
Elektrokemoterapija pri zdravljenju raka in genska imunoterapija pri bazalno celičnem karcinomu: klinična študija faze I

Electrochemotherapy in cancer treatment and gene immunotherapy of basal cell carcinoma: phase I clinical trial

Gregor Serša^{1,2} in Maja Čemažar^{1,3}

¹Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, Ljubljana

²Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, Ljubljana

³Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, Izola

Povzetek

Elektrokemoterapija je lokalna ablativna terapija, ki temelji na uporabi elektroporacije, kot dostavnega sistema za citostatika bleomicin ali cisplatin. Njena uporaba je predvsem za zdravljenje kožnih tumorjev, kot so kožne metastaze melanoma ali bazalno celični karcinomi. Elektrokemoterapija je v smernicah mnogih evropskih držav. Učinkovitost elektrokemoterapije je v povprečju za vse vrste kožnih tumorjev, 86% objektivnih odgovorov (OR) in 71% popolnih odgovorov (CR) po enkratni terapiji. Za zdravljenje so objavljeni standardizirani postopki, na voljo je več certificiranih generatorjev električnih pulzov in različni tipi elektrod. Obstajajo pa razlike v stopnji odgovorov med različnimi tumorji. Bazalno celični so najbolj občutljivi, melanomski tumorji pa manj. Klinični napovedni dejavniki so zato vrsta tumorjev, ter velikost tumorjev in predhodna zdravljenja. Nedavne študije so dokazale sinergizem njenega delovanja z zaviralci imunskih kontrolnih točk pri bolnikih z melanomom. Na bazalno celičnem karcinomu se izvaja tudi faza I kliničnega preskušanja, katerega namen je preučiti varnost in sprejemljivost zdravila za gensko terapijo, plazmida pHIL12.

Ključne besede: kožni tumorji, kožne metastaze, elektrokemoterapija, genska imunoterapija, interleukin 12

Abstract

Electrochemotherapy is a local ablative therapy based on the use of electroporation as a delivery system for the cytostatics bleomycin or cisplatin. Its use is mainly for the treatment of skin tumors, such as melanoma skin metastases or basal cell carcinomas. Electrochemotherapy is in the guidelines of many European countries. The effectiveness of electrochemotherapy is average for all types of skin tumors, 86% objective responses (OR) and 71% complete responses (CR) after a single therapy. There are published standardized procedures for treatment, several certified electric pulse generators and different types of electrodes are available. However, there are differences in response rates between different tumors. Basal cell tumors are the most sensitive, and melanoma tumors are less so. Clinical prognostic factors are therefore tumor type, tumor size and previous treatments. Recent studies have demonstrated synergism of its action with immune checkpoint inhibitors in melanoma patients. Basal cell carcinoma is also undergoing a Phase I clinical trial to study the safety and tolerability of a gene therapy drug, pHIL12 plasmid.

Key words: skin tumors, skin metastases, electrochemotherapy, gene immunotherapy, interleukin 12

1. Kaj je elektrokemoterapija?

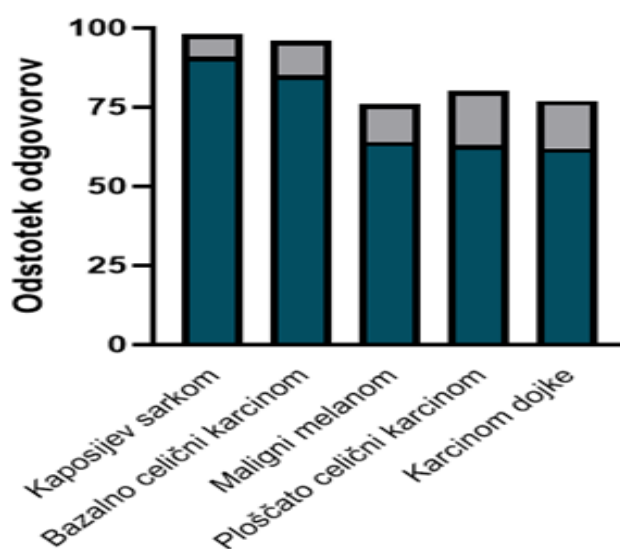
Elektrokemoterapija je sedaj že dobro uveljavljena lokalna ablativna terapija, ki se uporablja v približno 170 centrih po Evropi. Terapevtski pristop je sestavljen iz uporabe citostatika in aplikacije električnih pulzov, kot lokalnega dostavnega sistema za citostatike. Z aplikacijo električnih pulzov na tumor povzročimo elektroporacijo celic, ki postanejo permeabilne za molekule, ki sicer ne bi oziroma bi težko prehajale celično membrano. Elektroporacija začasno vzpostavi v membrani permeabilne strukture, ki omogočijo difuzijo molekul v celice. V nekaj sekundah, do minutah se te spremembe v membrani povrnejo v prvotno stanje. V elektrokemoterapiji se uporabljata dva citostatika, bleomicin in cisplatin. Bleomicin težko prehaja membrano, zato se njegova citotoksičnost z elektroporacijo poveča do 1000 krat, cisplatin pa nekaj desetkrat.

Elektrokemoterapija je bila dobro raziskana na pred kliničnem nivoju. S poskusi na tumorskih modelih na laboratorijskih miših, so bili optimizirani električni pulzi, ki imajo najboljše in vivo učinek, kot tudi njihovo število in pogoji za pokritost električnega polja v tumorju, ter doze citostatikov. V pred kliničnih poskusih se je tako pokazalo, da 8 električnih pulzov, jakosti 1300 V/cm, dolžine 100 μ s in frekvence 1 Hz, povzroči dobro elektroporacijo vrste različnih tumorjev za dober protitumorski učinek citostatikov. Enaki električni pulzi se uporabljajo tudi v kliniki, za zdravljenje kožnih tumorjev, različnih histologij.

Vrsta raziskav je tudi opredelila mehanizme, ki opredeljujejo učinek elektrokemoterapije. Prvi in najpomembnejši je povečana dostava citostatikov v celice. Dokazano je bilo, da se oba, bleomicin in cisplatin, signifikantno kopičita v tumorjih s pomočjo elektroporacije. Drugi mehanizem delovanja elektrokemoterapije so njeni vaskularni učinki. Aplikacijo električnih pulzov povzroči vazokonstrikcijo, zato se tudi citostatika dlje časa zadržujeta v tumorju. Poleg tega pa elektroporacija povzroči permeabilizacijo endotelijskih celic, kar sproži tudi žilno razdiralni učinek. Zato je elektrokemoterapija primerna tudi za zdravljenje krvavečih tumorjev. Tretji učinek pa je imunomodulatorni. Elektrokemoterapija sproži imunogeno celično smrt, tako z bleomicinom, kot tudi s cisplatinom. Zato se sproži lokalni imunski odziv, ki pripomore k celokupnem učinku elektrokemoterapije. To je učinek, ki je lasten še mnogim drugim ablativnim terapijam, in tudi radioterapiji. Nekaj dokazov pa je že zbranih na pred kliničnem nivoju, da je zato smiselno kombinirati elektrokemoterapijo z imunoterapijo, tako imunostimulatorno, kot tudi z inhibitorji imunskih kontrolnih točk.

2. Klinični rezultati zdravljenja z elektrokemoterapijo

Prva multicentrična klinična študija zdravljenja z elektrokemoterapijo je bila objavljena leta 2006. Študija je bila zasnovana z namenom uporabiti pripravljene standardizirane postopke za elektrokemoterapijo na bolnikih s kožnimi tumorji, velikosti do 3 cm, različnih histologij. Bleomicin se je injiciral intravensko ali intratumoralno, cisplatin pa samo intratumoralno. Uporabljene so bile različne konfiguracije elektrod in generator električnih pulzov, ki so ga razvili v predhodnem EU projektu. V kliničnem EU projektu- ESOPE, smo tako pripravili standardizirane postopke zdravljenja in nedvoumno pokazali učinkovitost zdravljenja z elektrokemoterapijo. Rezultati projekta so pokazali od 70-90% lokalno kontrolo rasti tumorjev, i.e. 85% objektivnih odgovorov, tako melanomskih metastaz, kot metastaz raka dojke in drugih histologij. Ta objava je sprožila širšo uporabo elektrokemoterapije po Evropi, najprej predvsem v Italiji, kjer je tudi proizvajalec generatorja električnih pulzov, nato pa še po ostalih centrih, in predvsem v Nemčiji.



Slika 1: Odgovori kožnih tumorjev na elektrokemoterapijo po enkratnem zdravljenju. Z zeleno so prikazani popolni odgovori, celoten stolpec predstavlja objektivne odgovore (povzeto po Clover et al 2020)

Centri, ki izvajajo elektrokemoterapijo se v veliki večini združujejo v InspECT konzorciju (International Network for Sharing Practice of Electrochemotherapy). Ta konzorcij zbira podatke o zdravljenju njihovih bolnikov, in tako tvori široko bazo, ki ima možnost analize različnih aspektov zdravljenja z elektrokemoterapijo. Tako je pred kratkim bil objavljen članek, ki je analiziral rezultate zdravljenja z elektrokemoterapijo na 987 bolnikih in 2482 tumorskih nodulih. Učinek zdravljenja, glede na nodule, in ne glede na histologijo tumorjev, je bil OR 85% (70 CR; 15% delnih odgovorov (PR); 11% stabilna bolezen (SD); 2% napredovanje bolezni (PD)), in glede na bolnika 83% OR (61% CR; 22% PR; 12% SD; 3% PD). Smo pa zaznali razliko v odzivih tumorjev glede na histologijo, najboljši odziv je bil zaznan pri Kaposijevem sarkomu in bazalno celičnem karcinomu, slabši pa pri malignem melanomu, raku dojke in ploščato celičnem karcinomu (Slika1,2). Iz kliničnih podatkov lahko izluščimo, da je napovedni dejavnik zdravljenja odvisen od histologije tumorjev, poleg tega pa se slabše odzivajo večji tumorji in pa predhodno že zdravljeni tumorji. Pomembno pa se nam je zdelo, da je potrebnih več raziskav, ki bi opredelile biološke napovedne dejavnike. Tako na nivoju značilnosti tumorskih celic, kot tudi tumorskega mikrookolja. Vemo, da je vaskularizacija tumorjev zelo pomembna za izid zdravljenja z elektrokemoterapijo. Predvidevamo, in na tumorskih modelih smo že dokazali, da so dobro ožiljeni tumorji z dobro mikrocirkulacijo krvi bolj občutljivi na elektrokemoterapijo. Žal pa kliničnih podatkov o tem še ni.



Slika 2: Slika 2. Zdravljenje in učinek elektrokemoterapije bazalnoceličnega karcinoma na nosu bolnika (iz arhiva Oddelka za eksperimentalno onkologijo Onkološkega Inštituta Ljubljana)

Drugi dejavnik, ki se nam zdi zelo pomemben je imunogenost tumorjev. Na tumorskih modelih smo že pokazali, da je z večanjem imunogenosti tumorjev njihova odzivnost večja. Tako je bil tudi v predkliničnih poskusih maligni melanom najmanj odziven tumor. Na drugi strani pa smo pokazali, da z adjuvantnim zdravljenjem z interlevkinom-12 (IL-12) lahko povečamo odzivnost tumorjev. Najbolj je bil protitumorski učinek povečan pri manj imunogenih tumorjih in najmanj pri bolj imunogenih tumorjih, ki odgovorijo dobro že na samo terapijo z elektrokemoterapijo. Elektrokemoterapijo bi lahko imeli kot *in situ* vakcinacijo organizma. Klinična študija, ki smo jo objavili potrjuje to možnost. V InspECT bazi smo zbrali bolnike z napredovalno boleznijo in s kožnimi metastazami melanoma, ki so bili zdravljeni s pembrolizumabom in smo jim kožne metastaze dodatno zdravili z elektrokemoterapijo. Študija je pokazala da, v primerjavi s primerljivima skupinama bolnikov, ki so bili zdravljeni samo z elektrokemoterapijo in skupino, ki je bila zdravljena samo s pembrolizumabom, elektrokemoterapija doprinese k lokalnem učinku na kožnih metastazah, kot tudi izboljša sistemski odgovor zdravljenja, tako na oddaljenih zasevkih kot tudi s povečanim celokupnim preživetjem. Zato se nam zdi smiselno, da gredo raziskave v smeri kombiniranega zdravljenja elektrokemoterapije z zaviralci imunskih kontrolnih točk, ali pa z imunogeno terapijo, ki jo razvijamo, s plazmidom z zapisom za IL-12.

Učinki elektrokemoterapije na kožnih tumorjih so sedaj že dobro znani in primerljivi z učinkovitostjo drugih ablativnimi terapijami, kar je pokazala meta-analiza. Se pa elektrokemoterapija razvija tudi v smeri zdravljenja globoko ležečih tumorjev. V ta namen se izpopolnjujejo tehnični pristopi, z razvojem novih vrst

elektrod. Prve študije na jetrnih tumorjih, trebušni slinavki, rektalnih tumorjih kažejo približno enako stopnjo odgovorov, kot pri kožnih tumorjih. Razvijajo in uveljavljajo pa se perkutani, endoskopski in laparoskopski pristopi.

3. Genska imunoterapija

Imunoterapije se v zadnjem času močno uveljavljajo pri zdravljenju različnih vrst raka in pri nekaterih prihajajo v prve linije zdravljenja. Trenutno so največji uspehi doseženi z zaviralci imunskih kontrolnih točk, razvijajo pa se tudi nove imunoterapije, ki temeljijo na celičnih terapijah (CART terapije), onkolitičnih virusih, tumorskih vakcinah in citokinih. Terapije, kjer so bili uporabljeni rekombinantni citokini so zelo veliko obetale zaradi izjemnih predkliničnih rezultatov, ki se pa žal niso potrdili v kliničnih študijah zaradi hudih neželenih učinkov.

Razvoj terapij s citokini se je zato razvijal predvsem v obliki genske imunoterapije, ki temelji na tem, da v organizem vnesemo gen za imunostimulatoreni citokin, ki se potem v celicah izraža v nizkih količinah, ter dalj časa. To ne vodi v povišane serumske koncentracije in s tem povezano toksičnostjo in neželene učinke. Ker pa je za vnos genov v celice potreben vnosni sistem, se genska zdravljenja razvijajo v večih smereh. Vnosni sistemi lahko temeljijo na virusnih vektorjih (predvsem adeno, lenti in z adenovirusi povezani virusni vektorji) ali pa na nevirusnih vnosnih sistemih, ki so lahko kemični (različni polimerni nosilci) ali fizikalni kot je elektroporacija. Genska imunoterapija z IL-12, ki je bila posredovana z elektroporacijo (genski elektrotransfer – GET), se je v mnogih predkliničnih študijah izkazala za uspešno na različnih tumorskih modelih. V kombinaciji z radioterapijo ali elektrokemoterapijo pa so bili doseženi še boljši protitumorski učinki, ki so vodili v ozdravitve primarnega tumorja in tudi v razvoj imunskega spomina. Kombinacija elektrokemoterapije in imunske genske terapije z IL-12 se že uporablja v veterinarski onkologiji za zdravljenje mastocitomov in oralnih melanomov.

V humani onkologiji se trenutno izvajajo klinične študije v ZDA za zdravljenje melanoma, karcinoma Merklvih celic in trojno negativnega raka dojke z uporabo GET plazmidne DNA z zapisom za humani IL-12.

4. Klinična študija faze I pri bazalno celičnem karcinomu

Bazalno celični karcinom obsega heterogene histološke različice, od zelo dobro omejenih in površinsko rastočih tumorjev do agresivnih, infiltrativno rastočih ali globoko invazivnih lezij. Zaradi zapletenih anatomskih stanj v nekaterih področjih glave (nos, orbitalni predel, ušesa) v kombinaciji z morebitno agresivnejšo obliko rasti lahko neustrezno prvo zdravljenje predstavlja resen terapevtski problem in vodi do ponovitve bolezni. Ponavljajoče se zdravljenje, bodisi kirurško bodisi obsevalno, je povezano z zmanjšano učinkovitostjo in/ali funkcionalno disfunkcijo na zdravljenem območju. Zato je s kliničnega vidika pomembno iskanje novih terapevtskih alternativ. V zadnjem času je imunoterapija postala pomembna tudi pri zdravljenju lokalno napredovalega ali metastatskega bazalno celičnega karcinoma s prvim odobrenim zaviralcem imunske kontrolne točke cemiplimabom, ki je postavil temelje za raziskave drugih imunoterapij.

Bazalno celični karcinom ima največje mutacijsko breme v primerjavi z drugimi kožnimi raki, kar pomeni, da je prisotnih veliko tumorskih neoantigenov, ki lahko povzročijo aktivacijo lokalnega imunskega odziva in s tem upočasnijo rast primarnega tumorja in metastaz. Rezultati kliničnih študij elektrokemoterapije različnih histoloških tipov kožnih tumorjev so pokazali, da je elektrokemoterapija učinkovitejša pri bazalnoceličnem karcinomu kot pri drugih histoloških tipih, kar je verjetno posledica dodatnega sproščanja tumorskih antigenov v tumorsko mikrookolje iz celic, ki so umrle zaradi delovanja elektrokemoterapije. Ti dodatno sproščeni tumorski antigeni lahko vodijo v povečano aktivacijo imunskega sistema in eliminacijo tumorskih celic.

V skladu s temi ugotovitvami smo zasnovali klinično študijo GET plazmidne DNA z zapisom za IL-12 (pIL12), ki bi jo izvedli lokalno na tumorju z namenom stimulacije imunskega odziva. Klinično študijo smo zasnovali kot nerandomizirano študijo faze I za testiranje varnosti in sprejemljivosti naraščajočega

odmerka plazmidne DNA phIL12 pri zdravljenju operabilnih bazalno celičnih karcinomov v področju glave in vratu.

Primarna cilja študije sta oceniti varnost in sprejemljivost genske imuno terapije. Sekundarni cilji pa so določiti farmakokinetiko, farmakodinamiko, izvedljivost raziskave in predvsem določiti odmerek plazmida, ki vodi v produkcijo proteina IL-12, ki je biološko aktiven, povzroči infiltracijo imunskih celic v tumor in ni toksičen, kar bo osnova za nadaljnje klinične raziskave.

Študijo sta odobrili Komisija Medicinske etike Republike Slovenije (RS) (0120-524/2020-12) in Javna agencija za zdravila in medicinske pripomočke RS. Študijo smo registrirana v podatkovni bazi ISRCTN (ISRCTN15479959) in Clinical Trials (NCT05077033), kjer so navedeni tudi vsi vključitveni in izključitveni kriteriji.

V študiji testiramo 3 odmerke phIL12 (0,5 mg/mL, 1 mg/mL and 2 mg/mL). Odmerke plazmidne DNA, protokol elektroporacije in število ponovitev terapije smo določili v ne-kliničnem delu študije, ki smo jo izvedli z mišjim ortologom phIL12 (pmIL12). Zdravljenje izvajamo v splošni anesteziji ali sedaciji, odvisno od presoje anesteziologa. Plazmidna DNA injiciramo intratumorsko in 5 minut za tem dovedemo na tumor električne pulze, ki se uporabljajo za elektrokemoterapijo, z generatorjem električnih pulzov Cliniporator (slika 3). Po koncu terapije rano oskrbimo s standardnimi postopki. Ko se bolniki prebudijo iz anestezije, bo ocenjena toksičnost in morebitni neželeni učinki ter bolečina po zdravljenju (VAS lestvica). Kontrolni pregledi so predvideni 3, 8, in 31 dan, kjer bolnikom jemljemo brise iz mesta aplikacije plazmida, kri in bioptični vzorec za določitev farmakodinamike (koncentracija IL-12 in interferona γ v tumorju, število kopij plazmida v tumorju) in farmakokinetike (koncentracija IL-12 v serumu). Varnost terapije ocenjujemo po kriterijih CTCAEv5.0. Sprejemljivost terapije spremljamo z vprašalnikom o kakovosti življenja EORTC QLQ-C30. Odgovor tumorja se določa po RECISTv1.1 kriteriju.



Priprava zdravila
Volumen injiciranja= $\frac{1}{4}$ volumna tumorja

Intratumorsko injiciranje

Aplikacija električnih pulzov preko igelnih elektrod

Slika 3: Potek priprave in aplikacije zdravila z elektroporacijo (iz arhiva Oddelka za eksperimentalno onkologijo Onkološkega Inštituta Ljubljana)

Do sedaj smo v študijo vključili 7 bolnikov. Zaključili smo vključevanje v prvi dve kohorti bolnikov, ki so bili zdravljeni z najnižjim odmerkom plazmida (0,5 mg/ml) in srednjim odmerkom (1 mg/ml). Vključili smo tudi prvega bolnika v najvišji odmerek (2 mg/ml). Pri vseh smo ugotovili, da je študija varna, sprejemljiva, izvedljiva in da neželenih učinkov ni bilo. Pri vseh bolnikih je bila izvedena tudi kirurška odstranitev tumorja po 31. dnevu, ker sama genska imunoterapija z IL-12 pričakovano ne vodi v popolni odgovor tumorja.

Viri

- Gehl J, Sersa G, Wichmann Matthiessen L, Muir T, Soden D, Occhini A, Quaglino P, Curatolo P, Campana L, Kunte C, Clover AJP, Bertino G, Farricha V, Odili J, Dahlstrom K, Benazzo M, Mir LM.

- Updated standard operating procedures for electrochemotherapy of cutaneous tumours and skin metastases. *Acta Oncol* 2018, **57**: 874-882.
- Clover AJP, deTerlizzi F, Bertino G, Curatolo P, Odili J, Campana LG, et al. Electrochemotherapy in the treatment of cutaneous malignancy: Outcomes and subgroup analysis from the cumulative results from the pan-European International Network for Sharing Practice in Electrochemotherapy gatabase for 2482 lesions in 987 patients (2008-2019). *Eur J Cancer* 2020; **138**: 30-40.
 - Sersa G, Ursic K, Cemazar M, Heller R, Bosnjak M, Campana LG. Biological factors of the tumor response to electrochemotherapy: review of evidence and a research roadmap. *EJSO* 2021; **47**: 1836-46.
 - Ursic K, Kos S, Kamensek U, Cemazar M, Miceska S, Markelc B, Bucek S, Staresinic B, Kloboves Prevodnik V, Heller R, Sersa G. Potentiation of electrochemotherapy effectiveness by immunostimulation with IL-12 gene electrotransfer in mice is dependent on tumor immune status. *J Controlled Release* 2021; **332**: 623-35.
 - Campana LG, Peric B, Mascherini M, Spina R, Kunte C, Kis E, Rozsa P, Quagliano P, Pritchard Jones R, Clover AJP, Curatolo P, Giorgione R, Cemazar M, de Terlizzi F, Bosnjak M, Sersa G. Combination of pembrolizumab with electrochemotherapy in cutaneous metastases from melanoma: A comparative retrospective study from the InspECT and Slovenian Cancer Registry. *Cancers* 2021; **13**: 4289.
 - Bhatia S, Longino N V., Miller NJ, Kulikauskas R, Iyer JG, Ibrani D, Blom A, Byrd DR, Parvathaneni U, Twitty CG, et al. Intratumoral delivery of plasmid IL12 via electroporation leads to regression of injected and noninjected tumors in Merkel cell carcinoma. *Clin Cancer Res* (2020) 26:598–607. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-0972
 - Cemazar M, Jarm T, Sersa G. Cancer Electrogene Therapy with Interleukin-12. *Curr Gene Ther* (2010) 10:300–311. doi: 10.2174/156652310791823425
 - Daud AI, DeConti RC, Andrews S, Urbas P, Riker AI, Sondak VK, Munster PN, Sullivan DM, Ugen KE, Messina JL, et al. Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* (2008) 26:5896–5903. doi: 10.1200/JCO.2007.15.6794
 - Groselj A, Bosnjak M, Jesenko T, Cemazar M, Markelc B, Strojan P, Sersa G. Treatment of skin tumors with intratumoral interleukin 12 gene electrotransfer in the head and neck region: a first-in-human clinical trial protocol. *Radiol Oncol*. 2022 Aug 14;56(3):398-408. doi: 10.2478/raon-2022-0021.
 - Kos S, Bosnjak M, Jesenko T, Markelc B, Kamensek U, Znidar K, Matkovic U, Rencelj A, Sersa G, Hudej R, et al. Non-Clinical In Vitro Evaluation of Antibiotic Resistance Gene-Free Plasmids Encoding Human or Murine IL-12 Intended for First-in-Human Clinical Study. *Pharmaceutics* (2021) 13:1739. doi: 10.3390/PHARMACEUTICS13101739