adoptive T-cell transfer. *Nature medicine.* 2005; 11(11): 1230–1237.
22. Chang AE, Li Q, Jiang G, Sayre DM, Braun TM, Redman BG. Phase II trial of autologous tumor vaccination, anti-CD3-activated vaccine-primed lymphocytes, and interleukin-2 in stage IV renal cell cancer. *J Clin Oncol.* 2003; 21(5): 884–890.
23. Huang J, Khong HT, Dudley ME, El-Gamil M, Li YF, Rosenberg SA, et al. Survival, persistence, and progressive differentiation of adoptively transferred tumor-reactive T cells associated with tumor regression. *J Immunother.* 2005; 28(3): 258–267.
24. Rosenberg SA, Dudley ME. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr Opin Immunol.* 2009; 21(2): 233–240.
25. June CH. Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *The Journal of clinical investigation.* 2007;117 (6): 1466–1476.

Článek přijat redakcí: 15. 1. 2015

Článek přijat k publikaci: 23. 1. 2015

Mgr. Kateřina Vávrová

Ústav imunologie 2. LF a FN Motol

V Úvalu 84, 150 06 Praha 5

katerina.vavrova@lfmotol.cuni.cz
