

žitím anti-PD-1 v nižším (prognosticky lepším) stadiu onemocnění. Podobně nadějný výsledek jsou i při neoadjuvantním podávání imunoterapie, a to např. při kombinaci anti-PD-1 a anti-CTLA-4 (ve studii **OpACIN** a **OpACIN-neo**), kde RFS se pohybuje při sledování 5 let okolo 70 % oproti 60 %, při podání stejné léčby v adjuvantním režimu a celkové přežití (OS) 90 % při neoadjuvantní léčbě oproti 70 % v adjuvanci (4). U metastazujícího melanomu jsou zatím nejlepší výsledky dosaženy při kombinaci anti-PD-1 a anti-CTLA-4 (nivolumabu a ipilimumabu), kdy ve studii **CheckMate 067**, bylo v 7,5letém sledování dosaženo 33 % pacientů přeživších bez progresse onemocnění (PFS) a 48 % pacientů s celkovým přežitím (OS) (5, 6). Navzdory těmto výsledkům je zejména v úvodu terapie poměrně velké procento pacientů, kteří na imunoterapii nevykazují žádnou nebo jen částečnou terapeutickou odpověď. Jednou z možných příčin selhání imunoterapie je nedostatečná stimulace imunitního systému nádorovými neoantigeny nebo i jejich nedostatečná produkce nádorovými melanocyty. mRNA protinádorové vakcíny mohou představovat účinný nástroj při stimulaci imunitního systému a společně s terapií checkpoint inhibitory může být navozena daleko účinnější protinádorová imunitní odpověď.

mRNA vakcína, princip a cíle

Již od 80.–90. let se mRNA začala využívat jako silný mediátor genové transkripce. Umělá indukce proteinové exprese díky použití mRNA v buněčných kulturách a myších modelech byla záhy široce použita 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 (7). Během posledních desetiletí se odborné znalosti týkající se výroby mRNA vakcín postupně zlepšovaly, 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. Hlavním důvodem je, že mRNA neproniká do jádra buňky, což by mohlo vyvolat nepatřičné (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, to umožňuje ještě bezpečnější podávání a produkci těchto vakcín ve velkém měřítku (8). Jak již bylo zmíněno, stabilita těchto vakcín je klíčem k účinné vakcinaci pomocí mRNA a to především díky křehké povaze mRNA a rozsáhlé přítomnosti extracelulárních RNáz, které snadno tyto molekuly degradují. Vytvoření robustní mRNA vakcíny lze dosáhnout začleněním 5' a 3' ne-translatovaných oblastí, které zahrnují kódující oblast, čímž se zabrání její degradaci. K další stabilizaci sekvence mRNA se používá překrytí (methyloací) 5' oblasti a připojení poly(A) konce (sekvence více adenosinmonofosfátů) k 3' oblasti (9). Na rozdíl od vakcinace v primární ochraně před infekčním onemocněním se pomocí protinádorových mRNA vakcín snažíme posílit protinádorovou imunitní reakci (nádorově) specifickou stimulací příslušným antigenem, který je specifický pro daný nádor.

Cílové proteiny kódované sekvencemi mRNA vakcín zkoumané v oblasti onkologie patří do jedné ze tří hlavních kategorií (10–12):

i) neoantigeny nebo mutované proteinové části 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.

Preklinické experimentální použití

mRNA vakcíny byly použity v celé řadě preklinických studií, které dokázaly zajímavé protinádorové a imunogenní vlastnosti v *in vitro* i *in vivo* experimentech. Oberli a jeho kolegové stabilizovali mRNA vakcínu lipidovými nanočásticemi fosforečnanu vápenatého, a tím dosáhli zlepšeného účinku mRNA vakcíny kódující gp100 a TRP-2 (s tyrosinázou související protein 2), která byla podána v melanomovém myším modelu s imunokompetentní myší B16F10. Očkování vyvolalo významné zmenšení nádoru a zároveň prodloužilo přežití léčených myší (13, 14). V roce 2018 Wang a kolegové popsali úspěšnou *in vitro* transfekci dendritických buněk pomocí vakcíny obsahující mRNA kódující TRP-2 a inhibující siRNA (silencing RNA) expresi PD-L1. V myším melanomovém modelu pak došlo k posílení tvorby specifických CD8+ T lymfocytů v lymfatických uzlinách a zpomalení růstu nádorů. Nebyl ale prokázán synergický vliv mRNA vakcíny proti TRP-2 v kombinaci s anti-PD-1 monoklonální protilátkou (15).

Z dalších prací lze zmínit experiment s použitím mRNA vakcíny opět kódující TRP-2 a ovalbumin, protein vaječného bílku, o kterém se ukázalo, že zvyšuje rozpoznání neoantigenů především cytotoxickými CD8+