

# **BIOMARKERJI IN ZAPLETI PO IMUNOTERAPIJI**

*Breda Škrbinc*

---

## **Povzetek**

Imunoterapija z zaviralci imunskih nadzornih točk (ZINT) je v zdravljenje raka prinesla spremembe, ki se odražajo v izboljšanem preživetju pomembnega deleža bolnikov z rakom. Delovanje ZINT je usmerjeno v reaktivacijo bolnikovega lastnega imunskega sistema, ki je do raka razvil imunsko toleranco. ZINT so monoklonska protitelesa, ki se vežejo na specifične receptorje na T limfocitih (CTLA4, PD1) ali pa na njihove ligande na različnih celicah v tumorskem mikrookolju (vključno s tumorskimi celicami). ZINT tako onemogočijo funkcionalen stik receptor-ligand in sprostijo zavoro bolnikovega imunskega sistema za delovanje proti raku. Po izsledkih kliničnih raziskav odgovori na zdravljenje z ZINT le 20% - 40% bolnikov, del teh ima tudi dolgotrajne remisije. Ker ZINT niso univerzalno učinkoviti, povzročajo pa tudi številne imunske pogojene neželene učinke, so za načrtovanje zdravljenja pomembni napovedni dejavniki odziva na zdravljenje. Napovedni dejavniki, ki jih uporabljamo danes so izraženost PD-L1 (ligand receptorja PD1) v tumorskem tkivu, breme tumorskih mutacij ter pomanjkljivo popraviljenje neujemanja DNA oz mikrosatelitna nestabilnost v tumorskem genomu.

---

## **Uvod**

Imunoterapija, predvsem zaviralci imunskih nadzornih točk (ZINT, angl. check-point inhibitors), so v zadnjih desetih letih v sistemsko zdravljenje raka prinesli revolucionarne spremembe. Kot monoterapija, kombinacija več ZINT ali v kombinaciji s klasično kemoterapijo ter z drugimi tarčnimi zdravili so ZINT postali ključni sestavni del systemskega zdravljenja številnih vrst raka, kot so maligni melanom, NSCLC, urotelni karcinom, rak ledvičnih celic, rak materničnega telesa, rak materničnega vratu, rak dojke in številnih drugih. V zdravljenju raka jajčnika/jajcevoda/PPSC v tem trenutku ni prepričljivih podatkov o učinkovitosti ZINT, se pa na tem področju že v kratkem obetajo objave rezultatov več kliničnih raziskav III. faze, ki naj bi po napovedih prinesle ključne spremembe že v prvo linijo zdravljenja te še vedno slabo obvladljive maligne bolezni.

## **Mehanizem delovanja ZINT**

Osnoven mehanizem delovanja ZINT izhaja iz dejstva, da posameznikov imunski sistem proti rakavim celicam ne ukrepa kot odstranjevalec tujkov, pač pa do njih razvije imunsko toleranco. Rak imunsko toleranco gostitelja doseže z uzurpacijo signalnega sistema, ki v normalno delujočem imunskem sistemu usklajuje spodbujevalne in zavorne poti imunskega odziva in s tem skrbi za njegovo dobro uravnano in učinkovito delovanje. Med najbolj raziskanimi imunskimi signalnimi potmi je sistem receptorjev CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated-protein 4) in PD1 (programmed cell death protein) z odgovarjajočimi ligandi. CTLA4 deluje v začetnem delu imunskega cikla kot spodbujevalec specifičnega imunskega odziva, kompleks receptorja PD1 in

njegovih ligandov PD-L1 in PD-L2 pa deluje v zaključnem, eliminacijskem delu imunskega cikla, ki sproži apoptozo tumorskih celic. Receptorji CTLA4 in PD1 se nahajajo na imunskih celicah (limfociti T, B, naravne celice ubijalke, monociti, dendritične celice) njihovi ligandi pa na različnih celicah tumorskega mikrookolja, vključno z rakavimi celicami. Kadar pride do vezave ligandov z receptorji na celicah T ubijalkah in pomagalkah, je efektorska vloga limfocitov T zavrta in rakave celice kot tujek ostanejo neprepoznane in na ta način inertne za gostiteljev imunski sistem. ZINT, ki so funkcionalno anti-CTLA4, anti-PD1 in anti-PD-L1/L2 monoklonska protitelesa, z vezavo na receptor ali na njegov ligand prekinejo zavoro signalne poti in ponovno omogočijo ustrezen imunski odziv organizma na rakave celice, torej njihovo prepoznavo, senzibilizacijo in v končni fazi uničenje rakavih celic.

Glede na dejstvo, da omenjeni signalni poti predstavljata le droben delček signalnega mehanizma imunskega sistema raka, predvsem pa, ker je zgodba nastanka in razvoja raka izrazito kompleksna in prepletena s številnimi procesi v človeškem organizmu, je razumljivo, da zdravljenje z ZINT prinese klinično dobrobit nekaterim, ne pa vsem bolnikom z rakom.

### **Napovedni dejavniki odziva na imunoterapijo z ZINT**

Imunoterapija z ZINT predstavlja specifično sistemsko zdravljenje s specifičnim profilom neželenih učinkov zdravljenja. Na zdravljenje z ZINT se odzove 20% - 40% bolnikov. Glede na to so si raziskovalci že v najzgodnejših obdobjih raziskav prizadevali tudi za oblikovanje ustreznih napovednih dejavnikov odziva na zdravljenje z ZINT. Ker na odziv na ZINT vplivajo različni dejavniki - nekateri izhajajo iz samih tumorskih celic, drugi iz tumorskega mikrookolja (TME), nekateri pa iz lastnosti gostiteljevega organizma, tudi napovedne dejavnike odziva na ZINT iščemo na več ravneh. Med napovedne dejavnike, ki jih določamo na tumorskih celicah sodijo izraženost PD-L1, breme tumorskih mutacij (angl tumor mutational burden – TMB), breme neoantigenov, okvara DNK popravljalnih mehanizmov (angl DNA damage repair - DDR) in specifične mutacije genov nekaterih signalnih poti (IFN $\gamma$ , KRAS, STK11). Med napovedne dejavnike tumorskega mikrookolja sodijo izraženost PD-L1, infiltracija tumorja z imunskimi celicami (imunski status TME, infiltracija limfocitov s specifičnim fenotipom – CD8+, CD4+, TAM, mieloidne celice, NKp46+), itd. Napovedni dejavniki s strani gostitelja so spol, starost, zarodne mutacije in zelo pomembno - črevesna mikrobiota, ki se vse bolj kaže kot eden ključnih dejavnikov vpliva na imunsko zdravljenje raka.

Določanje napovednih dejavnikov odziva na ZINT je ključno povezano z razpoložljivimi tehnološkimi postopki od metod imunohistokemičnih barvanj, ki v sodobnem času omogočajo določanje vse večjega števila molekularnih markerjev na manjših tkivnih vzorcih, do novih metod DNK sekvencioniranja in mikromrež, ki v kratkem času omogočijo analizo širšega spektra tumorskih genov in njihovih produktov. Glede na dejstvo, da imunski sistem ni statičen, tudi napovednih dejavnikov odziva na ZINT ne moremo dojemati statično. Za oceno dinamike napovednih dejavnikov pa je tekom zdravljenja potrebna večkratna analiza ustreznih vzorcev. V tem kontekstu zelo perspektivno možnost pridobivanja bioloških vzorcev prinaša tekočinska biopsija, ki na ne-invaziven način zagotavlja večkratno odvzem vzorcev krvi in drugih telesnih tekočin ter sprotno analizo v tekočinah prisotnih celičnih elementov. Sodobni trendi raziskav napovednih dejavnikov sistemskega zdravljenja sicer vodijo od donedavnega določanja

posameznih dejavnikov h kompleksom več sočasno določenih dejavnikov na različnih ravneh, kar pomeni bolj individualno opredelitev bolezni in s tem tudi bolj personificiran pristop k bolnikovemu zdravljenju. V tem procesu utegne v prihodnosti pomembno vlogo odigrati tudi umetna inteligenca.

## **Napovedni dejavniki odziva na ZINT, ki so aktualno v klinični rabi**

### **PD-L1**

PD-L1 je v kliničnih raziskavah in v vsakdanji klinični praksi najbolj uveljavljen napovedni dejavnik odziva na zdravljenje z ZINT, navzlic temu pa zaradi številnih pomanjkljivosti nikakor ni optimalen in univerzalno uporaben napovedni dejavnik. Ena večjih nedoslednosti PD-L1 je, da je s strani regulatornih organov odobrena uporaba posameznega ZINT vezana na specifičen test za določanje izraženosti PD-L1, ki ga določi proizvajalec tega ZINT. Za isti ZINT lahko obstaja več imunohistokemičnih testov, ki so bili specifično uporabljeni v posameznih kliničnih raziskavah in so vezani na zdravljenje specifične vrste raka in celo na zdravljenje posamezne vrste raka v različnih linijah zdravljenja. Tako je npr. za uvedbo zdravljenja različnih vrst raka s pembrolizumabom predpisan test Dako 22C3, za zdravljenje urotelnega karcinoma, TNBC, NSCLC z atezolizumabom pa test Ventana SP142. Pri tem gre za ti obvezne spremljevalne teste (angl. companion), ki so predpogoj za uvedbo zdravljenja. Po drugi strani pa sta npr. za zdravljenje napredovalega NSCLC z nivolumabom in urotelnega karcinoma z durvalumabom neobvezno priporočena dopolnilna (angl. complementary) testa Dako 28-8 oziroma Ventana SP263, ki sicer nista formalen predpogoj za uvedbo zdravljenja, kaže pa pozitiven PD-L1 test na višjo verjetnost ugodnega odziva na zdravljenje. PD-L1 se nahaja na tumorskih celicah, na raznih vrstah imunskih celic pa tudi na mezenhimskih celicah v TME. Osnovna zagata PD-L1 testov različnih proizvajalcev je, da posamezni testi določajo PD-L1 na različnih celicah – tumorskih, imunskih ali pa v kombinaciji obojega in je izraženost PD-L1 podana kot rezultat specifičnega izračuna. Tako govorimo o TC (tumor cells) in TPC (tumor positivity score), ki oba predstavljata odstotek PD-L1 pozitivnih viabilnih tumorskih celic, nadalje o CPS (combined positive score), ki pomeni razmerje PD-L1 pozitivnih tumorskih celic+limfocitov+makrofagov s celotnim številom viabilnih tumorskih celic itd. Takšna raznolika predstavitev izraženosti PD-L1 ne dopušča primerjave rezultatov med posameznimi testi, prospektivnih primerjav več testov na istih tkivnih vzorcih, ki bi omogočile morebitno zamenljivost testov, pa ni na voljo. Dodatna posebnost PD-L1 kot napovednega dejavnika odziva na zdravljenje z ZINT je, da nima univerzalnega referenčnega območja, pač pa je test pozitiven pri številnih vrednostih, od 1% pa vse do 50% izraženosti PD-L1 v tumorskem tkivu, kar je odvisno od statistične zasnove konkretne registracijske klinične raziskave. Še največja slabost PD-L1 kot napovednega dejavnika odziva na zdravljenje pa je v dejstvu, da na zdravljenje z ZINT ne odgovorijo izključno bolniki s PD-L1 pozitivnim rakom, ampak tudi nekateri bolniki s PD-L1 negativno boleznijo. Skratka PD-L1 je precej univerzalno uporabljan napovedni dejavnik odziva na zdravljenje z ZINT, ni pa univerzalno standardiziran in so na tem področju v bodoče vsekakor potrebne izboljšave.

## **Breme tumorskih mutacij (TMB), pomanjkljivo popravljane neujemanja DNK (dMMR) in mikrosatelitna nestabilnost (MSI)**

Gre za tri medsebojno prepletene napovedne dejavnike odziva na zdravljenje z ZINT, ki so vsi posredni pokazatelji tumorskih neoantigenov, osnovnih sprožilcev imunskega odziva na tumorske celice in s tem tudi odziva na zdravljenje z ZINT.

TMB predstavlja število vseh patogenih različic/mutacij na določeno število pregledanih nukleotidov, določamo ga z metodami NGS, praviloma je rezultat podan na 1000 000 pregledanih nukleotidov (število mutacij / 1 megabaza (Mb)). Raziskave so pri nekaterih vrstah raka pokazale visoko korelacijo med TME in odzivom na zdravljenje z ZINT. Junija 2020 je FDA TMB na podlagi izsledkov raziskave Keynote-158 tudi odobrila kot spremljevalni (companion) diagnostični biomarker za uvedbo zdravljenja s pembrolizumabom. TMB so kot potencialen napovedni dejavnik odziva na zdravljenje z ZINT raziskovali tudi v povezavi z drugimi ZINT. Pri nekaterih vrstah raka so korelacijo dokazali, vendar zaradi razlik v zasnovah raziskav TMB za enkrat še nima formalne vloge spremljevalnega testa za zdravljenje raka z drugimi ZINT.

Okvara popravljalnih mehanizmov DNK v genih MMR (angl mismatch repair deficiency - dMMR), to je v genih za popravljane neujemanja DNK (geni MSH2, MLH1, MSH6, PMS2), ki nastaja ob podvojevanju DNK, privede do povečanega števila tumorskih mutacij (povečano TMB) in posledično do povečanja bremena neoantigenov. V primeru dMMR so okvare DNK zelo številne v področju mikrosatelitnih sekvenc, kar povzroča mikrosatelitno nestabilnost. MSI torej sodi v okvir pokazateljev visokega TMB, pri čemer tumorji z visoko izraženo MSI predstavljajo le podskupino tumorjev z visokim TMB. Obsežna analiza 100 000 genomov je pokazala, da večina MSI-H tumorjev sovпада s TMB-H tumorji (v 83%), pri TMB  $\geq 10$  mutacij/Mb je bilo ujemanje celo 97%. V obratni smeri pa takšne korelacije ni, saj so raziskovalci odkrili MSI-H status le pri 16% TMB-H tumorjev. Translacijske raziskave so v MSI-H tumorjih pokazale intenzivno infiltracijo CD8+ limfocitov in visoko izraženo proteinov PD1, PD-L1 in CTLA4. Klinične raziskave pa so pri bolnikih z MSI-H tumorji, ne glede na histološki tip, potrdile odziv na zdravljenje (angl overall response rate ORR) s pembrolizumabom. Manjša pilotna raziskava je pokazala ORR pri 71% bolnikov z MSI-H nekolorektalnimi raki in pri 40% bolnikov s MSI-H kolorektalnim rakom, kar je vodilo v zasnovano nerandomizirano, odprto, multikohortno raziskavo faze II Keynote-158. Ta je pri bolnikih z različnimi vrstami raka, vendar z MSI-H/dMMR tumorji potrdila 35.3 % ORR, pri tem je bil ugotovljen srednji čas do progressa bolezni (angl median progression free survival - mPFS) 4.1 meseca in srednji čas celokupnega preživetja (angl median overall survival – mOS) 23,5 meseca. Na podlagi izsledkov te klinične raziskave je FDA v maju 2017, kmalu za njo pa tudi EMA, vsem bolnikom z MSI-H/dMMR rakom, ki nimajo več možnosti učinkovitega standardnega zdravljenja, odobrila možnost tumor-agnostičnega zdravljenja s pembrolizumabom.

## **Neželeni učinki zdravljenja z ZINT**

Imunsko pogojeni neželeni učinki zdravljenja (angl. Immune related adverse effects - iRAE) predstavljajo serijo zapletov, ki jih srečujemo pri zdravljenju z ZINT. Pretežno gre za avtoimunska vnetna dogajanja različnih stopenj, tudi življenjsko ogrožujočih, ki pa praviloma prizadenejo manjši delež zdravljenih bolnikov, če so ti zdravljeni z enim ZINT (Gr 3 – 4 do 10% bolnikov), pogosteje in v hujših stopnjah pa se iRAE pojavljajo pri kombiniranem zdravljenju, ki vključuje

več ZINT npr kombinacijo ipilimumaba in nivolumaba (Gr 3 – 4 lahko tudi 40% - 50% bolnikov). iRAE načeloma lahko prizadenejo katerikoli organ in tkivo v telesu, se pa poročila o incidenci specifičnih iRAE med kliničnimi raziskavami nekoliko razlikujejo, kar je glede na precej različne demografske lastnosti vključenih bolnikov, na različne protokole preizkušanj specifičnih ZINT in na različne linije systemskega zdravljenja v preizkušanju, precej razumljivo. Praviloma se iRAE pojavljajo v začetnem obdobju zdravljenja z ZINT (4 – 12 tednov po uvedbi ZINT), kasneje pa manj pogosto, se pa lahko pojavijo tudi še 1 – 2 leti po zaključku zdravljenja z ZINT, kar je značilno predvsem za revmatološke iRAE. Med najpogostejšimi iRAE so kožna vnetja različnih stopenj, ki se pojavljajo tudi najprej, po pogostosti sledijo črevesna vnetja, pnevmonitisi, endokrinopatije in imunsko pogojeni hepatitisi. Potencialnih vzrokov za iRAE je več. Izsledki raziskav kažejo na verjetnost, da pri reaktivaciji celičnega imunskega odziva zoper rakave celice pride tudi do nespecifične aktivacije T limfocitov, kar vodi do navzkrižnih reakcij. Dodatno se aktivira tudi večja koncentracija provnetnih citokinov (IFgama, TNFalfa, IL-17), nespecifičen vnetni odziv zlasti pri antiCTLA-4 protitelesih sproži lahko njihova neposredna vezava na tkivne komponente komplemента, lahko se poviša nivo sicer že prisotnih autoproteles (kar naj bi bil predvsem mehanizem pri zdravljenju z ZINT pogosto prisotnega tiroiditisa), določen delež iRAE pa gre verjetno tudi na račun nespecifično spodbujene humoralne imunosti.

Raziskave morebitnih napovednih dejavnikov pojava iRAE so pretežno vezane na posamezen ZINT ali na posamezno vrsto raka, zato univerzalni napovedni dejavniki iRAE niso opredeljeni, nakazujejo pa analize podatkov iz klinične praksa nekaj dejavnikov na katere velja biti pozoren pred uvedbo zdravljenja z ZINT. iRAE naj bi se pogosteje pojavljali pri pacientih v starosti manj kot 60 let, pri tistih z visokim BMI, pri zdravljenju z anti-CTL4 pogosteje pri ženskah, pri zdravljenju z anti-PD1/PDL1 pa pogosteje pri moških. Bolniki s hujšo okvaro ledvične funkcije, izrazitejšimi motnjami kardialne funkcije in kroničnimi pljučnimi boleznimi naj bi imeli večje tveganje za pojav iRAE vezano na kronično prizadet organ. Čeprav preeksistentna autoimuna stanja sama po sebi ne pomenijo absolutne kontraindikacije za zdravljenje z ZINT, pa vsekakor zahtevajo tehten multidisciplinaren razmislek glede uvedbe takšnega zdravljenja in nato tudi multidisciplinarno vodenje zdravljenja z ZINT.

iRAE so po stopnji izraženosti v splošnem razvrščeni v 4 stopnje oz graduse (Gr). Neželeni učinki Gr1 in Gr2 so blažje stopnje in ne potrebujejo specifičnega ukrepanja, paciente obravnavamo ambulantno, pri Gr 2 zdravljenje z ZINT lahko prekinemo do umiritve vnetja pod stopnjo Gr1, nakar z zdravljenjem z ZINT ponovno pričnemo brez prilagoditev protokola zdravljenja. Pri iRAE Gr3 in Gr4 je zdravljenje z ZINT takoj potrebno prekiniti in neposredno uvesti imunosupresivno zdravljenje. Imunosupresivno zdravljenje pričnemo s kortikosteroidi (npr. metilprednisolon v odmerku 1 – 2 mg/kg tel. teže), kar v 90% primerov učinkovito zavre z ZINT pogojeno vnetje. Pri manjšem deležu bolnikov je potrebna intenzivnejša imunosupresija (npr. infliksimab, mikofelonat, azatioprin, itd) ter urgenten dobro koordiniran multispecialističen / multidisciplinaren pristop k zdravljenju. iRAE večinoma izzvenijo v 6 – 12 tednih, je pa ob izboljšanju stanja potrebno odmerke kortikosteroida zniževati počasi in postopno, da se izognemo ponovnemu zagonu vnetja. Po umiritvi vnetne reakcije Gr3 lahko zdravljenje z ZINT ponovno uvedemo, vendar po prilagojeni shemi, pri pacientih z iRAE Gr4 pa zdravljenja z ZINT ne uvajamo več. Edina izjema pri tem pravilu so lahko nekateri bolniki z endokrinološkimi iRAE, ki imajo uvedeno ustrezno nadomestno hormonsko zdravljenje. Pri obravnavi iRAE sicer sledimo

priporočilom o diagnostičnih postopkih in principih zdravljenja iRAE, ki so jih izoblikovala mednarodna strokovna združenja kot so ESMO (evropsko združenje za internistično onkologijo), ASCO (ameriško združenje za klinično onkologijo) SITC (mednarodno združenje za imunoterapijo raka) pa tudi še nekatera druga mednarodna specialistična združenja.

## Lieratura

1. Bai R, Lv Z, Xu D, Cui J: Predictive biomarkers for cancer immunotherapy with immune checkpoint inhibitors; <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00209-0>
2. Doroshow DB, Bhalla S, Beasley MB, Sholl LM: PD-L1 as a biomarker of response to immune- checkpoint inhibitors; *Nat Rev Clin Oncol* 18, 345–362 (2021).
3. Subbiah V, Solit DB, Chan TA, Kurzrock R: The FDA approval of pembrolizumab for adult and pediatric patients with tumor mutational burden (TMB) ‡10: a decision centered on empowering patients and their physicians; <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.07.002>
4. Yarchoan M, Hopkins A, Jaffee EM: Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition; *N Engl J Med* 2017;377:2500-01.
5. Chan T, Yarchoan M, Jaffee E, Swanton C: Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic; *Annals of Oncology* 30: 44–56, 2019
6. Maio M, Ascierto PA, Manzyuk L, Motola-Kuba D et al: Pembrolizumab in microsatellite instability high or mismatch repair deficient cancers: updated analysis from the phase II KEYNOTE-158 study; <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.05.519>
7. O'Malley DM; Giovanni Mendonca Bariani G; Cassier PA; Marabelle A et al: Pembrolizumab in Patients With Microsatellite Instability–High Advanced Endometrial Cancer: Results From the KEYNOTE-158 Study; treated, advanced MSI-H/dMMR endometrial cancer. *J Clin Oncol* 2022; 40:752-761.
8. Chennamadhavuni A, Abushahin L, Jin N, Presley CJ and Manne A (2022); Risk Factors and Biomarkers for Immune-Related Adverse Events: A Practical Guide to Identifying High-Risk Patients and Rechallenging Immune Checkpoint Inhibitors. *Front. Immunol.* 13:779691.
9. Haanen J, Obeid M, Spain L, Carbonnel F, Wang Y et al; Management of toxicities from immunotherapy: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2022 Dec;33(12):1217-1238
10. Postow MA, Sidlow R, Hellmann MD: Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *N Engl J Med* 2018;378:158-68
11. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v5.0; [https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic\\_applications/docs/ctcae\\_v5\\_quick\\_reference\\_5x7.pdf](https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/ctcae_v5_quick_reference_5x7.pdf)