

Novosti u imunoterapiji liječenja metastatskog melanoma

Jazbec, Petar

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:442584>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Petar Jazbec

**Novosti u imunoterapiji liječenja metastatskog
melanoma**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Klinici za onkologiju i nuklearnu medicinu, KBC Sestre milosrdnice pod vodstvom doc.dr.sc. Jasmine Marić Brozić i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2020/2021.

Popis i objašnjenje kratica korištenih u radu

UV - *ultraviolet*, ultraljubičasto zračenje

CDKN2A - *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*, inhibitor kinaze ovisne o ciklinima 2A

MAPK - *mitogen-activated protein kinase*, mitogenom aktivirana proteinska kinaza

PI3K - *phosphoinositide 3-kinase*, fosfoinozimid 3-kinaza (ili fosfatidilinozitol 3-kinaza)

TERT - *telomerase reverse transcriptase*, gen za katalitičku podjedinicu telomeraze

ICI - *immune checkpoint inhibitors*, inhibitori staničnih kontrolnih točaka imunološkog odgovora

APC - *antigen presenting cells*, antigen prezentirajuće stanice

TNF- α - *tumor necrosis factor alpha*, faktor tumorske nekroze alfa

MHC - *major histocompatibility complex*

TCR - *T-cell receptor*, T-limfocitni receptor

CTLA-4 - *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*

PD-1 - *programmed death 1*

GM-CSF - *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, granulocito-makrofagni čimbenik rasta kolonija

DS-cjepiva - cjepiva usmjerena na dendritičke stanice

T-VEC - genetički promijenjen herpesvirus – talimogen laherpaverpec

VSV-GP - genetski modificirani vezikularni stomatitis virus

LAK stanice - *lymphokine activated killer cells*

TIL - *tumor infiltrating lymphocytes*, tumor infiltrirajući limfociti

CAR-T - *chimeric antigen receptor T cells*

MCSP - *melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan*

PFS - *progression free survival*, preživljenje bez progresije bolesti

Ipi/nivo - kombinirana terapija ipilimumabom i nivolumabom

PD-1⁺ Treg - PD-1 pozitivni regulatorni T-limfociti

Sadržaj

SAŽETAK	1
ABSTRACT	2
UVOD	3
EPIDEMIOLOGIJA MELANOMA.....	4
ETIOPATOGENEZA MELANOMA	6
1. Okolišni čimbenici.....	6
2. Genetski čimbenici	6
3. Imunološki čimbenici	8
IMUNOTERAPIJA METASTATSKOG MELANOMA.....	11
1. Biološka imunoterapija	11
2. Cijepljenje.....	12
3. Adaptivna imunoterapija.....	13
4. Inhibitori staničnih kontrolnih točaka imunološkog odgovora, ICI	14
CTLA-4 inhibicija.....	14
PD-1 inhibicija	16
5. Kombinacija imunoterapije	17
BIOMARKERI	20
ZAKLJUČAK.....	21
LITERATURA	23
ŽIVOTOPIS	31

SAŽETAK

Novosti u imunoterapiji liječenja metastatskog melanoma

Petar Jazbec

Melanom je zloćudna novotvorina koja nastaje malignom pretvorbom melanocita. Zbog izrazite sklonosti ranom limfogenom i hematogenom metastaziranju ubraja se među najagresivnije tumore kože i sluznica. Najveći kumulativni rizik za oboljenje bilježe populacije Australije i Novog Zelanda, Sjeverne Amerike i Europe. Najznačajniji okolišni čimbenik za nastanak melanoma je sunčevo UV zračenje. Brojne mutacije u genima za kontrolu staničnog ciklusa i poremećena funkcija staničnih kontrolnih točaka imunološkog odgovora su prepoznati kao ključni čimbenici nastanka metastatskog melanoma. Pojavili su se novi oblici terapija, poput ciljane terapije i imunoterapije. Cilj imunoterapije tumora je osnažiti ili obnoviti sposobnost imunološkog sustava da prepozna i uništi tumorske stanice tako što će spriječiti mehanizme kojima tumor ostvaruje izbjegavanje i inhibiciju imunološkog odgovora. Melanom je izrazito imunogeni tumor, stoga je imunoterapija jedna od najučinkovitijih strategija u liječenju ove bolesti. Ovaj rad će prezentirati dosadašnje dosege i buduće smjerove u istraživanju imunoterapije liječenja metastatskog melanoma.

ključne riječi: imunoterapija, metastatski melanom

ABSTRACT

Novelties in immunotherapy for the treatment of metastatic melanoma

Petar Jazbec

Melanoma is a malignant neoplasm caused by malignant conversion of melanocytes. Due to its pronounced tendency to early lymphogenic and hematogenous metastasizing, it is one of the most aggressive tumors of the skin and mucous membranes. The highest cumulative risk for the disease is recorded in the populations of Australia, New Zealand, North America, and Europe. The most significant environmental factor for the formation of melanoma is the sun's UV radiation. Numerous mutations in cell cycle control genes and impaired function of cellular immune response checkpoints have been identified as key factors in the development of metastatic melanoma. New forms of therapies have emerged, such as targeted therapy and immunotherapy. The goal of the tumor immunotherapy is to strengthen or restore the ability of the immune system to recognize and destroy tumor cells by preventing the mechanisms by which the tumor avoids and inhibits the immune response. Melanoma is a highly immunogenic tumor, so immunotherapy is one of the most effective strategies in treating this disease. This paper will present past achievements and future directions in immunotherapy for metastatic melanoma research.

keywords: immunotherapy, metastatic melanoma

UVOD

Melanom je zloćudna novotvorina koja nastaje malignom pretvorbom melanocita (1). Melanociti su sastavni dio kože, a prisutni su i u dijelovima oka, moždanim ovojnicama, limfnim čvorovima te sluznicama gastrointestinalnog, gornjeg dišnog i urogenitalnog sustava. Ishodište melanoma možemo pronaći u svim gore navedenim sijelima (2,3). Zbog izrazite sklonosti ranom limfogenom i hematogenom metastaziranju ubraja se među najagresivnije tumore kože i sluznica (4). Kod bolesnika s metastatskom diseminacijom melanoma, imunoterapija je jedan od glavnih načina liječenja. Imunoterapija se pokazala učinkovitom u liječenju melanoma jer je taj tumor vrlo imunogen. Mehanizmi djelovanja imunoterapije temelje se na specifičnim metama i regulatornim mehanizmima imunološkog odgovora (5).

EPIDEMIOLOGIJA MELANOMA

Učestalost melanoma se povećava u mnogim zemljama svijeta (1). Kohortna analiza incidencije melanoma u Australiji, Novom Zelandu, Norveškoj, Švedskoj, Ujedinjenom Kraljevstvu i Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) od 1982. do 2011. godine otkriva godišnji porast incidencije melanoma za oko 3% (6). Unatoč mnogim preventivnim mjerama, melanom ima veći porast incidencije od ostalih maligniteta, pogotovo kod mlađih žena bijele rase (7).

Melanomi se češće pojavljuju u osoba svijetle puti, dok su kod pripadnika crne rase vrlo rijetki. Postoji i velika zemljopisna varijacija. Češća je pojavnost u sunčanijim krajevima bliže ekvatoru nego u hladnijim sjevernim i južnim područjima (1). Tako je najveća pojavnost melanoma kože upravo kod svijetloputog stanovništva Australije i Novog Zelanda. Oni bilježe godišnju stopu incidencije koja varira od 50 do 100 oboljenja na 100 000 stanovnika. U tim populacijama melanom je najčešći zloćudni tumor u osoba mlađih od 40 godina, i jedan od najčešćih zloćudnih tumora uopće. U područjima Središnje i Južne Amerike, Azije i Afrike melanom je rijetka pojava s godišnjom stopom manjom od 3 na 100 000 stanovnika (8). Muškarci imaju 1,5 puta veću vjerojatnost za oboljenjem od melanoma kože od žena (9). Petogodišnje dobno standardizirano relativno preživljenje kožnih melanoma dijagnosticiranih u vremenskom razdoblju od 2000. do 2007. godine u Europi variraju od 74,4% u Istočnoj Europi do 87,7% u Sjevernoj Europi. Relativno preživljenje je kod žena veće nego kod muškaraca (10). Pacijenti oboljeli od melanoma koji imaju udaljene metastaze pokazuju petogodišnje preživljenje od samo 23%, što metastaze čini glavnim uzrokom smrti povezanih s melanomom (5).

Podatci Svjetske zdravstvene organizacije za 2020. godinu govore da je broj novooboljelih od kožnog melanoma u 2020. godini 324 635. Broj smrtnih ishoda od ove bolesti iznosi 57 043. Najveći kumulativni rizik za oboljenje očekivano bilježe populacije Australije i Novog Zelanda, Sjeverne Amerike i Europe (11).

Prema posljednje objavljenom Registru za rak u Hrvatskoj za 2018. godinu, melanom kože je osmi najčešći rak u oba spola. Incidencija melanoma kože je bila 22,7 na 100 000 stanovnika. Tako Hrvatsku možemo ubrojiti među zemlje s vrlo visokom pojavnošću ove bolesti. Mortalitet se uvelike razlikuje među spolovima. Kod

muškaraca je broj umrlih znatno veći i iznosi 417 u odnosu na broj oboljelih koji je 535, dok je kod žena broj umrlih tek 86 u odnosu na broj oboljelih od 425. Nesrazmjer u smrtnosti se djelomično može objasniti stadijem bolesti u kojem su bolesnici bili dijagnosticirani. Tako je melanom kože s udaljenim metastazama dijagnosticiran dvostruko više kod muškarca nego kod žena (12).

ETIOPATOGENEZA MELANOMA

Čimbenici koji utječu na razvoj melanoma se mogu podijeliti na okolišne, genetske i imunološke (5). U ovom se radu posebna pažnja posvetila imunološkim čimbenicima i mehanizmima u nastanku tumora radi lakšeg shvaćanja suvremenih imunoterapijskih opcija.

1. Okolišni čimbenici

Istraživanja su otkrila da UV (*ultraviolet*) zračenje igra veliku ulogu u razvoju melanoma. 1992. godine sunčevo UV zračenje je klasificirano kao kancerogeno, a 2009. godine je uključeno i UV zračenje u solarijima (9). Na otkrivenim dijelovima kože nastaje oko 75% melanoma (2). Incidencija melanoma se razlikuje ovisno o geografskoj lokaciji među ljudima iste etničke pripadnosti. Incidencija je povećana na lokacijama bližima ekvatoru, kao i na višim nadmorskim visinama gdje je smanjena ozonska apsorpcija, manja oblačna prekrivenost i povećana refleksija sa snježnih površina koja dodatno povećava UV zračenje (5). Kronično dugotrajno izlaganje UV zračenju povezuje se s povećanom pojavnosti melanoma kao i karcinoma bazalnih i pločastih stanica, dok se kronično intermitentno izlaganje UV zrakama i zadobivene opekline od sunca više povezuju s melanomom u odnosu na ostale tumore kože (9). UVB i UVA spektar UV zračenja, čiji fotoni najviše oštećuju deoksiribonukleinsku kiselinu u stanicama, induciraju prijelaz melanocita u melanomske stanice (4). Iako se pretpostavlja da su mnoge patogenetski značajne mutacije u melanomu posljedica izravnog mutagenskog efekta UVB i UVA zraka, posredni učinci poput stvaranja slobodnih radikala uslijed biokemijske reakcije UVA s melaninom isto tako uzrokuju mutacije i genetske aberacije (10). Važno je još spomenuti terapijska UV zračenja koja mogu uzrokovati nastanak kožnog melanoma, kao i više od 6000 novih slučajeva melanoma godišnje u SAD-u kao posljedica UV zračenja u solarijima (9).

2. Genetski čimbenici

Određeni fenotipovi kože, očiju i kose su povezani s većom osjetljivošću na zrake sunca i rizikom za nastanak melanoma. Pjegavost, crvena kosa, svijetle oči i koža te

nemogućnost tamnjenja kože povećavaju rizik za nastanak melanoma za 50%. Uz to, pojedinci svijetlije puti češće razviju amelanotične lezije, koje se mogu uočiti tek kad se lezija proširi (9). Iako melanom najčešće nastaje na nepromijenjenoj koži, može nastati i iz dobroćudnih melanocitnih nevusa (2). Pojedinci s mnogobrojnim atipičnim madežima imaju veću vjerojatnost za oboljenjem od melanoma (13).

Pozitivna obiteljska anamneza i genska mutacija utječu na razvoj melanoma. U kombiniranoj analizi 8 istraživanja slučajeva i kontrola kod bjelačke populacije, pojedinci s pozitivnom obiteljskom anamnezom melanoma imaju relativni rizik od 2,24 za oboljenje od melanoma u odnosu na pojedince bez pozitivne obiteljske anamneze (14). Najčešća mutacija identificirana u obiteljski nasljednim formama melanoma je mutacija CDKN2A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) gena (9). Kod približno 30 do 40% nasljednih melanoma je nađena mutacija ovog gena. CDKN2A gen kodira dva proteina, p16 i p14, oba u funkciji regulacije staničnog ciklusa (13). Ista se mutacija može naći u 8 do 15% slučajeva multiplih primarnih melanoma kod pacijenata bez pozitivne obiteljske anamneze (15).

Najčešće mutacije kod sporadičnih melanoma su one u kojima je zahvaćen MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) i PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) stanični signalni lanac. MAPK i PI3K signalni lanci uključeni su mnoge stanične funkcije, uključujući proliferaciju, diferencijaciju i preživljenje stanice (16). Među njima je na prvom mjestu mutacija BRAF gena. Taj gen kodira serin/treonin protein kinazu koja je ključna u regulaciji MAPK signalnog puta. Istraživanja su pokazala da približno 40 do 60% kožnih melanoma ima mutaciju BRAF gena (1,15). Upravo definiranjem BRAF mutacije kao najčešće kod melanoma započeo je novi pristup liječenju melanoma ciljanom terapijom. To je značilo inhibiciju MAPK staničnog lanca BRAF i MEK inhibitorima kod bolesnika s BRAF mutacijom (2). Druga najčešća somatska mutacija je mutacija NRAS gena, regulatora staničnog rasta i maligne transformacije preko MAPK te PI3K staničnog lanca. Pojavljuje se u 20% slučajeva i povezana je s izrazito agresivnom bolešću i slabim preživljenjem (17). Važno je napomenuti kako su NRAS mutacije detektirane gotovo isključivo u melanomima bez BRAF mutacija (18).

Aberantnu ekspresiju TERT (*telomerase reverse transcriptase*) gena, koji kodira katalitičku podjedinicu telomeraze, enzima koji održava duljinu telomera i kromosomsku stabilnost, nalazimo u 90% malignih tvorbi. Reaktivacija TERT gena premošćuje stanično mirovanje inducirano replikacijom, kritični korak u inicijaciji

tumorske pretvorbe (19). Mutacije u promotorima TERT gena dovode do višestrukog porasta transkripcije TERT gena. Te mutacije pronađene u melanomima odgovarale su UV-specifičnim mutacijama, tako naglašavajući indukcijsku ulogu UV zračenja. Identificirane su u sporadičnim primarnim melanomima u 33% slučajeva, a u metastatskim melanomima u čak 85% oboljelih, što pokazuje povezanost metastatske bolesti i mutacija TERT promotora (20,21).

Razvoj metastatskog melanoma povezan je i s mutacijama u tumorsupresorskim genima PTEN i TP53 (10). PTEN gen kodira PTEN protein, ključni regulator PI3K signalnog lanca. Somatske promjene PTEN gena su pronađene u 14% kožnih melanoma (22). Međutim, studije sugeriraju puno češću pojavnost mutiranog PTEN i TP53 gena u metastatskoj bolesti nego u ranijim fazama bolesti (23,24). Nedavna istraživanja podupiru tvrdnju da mutacija PTEN gena igra ključnu ulogu u rezistenciji na terapiju malim molekulama, odnosno ciljanu terapiju, te terapiju inhibitorima staničnih kontrolnih točaka imunološkog odgovora (eng. *immune checkpoint inhibitors*, ICI) (25–27). U 2015. godini, Peng i sur. su demonstrirali da utišavanje PTEN gena u melanomskim stanicama smanjuje sposobnost djelovanja T limfocita na tumorske stanice. *In vivo*, prilagođeni transferirani T limfociti su slabije ubijali stanice presađenog tumora s utišanim PTEN genom nego one s aktivnim PTEN genom. U imonohistokemijskim analizama kohorte pacijenata s metastatskim melanomom koji su primili terapiju ICI, tumori s ekspresijom PTEN gena su doživjeli veću redukciju u veličini nego tumori s utišanim PTEN genom (25). Na temelju prošlih dokaza da se PI3K signalni lanac aktivira u nedostatku PTEN gena, autori su uspjeli dokazati da inhibicijom PI3K lanca selektivnim inhibitorima, simulirajući rad PTEN proteina, melanomske stanice postaju osjetljive na imunoterapiju (25,28). U životinjskom modelu korištenom u istraživanju Peng i sur., terapijska kombinacija PI3K selektivnih inhibitora i ICI rezultiraju većom redukcijom tumora u BRAF-mutiranim i PTEN-utišanim melanomima nego samostalna terapija ICI (25). Zato ova otkrića podržavaju daljnja istraživanja terapije PI3K inhibicije u melanomima i nekoliko ih je već u razvoju (17).

3. Imunološki čimbenici

Niz koraka je potrebno da imunološki sustav uspješno uništi tumorske stanice. Ti koraci tvore ciklus interakcije tumorskih i imunoloških stanica (Slika 2). Prvo se onkogenezom

stvoreni neoantigeni otpuštaju u okolinu. Zatim ih antigen prezentirajuće stanice (eng. *antigen presenting cells*, APC) prepoznaju i fagocitiraju, za što su im potrebni dodatni signali koji induciraju imunost bez tolerancije prema tumorskim antigenima. Neki od imunogenih signala uključuju protuupalne citokine, poput TNF- α (eng. *tumor necrosis factor alpha*, faktor tumorske nekroze alfa) i IL-2 (interleukin-2), te faktore koje otpuštaju umiruće tumorske stanice. Zatim se tumorski antigeni u APC prerađuju i predočuju na molekule MHC (eng. *major histocompatibility complex*) što rezultira aktivacijom efektorskih T-limfocita protiv specifičnih tumorskih antigena. Naposljetku, aktivirani T-limfociti infiltriraju tumor, specifično ga prepoznaju, vežu se T-limfocitnim receptorom (eng. *T-cell receptor*, TCR) na kompleks antigen-MHC i uništavaju tumorsku stanicu. Uništavanjem stanice otpuštaju se antigeni povezani s tumorom koji pojačavaju imunološku reakciju i ciklus se ponavlja. Antigeni povezani s tumorom, koje prepoznaju autologna antitijela i T-limfociti i koji mogu potaknuti imunološki odgovor, identificirani su i klasificirani u melanomu. Neki od njih su diferencijacijski antigeni poput glikoproteina 100 (gp100), tirozinaze i Melan-A (7,29).

Imunološki sustav mora razlikovati domaće od tuđih antigena. Iako je ovaj koncept jednostavan, mehanizmi su kompleksni i bila su potrebna desetljeća istraživanja da ih se shvati. U središtu ovog procesa je prepoznavanje i vezanje TCR na kompleks antigena i MHC molekule na površini APC. Selekcija T-limfocita počinje u timusu gdje se uništavaju T-limfociti koji snažno reagiraju na vlastite antigene. Taj proces se zove središnja tolerancija. Neki TCR imaju specifičnost na strane antigene koja su križno osjetljiva i na vlastite antigene. Kako bi se prevenirala autoimuna reakcija, mnoge kontrolne točke reguliraju aktivaciju T-limfocita za vrijeme imunološkog odgovora, u procesu koji se zove periferna tolerancija. U središtu ovog procesa su dva kontrolna proteina, CTLA-4 (eng. *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*) i PD-1 (eng. *programmed death 1*). CTLA-4 i PD-1 kontroliraju stanični imunološki odgovor na različitim stadijima. Smatra se da je CTLA-4 predvodnik u prigušivanju imunološkog odgovora, jer on zaustavlja potencijalno autoreaktivne T-limfocite u početnom stadiju aktivacije naivnih T-limfocita u limfnim čvorovima. PD-1 signalni put regulira prethodno aktivirane T-limfocite u kasnijim stadijima imunološkog odgovora, primarno u perifernim tkivima. Upravo periferna tolerancija je ključni koncept kojim tumorske stanice izbjegavaju uništenje tako što ulaze u interakciju s kontrolnim proteinima koji prigušuju imunološki odgovor (30–32).

Iznimna imunogenost melanoma je temelj odnosa između melanoma i imunološkog sustava (5). Imunološki sustav može kontrolirati bolest samo u početnom stadiju tumora kada su tumorske stanice u niskom stupnju promijenjenosti i obrambeni mehanizmi još uvijek dostatni. Nedostatna aktivacija imunološkog sustava na tumorske stanice omogućuje tumoru takozvani „imunološki bijeg“. Ovaj mehanizam je podržan dokazima da neki pacijenti s metastatskim melanomom nemaju očitu primarnu leziju. Takvi slučajevi metastatskog melanoma bez poznatog primarnog sijela temelje se na imunomodulatornim mehanizmima. Imunološki sustav se može iscrpiti nakon dugotrajnog izlaganja tumorskim antigenima i antigenskom stimulacijom imunoloških stanica. Iscrpljenje imunološkog sustava i „imunološki bijeg“ omogućuju rast melanoma i njegov metastatski rasap (7,33–37). Isto tako, melanomske stanice mogu izbjeći detekciju kroz smanjenje ekspresije imunogenih tumorskih antigena, smanjenje ekspresije MHC molekula, promjene u prerađivanju antigena i novačenju imunosupresivnih stanica poput regulacijskih T-limfocita (38–41).

IMUNOTERAPIJA METASTATSKOG MELANOMA

Sve do nedavno jedini način liječenja metastatskog melanoma je bila kemoterapija. Najaktivniji i najčešće primjenjivani citostatik je bio dakarbazin. Odgovor na ovu terapiju je bio vrlo skroman, do 20%, a medijan preživljenja tek 9 mjeseci. Razlike između monoterapije dakarbazinom i kombinirane kemoterapije nije bilo. Ništa bolji rezultati nisu postignuti ni s radioterapijom. Međutim, posljednjih godina, nakon otkrića mnogih signalnih lanaca tumorskih i imunoloških stanica, pojavili su se novi oblici terapija, poput ciljane i imunoterapije. Oni su ostvarili dugoročne odgovore u znatnom broju bolesnika s metastatskim melanomom i produljili ukupno preživljenje. Ciljana terapija i imunoterapija postale su temeljni oblici liječenja metastatskog melanoma. Sljedeći ulomak će se posebno osvrnuti na imunoterapiju metastatskog melanoma.

Cilj imunoterapije tumora je osnažiti ili obnoviti sposobnost imunološkog sustava da prepozna i uništi tumorske stanice tako što će spriječiti mehanizme kojima tumor ostvaruje izbjegavanje i inhibiciju imunološkog odgovora. Imunoterapija kao novi oblik liječenja tumora najviše se istraživao upravo na metastatskom melanomu (42). Imunoterapiju možemo podijeliti u četiri glavne skupine. Prva uključuje biološke lijekove poput citokina, interferona i granulocito-makrofagnih čimbenika rasta kolonija (eng. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF). Druga skupina je terapija cijepljenjem, gdje se organizam izlaže tumorskim antigenima. Treća skupina je adaptivna imunoterapija, gdje se koriste specifični limfociti s protutumorskom aktivnošću. Četvrtu skupinu čine ICI (2,5,43–45).

1. Biološka imunoterapija

Prva imunoterapija u liječenju metastatskog melanoma koja se počela koristiti zasebno ili kao nadopuna kemoterapiji bila je biološka imunoterapija. Najčešći lijekovi koji su se koristili bili su visoke doze IL-2 i interferona tip 1 (IFN-1).

Terapija visokim dozama IL-2 je prva odobrena imunoterapija melanoma. Skromni rezultati liječenja i značajna toksičnost, uz pojavu novijih imunoterapijskih rješenja, umanjili su njegov značaj u liječenju metastatskog melanoma. Međutim uz pažljivi

odabir kandidata i kontrolu nuspojava, terapija visokim dozama IL-2 i dalje jest opcija kod pacijenata koji nisu reagirali na ostale terapijske metode.

Antitumorska svojstva IFN-1 se temelji na direktnim proapoptotičkim i antiproliferativnim učincima. Ujedno i aktivira mnoge imunološke stanice te tako potiče imunološki odgovor. U prošlosti je terapija interferonom isporučila slabe rezultate u liječenju melanoma, ali nedavna istraživanja su pokazala da kombinacija novijih lijekova poput ICI i visokih doza IFN pokazuju obećavajuće rezultate u liječenju melanoma (46–48).

2. Cijepljenje

Cijepljenje je aktivna i specifična imunoterapija koja se temelji na izlaganju neoantigena ili tumorskih stanica imunološkom sustavu. Za razliku od infektivnih bolesti, gdje se cijepljenje provodi radi prevencije, kod tumora se cijepljenje koristi nakon dijagnoze bolesti kako bi se povećao broj već aktiviranih T-limfocita specifičnih na neoantigen i inducirali aktivaciju novih T-limfocita. Materijal za imunizaciju se dobiva biopsijom ili resekcijom tumora pacijenata ili donora (2,49).

Nekoliko strategija terapije cijepljenjem se trenutno istražuju, uključujući cjepiva usmjerena na dendritičke stanice (DS-cjepiva) i virusna cjepiva. (5)

DS-cjepiva ispravljaju poremećaj prepoznavanja tumorskih antigena tako što se dendritičke stanice izoliraju iz krvi, zatim *ex vivo* stimuliraju i fuzioniraju s tumorskim antigenima i naposljetku injektiraju u pacijenta. Aktivirane DS će tako prezentirati i aktivirati specifične T-limfocite koji će moći uništiti tumorske stanice. Istraživanja su pokazala veći značaj DC-cjepiva kao adjuvantne terapije nego kod terapija metastatske bolesti, a kao jedna od najvećih prednosti se pokazuje niska toksičnost, dok su ukupni rezultati liječenja slabiji od terapije ICI. Daljnja istraživanja su potrebna kako bi ova terapijadobila definitivnu ulogu u liječenju uznapredovalih stadija tumora, posebno u kontekstu kombinacije s ICI (50).

Virusna cjepiva temelje se na onkolitičkom djelovanju, odnosno poticanju imunološkog odgovora proizvodnjom citokina i imunomodulatornih molekula. Uštrcavanjem u neoperabilne lezije, virus se razmnožava u tumorskoj stanici, uništava stanicu i dalje širi kroz tumorsko tkivo. Prvi onkolitički virus bio je genetički promijenjeni herpesvirus

– talimogen laherpaverpec (T-VEC), koji je 2015. godine odobren kao terapija uznapredovalog melanoma. On, osim lize tumorskih stanica, nosi i gen za GM-CSF, koji dodatno osnažuje imunološku aktivnost. Novija istraživanja nisu dokazala njegovu učinkovitost u stimulaciji imunološkog odgovora. Istraživanja na staničnim kulturama i miševima pokazala su učinkovitost virusa VSV-GP (genetski modificirani vezikularni stomatitis virus) na potkožne melanomske lezije i sprječavanju razvoja metastaza u sistemske aplikaciji. Međutim potrebna su *in vivo* istraživanja koja bi dokazala vrijednost ovog otkrića (2,5,51).

3. Adaptivna imunoterapija

U adaptivnu imunoterapiju ubrajamo terapiju LAK stanicama (eng. *lymphokine activated killer cells*) i terapiju TIL-om (eng. *tumor infiltrating lymphocytes*). Oba načina zahtijevaju izolaciju bolesnikovih limfocita i izvantjelesnu inkubaciju tih limfocita s IL-2. LAK-stanice nastaju inkubacijom perifernih limfocita, a TIL stanice se izoliraju iz tumorske tvorbe, te im je zato potrebna manja doza IL-2 za aktivaciju. K tome, TIL stanice imaju sposobnost prepoznavanja tumoru pridruženih biljega. Imunoterapija TIL-om je puno učinkovitija od terapije LAK-stanicama (2).

Prema podacima iz 2020.godine, u manjem kliničkom istraživanju od Van den Berg i sur. možemo vidjeti odlične rezultate liječenja metastatskog melanoma TIL-om. Uz naglasak da prilikom pokretanja studije nije bilo PD-1/PDL-1 inhibitora, odgovor na terapiju je postojao u 50% slučajeva, a u 20% je došlo do potpune remisije koja traje više od sedam godina. Ohrabrujući rezultati su bili temelj za pokretanje treće faze kliničke studije koja je u tijeku (52). Istraživanje od Sarnaik i sur. je pokazalo ohrabrujuće rezultate kod bolesnika kod kojih je bolest progredirala nakon terapije PD-1 inhibitorima. Odgovor na terapiju se postigao u 38% bolesnika (53).

Spomenimo i još jedan oblik adaptivnog stjecanja imunosti koji ne spada u skupinu adaptivne imunoterapije, a to je CAR-T liječenje (eng. *chimeric antigen receptor T cells*). Ova metoda se sastoji od izuzimanja T-limfocita iz krvi bolesnika, potom se T-limfociti inficiraju viralnim vektorom što uzrokuje predočavanje specifičnih receptora koji imaju i funkciju prepoznavanja specifičnih tumorskih antigena i aktivaciju T-limfocita. Takvi se limfociti naposljetku umnažaju i infundiraju u bolesnika. Ova terapija

je postala vrlo uspješna priča u liječenju hematoloških maligniteta i odobrena je kao terapija izbora. Sljedeći korak bio je evaluacija djelovanja na solidne tumore, no prvi rezultati istraživanja nisu pokazali impresivne rezultate poput onih kod hematoloških maligniteta. Neke prepoznate prepreke koje čine CAR-T terapiju manje efikasnom kod solidnih tumora je slaba migracija CAR-T stanica iz krvnih žila u prostor tumora, imunosupresivni tumorski mikrookoliš i neidentificiran idealan ciljni tumorski antigen. Kod melanoma se razmatraju tumorski antigeni poput MCSP (eng. *melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan*) i gp100. Trenutno se istražuje opcija kontrole imunosupresivnog tumorskog mikrookoliša kod CAR-T terapije kombinacijom s ICI (2,54).

4. Inhibitori staničnih kontrolnih točaka imunološkog odgovora, ICI

Mnogi inhibitorni putevi postoje u imunološkom sustavu s ciljem održavanja tolerancije na vlastite antigene. Oni se zajedno zovu stanične kontrolne točke imunološkog odgovora (eng. *immune checkpoints*, IC). Glavna uloga IC je zaštita tkiva od ozljede koja može nastati prilikom djelovanja imunološkog sustava na strane antigene i onemogućiti pojavu autoimunosti, odnosno djelovanja imunološkog sustava na vlastite antigene. Zaštita se ostvaruje inhibicijom T-limfocita. Mnoga istraživanja dokazala su da je primarni mehanizam tumorskih stanica u zaobilaženju adekvatnog imunološkog odgovora aktivacija IC. Ova saznanja su potaknula razvoj novih lijekova koji moduliraju, odnosno inhibiraju IC i oporavljaju antitumorsku aktivnost. Primjeri molekula koje takva terapija cilja su CTLA-4 i PD-1 (5,55).

CTLA-4 inhibicija

Za aktivaciju T-limfocita, najčešće u limfnom tkivu, potrebno je više od jednog stimulacijskog signala. Prvi i najvažniji signal za aktivaciju T-limfocita je specifično vezanje TRC s MHC-antigen kompleksom koji predočuju APC. Potrebno je još vezanje kostimulacijskih molekula CD28 na T-limfocitu i B7 na APC da bi došlo do aktivacije i diferencijacije T-limfocita preko pojačane transkripcije IL-2. Ovim vezanjem inducirati će se predočenje CTLA-4 molekula na površini T-limfocita koji imaju veći afinitet za vezanje na B7 od CD28. Omjer vezanja CTLA-4 i CD28 s B7 odrediti će hoće li T-

limfocit biti aktiviran ili će ući u stanje mirovanja. Pretjerana ekspresija CTLA-4 molekula u bolesnika s tumorom dovodi do nedostatne aktivacije T-limfocita i nedostatnog imunološkog odgovora na tumorske stanice (2,5,30).

Najznačajniji inhibitor CTLA-4 je ipilimumab. To je humano monoklonsko protutijelo koji se veže na CTLA-4 molekulu na površini T-limfocita i sprječava inhibitorski signal posredovan vezanjem B7 i CTLA-4 molekula. Time će se omogućiti aktivacija T-limfocita (2). Ipilimumab je 2011. godine bio prvi ICI koji je odobren za liječenje metastatskog melanoma na temelju rezultata treće faze kliničkog istraživanja od Hodi i sur. gdje se kod otprilike 20% pacijenata postiglo dugoročno preživljenje (56). U velikoj zajedničkoj analizi iz 2015. godine od Schadendorf i sur potvrđeno je dugoročno preživljenje u određenom broju bolesnika s metastatskim melanomom liječenim ipilimumabom. Medijan ukupnog preživljenja je bio 11,4 mjeseca, a plato ukupnog preživljenja se postigao u trećoj godini, kada su stope preživljenja varirale između 20 i 26%. Daljnjim praćenjem se pokazalo da se stope drastično ne mijenjaju, približno 20% pacijenata je živo i nakon 10 godina od početka terapije. Ovi rezultati imunoterapiju predstavljaju kao opciju koja pretvara smrtonosnu bolest u kroničnu. S obzirom na prethodni medijan preživljenja kod terapija klasičnim protutumorskim modalitetima koji je brojio 8-10 mjeseci i ostvarivao udio petogodišnjeg preživljenja od otprilike 10% u uznapredovalim oblicima melanoma, ovi rezultati pokazuju veliki uspjeh u ukupnom preživljenju metastatskog melanoma (5,57).

Mnoge studije su pokazale brojne nuspojave povezane s imunoterapijom. Kod terapije ipilimumabom, najčešće su bile nuspojave gastrointestinalnog sustava (kolitis i proljev), kože (dermatitis i pruritus), jetre (hepatitis i povišeni jetreni enzimi) te endokrinih organa (hipofizitis i tiroiditis). Posljedično tome, razvile su se smjernice za ublažavanje nuspojava kod terapije ipilimumabom (10,58).

Ipilimumab je prvi lijek nakon više desetaka godina pokazao drastično poboljšanje preživljenja bolesnika s metastatskim melanomom, ali rezultati u preživljenju bez progresije bolesti (eng. *progression free survival*, PFS) su bili puno skromniji. Ovaj se učinak terapije ipilimumabom, a kasnije se prikazao i kod terapije PD-1 inhibitorima, može objasniti fenomenom pseudoprogresije. Pseudoprogresija je obilježena povećanjem broja stanica imunološkog sustava u tumorskom tkivu koje uzrokuju porast mase tumora. Na početku terapije tumorska masa progredira, odnosno naraste

za oko 10 do 13%, te se nastavkom terapije počne smanjivati, ako je terapija uspješna (5).

PD-1 inhibicija

PD-1 je inhibicijska molekula koja se predočuje na površini aktiviranih B, T i NK-limfocita. Prilikom vezivanja PD-1 na PD-L1 (eng. *programmed death ligand 1*), koju predočuju normalne i tumorske stanice, aktivirani limfociti se negativno reguliraju i stanice s predočenim PD-L1 mogu izbjeći fatalni imunološki odgovor. Nekoliko studija je dokazalo povećanu ekspresiju PD-L1 molekule na površini APC i tumorskih stanica u melanomskim lezijama što će uzrokovati sniženje funkcije aktiviranih limfocita. PD-L1 ekspresija je pojačana u prisutnosti limfocita koji luče IFN- γ u tumorskom mikrookolišu. Kao što je već spomenuto, tumorski mikrookoliš će zbog kroničnog predočenja tumorskih antigena dovesti do „iscrpljenja“ imunološkog sustava, odnosno doći će do ekspresije „iscrpljenog“ fenotipa kod T-limfocita. Takvi T-limfociti imaju povećanu ekspresiju PD-1 molekula na svojoj površini (2,5,59).

Nivolumab i pembrolizumab su monoklonska protutijela koja se vežu za PD-1 na površini T-limfocita. Tako sprječavaju vezanje PD-L1 i PD-1 koje bi uzrokovale inhibiciju imunološkog odgovora posredovanog T-limfocitima. Mnoge studije su istraživale učinkovitost nivolumaba i pembrolizumaba.

Istraživanje objavljeno 2014. godine od Robert i sur. prikazalo je usporedbu dviju terapija kod bolesnika s metastatskim melanomom bez mutacije BRAF gena. Pacijenti, koji prethodno nisu bili liječeni, su podijeljeni u dvije skupine. Jedna skupina je liječena dakarbazinom, a druga nivolumabom. Rezultati su pokazali značajnu razliku u preživljenju nakon prve godine, 72,9% kod skupine liječene nivolumabom u usporedbi s 42,1% kod skupine liječene dakarbazinom. Objektivni odgovor na terapiju je bio postignut u 40% bolesnika liječenih nivolumabom, dok je u grupi liječenih dakarbazinom samo 13,9% odgovorilo na terapiju (60). Ubrzo je i istraživanje od Weber i sur. pokazalo kako nivolumab značajno povećava preživljenje te da postiže rezultate i kod bolesnika koji su prethodno neuspješno bili liječeni ipilimumabom i BRAF inhibitorima (61). U istraživanju iz 2018. godine od Ascierto i sur. grupa liječena nivolumabom je pokazala trogodišnje preživljenje od 51,2%, a grupa liječena dakarbazinom 21,6% (62).

Pembrolizumab je u istraživanju od Robert i sur. objavljenom 2015. godine pokazao slične kvalitete u liječenju metastatskog melanoma kao i nivolumab. Uspoređivao se i učinak liječenja pembrolizumabom u odnosu na ipilimumab. Pembrolizumab se pokazao kao lijek koji ima bolje šestomjesečno preživljenje bez progresije bolesti i veću stopu jednogodišnjeg preživljenja u odnosu na ipilimumab. Pojava težih nuspojava je bila rjeđa u grupi liječenoj pembrolizumabom nego u grupi liječenoj ipilimumabom (63). 2018. godine u KEYNOTE006 istraživanju evaluirani su rezultati petogodišnjeg usporednog praćenja terapije pembrolizumabom i ipilimumabom. Medijan preživljenja u grupi liječenih pembrolizumabom je bio 32,7 mjeseci, a u grupi liječenih ipilimumabom 15,9 mjeseci. Petogodišnje preživljenje bilo je 38,7% u bolesnika liječenih pembrolizumabom u odnosu na 31% liječenih ipilimumabom (64). CheckMate067 istraživanje od Hodi i sur. objavljeno 2018. u trajanju od 4 godine uspoređivalo je djelotvornost ipilimumaba i nivolumaba. Medijan preživljenja je u grupi liječenoj nivolumabom bio 36,9 mjeseci, dok je u grupi liječenoj ipilimumabom bio 19,9 mjeseci. Četverogodišnje preživljenje bilo je 46% u bolesnika liječenih nivolumabom u odnosu na 30% liječenih ipilimumabom (65). I Pembrolizumab i nivolumab su u liječenju uznapredovalog melanoma pokazali superiornost u odnosu na ipilimumab.

Pembrolizumab i nivolumab su do 2016. godine zamijenili ipilimumab kao prvu liniju terapije uznapredovalog melanoma, zbog veće učinkovitosti i tolerancije u usporedbi s ipilimumabom. Češće se pripisivala terapija pembrolizumabom, zbog svojeg doziranja koja su se održavala svaka tri tjedna, u usporedbi s rjeđe pripisivanim nivolumabom koji se dozirao svaka dva tjedna. Međutim, nedavno istraživanje u Engleskoj objavljeno 2020. godine pokazalo je različite učinke pembrolizumaba i nivolumaba u liječenju uznapredovalog melanoma. Trogodišnje preživljenje kod liječenja nivolumabom je bilo 51% dok je kod liječenja pembrolizumabom bilo 40% (66).

5. Kombinacija imunoterapije

Prethodno navedene studije su pokazale da PD-1 inhibitori imaju veću učinkovitost u liječenju metastatskog melanoma naspram CTLA-4 inhibitora, stoga su se nametnuli kao prva linija liječenja. Kombinacija PD-1 i CTLA-4 inhibitora je bio sljedeći korak u razvoju djelotvornije terapije metastatskog melanoma. Već spomenuto CheckMate067 istraživanje pokazalo je kako kombinirana terapija ipilimumabom i nivolumabom

(ipi/nivo) ima veći učinak nego monoterapija nivolumabom. Četverogodišnje preživljenje bilo je 53% u grupi liječenoj ipi/nivo, dok je u grupi liječenoj samo nivolumabom bilo 46%. Četverogodišnji PFS je bio 37% u grupi liječenoj ipi/nivo, a 31% u grupi liječenoj nivolumabom. Međutim poboljšanje u ishodu kombinirane terapije je pratilo i značajno povećanje tretiranih bolesnika s težim nuspojavama povezanim s ICI. Tako su se teže nuspojave pojavile u čak 59% bolesnika grupe liječene ipi/nivo, dok su se u grupi liječenoj nivolumabom teže nuspojave javile kod 22% bolesnika (65). Terapija pembrolizumabom je pokazala najmanju stopu težih nuspojava od samo 10% (64). Drugo već spomenuto istraživanje u Engleskoj objavljeno 2020. godine potvrdilo je veću djelotvornost kombinirane terapije u odnosu na monoterapiju PD-1 inhibitorima. Isto tako je potvrđena veća toksičnost kombinirane terapije, koja međutim ne mora uzrokovati povećani mortalitet tijekom provođenja terapije ako se nuspojave ispravno liječe. Zato kombiniranu terapiju preporučaju mlađim bolesnicima boljeg općeg stanja (66). Još jedno istraživanje koje je uspoređivalo djelotvornost ipi/nivo i monoterapije nivolumabom je pokazalo veću djelotvornost kombinirane terapije. Bolesnici uključeni u istraživanje su imali metastaze u mozgu. Grupa liječena ipi/nivo je pokazala stopu intrakranijalnog odgovora od 46% u odnosu na monoterapiju nivolumabom od samo 6% (67).

Prema posljednjim smjernicama Američkog društva kliničke onkologije (eng. *American Society of Clinical Oncology*, ASCO) iz 2020. godine terapija neoperabilnog melanoma se temelji na imunoterapiji. U obzir dolazi ipi/nivo terapija ili monoterapija nivolumabom ili pembrolizumabom neovisno o BRAF mutaciji. Kod bolesnika s melanomom u kojem je prisutna BRAF mutacija moguća je još opcija liječenja BRAF/MEK dvojnomo inhibicijom (68). Prema posljednjim smjernicama Europskog društva za medicinsku onkologiju (eng. *European Society for Medical oncology*, ESMO) iz 2020. godine, terapija metastatskog melanoma se mora individualizirati i temeljiti na terapijskim ciljevima (kratkoročni, odnosno dugoročni ciljevi). Ako se pacijentu može u prvih nekoliko mjeseci dati imunoterapija, neovisno o BRAF statusu, onda bi se upravo ona trebala primijeniti, jer bi mogla doprinijeti dugoročnoj kontroli bolesti i nakon prestanka primjene terapije (69).

Kod pacijenata s BRAF mutacijom, postoji potencijal za kombinacijom imunoterapije i ciljane terapije. Međutim, ovaj pristup liječenju uznapređovalog melanoma je trenutno u fazi istraživanja. SECOMBIT i ECOG 6134 studije uspoređuju kombinaciju

imunoterapije i ciljane terapije, ovisno o tome koja terapija se primjenjuje prva. Preliminarni rezultati pokazuju veću učinkovitost, ali i toksičnost kombinirane imunoterapije i ciljane terapije (5,69).

BIOMARKERI

Unatoč ohrabrujućim rezultatima ICI, samo kod 20 do 40% bolesnika s uznapredovalim melanomom se postižu dugotrajni učinci, dok ostali razviju primarnu ili sekundarnu rezistenciju. Ti bolesnici su okarakterizirani s vrlo kratkim PFS i ukupnim preživljenjem (5,70).

PD-L1 je biomarker koji se najviše istraživao kao prediktivni čimbenik u terapiji PD-1 inhibitorima. On se predočuje i na tumorskim i na upalnim stanicama. Međutim do danas nije nedvosmisleno dokazano da količina stanica u tumorskoj masi koja predočuje PD-L1 može ukazati na potencijalnu djelotvornost terapije PD-1 inhibitorima. Problemi u evaluaciji istraživanja koja su proučavala PD-L1 kao biomarker su bile biopsije koje ne mogu prikazati tumor u cjelini, različite vrijednosti koje bi se uzimale u obzir prilikom proglašavanja tumora PD-L1 pozitivnim ili negativnim i korištenje različitih imunoesajskih tehnika i antitijela za dokazivanje (71).

Prema istraživanju Gambichler i sur., cirkulirajući PD-1 pozitivni regulatorni T-limfociti (PD-1⁺ Treg) imaju prediktivnu vrijednost kod terapije nivolumabom i pembrolizumabom. Autori su prikazali da kod bolesnika gdje je zabilježen značajan pad PD-1⁺ Treg nakon početka primjene terapije PD-1 blokirajućim antitijelima postoji manji rizik za smrću uzrokovanu melanomom i bolji PFS. Bolesnici kod kojih nije došlo do značajnijeg pada u PD-1⁺ Treg u perifernoj krvi nisu odgovorili na terapiju PD-1 inhibitorima na zadovoljavajući način i imali su lošiji ishod (72).

Crijevna mikrobiota je pokazala da može utjecati na imunoterapiju. Miševi koji su tretirani antibioticima i miševi bez crijevne mikrobiote pokazali su slabije rezultate u liječenju CTLA-4 inhibitorima. Nedavno je demonstrirano da je povećana kolonizacija s *Faecalibacterium* i veća raznolikost crijevne mikrobiote povezana s boljim odgovorom na PD-1 inhibitore u bolesnika s melanomom (5,73).

ZAKLJUČAK

Melanom je tumor kože koji se najčešće pojavljuje kod bjeloputog stanovništva koji žive u toplijim krajevima. Ključni okolišni čimbenik za nastanak melanoma je sunčevo UV zračenje. Melanom u svojem uznapredovalom stadiju ima vrlo lošu prognozu. Bolesnici s metastatskim melanomom su slabo odgovarali na terapijske opcije koje su bile prisutne prije otkrića ciljane terapije i imunoterapije. Imunoterapija ICI je nakon više desetljeća neuspješnog liječenja metastatskog melanoma uspjela značajno produžiti preživljenje i kod određenog broja bolesnika dovesti do trajne kontrole bolesti. Međutim kod većine bolesnika se ne postižu dobri rezultati. Zato su potrebna daljnja istraživanja staničnih mehanizama nastanka i razvoja melanoma i imunoterapijskih opcija u svrhu pronalaska boljeg modaliteta liječenja ove teške bolesti.

ZAHVALA

Želio bih se zahvaliti obitelji i prijateljima na podršci koju su mi pružali tijekom studija.

Posebno bih se htio zahvaliti i svojoj mentorici doc.dr.sc. Jasmini Marić Brozić na pomoći prilikom pisanja ovog diplomskog rada.

LITERATURA

1. Jukić D, Križanac Š, Damjanov I. Bolesti kože. In: Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M, editors. Patologija. 5th ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. p. 697–728.
2. Vrdoljak E, Belac-Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Klinička onkologija. 3rd ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. 316 p.
3. Kibbi N, Kluger H, Choi JN. Melanoma: Clinical presentations. *Cancer Treat Res.* 2016;167:107–29.
4. Šitum M. Melanom. In: Basta-Juzbašić A, editor. Dermatovenerologija. 1st ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. p. 687–703.
5. Ralli M, Botticelli A, Visconti IC, Angeletti D, Fiore M, Marchetti P, et al. Review Article Immunotherapy in the Treatment of Metastatic Melanoma : Current Knowledge and Future Directions. 2020;2020.
6. Whiteman DC, Green AC, Olsen CM. SC. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2016.01.035>
7. Maio M. Melanoma as a model tumour for immuno-oncology. In: *Annals of Oncology.* 2012.
8. Wild CP, Weiderpass E SB. World cancer report 2020 [Internet]. World Health Organization. 2020. 613 p. Available from: <http://publications.iarc.fr/586>
9. Carr S, Smith C, Wernberg J. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma Carcinogen Ultraviolet radiation Indoor tanning Prevention. *Surg Clin NA* [Internet]. 2019; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.suc.2019.09.005>
10. Schadendorf D, Akkooi ACJ Van, Berking C, Griewank KG, Gutzmer R, Hauschild A, et al. Melanoma. 2018;971–84.
11. Melanoma of skin Source: Globocan 2020 [Internet]. 2020 [cited 2021 Jun 19]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>
12. Šekerija M. Incidencija raka u Hrvatskoj Bilten 2018. Hrv zavod za javno Zdr.

2018;Bilten 43(43).

13. Hawkes JE, Truong A, Meyer LJ. Genetic predisposition to melanoma. *Semin Oncol* [Internet]. 2016;43(5):591–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.seminoncol.2016.08.003>
14. Ford D, Bliss JM, Swerdlow AJ, Armstrong BK, Franceschi S, Green A, et al. Risk of cutaneous melanoma associated with a family history of the disease. *Int J Cancer*. 1995;62(4):377–81.
15. Pastorino L, Bonelli L, Ghiorzo P, Queirola P, Battistuzzi L, Balleari E, et al. CDKN2A mutations and MC1R variants in Italian patients with single or multiple primary melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2008 Dec;21(6):700–9.
16. Hawryluk EB, Tsao H. Melanoma: Clinical features and genomic insights. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(9).
17. Reddy BY, Miller DM, Tsao H. Somatic driver mutations in melanoma. *Cancer*. 2017;123:2104–17.
18. Nikolaou VA, Stratigos AJ, Flaherty KT, Tsao H. Melanoma: New insights and new therapies. Vol. 132, *Journal of Investigative Dermatology*. Nature Publishing Group; 2012. p. 854–63.
19. Bell RJA, Rube HT, Kreig A, Mancini A, Fouse SD, Nagarajan RP, et al. The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer. *Science* (80-). 2015 May 29;348(6238):1036–9.
20. Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov G V., Chin L, Garraway LA. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science* (80-). 2013 Feb 22;339(6122):957–9.
21. Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science* (80-). 2013 Feb 22;339(6122):959–61.
22. Akbani R, Akdemir KC, Aksoy BA, Albert M, Ally A, Amin SB, et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*. 2015 Jun 20;161(7):1681–96.
23. Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, Sriharan A, Talevich E, Gagnon A, et al. The

- Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *N Engl J Med*. 2015 Nov 12;373(20):1926–36.
24. Tsao H, Goel V, Wu AH, Yang AG, FGH. Genetic Interaction Between NRAS and BRAF Mutations and PTEN / MMAC1 Inactivation in Melanoma. 2004;47.
 25. Peng W, Chen JQ, Liu C, Malu S, Creasy C, Tetzlaff MT, et al. Loss of PTEN promotes resistance to T cell–mediated immunotherapy. *Cancer Discov*. 2016;6(2):202–16.
 26. Bucheit AD, Chen G, Siroy A, Tetzlaff M, Broaddus R, Milton D, et al. Complete loss of PTEN protein expression correlates with shorter time to brain metastasis and survival in stage IIIB/C melanoma patients with BRAFV600 mutations. *Clin Cancer Res*. 2014 Nov 1;20(21):5527–36.
 27. Paraiso KHT, Xiang Y, Rebecca VW, Abel E V., Chen YA, Munko AC, et al. PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. *Cancer Res*. 2011 Apr 1;71(7):2750–60.
 28. Jia S, Liu Z, Zhang S, Liu P, Zhang L, Lee SH, et al. Essential roles of PI(3)K-p110 β in cell growth, metabolism and tumorigenesis. *Nature*. 2008 Aug 7;454(7205):776–9.
 29. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39(1):1–10.
 30. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am J Clin Oncol Cancer Clin Trials*. 2016;39(1):98–106.
 31. Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. Vol. 224, *Immunological Reviews*. 2008. p. 166–82.
 32. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. Vol. 23, *Annual Review of Immunology*. 2005. p. 515–48.
 33. Passarelli A, Mannavola F, Stucci LS, Tucci M, Silvestris F. Immune system and melanoma biology: a balance between immunosurveillance and immune escape. *Oncotarget [Internet]*. 2017 Dec 1 [cited 2021 Jun 9];8(62):106132–42.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29285320>

34. Motofei IG. Malignant Melanoma: Autoimmunity and Supracellular Messaging as New Therapeutic Approaches. Vol. 20, *Current Treatment Options in Oncology*. Springer New York LLC; 2019.
35. Motofei IG. Melanoma and autoimmunity: Spontaneous regressions as a possible model for new therapeutic approaches. Vol. 29, *Melanoma Research*. Lippincott Williams and Wilkins; 2019. p. 231–6.
36. Scott JF, Gerstenblith MR. 7 Melanoma of Unknown Primary. *exonpublications.com* [Internet]. [cited 2021 Jun 9];978–978. Available from: <https://sci-hub.do/https://exonpublications.com/index.php/exon/article/view/58>
37. Gyorki DE, Callahan M, Wolchok JD, Ariyan CE. The delicate balance of melanoma immunotherapy. *Clin & Transl Immunol* [Internet]. 2013;2(8):e5-8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cti.2013.5>
38. Sadozai H, Gruber T, Hunger RE, Schenk M. Recent successes and future directions in immunotherapy of cutaneous melanoma. Vol. 8, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2017.
39. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. Vol. 480, *Nature*. Nature Publishing Group; 2011. p. 480–9.
40. Teng M, Galon J, ... WF-TJ of clinical, 2015 undefined. From mice to humans: developments in cancer immunoediting. *Am Soc Clin Investig* [Internet]. [cited 2021 Jun 13]; Available from: <https://sci-hub.do/https://www.jci.org/articles/view/80004>
41. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium and escape. Vol. 27, *Current Opinion in Immunology*. 2014. p. 16–25.
42. Haanen JBAG. Immunotherapy of melanoma. In: *European Journal of Cancer, Supplement*. 2013. p. 97–105.
43. Choubey D. Type i interferon (IFN)-inducible Absent in Melanoma 2 proteins in neuroinflammation: Implications for Alzheimer's disease. Vol. 16, *Journal of Neuroinflammation*. BioMed Central Ltd.; 2019.

44. Sukari A, Abdallah N, Nagasaka M. Unleash the power of the mighty T cells-basis of adoptive cellular therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2019;136(January):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.01.015>
45. Coventry BJ. Therapeutic vaccination immunomodulation: forming the basis of all cancer immunotherapy. *Ther Adv Vaccines Immunother*. 2019;7:251513551986223.
46. Sanlorenzo M, Vujic I, Carnevale-Schianca F, Quaglino P, Gammaitoni L, Fierro MT, et al. Role of interferon in melanoma: old hopes and new perspectives. Vol. 17, *Expert Opinion on Biological Therapy*. Taylor and Francis Ltd; 2017. p. 475–83.
47. Rafique I, Kirkwood JM, Tarhini AA. Immune checkpoint blockade and interferon- α in melanoma. Vol. 42, *Seminars in Oncology*. W.B. Saunders; 2015. p. 436–47.
48. Marabondo S, Kaufman HL. High-dose interleukin-2 (IL-2) for the treatment of melanoma: safety considerations and future directions. *Expert Opin Drug Saf*. 2017 Dec 2;16(12):1347–57.
49. Ott PA, Hu Z, Keskin DB, Shukla SA, Sun J, Bozym DJ, et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature* [Internet]. 2017 Jul 13 [cited 2021 Jun 21];547(7662):217–21. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature22991>
50. Van Willigen WW, Bloemendal M, Gerritsen WR, Schreibelt G, De Vries IJM, Bol KF. Dendritic cell cancer therapy: Vaccinating the right patient at the right time. Vol. 9, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2018.
51. Kimpel J, Urbiola C, Koske I, Tober R, Banki Z, Wollmann G, et al. The oncolytic virus VSV-GP is effective against malignant melanoma. *Viruses*. 2018 Mar 2;10(3).
52. Van Den Berg JH, Heemskerk B, Van Rooij N, Gomez-Eerland R, Michels S, Van Zon M, et al. Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) therapy in metastatic melanoma: Boosting of neoantigen-specific T cell reactivity and long-term follow-up. *J Immunother Cancer*. 2020;8(2):1–11.

53. Sarnaik A, Khushalani NI, Chesney JA, Kluger HM, Curti BD, Lewis KD, et al. Safety and efficacy of cryopreserved autologous tumor infiltrating lymphocyte therapy (LN-144, lifileucel) in advanced metastatic melanoma patients who progressed on multiple prior therapies including anti-PD-1.
54. Simon B, Uslu U. CAR-T cell therapy in melanoma: A future success story? *Exp Dermatol*. 2018 Dec 1;27(12):1315–21.
55. Disis ML. Mechanism of action of immunotherapy. *Semin Oncol* [Internet]. 2014;41(S5):S3–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.09.004>
56. Hodi FS et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N Engl J Med*. 2010 Sep 23;363(13):1290–1290.
57. Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, Weber JS, Margolin K, Hamid O, et al. Pooled analysis of long-term survival data from phase II and phase III trials of ipilimumab in unresectable or metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2015 Jun 10;33(17):1889–94.
58. Ascierto PA, Del Vecchio M, Robert C, Mackiewicz A, Chiarion-Sileni V, Arance A, et al. Ipilimumab 10 mg/kg versus ipilimumab 3 mg/kg in patients with unresectable or metastatic melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017 May 1;18(5):611–22.
59. Sadozai H, Gruber T, Hunger RE, Schenk M. Recent successes and future directions in immunotherapy of cutaneous melanoma. *Front Immunol*. 2017 Dec 8;8(DEC).
60. Robert C, Long G V., Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without BRAF Mutation . *N Engl J Med*. 2015 Jan 22;372(4):320–30.
61. Weber JS, D'Angelo SP, Minor D, Hodi FS, Gutzmer R, Neyns B, et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): A randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(4):375–84.
62. Ascierto PA, Long G V, Robert C, Brady B, Dutriaux C, Maria A, et al. Survival

- Outcomes in Patients With Previously Untreated. 2019;5(2):187–94.
63. Robert C, Schachter J, Long G V., Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2521–32.
 64. Robert C, Ribas A, Schachter J, Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma (KEYNOTE-006): post-hoc 5-year results from an open-label, multicentre, randomised, controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2019 Sep 1;20(9):1239–51.
 65. Hodi FS, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P, Cowey CL, 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* [Internet]. 2018;19(11):1480–92. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30700-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30700-9)
 66. Board R, Smittenaar R, Lawton S, Liu H, Juwa B, Chao D, et al. Metastatic melanoma patient outcomes since introduction of immune checkpoint inhibitors in England between 2014 and 2018. *Int J Cancer*. 2021;148(4):868–75.
 67. Long G V., Atkinson V, Lo S, Sandhu S, Guminski AD, Brown MP, et al. Combination nivolumab and ipilimumab or nivolumab alone in melanoma brain metastases: a multicentre randomised phase 2 study. *Lancet Oncol* [Internet]. 2018;19(5):672–81. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30139-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30139-6)
 68. Seth R, Messersmith H, Kaur V, Kirkwood JM, Kudchadkar R, McQuade JL, et al. Systemic therapy for melanoma: ASCO guideline. *J Clin Oncol*. 2020;38(33):3947–70.
 69. Keilholz U, Ascierto PA, Dummer R, Robert C, Lorigan P, van Akkooi A, et al. ESMO consensus conference recommendations on the management of metastatic melanoma: under the auspices of the ESMO Guidelines Committee. *Ann Oncol* [Internet]. 2020;31(11):1435–48. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.07.004>
 70. Luke JJ, Flaherty KT, Ribas A, Long G V. Targeted agents and immunotherapies: Optimizing outcomes in melanoma [Internet]. Vol. 14, *Nature*

Reviews Clinical Oncology. Nature Publishing Group; 2017 [cited 2021 Jul 4]. p. 463–82. Available from: www.nature.com/nrclinonc

71. Berghoff AS, Ricken G, Widhalm G, Rajky O, Dieckmann K, Birner P, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) in melanoma brain metastases. *Histopathology*. 2015;66(2):289–99.
72. Gambichler T, Schröter U, Höxtermann S, Susok L, Stockfleth E, Becker JC. Decline of programmed death-1-positive circulating T regulatory cells predicts more favourable clinical outcome of patients with melanoma under immune checkpoint blockade. *Br J Dermatol*. 2020 May 1;182(5):1214–20.
73. Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpinets T V., et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science* (80-). 2018 Jan 5;359(6371):97–103.

ŽIVOTOPIS

Rođen sam 25.07.1996. u Zagrebu. Završio sam Osnovnu školu Vrbani, zatim i II. Gimnaziju u Zagrebu. 2015. godine sam upisao Medicinski fakultet u Zagrebu i završio ga u roku. Tijekom studija sam bio demonstrator na Katedri za patofiziologiju i bio član teniske sekcije. Redovito se bavim sportom, najviše tenisom i nogometom, te skijanjem i surfanjem. Engleskim jezikom izvrsno vladam, a njemački govorim dobro.