

Osnove imunoterapije u liječenju malignih bolesti

Stranjik, Jan

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:105:879364>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-01**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Jan Stranjik

**Osnove imunoterapije u liječenju
malignih bolesti**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2021.

*Ovaj rad izrađen je u Klinici za plućne bolesti Jordanovac pod vodstvom prof. dr. sc.
Marka Jakopovića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2020./2021.*

Sadržaj

Uvod	1
Povijesni pregled	1
Imunologija	2
Maligne stanice	2
Imunosni odgovor	2
Izbjegavanje imunosnog odgovora	3
Imunoterapija malignih bolesti	4
Inhibitori kontrolnih točki	4
CTLA-4 blokada	4
PD i PD-L blokada	6
Nuspojave inhibitora kontrolnih točki	8
Adoptivna stanična terapija	10
Prirodno prisutni tumor-specifični T limfociti	10
Genetički modificirani T limfociti	11
CAR-T stanična terapija.....	12
Terapijska tumorska cjepiva	14
Odabir antigena.....	14
Dopremanje antigena.....	15
Onkolitička viroterapija	16
Rasprava	18
Zaključak	19
Zahvale	20
Literatura	21
Životopis	26

Sažetak

Osnove imunoterapije u liječenju malignih bolesti

Jan Stranjik

Maligne bolesti predstavljaju veliki javnozdravstveni problem današnjice, postupno postajući najčešći uzrok smrti u razvijenim zemljama i noseći visoke stope morbiditeta. Trenutne terapijske mogućnosti su relativno bezuspješne i nose sa sobom mnoge nuspojave posljedično njihovim mehanizmima djelovanja. Stoga znanstvenici razvijaju nove pristupe u liječenju kako bi nadvladali ove prepreke. Jedan od tih pristupa je imunoterapija. Imunoterapija malignih bolesti iskorištava sposobnost imunološkog sustava domaćina da se suprotstavi rastu tumora tako što osnažuje njegove dobro uspostavljene načine odgovora na nepoznate antigene. Adoptivna imunost, predvođena T limfocitima, i urođena imunost, sastavljena od prirodnoubilačkih stanica i makrofaga, zajedno igraju bitnu ulogu u otkrivanju i u konačnici eliminaciji malignih stanica, štiteći tako domaćina od nekontroliranog tumorskog rasta. Budući da se služi ciljanim načinima djelovanja, smatra se da bi imunoterapija trebala nositi manju toksičnost, a zahvaljujući imunološkom pamćenju rezultirati dugotrajnim kliničkim odgovorom. U ovom radu pokušao sam istražiti područje imunoterapije u liječenju malignih bolesti baveći se pregledom jednih od najobčavljajućih pristupa u ovom području poput inhibitora kontrolnih točki, adoptivne stanične terapije, terapijskih tumorskih cjepiva i onkolitičke viroterapije. Rad je usredotočen na biološke osnove imunoterapije malignih bolesti i dotiče se nekih gledišta poput trenutnih kliničkih primjena ove vrste terapije, njezinih izgleda u budućnosti i izazova koji tek predstoje.

Ključne riječi: novotvorine, imunoterapija, inhibitori kontrolnih točki, adoptivna imunoterapija, tumorska cjepiva

Summary

Principles of immunotherapy in the treatment of malignant diseases

Jan Stranjik

Cancer is a major public health issue by becoming the number one cause of death in developed countries and causing high rates of morbidity. The current treatment options are still relatively unsuccessful and carry a lot of adverse effects due to their nonspecific mechanisms of action. Thus, scientists are developing novel approaches to overcome these hurdles. One of these approaches is immunotherapy. Cancer immunotherapy uses the capabilities of host's immune system to fight cancer by enhancing its established ways of dealing with non-self antigens. Adoptive immunity, led by T lymphocytes, and native immunity, consisting of natural killers cells and macrophages, both play a vital role in detection and eventual destruction of malignant cells, protecting the host from uncontrolled tumor growth. Having targeted mechanisms of action, it is thought that immunotherapy could bear less toxicity, and, due to immunological memory, it would result in durable clinical responses. In this thesis I tried to explore the field of cancer immunotherapy by reviewing some of the most promising approaches, including immune checkpoint inhibitors, adoptive cell therapy, therapeutic cancer vaccines and oncolytic virotherapy. The discussion focuses on biological principles of cancer immunotherapy and touches some aspects like current clinical applications of cancer immunotherapy, its future prospects and challenges ahead.

Keywords: neoplasms, immunotherapy, immune checkpoint inhibitors, adoptive immunotherapy, cancer vaccines

Uvod

Maligne bolesti danas predstavljaju veliki javnozdravstveni problem, s tendencijom da postanu vodeći uzrok smrti u svijetu. Procjenjuje se da je u svijetu u 2020. godini broj novih slučajeva malignih bolesti iznosio 19.3 milijuna, a broj smrti toga uzroka gotovo 10 milijuna. Rak dojke je preuzeo vodeće mjesto po učestalosti ispred karcinoma pluća, koji je i dalje najsmrtonosniji karcinom. U razvijenim zemljama ukupna incidencija je 2-3 puta veća u odnosu na zemlje u tranziciji, a predviđa se da će se globalna godišnja incidencija povećati za 47% do 2040. godine. (1)

Liječenje malignih bolesti danas još uvijek uključuje upotrebu lijekova koji djeluju relativno neselektivno i oštećuju zdrave stanice, kao neželjeni učinak njihova mehanizma djelovanja, što dovodi do znatnog poboljšavanja i smrtnosti. S druge strane, imunološki sustav je sposoban uništavati točno određene stanice prema njihovim jedinstvenim karakteristikama i ta činjenica godinama pobuđuje interes onkologa i imunologa da iskoriste imunološki sustav za borbu protiv malignih bolesti. (2)

Povijesni pregled

Imunoterapija se sada smatra petim stupom u nizu u liječenju malignih bolesti, zajedno s kirurgijom, radioterapijom, kemoterapijom i ciljanom terapijom. (3)

Prvi znanstveno utemeljeni pokušaji liječenja malignih bolesti putem modulacije imunološkog sustava pripisuju se njemačkim liječnicima Friedrichu Fehleisenu i Wilhelmu Buschu koji su neovisno jedan o drugome uočili značajnu regresiju tumora nakon preboljelog erizipela. (4) Busch je 1868. godine bio prvi koji je namjerno inficirao onkološkog pacijenta kako bi izazvao regresiju tumora. (5) Nakon toga je William Bradley Coley, danas zvan ocem imunoterapije, 1891. počeo liječiti onkološke pacijente takozvanim Coleyevim toksinom. Radilo se o toplinski inaktiviranim *Streptococcus pyogenes* i *Serratia marcescens* kojim je inokulirao pacijente oboljele od sarkoma, limfoma i karcinoma testisa. (4,6,7) Mada je postigao trajne potpune remisije, rizik od ozbiljnih infekcija i zbog manjka reproducibilnosti potaknuo je onkologe toga doba na korištenje kirurgije i radioterapije umjesto toga. (6,7) Prošlo je preko 50 godina da bi nove spoznaje o imunološkom sustavu i hipoteze poput imunskog nadzora raka (eng. *cancer immunosurveillance*) obnovile interes za i-

munoterapiju (4,7) Poseban je zamah ovo područje doživjelo otkrićem imunoloških kontrolnih točki Jamesa Allisona i Tasuka Honja koji su za to dobili Nobelovu nagradu za medicinu 2018. godine. (8)

Oblici imunoterapije koji trenutno najviše obećavaju su inhibitori kontrolnih točki i adoptivna stanična terapija, a od posebno zanimljivih izdvajaju se još terapijska tumorska cjepiva i onkolitička viroterapija. (4,7,9)

Imunologija

Maligne stanice

Mada su maligne stanice podrijetlom stanice domaćina, one mogu potaknuti imunološki odgovor. Razlog tomu je promijenjeni genetski i epigenetski profil tih stanica koji dovodi do ekspresije tzv. tumorskih antigena, a koje domaćin prepoznaje kao strane. Ti antigeni mogu biti jedinstveni za maligne stanice ili se izražavaju i na normalnim stanicama, ali se na malignim izražavaju u abnormalnim količinama. Oni mogu biti produkti mutiranih gena, prekomjerno izraženi produkti normalnih gena, produkti onkogenih virusa i onkofetalni antigeni (normalno izraženi tijekom fetalnog razdoblja). (2)

Imunosni odgovor

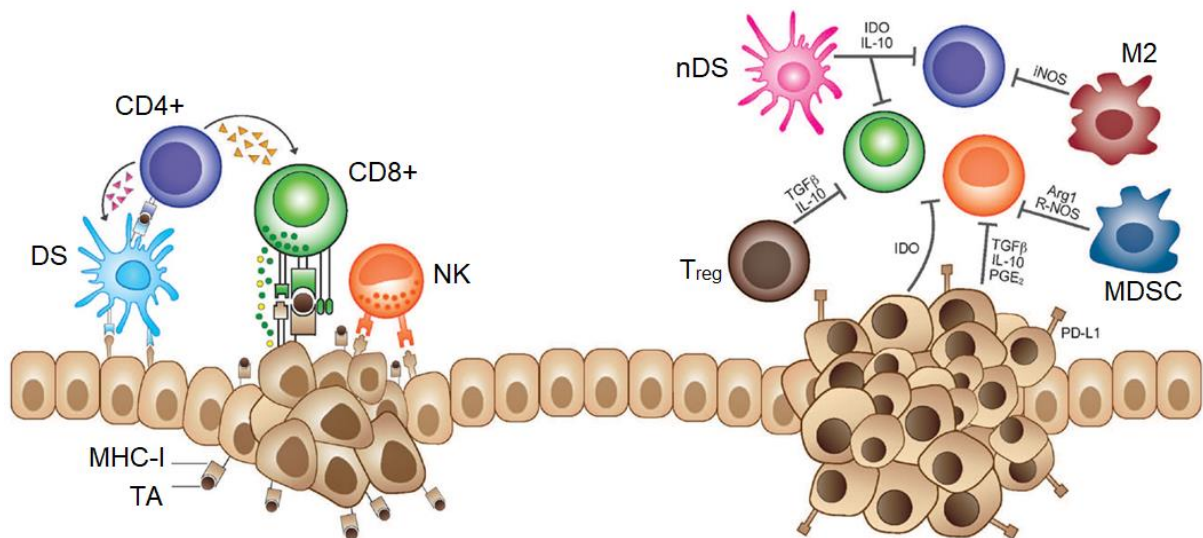
U reakciji imunološkog sustava na maligne stanice involvirani su i urođeni i adaptivni imunosni mehanizmi, a posredovani su raznim stanicama (Slika 1). U sklopu adaptivne imunosti najvažniju ulogu imaju citotoksični CD8+ limfociti T koji imaju nadzornu ulogu prepoznavanjem stranih peptida, u ovom slučaju tumorskih, u sklopu molekula MHC-I (eng. *major histocompatibility complex*) i uništavanjem potencijalno zloćudnih stanica. Ukoliko ne izražavaju MHC-I molekule, u igru ulaze prirodno-ubilačke stanice (eng. *natural killer, NK*), kao dio urođene imunosti, koje se aktiviraju upravo u odsustvu tih molekula na stanicama. Isto tako, ti antigeni se prerađuju i predočavaju od strane predočnih stanica koje zatim aktiviraju limfocite. Makrofagi aktivirani na klasičan način (M1 fenotip) mogu uništavati maligne stanice kao što to inače čine sa klicama, potaknuti DAMP-ovima (eng. *danger-associated molecular patterns*) - proizvodi umrlih malignih stanica, i IFN- γ (interferon gama) kojeg luče tumorspecifični T limfociti. S druge strane, malo je dokaza da je humoralna imunost, posredovana protutijelima, učinkovita u odgovoru na tumore. (2)

Izbjegavanje imunskog odgovora

Maligne stanice stječu razne karakteristike koje im omogućuju izbjegavanje imunskog odgovora. Njihove karakteristike se mijenjaju pod utjecajem samog imunskog odgovora, pri kojem se eliminiraju klonovi koji izražavaju imunogene antigene, ali i MHC-I molekule, i s vremenom opstaju samo klonovi koji ih ne izražavaju. Taj proces se naziva imunouređivanje tumora (eng. *immunoediting*).

Drugi mehanizam izbjegavanja je aktivna inhibicija imunskog odgovora putem izražavanja inhibitornih molekula

poput PD-L1, lučenja immunosupresivnih produkata poput TGF- β (eng. *transforming growth factor beta*) i novačenjem stanica domaćina poput regulacijskih T limfocita (T_{reg}), makrofaga pridruženih tumoru (eng. *tumor-associated macrophages, TAMs*) i supresivskih stanica mijeloidnog podrijetla (eng. *myeloid-derived suppressor cells, MDSC*), koje koristi za stvaranje immunosupresivnog tumorskog mikrookoliša i kočenje protutumorskog odgovora. (2)



SLIKA 1. Imunološki odgovor domaćina na tumor i izbjegavanje imunskog odgovora od strane tumora. CD4+, pomagački limfocit T; CD8+, citotoksični limfocit T; DS, dendritička stanica; M2, makrofag M2 fenotipa; MDSC, supresivske stanice mijeloidnog podrijetla; nDS, nezrela DS; NK, prirodno ubilačka stanica; TA, tumorski antigen; T_{reg}, regulatorni T limfocit. Modificirano prema A1candidate (2014.) (10)

Imunoterapija malignih bolesti

Imunoterapija malignih bolesti je oblik liječenja u kojem se iskorištavaju svojstva imunološkog sustava za liječenje novotvorina. (11) U ovom radu bit će govora o inhibitorima kontrolnih točki, adoptivnoj staničnoj terapiji, terapijskim tumorskim cjepivima i onkolitičkoj viroterapiji.

Inhibitori kontrolnih točki

Inhibitori kontrolnih točki (IKT, eng. *immune checkpoint inhibitors, ICI*) su sada već dobro prepoznati oblici imunoterapije i odobreni su za liječenje širokog raspona malignih bolesti (Tablica 1). Mehanizam djelovanja im je takav da uklanjaju inhibitorni signal u aktivaciji T limfocita i omogućuju tumor-reaktivnim T limfocitima da se uspješno suprotstave imunosuprimirajućem djelovanju malignih stanica. (Slika 2) (12)

Dva su važna sustava negativne povratne sprege T limfocita koji doprinose finoj regulaciji njihove funkcije: molekula CTLA-4 (eng. *cytotoxic T lymphocyte antigen 4*) i sustav molekula programirane smrti (eng. *programmed death, PD*), koinhibitorne kontrolne točke koje

se pojavljuju nakon aktivacije T limfocita, a potrebno je savladati njihov inhibitorni signal kako bi T limfociti postali efektorske stanice u punom obliku. (7,13) Te su se molekule evolucijski razvile kako bi se spriječila autoimunost hiperreaktivnih T limfocita, mimo središnje eliminacije autoreaktivnih limfocita unutar timusa. (7,12)

CTLA-4 blokada

CTLA-4 je prvotno otkriven kao novi član imunoglobulinske superobitelji koji je uglavnom bio izražen na aktiviranim T limfocitima. (14) Konstitutivno je izražen na regulatornim T limfocitima te je ključan za njihovo imunosupresivno djelovanje, a na ostalim T limfocitima je izražen tek nakon aktivacije na mjestima poput sekundarnih limfnih organa (npr. u drenirajućim limfnim čvorovima). Sličan je kostimulatornoj molekuli CD28 s kojom se natječe u vezanju za B7 ligande, B7-1 (CD80) i B7-2 (CD86), na predočnim stanicama, no za razliku od CD28 izaziva inhibitorni signal za T limfocite i prekida njihovu trajnu aktivaciju. (2,7,12,15)

Uvid u ulogu CTLA-4 molekule pružaju pacijenti koji su haploinsuficijentni za gen *CTLA4* (bolest CHAI, od eng.

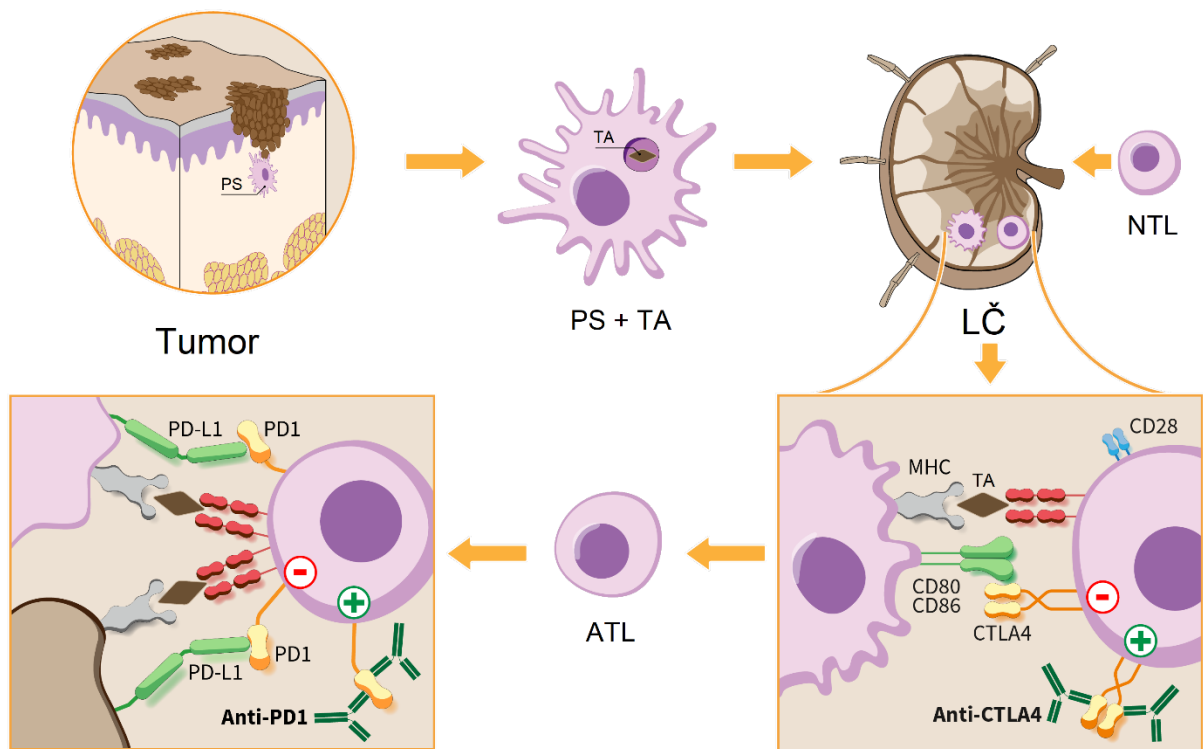
CTLA-4 haploinsufficiency) kod kojih se javlja ozbiljna imunološka disregulacija, hiperaktivacija efektorskih T limfocita i limfocitna infiltracija ciljnih organa. (16) Dakle, uklanjanjem ovog kontrolnog mehanizma dovodi do gubitka periferne tolerancije i teške bolesti posredovane T limfocitima. (2) Isto tako, varijante ovog proteina povezane su s mnogim autoimunim bolestima, ali i rizikom obolijevanja od karcinoma. (17)

Učinak CTLA-4 blokade zasniva se na dezinhibiciji kostimulatornog učinka molekule CD28. Zbog toga što tumorske stanice ne izražavaju B7 ligande, ova interakcija se odigrava pretežno u limfnim čvorovima u koje se tumor drenira (iako moguće i unutar tumora), gdje predočne stanice aktiviraju tumorspecifične T limfocite. Za to je prethodno potrebna smrt tumorskih stanica kako bi otpustile antigene koje će predočne stanice preraditi i predočiti. To mogu biti

neoantigeni ili antigeni pridruženi tumoru (eng. *tumor associated antigens, TAAs*). (12) Reaktivnost na neoantigene može se potaknuti primjenom zračenja, cijepljenja ili ciljanom terapijom. (13)

CTLA-4 blokada isto tako omogućuje limfocitima manjeg afiniteta za tumorske antigene da dođu do izražaja. (12) Međutim, to povećanje repertoara reaktivnih limfocita povezano je i s povećanom učestalošću imunološki vezanih neželjenih učinaka (eng. *immune related adverse effects, irAE*) koje se javljaju kod 15-90% pacijenata, a variraju od blagih do životno ugrožavajućih. (7,17)

Jedan od učinaka je i deplecija regulatornih T limfocita (T_{reg}) unutar tumora, no ne i perifernih, moguće preko stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima (eng. *antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC*) preko makrofaga pridruženih tumoru. (12,18,19)



Slika 2. Mehanizmi inhibicije kontrolnih točki. CTLA-4 blokada je zaslužna za dezinhibiciju aktivacije T limfocita, dok blokada PD-1 osi sprječava njihovo iscrpljenje. ATL, aktivirani T limfocit; LČ, limfni čvor; NTL, naivni T limfocit; PS, predočna stanica; TA, tumorski antigen. Modificirano prema: Guido Hegasy (2018.) (20)

Prvi lijek koji je iskoristio svojstva CTLA-4 blokade bilo je monoklonsko protutijelo ipilimumab, odobren od strane Američke Agencije za hranu i lijekove (U.S. Food and Drug Administration, FDA) 2011. godine za liječenje nere-sektabilnog metastatskog melanoma, na temelju prethodnih studija koje su pokazale značajno produljenje preživljenja i dugotrajan učinak takve terapije. Međutim, ispitivanja nisu pokazala tako dobre rezultate pri liječenju karcinoma bubrega, sitnostaničnog (SCLC) i nesit-

nostaničnog karcinoma pluća (NSCLC) te karcinoma prostate. (7)

Drugi lijek, tremelimumab još uvijek nema odobrenje za liječenje niti jedne maligne bolesti od strane FDA, što ipilimumab čini i dalje jedinim odobrenim CTLA-4 inhibitorom. (21)

PD i PD-L blokada

Programmed death-1 (PD-1) je transmembranski receptor koji je otkriven na T limfocitima koji su prolazili programi-

ranu staničnu smrt nakon aktivacije. (22,23) Izražen je nakon stimulacije T staničnim receptorom i veže se na B7 homologe PD-L1 i PD-L2 (eng. *programmed death ligand*) koji se nalaze na predočnim stanicama, ali mogu biti izraženi i na nehematopoetskim tkivima u prisustvu proupalnih citokina. (7) Vežanjem za ove ligande dovodi do inaktivacije T limfocita. (2) Osnovna zadaća mu je održavanje periferne tolerancije i održavanje aktivnosti T limfocita u željenim fiziološkim okvirima. (12) Dok je CTLA-4 zaslužan za indukciju tolerancije, PD-1 je ključan za njezino održavanje. (24)

Gubitak gena *Pdcd1* kod miševa, koji kodira PD-1, rezultira autoimunim patologijama nalik na lupus koje su blaže od onih zbog manjka CTLA-4, dok su kod ljudi jednonukleotidni polimorfizmi u *PDCD1* genu povezani s autoimunim bolestima. (2,12,13)

Vežanje PD-1 za svoje ligande (PD-L1 i PD-L2) na T limfocitima uzrokuje negativni kostimulatorni signal i dovodi do njihova iscrpljenja (eng. *exhaustion*). Iscrpljenje je inače važan mehanizam koji ograničava aktivnost T limfocita u prisutnosti kronične antigenske stimulacije. (12) Tumorske stanice iskorištavaju ovu činjenicu tako što pojačano izražavaju PD-1 ligande (PD-L1). (25)

U načelu, PD-1 blokada nastoji ponovno oživiti iscrpljene efektorne CD8+ limfocite kako bi nastavili izvršavati svoje efektorske uloge, pa time i uništavanje malignih stanica. (12)

Nakon pretkliničkih ispitivanja gdje je dokazana regresija tumora nakon PD-1/PD-L1 blokade, takav mehanizam tumorske obrane se pokušao suzbiti razvojem monoklonskih protutijela, a u konačnici je rezultiralo odobrenjem dva nova lijeka od strane FDA. To su bili pembrolizumab (humanizirano) i nivolumab (humano protutijelo) 2014. godine, kao prvi PD-1 ciljani lijekovi za liječenje refraktornog i neresektabilnog melanoma. (7)

2016. godine je kao prvo anti-PD-L1 humanizirano monoklonsko protutijelo odobren atezolizumab za liječenje urotelnog karcinoma. Indikacije su od tada proširene na liječenje SCLC i NSCLC, te trostruko negativni karcinom dojke. (7) 2017. godine odobrena su još dva anti-PD-L1 humana monoklonska protutijela, avelumab (za liječenje metastatskog urotelnog karcinoma koji je progredirao nakon prvotne kemoterapije i metastatski karcinom Merkelovih stanica), te durvalumab (kao druga linija terapije za progresivni metastatski urotelni karcinom i za treći stadij NSCLC-a). (26)

Tablica 1: Odobreni inhibitori kontrolnih točki od strane FDA i njihove indikacije

Skupina lijekova	Lijek	Indikacije ^a
CTLA-4 inhibitor	ipilimumab	melanom, k. bubrega, kolorektalni k., pleuralni mezoteliom, NSCLC
PD-1 inhibitori	nivolumab	melanom, NSCLC, SCLC, k. bubrega, Hodgkinov limfom, HNSCC, urotelni k., kolorektalni k., hepatocelularni k., pleuralni mezoteliom, planocelularni k. jednjaka,
	pembrolizumab	melanom, NSCLC, HNSCC, Hodgkinov limfom, urotelni k., adenok. želuca ili gastroezofagealnog prijelaza, k. jednjaka, k. vrata maternice, primarni limfom velikih B limfocita medijastinuma, hepatocelularni k., k. Merkelovih stanica, k. bubrega, trostrukonegativni k. dojke, kolorektalni k., k. pločastih stanica kože, k. mokraćnog mjehura
	cemiplimab	k. pločastih stanica kože, NSCLC, bazaliom
PD-L1 inhibitori	avelumab	k. Merkelovih stanica, urotelni k., karcinom bubrega
	durvalumab	urotelni k., NSCLC, k. jednjaka
	atezolizumab	urotelni k., NSCLC, SCLC, trostruko negativni k. dojke, hepatocelularni k.

Podaci prikupljeni sa FDA.gov (27) i rada Vaddepally i sur. (28)

^aopis indikacija je sažet na sijelo i/ili histološki tip novotvorina

k., karcinom; SCLC, eng. *small cell lung cancer* (sitnostanični karcinom pluća); NSCLC, eng. *non-small cell lung cancer* (nesitnostanični karcinom pluća); HNSCC, eng. *head and neck squamous cell carcinoma* (karcinom pločastih stanica glave i vrata)

Nuspojave inhibitora kontrolnih točki

Nekoliko studija sugerira da je sigurnosni profil inhibitora kontrolnih točaka

bolji od kemoterapije, a većina prisutnih toksičnih učinaka je reverzibilno. Imunološki posredovane nuspojave uzro-

kovane su pojačanim odgovorom prema zdravom tkivu. Blokada kontrolnih točaka može dovesti do upale bilo kojeg organa, no najčešće su pogođeni gastrointestinalni trakt (mukozitis, enteritis, kolitis), endokrine žlijezde (tiroiditis, pankreatitis, adrenalna insuficijencija), koža (osip, vitiligo) i jetra (hepatitis). Među rjeđe pogođenima su središnji živčani sustav (encefalitis, aseptični meningitis, hipofizitis), kardiovaskularni (miokarditis, vaskulitis) i mišićno-koštani sustav (aralgija), pluća (pneumonitis) i hematopoetski sustav (anemija, trombocitopenija). (29) Imunološke kontrolne točke su dio kompleksnog sustava čija je zadaća spriječiti autoimune reakcije, i široka paleta nuspojava ovih lijekova je u biti odraz njihova mehanizma djelovanja – inhibicije toga sustava. (19)

Kako bi se izbjegla prevelika autoimunost, razvijaju se mnoge strategije kojima bi se povećala imunogenost tumora, odnosno ekspresija neoantigena, poput primjerice primjena kemoterapije i radioterapije kojima se izazivaju mutacije. (13)

Nuspojave IKT-a se uspješno suzbijaju prekidanjem terapije ili, shodno uzroku, primjenom imunosupresivne terapije. Privremena imunosupresija se postiže primjenom oralnih glukokortikoida, a u

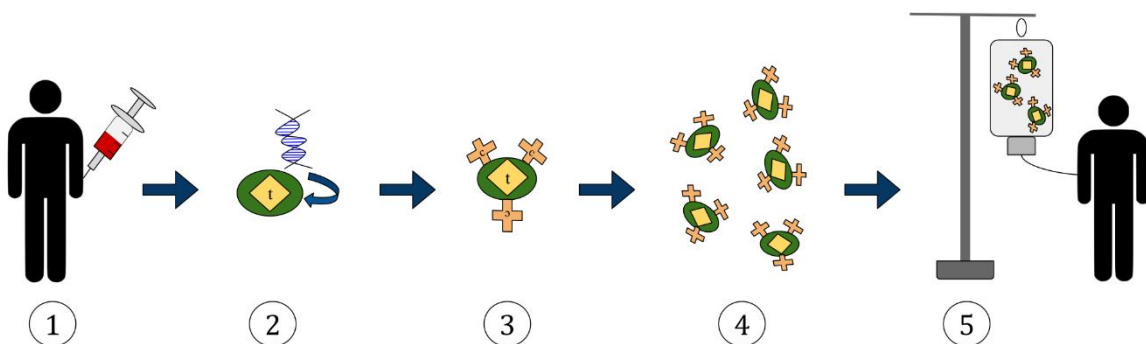
težim slučajevima imunosupresivima poput infliksimaba. Imunološki vezane nuspojave IKT-a se javljaju prvih nekoliko tjedana ili mjeseci nakon početka terapije, a za sada nije poznato imaju li dugoročni rizik toksičnosti. (7,29) Istraživanja su usmjerena na pronalazak biomarkera za predviđanje toksičnosti ovih lijekova. (7)

Kako bi se povećala uspješnost inhibitora kontrolnih točki, kombiniraju se s konvencionalnom terapijom za liječenje malignih bolesti. Primjerice, kemoterapija je sposobna povećati mutacijsko opterećenje, ekspresiju neoantigena i antigenost tumora, te inducirati imunogenu staničnu smrt. Raspad malignih stanica oslobađa DAMP-ove i TAA koji pobuđuju imunološki odgovor. Ciljana terapija može imati određena imunomodulatorna djelovanja, a imunoterapija pak pruža dugotrajan učinak koji se inače ne ostvaruje ciljanom terapijom zbog razvoja rezistencije. (30) Radioterapija također može izazvati imunogenu staničnu smrt izravnim citotoksičnim učinkom kojim se oslobađaju TAA i DAMP-ovi, potičući aktivaciju T limfocita. Tim mehanizmom moguće je potaknuti protutumorski odgovor i na neozračenim mjestima što se naziva apskopalnim učinkom. (31)

Adoptivna stanična terapija

Adoptivna stanična terapija (eng. *adoptive cell therapy, ACT*) je oblik stanične imunoterapije u kojoj se T limfociti modificiraju kako bi se unaprijedila njihova funkcija u borbi s raznim bolestima, pa tako i malignim. (32) Može se podijeliti na dva pristupa: prvi iskorištava limfocite koji prirodno infiltriraju tumore (eng. *tumor-infiltrating lymphocytes, TILs*), a

drugi genetički modificirane T limfocite derivirane iz krvi. T limfociti mogu biti modificirani tako da im se izmijeni postojeći T stanični receptor (eng. *T cell receptor, TCR*) ili pak da se sintetizira kimerični antigenski receptor (eng. *chimeric antigen receptor, CAR*). U oba slučaja se T limfociti prerade van tijela, umnože i u konačnici reinfundiraju u krvotok (Slika 3.). (33)



SLIKA 3. Postupak CAR-T stanične terapije. T limfociti se izoliraju iz pacijentove periferne krvi (1), podvrgnu se genetičkoj modifikaciji (2) kako bi izrazili kimerične antigenske receptore (3), nakon čega se umnože (4) i reinfundiraju natrag u pacijentov krvotok (5). Prema: Reyasingh56 (2018.). (34)

Prirодно prisutni tumor-specifični T limfociti

Limfociti koji infiltriraju tumor (eng. tumor-infiltrating lymphocytes, TILs)

Tumore infiltriraju heterogene skupine limfocita no većinom su to T limfociti i prirodno ubilačke stanice (eng. *natural killer cells, NK cells*). TIL-ovi koji reagiraju na antigene pridružene tumorima se mogu izolirati iz resekiranih tumora,

no njihov broj nije dovoljan za ACT. Stoga ih je potrebno umnožiti izlaganjem interleukinu 2 (IL-2) *in vitro*.

Postupak se sastoji od fragmentiranja resekiranog tumora i uzgajanja s IL-2 svakog fragmenta zasebno ili se uzorak enzimatski dispergira u jedinstvenu suspenziju s dodatkom IL-2, nakon čega se limfociti umnožavaju i u konačnici eradikiraju tumorske stanice čime se

dobiva čista kultura TIL stanica. Te kulture se mogu dodatno selektirati prema reaktivnosti na autologne tumorske stanice i citotoksičnosti. I konačno, prije infundiranja *ex vivo* umnoženih limfocita natrag u pacijentovu krv, pacijent se podvrgava protokolu prekondicioniranja tako što se učini nemijeloablativna limfodeplecija pomoću ciklofosfamida i fludarabina.

Uspješnost ovakve terapije dokazana je u mnogim studijama koje prijavljuju objektivne stope odgovora od 40 do 50% i potpune regresije tumora od 10 do 25% u liječenih od metastatskog melanoma. Iako su TIL-ovi uzgajani i za druge tipove tumora, poput karcinoma jajnika, dojke, kolona, vrata maternice, bubrega i sarkoma, klinički odgovor je bio umjeren.

Iako je rjeđe viđena smrtnost vezana uz ovakav oblik terapije u usporedbi s uobičajenom za povratne i refraktorne tumore, značajni štetni učinci su ipak uočeni. Prvenstveno su povezana s protokolom prekondicioniranja i primjene visokih doza IL-2 nakon reinfuzije stanica, a njihovo liječenje nije zahtijevalo intenzivnu skrb. (33)

Genetički modificirani T limfociti

Limfociti s genetički modificiranim T staničnim receptorom

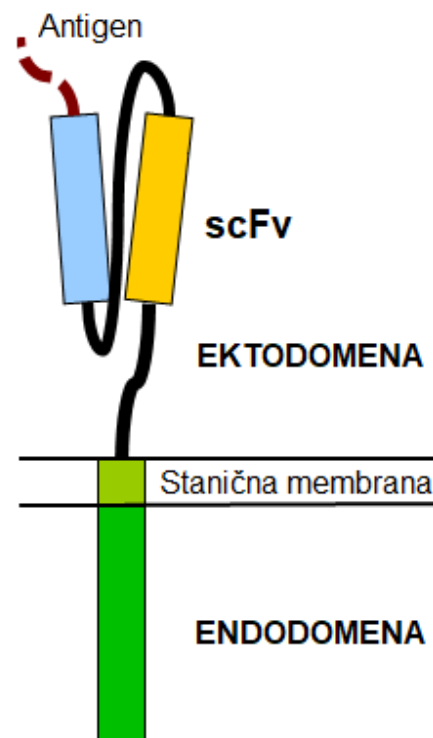
Ovi limfociti posjeduju T stanični receptor (TSR) koji je dobiven genetskim inženjeringom. Dobiva se izolacijom tumorspecifičnog TSR-a, njegovim sekvenciranjem, kloniranjem i ugradnjom u viralni vektor (retro- ili lentiviralni). Vektorom se *in vitro* transduciraju pacijentovi T limfociti iz periferne krvi, nakon toga umnože i reinfundiraju natrag u pacijenta. (33)

S obzirom da se i dalje radi o TSR-u, prepoznavanje antigena je ovisno o predočavanju u sklopu MHC (HLA, eng. *human leukocyte antigen*) molekula. (35) To donosi dva uvjeta za uspješnu primjenu takvih stanica. Prvo, pacijent mora biti HLA podudaran sa primijenjenim stanicama, (33) i drugo, na taj način je moguće ciljati jedino tumorske stanice koje izražavaju MHC molekule, čiju ekspresiju nerijetko smanjuju kao mehanizam imunološkog bijega. (36)

CAR-T stanična terapija

CAR-T stanična terapija iskorištava antigensku specifičnost protutijela i karakteristike T limfocita. Radi se o T limfocitima koji na sebi nose sintetički receptor sastavljen od varijabilne domene protutijela (ektodomena) i dijela TSR-a koji je zadužen za transdukciju signala (endodomena). (Slika 4.) Zbog toga što se ne radi o klasičnom TSR-u, prepoznavanje antigena na ciljnim stanicama nije ovisno o MHC molekuli, stoga svaka površinska molekula na stanici predstavlja potencijalni ciljni epitop. (33)

CAR-ovi dolaze u više generacija. Svaka u svom sastavu ima regiju koja veže antigen (eng. *single-chain antibody variable fragment*, *scFv*). Prva generacija u svom sastavu ima još samo CD3 ζ-lanac koji simulira TSR signaliziranje. (7,33) Iako su takve stanice polučile citotoksični učinak, nakon ponovne stimulacije antigenom dolazilo je do anergije, nedovoljne ekspanzije i nezadovoljavajućeg kliničkog učinka. (3)



SLIKA 4. Kimerični antigenski receptor. Modificirano prema Mxpule (2011.). (37)

Slijedom toga, sljedećim generacijama CAR-ova su dodane određene domene kostimulirajućih molekula poput CD28 i/ili 4-1BB kako bi pojačali aktivaciju CAR-T limfocita. Najnovija generacija, tzv. oklopljeni CAR-T limfociti (eng. *armored*), opremljena je kimernim citokinim receptorom $4\alpha\beta$ koji vezanjem IL-4, prisutnom u izobilju u tumorskom mikrookolišu, potiče proliferaciju limfocita. (7)

Kao prikladan ciljni antigen za CAR-T staničnu terapiju izdvaja se CD19 molekula. (3) Razlozi za taj odabir leže u njegovoj ekspresiji. CD19 je izražen na

površini gotovo svih B limfocita, pa tako i malignih, a manje je izražen u ostalim tkivima, poput matičnih stanica koštane srži, što je vrlo značajno za sigurnost takve terapije. (3,33,38,39) K tome se hematološke novotvorine najčešće sastoje od jednog klona stanica i ne stvaraju toliko solidne nakupine (što omogućuje slobodan prodor T limfocita) te svi ovi razlozi objašnjavaju dobre rezultate CAR-T stanične terapije u ovoj skupini novotvorina. (7)

FDA je za liječenje do sada odobrila tisagenlecleucel za akutnu limfoblastičnu leukemiju i axicabtagene ciloleucel za B-velikostanični limfom 2017., brexucabtagene autoleucel za limfom plaštene zone 2020., te lisocabtagene maraleucel za relapsni ili refraktorni B-velikostanični limfom 2021. godine. (40,41) CD19 molekula ostaje najpopularnija meta. (41)

Učinkovitost CAR-T stanične terapije ovisi o infiltraciji upotrijebljenih stanica u sijela tumora i njihovom preživljavanju i proliferaciji *in situ*. (42) Za razliku od hematoloških novotvorina, liječenje solidnih tumora za sada nije tako uspješno, iz više razloga. Prvo, solidni tumori se sastoje od heterogene skupine malignih stanica, a drugo, tumorske stanice su teže dostupne terapijskim stanicama, što zbog građe ekstracelularnog

matriksa, što zbog imunosupresivnog mikrookoliša unutar tumora. (33)

CAR-T stanična terapija je povezana s određenim nuspojavama. Reprezentativni su sindrom otpuštanja citokina (eng. *cytokine release syndrome, CRS*) i sindrom neurotoksičnosti povezan s imunološkim efektorskim stanicama (eng. *immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome, ICANS*) (3,43) CRS se javlja nakon prvih nekoliko dana od primjene terapije i manifestira se vrućicom, hipotenzijom i tahikardijom. Liječi se tocilizumabom i kortikosteroidima. Sindrom može progredirati do hemodinamske nestabilnosti i ozljede krajnjih organa. ICANS se uobičajeno javlja nekoliko dana nakon CRS-a, ali mogu se javiti i istovremeno, a postoje i određena preklapanja između ta dva entiteta. Simptomi variraju od jedva zamjetnog pada kognicije, do afazije, epileptičkih napadaja i kome. Stanje se liječi kortikosteroidima i antiepilepticima. (3) Razvijaju se metode suzbijanja nuspojava koje ne bi smanjile učinkovitost terapije, primjerice CAR-T stanice sa samoubilačkim genima, ciljano antagoniziranje citokina i primjena dasatiniba. (44–46)

Terapijska tumorska cjepiva

Za razliku od profilaktičkih cjepiva kojima se sprječava nastanak novotvorina, poput cjepiva protiv humanog papiloma virusa (HPV) i hepatitis B virusa (HBV), terapijska cjepiva nastoje usmjeriti imunološki sustav na već razvijene tumorske procese. (7)

Dva osnovna pitanja se postavljaju pri dizajniranju tumorskih cjepiva. Prvo, koji antigen odabrati, i drugo, kako ga dopremiti do ciljnih stanica. (47)

Odabir antigena

Idealni antigen bio bi onaj koji je izražen isključivo na tumorskim stanicama, prisutan je na svim tumorskim stanicama, ključan je za opstanak tih stanica i jako je imunogen. Takav antigen je, dakako, teško pronaći.

Ciljni antigeni za razvoj cjepiva se mogu podijeliti na antigene vezane uz tumore (eng. *tumor-associated antigens, TAA*) i antigene specifične za tumore (eng. *tumor-specific antigens, TSA*).

TAA se mogu nalaziti i na normalnim stanicama, ali na tumorskim stanicama su abnormalno izraženi. Oni uključuju proteine koji su pojačano izraženi na tumorskim stanicama (npr. hTERT, HER2, mezotelin i MUC-1), antigeni koji normalno nisu izraženi u tkivu odraslih,

tzv. diferencijacijski antigeni (npr. tirozinaza, gp100, MART-1, PSA, PAP), i tzv. antigeni karcinom/testisa (eng. *cancer/testis, CT*) koji su izraženi samo na imunoprivilegiranim stanicama (npr. MAGE-A1, MAGE-A3, NY-ESO-1).

Postoje određene prepreke u razvoju cjepiva na TAA. Prvo, s obzirom da su TAA svojstveni zdravim tkivima, mnogi autoreaktivni limfociti su eliminirani procesom stjecanja tolerancije i reaktivnost je potrebno podupirati snažnim adjuvansima, kostimulatorima i ponovljenim cijepljenjima. Drugo, ekspresija na zdravim tkivima može dovesti do njihova kolateralnog oštećenja (tzv. eng. *on-target off-tumor toxicity*).

S druge strane, TSA se nalaze samo na tumorskim stanicama i mogu se podijeliti na onkoviralne antigene i neoantigene, koji nastaju mutacijama u tumorskim stanicama. Za razliku od TAA, TSA djeluju strano i zbog toga su puno više imunogeni.

Profilaktička cjepiva, primjerice protiv HPV-a, nisu uspješni za suzbijanje već nastalih karcinoma jer razvijaju isključivo humoralni odgovor, koji nije u stanju eradikirati tumor kao što to čini stanični odgovor. Naprotiv, cjepiva koja su usmjerena na E6 i E7 proteine (onkoproteini predočeni na inficiranim stanica-

ma) pokazala su obećavajuće rezultate u ranim kliničkim ispitivanjima.

Neoantigeni mogu biti jedinstveni za pacijenta (većina neoantigena) ili prisutni u jednakom obliku u populaciji pacijenata. Ciljanje jedinstvenih neoantigena zahtijeva personaliziranu terapiju. Ona se provodi sekvenciranjem tumorskog genoma, identifikacijom mutacija, predikcijom neoantigena kompjutoriziranim algoritmima i njihovom produkcijom i aplikacijom u obliku cjepiva. (47)

Dopremanje antigena

Postoje 4 glavna oblika formulacije terapijskih tumorskih cjepiva: stanična, virusna, peptidna i DNA/RNA cjepiva. (47)

Stanična cjepiva

Stanična cjepiva mogu biti pripravljena od mrtvih tumorskih stanica ili autolognih antigen-prezentirajućih stanica (tj. dendritičkih stanica). Prednost cjepiva s tumorskim stanicama je da se ciljni antigeni ne moraju unaprijed definirati. Iako su takva cjepiva razvila imunološki odgovor kod pacijenata, efikasnost takve terapije je bila ograničena. (47)

DC cjepiva su pripravljena od autolognih dendritičkih stanica (eng. *dendritic cell*, DC) natovarenih tumorskim antigenima ili su transficirane genima tih antigena. Prvo tumorsko cjepivo odob-

reno od strane FDA, sipuleucel-T, koristi se za liječenje metastatskog karcinoma prostate rezistentnog na kastraciju. Priprema se od autolognih dendritičkih stanica dobivenih leukaferozom i njihovom *ex vivo* aktivacijom pomoću kimeranog proteina kojeg čine GM-CSF (eng. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) stopljen s antigenom PAP (eng. *prostatic acid phosphatase*). Unatoč značajnom povećanju medijana sveukupnog preživljenja i dobre podnošljivosti (najčešće nuspojave su prolazni simptomi nalik influenci i vrućica), složenost i troškovi izrade ograničavaju širu upotrebu. (47)

Bakterijska cjepiva mogu poslužiti za stimulaciju imunološkog sustava (BCG, *Bacillus Calmette-Guérin*, u liječenju karcinoma mokraćnog mjehura) ili za dopremu tumorskih antigena (*Lysteria monocytogenes*), no za potonje treba tek utvrditi reproducibilnost i učinkovitost. (47)

Virusna cjepiva

Najčešće korišteni vektori su poksvirusi, adenovirusi i alfavirusi. Prednost ovih cjepiva je u učinkovitosti odgovora imunološkog sustava na virusne čestice. Taj odgovor ima i svoje nedostatke – neutralizaciju vektora – što ograničava ponovnu primjenu cjepiva. Tome se doskače tzv. *booster* dozama koje sa-

drže drugačiji vektor s istim antigenom. (47)

Peptidna cjepiva

Prednost peptidnih cjepiva je relativno niska cijena i jednostavnost proizvodnje. Rađeno je puno kliničkih ispitivanja s peptidnim cjepivima, no njihova klinička korist je za sada upitna. Koriste se kraći i duži peptidi. Kraći (dužine <15 aminokiselina) često ne dovode do dovoljno jakog imunog odgovora, a i slabo su rješenje za antigensku heterogenost tumora. Ovi nedostaci se pokušavaju riješiti dodavanjem snažnih adjuvansa ili imununoloških modulatora, te konstruiranjem nosača. Dugi peptidi (eng. *multivalent synthetic long peptides*, *SLPs*) su pak mnogo više imunogeni. (47)

DNA/RNA cjepiva

Osim relativno niske cijene i jednostavnosti proizvodnje, cjepiva napravljena od nukleinskih kiselina preferiraju se zbog dobre imunogenosti, a za razliku od vektorskih cjepiva, mogu se primjenjivati uzastopno. Bez vektora potrebna su rješenja za poboljšanje transfekcije, poput nanočestica, genske puške, *in situ* elektroporacije i sl. Među DNA cjepivima, ističe se VGX-3100, koje se pokazalo značajno učinkovitim u postizanju regresije cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN) gradusa 2/3 poveza-

nom s HPV infekcijom (faza 2b). (47,48) Cjepivo se trenutno ispituje u fazi 3 kliničkih ispitivanja za liječenje cervikalnog HSIL-a (eng. *high-grade squamous intraepithelial lesion*). (49)

RNA cjepiva nude određene prednosti u odnosu na DNA cjepiva. Ona nemaju onkogeni potencijal i lakša su za dopremiti. No, RNA je i puno nestabilnija molekula i zahtijeva određene modifikacije. Uglavnom je korištena mRNA, a replikon RNA se također istražuje. (47)

Onkolitička viroterapija

Ovim oblikom terapije iskorištavaju se dva svojstva onkolitičkih virusa (OV): selektivno uništavanje tumorskih stanica i poticanje sustavnog protutumorskog imunološkog odgovora domaćina, na temelju sposobnosti OV-a da upale tumorski mikrokoliš i pretvore imunološki *hladne* (tumori niskog mutacijskog opterećenja s manjkom CD8⁺ T limfocita) u *tople* tumore. Mogu se koristiti nativni ili genetički modificirani virusi, a do sada se najviše radilo s adenovirusima, herpes simplex virusom i vakcinijom. (9,50) Primjenjuju se sustavno (intravenoski) ili lokalno (intratumoralno). (50) Od neželjenih učinaka pacijenti najčešće imaju simptome nalik influenci u prva

24 sata od primjene. (9) Iako virusi inficiraju i normalne stanice, tumorske stanice stječu mnoge promjene koje rezultiraju preferabilnom replikacijom virusa unutar tumorskih stanica. Primjerice, protuvirusni mehanizmi mogu biti defektni u tumorskim stanicama, a brzo dijeleće stanice s visokim stupnjem metaboličke aktivnosti bi mogle podupirati virusnu replikaciju. (9,51) Nadalje, onkolitički virusi se mogu tako dizajnirati da ciljaju specifične receptore koji su izraženi samo na tumorskim stanicama ili iskorištavaju abnormalne signalne puteve koji pospješuju replikaciju virusa. (52)

U trenutku smrti inficirane tumorske stanice, dolazi do rasapa tumorskih antigena (TAA i neoantigena), ali i tzv. PAMP-ova (eng. *pathogen-associated molecular patterns*) i DAMP-ova, te citokina koji zajedno potiču imunološki odgovor domaćina. No, taj odgovor rezultira i eliminacijom samog virusa, što smanjuje učinkovitost terapije. (52) Stoga je potrebno uspostaviti ravnotežu između protuvirusnog i protutumorskog djelovanja imunološkog sustava. (50)

Do sada je terapija solidnih tumora bila manje uspješna od terapije hematoloških novotvorina. (50) Razlozi za to su prisutnost fizičkih barijera (gusti izvanstanični matriks, visok intersticijski tlak,

smanjena vaskularizacija) koje sprječavaju dopremu virusa do ciljnih stanica, tumorska heterogenost i imunosupresivni tumorski mikrokoliš. (50,52)

Kako bi se poboljšala učinkovitost onkolitičke viroterapije, vrše se razne modifikacije primjenjivanih virusa. Postoje dva glavna smjera u kojima se istraživanja kreću: poboljšano ciljanje tumorskih stanica i opremanje virusa čimbenicima koji potiču sustavni imunološki odgovor. Selektivnost virusa za tumorske stanice nastoji se poboljšati modifikacijom kapside, genomskim inženjeringom i kemijskim modifikacijama viriona. Obzirom da su virusne čestice brzo sekvstrirane i eliminirane od strane imunološkog sustava, nastoje se dizajnirati nosači za prijenos virusnih čestica do ciljnih stanica. Ti nosači mogu biti stanice ili nanočestice. Infiltracija virusa u tumorsko tkivo može se poboljšati virusima koji izražavaju fuzijske proteine koji potiču spajanje tumorskih stanica što doprinosi širenju virusa. Imunosupresivni tumorski mikrokoliš može se oboriti dizajniranjem virusa koji nose gene za citokine, kemokine i kostimulativne molekule. Efekt onkolize se može pojačati insercijom samoubilačkih, tumorsupresorskih i proapoptičkih gena (50)

Talimogene laherparepvec (T-VEC) je 2015. godine postao prva onkolitička viroterapija odobrena od strane FDA. (53) Radi se o živom atenuiranom herpes simplex virusu tipa 1 (HSV-1) koji kodira gen za humani GM-CSF. (54) Odobren je za lokalnu terapiju kutanih, subkutanih i nodalnih lezija kod pacijenata s rekurentnim melanomom nakon inicijalnog kirurškog zahvata. (55) Njegova intratumoralna primjena demonstrirala je lokalni i sustavni imunološki odgovor, pri čemu se selektivno umnožava u malignim stanicama s onkolitičkim učinkom. (56)

U proizvodnji onkolitičkih virusa predstoje određeni izazovi. S farmakodinamskog gledišta, obzirom da se virusi nakon primjene umnožavaju, efektivne doze su uvelike varijabilne. Nadalje, eliminacija virusa nije toliko podložna metaboličkim procesima koliko imunološkom odgovoru domaćina. S gledišta biosigurnosti, onkolitički virusi predstavljaju izvor infekcije za osobe koje su uključene u proizvodnju i distribuciju lijeka, skrb o bolesnicima i osobe u bližem okruženju pacijenta. Također, postoji teoretska mogućnost rekombinacije terapijskih virusa s virusima divljeg tipa. (52)

Rasprava

Učinak imunoterapije u liječenju refrakturnih tumora pokazao se daleko većim od najučinkovitijih kemoterapeutika, a i nuspojave, iako česte, bolje su tolerirane. (7) Unatoč tome, pred imunoterapijom malignih bolesti stoje još mnogi izazovi.

Jedno od ključnih pitanja je zašto neki pacijenti odlično odgovore na terapiju, a drugi pak ne pokazuju nikakav odgovor. (4) Primjerice, iako je za mnoge maligne bolesti odobrena terapija IKT-ima kao dio standardne terapije, kod većine bolesnika se bolest ne uspijeva učinkovito kontrolirati. Stoga se posljednjih godina traga za kombiniranom terapijom. (9)

Zanimanje za ovu vrstu terapije je veliko, najviše zbog toga što pruža dugoročne rezultate. (57) Budućnost možda ovisi o kombinaciji već postojećih oblika imunoterapije, prvenstvo inhibitora kontrolnih točaka s personaliziranim cjepivima i ciljanje tumorskog mikrookoliša, njegove glikozilacije i domaćinove mikrobiote. (6) Do sada je pokazano da su tzv. *hladni* tumori povezani sa smanjenim odgovorom na terapiju IKT-ima te je trenutno veliki interes za pronalazak metoda za njihovo pretvaranje u *tope*

tumore, a možda najbolji kandidati za to su tumorska cjepiva i onkolitički virusi. (6,9) Uporabom nanotehnologije nastoji se povećati učinkovitost imunoterapija poput tumorskih cjepiva i adoptivne stanične terapije, uz smanjenje toksičnosti, te osnažiti endogene imunosne odgovore. (58)

Istražuju se i novi ciljevi u inhibiciji kontrolnih točki poput LAG3 (eng. *lymphocyte activation gene 3*), TIM3 (eng. *T cell immunoglobulin 3*), VISTA (eng. *V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation*) i TIGIT (eng. *T cell immunoreceptor with immunoglobulin and immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif domains*), za sada samo kao adjuvantna terapija postojećim IKT-ima. (7)

Neki od dodatnih izazova koji se ističu su otkrivanje glavnih pokretača protutumorskog imuniteta, razumijevanje molekularnih i staničnih mehanizama izbjegavanja imunološkog odgovora, razvoj personaliziranog pristupa kroz analizu prediktivnih biomarkera i pronalazak novih kombiniranih protokola. (42)

Zaključak

Imunoterapija je unijela revoluciju u liječenje malignih bolesti i sada postoji mnogo indikacija za njenu primjenu. Unatoč obećavajućim rezultatima, kod mnogih pacijenata i dalje ne daje zadovoljavajuće rezultate. Usprkos mnogim preprekama, imunoterapija predstavlja modalitet liječenja koji unosi velike nade u borbu s malignim bolestima.

Zahvale

Zahvaljujem se Medicinskom fakultetu i njegovim djelatnicima na pruženom obrazovanju, a posebno mentoru prof. Marku Jakopoviću na pomoći pri izradi diplomskog rada. Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima na podršci tijekom studija.

Literatura

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, i sur. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021.;0(0):1–41.
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Stanična i molekularna imunologija. 8. izd. Batinić D, Lukinović-Škudar V, ur. Zagreb: Medicinska naklada; 2018.
3. Singh AK, McGuirk JP. CAR T cells: continuation in a revolution of immunotherapy. *Lancet Oncol.* 2020.;21(3):e168–78.
4. Dobosz P, Dzieciatkowski T. The Intriguing History of Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2019.;10(December).
5. Oiseth SJ, Aziz MS. Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. *J Cancer Metastasis Treat.* 2017.;3(10):250.
6. Esfahani K, Roudaia L, Buhlaiga N, Del Rincon SV, Papneja N, Miller WH. A Review of Cancer Immunotherapy: From the Past, to the Present, to the Future. *Curr Oncol.* 2020.;27(12):87–97.
7. Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol.* 2020.;20(11):651–68.
8. Fritz JM, Lenardo MJ. Development of immune checkpoint therapy for cancer. *J Exp Med.* 2019.;216(6):1244–54.
9. Russell L, Peng KW, Russell SJ, Diaz RM. Oncolytic Viruses: Priming Time for Cancer Immunotherapy. *BioDrugs.* 2019.;33(5):485–501.
10. Tumor microenvironment.jpg [Internet]. 2013 [pristupljeno 14. travanj 2021.]. Dostupno na: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tumor_microenvironment.jpg
11. Cohen E. What is Immunotherapy? [Internet]. [pristupljeno 31. svibanj 2021.]. Dostupno na: <https://www.cancerresearch.org/en-us/immunotherapy/what-is-immunotherapy>
12. Wei SC, Duffy CR, Allison JP. Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy. *Cancer Discov.* 2018.;8(9):1069–86.
13. Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev*

- Immunol. 2018.;18(3):153–67.
14. Brunet J-F, Denizot F, Luciani M-F, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei M-G, i sur. A new member of the immunoglobulin superfamily—CTLA-4. *Nature*. 1987.;328(6127):267–70.
 15. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, i sur. Immunologic Self-Tolerance Maintained by Cd25+Cd4+Regulatory T Cells Constitutively Expressing Cytotoxic T Lymphocyte–Associated Antigen 4. *J Exp Med*. 2000.;192(2):303–10.
 16. Kuehn HS, Ouyang W, Lo B, Deenick EK, Niemela JE, Avery DT, i sur. Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. *Science (80-)*. 2014.;345(6204):1623–7.
 17. Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: A moving target in immunotherapy. *Blood*. 2018.;131(1):58–67.
 18. Sharma N, Vacher J, Allison JP. TLR1/2 ligand enhances antitumor efficacy of CTLA-4 blockade by increasing intratumoral Treg depletion. *Proc Natl Acad Sci*. 2019.;116(21):10453–62.
 19. Boutros C, Tarhini A, Routier E, Lambotte O, Ladurie FL, Carbonnel F, i sur. Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016.;13(8):473–86.
 20. Hegasy G. CTLA-4 PD-1 Immunotherapy [Internet]. 2018 [pristupljeno 05. travanj 2021.]. Dostupno na: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:11_Hegasy_CTLA4_PD1_Immunotherapy.png
 21. Selby K. Tremelimumab [Internet]. [pristupljeno 18. ožujak 2021.]. Dostupno na: <https://www.asbestos.com/treatment/immunotherapy/tremelimumab/>
 22. Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2002.;20:29–53.
 23. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992.;11(11):3887–95.
 24. Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the

- CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev.* 2008.;224(1):166–82.
25. Pauken KE, Wherry EJ. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends Immunol.* 2015.;36(4):265–76.
 26. Hargadon KM, Johnson CE, Williams CJ. Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors. *Int Immunopharmacol.* 2018.;62(June):29–39.
 27. Hematology/Oncology (Cancer) Approvals & Safety Notifications [Internet]. FDA. [pristupljeno 05. travanj 2021.]. Dostupno na: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/hematologyoncology-cancer-approvals-safety-notifications>
 28. Vaddepally RK, Kharel P, Pandey R, Garje R, Chandra AB. Review of indications of FDA-approved immune checkpoint inhibitors per NCCN guidelines with the level of evidence. *Cancers (Basel).* 2020.;12(3):1–19.
 29. Postow MA, Sidlow R, Hellmann MD. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. Longo DL, urednik. *N Engl J Med.* 2018.;378(2):158–68.
 30. Yan Y, Kumar AB, Finnes H, Markovic SN, Park S, Dronca RS, i sur. Combining Immune Checkpoint Inhibitors With Conventional Cancer Therapy. *Front Immunol.* 2018.;9(July):1739.
 31. Yu W Di, Sun G, Li J, Xu J, Wang X. Mechanisms and therapeutic potentials of cancer immunotherapy in combination with radiotherapy and/or chemotherapy. Sv. 452, *Cancer Letters.* Elsevier Ireland Ltd; 2019. str. 66–70.
 32. Definition of adoptive cell therapy [Internet]. NCI Dictionaries - Dictionary of Cancer Terms. [pristupljeno 08. travanj 2021.]. Dostupno na: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/adoptive-cell-therapy>
 33. Met Ö, Jensen KM, Chamberlain CA, Donia M, Svane IM. Principles of adoptive T cell therapy in cancer. *Semin Immunopathol.* 2019.;41(1):49–58.
 34. Reyasingh56. CAR T-cell Therapy [Internet]. 2018 [pristupljeno 21. travanj 2021.]. Dostupno na: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:CAR_T-cell_Therapy.svg
 35. Perica K, Varela JC, Oelke M, Schneck J. Adoptive T Cell Immunotherapy For Cancer. *Rambam Maimonides Med J.* 2015.;6(1):e0004.

36. Garrido F, Aptsiauri N, Doorduyn EM, Garcia Lora AM, van Hall T. The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2016.;39:44–51.
37. Mxpule. Chimeric antigen receptor [Internet]. [pristupljeno 08. travanj 2021.]. Dostupno na: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/47/CAR_cartoon.png
38. Pegram HJ, Lee JC, Hayman EG, Imperato GH, Tedder TF, Sadelain M, i sur. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood*. 2012.;119(18):4133–41.
39. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. 2008.;112(5):1570–80.
40. FDA. FDA approves lisocabtagene maraleucel for relapsed or refractory large B-cell lymphoma [Internet]. 2021 [pristupljeno 08. travanj 2021.]. Dostupno na: <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-lisocabtagene-maraleucel-relapsed-or-refractory-large-b-cell-lymphoma>
41. Mullard A. FDA approves fourth CAR-T cell therapy. Sv. 20, *Nature reviews. Drug discovery*. 2021. str. 166.
42. Hegde PS, Chen DS. Top 10 Challenges in Cancer Immunotherapy. *Immunity*. 2020.;52(1):17–35.
43. Dietrich J, Frigault MJ. Immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome (ICANS) [Internet]. UpToDate. [pristupljeno 22. ožujak 2021.]. Dostupno na: <https://www.uptodate.com/contents/immune-effector-cell-associated-neurotoxicity-syndrome-icans>
44. Di Stasi A, Tey S-K, Dotti G, Fujita Y, Kennedy-Nasser A, Martinez C, i sur. Inducible Apoptosis as a Safety Switch for Adoptive Cell Therapy. *N Engl J Med*. 2011.;365(18):1673–83.
45. Sterner RM, Sakemura R, Cox MJ, Yang N, Khadka RH, Forsman CL, i sur. GM-CSF inhibition reduces cytokine release syndrome and neuroinflammation but enhances CAR-T cell function in xenografts. *Blood*. 2019.;133(7):697–709.
46. Weber EW, Lynn RC, Sotillo E, Lattin J, Xu P, Mackall CL. Pharmacologic control of CAR-T cell function using dasatinib. *Blood Adv*. 2019.;3(5):711–7.
47. Hollingsworth RE, Jansen K. Turning the corner on therapeutic cancer vaccines. *npj Vaccines*. 2019.;4(1):7.

48. Trimble CL, Morrow MP, Kraynyak KA, Shen X, Dallas M, Yan J, i sur. Safety, efficacy, and immunogenicity of VGX-3100, a therapeutic synthetic DNA vaccine targeting human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 proteins for cervical intraepithelial neoplasia 2/3: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet*. 2015.;386(10008):2078–88.
49. REVEAL 1 (Evaluation of VGX-3100 and Electroporation for the Treatment of Cervical HSIL) [Internet]. [pristupljeno 25. ožujak 2021.]. Dostupno na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03185013>
50. Zheng M, Huang J, Tong A, Yang H. Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Barriers and Recent Advances. *Mol Ther - Oncolytics*. 2019.;15(37):234–47.
51. Lawler SE, Speranza MC, Cho CF, Chiocca EA. Oncolytic viruses in cancer treatment a review. *JAMA Oncol*. 2017.;3(6):841–9.
52. Kaufman HL, Kohlhapp FJ, Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2015.;14(9):642–62.
53. FDA Approves Talimogene Laherparepvec to Treat Metastatic Melanoma [Internet]. National Cancer Institute. 2015 [pristupljeno 28. ožujak 2021.]. Dostupno na: <https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2015/t-vec-melanoma>
54. Conry RM, Westbrook B, McKee S, Norwood TG. Talimogene laherparepvec: First in class oncolytic virotherapy. *Hum Vaccines Immunother*. 2018.;14(4):839–46.
55. IMLYGIC (talimogene laherparepvec) [Internet]. Approved Cellular and Gene Therapy Products. [pristupljeno 28. ožujak 2021.]. Dostupno na: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/imlygic-talimogene-laherparepvec>
56. Kaufman HL, Kim DW, Deraffe G, Mitcham J, Coffin RS, Kim-schulze S. Local and Distant Immunity Induced by Intralesional Vaccination with an Oncolytic Herpes Virus Encoding GM-CSF in Patients with Stage IIIc and IV Melanoma. 2010.;50:718–30.
57. Murciano-Goroff YR, Warner AB, Wolchok JD. The future of cancer immunotherapy: microenvironment-targeting combinations. *Cell Res*. 2020.;30(6):507–19.
58. Goldberg MS. Improving cancer immunotherapy through nanotechnology. *Nat Rev Cancer*. 2019.;19(10):587–602.

Životopis

Rođen sam 26. studenog 1996. godine u Bjelovaru. Opću gimnaziju u Daruvaru sam završio 2015. godine, nakon čega sam upisao Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Dobitnik sam Dekanove nagrade za uspjeh u akademskoj godini 2016./2017.