

# IMUNOTERAPIJA PRI ZDRAVLJENJU GLIOBLASTOMA: KAKO DALEČ (ŠE) DO KLINIČNE UPORABE?

## IMMUNOTHERAPY IN THE TREATMENT OF GLIOBLASTOMA: HOW FAR (YET) TO CLINICAL USE?

AVTORICE / AUTHORS:

Lea Knez, dipl. biokem.<sup>1, 2</sup>

Eva Krivec, mag. bioteh.<sup>1, 3</sup>

asist. dr. Alja Zottel, mag. biokem.<sup>1</sup>

asist. dr. Neja Šamec, dipl. uni. biokem.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta,  
Medicinski center za molekularno biologijo,  
Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko,  
Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Univerza v Ljubljani,  
Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo,  
Večna pot 113, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta,  
Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: neja.samec@mf.uni-lj.si

### POVZETEK

Glioblastom je najpogostejši primarni maligni tumor možganov in hkrati tudi najbolj smrtonosna in agresivna oblika tumorja, ki se pojavlja v možganih. Povprečno preživetje bolnikov z glioblastomom je kljub prejetju standardne terapije le 12 do 15 mesecev. V zadnjih letih se kot napredna možnost zdravljenja glioblastoma pojavlja imunoterapija, ki je pri zdravljenju nekaterih drugih rakov doživela izjemen uspeh. Posebnost glioblastoma je visoka stopnja imunosupresije, ki je predvsem posledica povečanega izražanja PD-1, PD-L1, TGF- $\beta$  in metaloproteaz ter znižanega izražanja MHCI. Imunoterapevtski pristopi za zdravljenje glioblastoma, ki so prešli v tretjo fazo kliničnih preskušanj, so peptidna cepiva proti EGFRvIII, ki pa se na koncu niso izkazala kot najbolj uspešna. Podobno tudi celična terapija z dendritičnimi celicami in s citokini induciranimi celicami ubijalkami ter terapija z zaviralci imunskih kontrolnih točk (npr. nivolumab) ni prinesla zelenih rezultatov. Znanstveniki so za zdravljenje glioblastoma razvili tudi celice CAR-T, usmerjene proti HER2, IL-13Ra2 in EGFRvIII, a niso imele znatnega dolgotrajnega učinka na paciente. Prihodnost imunoterapije pri zdravljenju glioblastoma je predvsem v izboljšanju trenutnih terapij in kombinaciji več pristopov.

### KLJUČNE BESEDE:

CAR-T, glioblastom, imunoterapija, klinična raziskava

### ABSTRACT

Glioblastoma is the most common primary malignant brain tumor, and at the same time the most aggressive and deadliest form of tumor occurring in the brain. The average survival of patients with glioblastoma, despite receiving standard therapy, is only 12-15 months. In recent years, immunotherapy has emerged as an advanced treatment option for glioblastoma and has been extremely successful in treating some other cancers. A special feature of glioblastoma is a high level of immunosuppression, which is mainly due to increased expression of PD-1, PD-L1, TGF- $\beta$  and metalloproteases and decreased expression of MHCI. Immunotherapeutic approaches for the treatment of glioblastoma that have passed into the third phase of clinical trials are peptide vaccines



against EGFRvIII, which in the end did not prove to be the most successful. Similarly, cell therapy with dendritic cells and cytokine-induced killer cells and therapy with immune checkpoint inhibitors (eg nivolumab) did not produce the desired results. Scientists have also developed CAR-T-targeted HER2, IL-13R $\alpha$ 2, and EGFRvIII for the treatment of glioblastoma but they did not have a significant long-term effect on patients. The future of immunotherapy in the treatment of glioblastoma lies primarily in the improvement of current therapies and the combination of several approaches.

**KEY WORDS:**

CAR-T, clinical trials, glioblastoma, immunotherapy

# 1 UVOD

Glioblastom je najpogostejši primarni tumor centralnega živčnega sistema in je tudi eden izmed najbolj smrtonosnih rakov, saj petletno preživetje po diagnozi znaša le 5,5 %. Glioblastom je redek rak in se v Združenih državah Amerike pojavlja s pogostostjo 3,2 primera na 100.000 prebivalcev (1). Pogosteje se pojavlja pri starejši populaciji z mediano povprečne starosti 64 let (2). Po razdelitvi Svetovne zdravstvene organizacije glioblastom spada v četrto, najbolj maligno stopnjo gliomov. Vzrokov za nastanek gliomov v veliki meri ne poznamo. Med dejavnike tveganja sodijo izpostavljenost ionizirajočemu sevanju in nekateri redki družinski sindromi, kot je npr. Li-Fraumenijev sindrom (3). Prvi znaki bolezni so povezani predvsem z mestom tumorja in so lahko zelo jasni, kot je npr. izguba vida, spremembe pri sporazumevanju ali otrplost. Lahko pa so tudi blagi, npr. utrujenost, blage težave s spominom in motnje razpoloženja (2). Značilnosti tumorskih celic so netipična jedra, celični pleomorfizem, visoka mitotska aktivnost, nekroza in mikrovaskularna proliferacija (1). Zdravljenje bolnikov, mlajših od 70 let, obsega največjo možno odstranitev tumorja, radioterapijo in kemoterapijo s temozolomidom (2). Kljub zdravljenju večina bolnikov umre 15 mesecev po diagnozi (4). Neuspešnost klasične terapije je med drugim posledica izražanja proteinov, ki izločajo protitumorske učinkovine iz celice, in izražanje encima O-6-metilgvanin-DNA metiltransferaze (MGMT). Ta namreč odstrani poškodbe, ki jih je povzročil temozolomid. Poleg tega so v tumorju prisotne

tudi glioblastomske matične celice (5), ki so še posebno odporne na zdravljenje s temozolomidom in radioterapijo (4, 6). Za glioblastom je značilna tudi visoka stopnja heterogenosti tako znotraj tumorja kot tudi med tumorji različnih bolnikov, kar dodatno otežuje načrtovanje novih zdravil (4). Zaradi izjemno visoke stopnje smrtnosti bolnikov so nova, učinkovitejša zdravila nujno potrebna.

Eden izmed trenutno najbolj obetavnih načinov zdravljenja raka so imunoterapevtski pristopi, ki temeljijo na izboljšanju imunskega odziva telesa na tumor ali pa na ciljanju specifičnih tumorskih antigenov (7). Leta 2018 so raziskovalcema Jamesu Allisonu in Tasuku Honju podelili Nobelovo nagrado na področju imunoterapije, in sicer za odkritje zaviralcev imunskih kontrolnih točk (8, 9). Imunske kontrolne točke so namreč ključen del imunskega sistema, saj skrbijo za natančno uravnavanje imunskega odziva. Rakave celice med drugim izražajo tarče imunskih kontrolnih točk (10). S tem preprečijo njihovo prepoznavanje in odstranitev z naravnimi celicami ubijalkami oz. citotoksičnimi limfociti T ter tako zavrejo delovanje imunskega odziva. Prvi imunoterapevtik, ipilimumab, so odobrili leta 2011 za zdravljenje metastatskega melanoma. Kmalu zatem so odobrili več zdravil za zdravljenje različnih rakov, kot so npr. majhnocelični rak pljuč, nemajhnocelični rak pljuč in rak materničnega vratu (8). V tem članku bomo najprej na kratko opisali posebnosti imunskega sistema pri glioblastomu in predstavili imunoterapevtske pristope za njegovo zdravljenje, ki so se izkazali kot najbolj obetavni in so prešli v tretjo klinično fazo preskušanj. Nato bomo predstavili ostale obetajoče imunoterapevtske načine zdravljenja glioblastoma.

# 2 IMUNSKI SISTEM V GLIOBLASTOMU

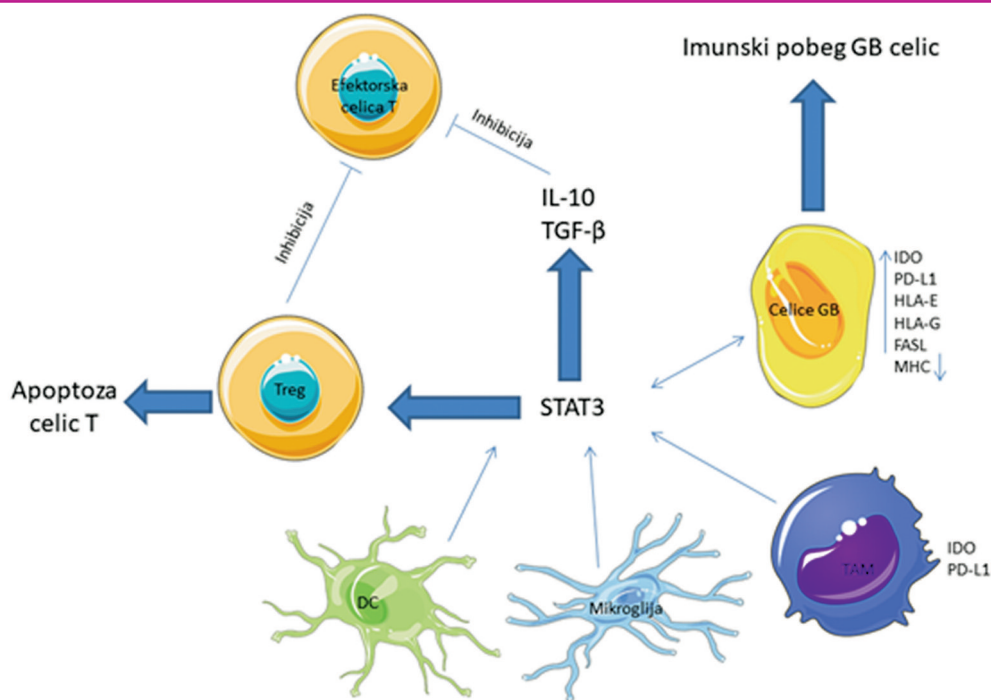
Dolgo časa je veljalo prepričanje, da je centralni živčni sistem organ v imunološkem mirovanju, ki ga vzdržujejo izključno celice mikroglije. Le-te pa pred vsemi interakcijami perifernega imunskega sistema ščiti krvno-možganska pregrada. V zadnjih dvajsetih letih so ugotovili, da se znotraj centralnega živčnega sistema prepletajo elementi prirojenega in pridobljenega imunskega sistema. Poleg tega je krvno-možganska pregrada pri poškodbah in vnetjih ter pri razvoju tumorjev propustna in tako dostopna imunskim celicam (11). Kot primer, aktivirani limfociti T, ki se nahajajo v vratnih bezgavkah, lahko prehajajo skozi krvno-možgansko pregrado in vstopijo iz limfnega sistema v centralni živčni sistem (12, 13).

Čeprav ima centralni živčni sistem edinstveni imunski mehanizem, je za glioblastom značilna visoka stopnja imunosupresije (slika 1). Na sliki so prikazani posamezni mehanizmi, ki v tumorju glioblastoma delujejo imunosupresivno. Fonseca je s sodelavci raziskoval zbiranje celic mikroglije in makrofagov v glioblastomu in dokazal, da mikroglija z uravnavanjem transformirajočega rastnega faktorja beta (TGF- $\beta$ ) preko stika s tumorskimi celicami spodbuja napredovanje tumorja (12, 14). Maligne glioblastomske celice izražajo in izločajo imunosupresivne dejavnike, kot so prostaglandini E2 in citokini (TGF- $\beta$  in IL-10), ki rekrutirajo regulatorne celice T, inhibirajo proliferacijo in aktivnost efektorskih celic T in antigen predstavitevni celic ter zavirajo zorenje dendritičnih celic (12, 13). V začetni fazi razvoja tumorja infiltracija regulatornih celic T z izražanjem ligandov imunskih kontrolnih točk, ki citotoksičnim limfocitom T preprečijo proliferacijo in sprostitvev imunsko aktiviranih citokinov, prispeva k zaščiti tumorja (11). S tumorjem povezani makrofagi (TAM M2), ki imajo imunosupresivni fenotip, izločajo faktorje, kot je npr. TGF- $\beta$ , in s tem zaustavijo citotoksične celice T ter rekrutirajo metaloproteazo MMP14. V pozitivni povratni zanki s tumorjem povezani makrofagi izločajo MMP14, ki stimulira tumorske ce-

lice, da pričnejo izločati MMP2 in MMP9, in s tem pospešijo uničenje zunajceličnega ogrodja in odstranitev apoptotičnih celice, kar oboje vodi k razširitvi tumorja (11).

Bloch je poročal, da makrofagi, izolirani iz periferne krvi bolnikov z glioblastomom, izražajo povišano raven liganda programirane celične smrti (PD-L1), ki aktivira receptor PD-1 in s tem omeji delovanje citotoksičnih limfocitov T (14, 15).

Celice glioblastoma se lahko z izražanjem receptorjev FASL, B7 in PD-L1 vežejo na negativne regulatorne faktorje imunskih funkcij in tako inhibirajo aktivnost citotoksičnih limfocitov T in spodbudijo »imunski pobeg« glioblastoma (16). Znižano izražanje klasičnih molekul pglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa (MHC) in prekomerno izražanje določenih neklasičnih molekul MHC (HLA-G, HLA-E) lahko inhibirata citotoksičnost citotoksičnih limfocitov T in citotoksičnost celic T, kar prav tako prispeva k imunskemu pobegu tumorja (12, 17). Središče imunskega pobega so med drugim tudi glioblastomske matične celice, saj predstavljajo samoobnavljajočo se populacijo tumorskih celic, ki so odgovorne za širjenje glioblastoma, angiogenezo, odpornost na kemo- oz. radioterapijo in imunsko slabljenje.



Slika je narejena s programom SMART – Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>) pod licenco Creative Commons Attribution 3.0 Unported License.

Slika 1: Imunski pobeg celic glioblastoma (GB).

Figure 1: Immune escape of glioblastoma (GB) cells.

Glioblastomske matične celice prispevajo k spremenjeni imunogenosti, zmanjšanemu izražanju kompleksa MHC I in ekspresiji PD-L1. Slednja sproži indukcijo T-celične anergije in prepreči imunski odgovor. Glioblastomske matične celice na svoji površini nimajo kostimulatornih molekul CD80 in CD86, ki sta potrebni za aktivacijo antigen specifičnih citotoksičnih limfocitov T (18, 19). Izločajo tudi TGF- $\beta$ , ki stimulira rast tumorja, galektin-3, ki sproži citotoksično T-celično apoptozo, in arginazo ter periostin, ki spodbujata diferenciacijo okoliških s tumorjem povezanih makrofagov M2. Z izločanjem vseh teh dejavnikov lahko glioblastomske matične celice usmerjajo in nadzorujejo svoje imunsko mikrookolje (11, 20).

## 3 IMUNOTERAPIJA PRI ZDRAVLJENJU GLIOBLASTOMA

### 3.1 KLINIČNE FAZE

Zdravila morajo prestati številna dolgotrajna in zahtevna preskušanja pred njihovo odobritvijo na trgu. Klinična preskušanja zdravil razdelimo v štiri faze (21–23). V prvi klinični fazi zdravilo testiramo na manjši skupini (do 100) zdravih posameznikov ali pa na rakavih bolnikih z napredujočo boleznijo, kjer določimo varen odmerek zdravila in identificiramo možne neželene učinke (21, 22). V drugi klinični fazi zdravilo testiramo na večjemu številu rakavih bolnikov (100 do 500) in določimo učinkovitost zdravila in dodatne neželene učinke (21, 22). V tretji klinični fazi, ki je običajno randomizirana, pa zdravilo testiramo na še večjem številu bolnikov (1000 do 5000), da določimo učinkovitost zdravila ter možne neželene učinke in nato uspešnost primerjamo z obstoječimi zdravljenji (21, 22). Četrta faza obsega ovrednotenje zdravila, ko je to že na trgu.

### 3.2 KLINIČNE RAZISKAVE V DRUGI IN TRETJI FAZI PRESKUŠANJA

V tretjo fazo kliničnih preskušanj za zdravljenje glioblastoma so prešli imunoterapevtski pristopi, kot so peptidna cepiva in cepiva iz dendritičnih celic, celična terapija ter inhibitorji imunskih kontrolnih točk (preglednica 1).

#### 3.2.1 Peptidna cepiva

Peptidna cepiva so lahko usmerjena proti enemu ali več antigenom. Peptidno cepivo, usmerjeno proti mutiranemu

receptorju za epidermalni rastni faktor (EGFR), NCT01480479, je sestavljeno iz 14 aminokislin dolgega neoplazemskega epitopa, vezanega na hemocianin iz morskih polžev, in granulocitne in monocitne kolonije spodbujajočega dejavnika. EGFR je namreč obetajoča tarča glioblastoma, saj je prekomerno izražen pri 34 do 63 % bolnikov. Od teh jih ima 25 do 64 % delež 801 baznih parov, ki zapisujejo 267 aminokislin zunanje domene receptorja, in jo označujemo z EGFRvIII. Mutacija povzroči konstitutivno aktivacijo receptorja, neodvisno od vezave liganda (24). Klinično raziskavo so izvedli na bolnikih s primarnim glioblastomom z izraženim EGFRvIII, ki so prejeli standardno zdravljenje (kirurško odstranitev tumorja ter radio- in kemoterapijo), pri čemer med zaključkom standardne terapije in začetkom imunoterapije bolezen ni napredovala. Raziskavo so predčasno prekinili, saj vmesna analiza rezultatov skupine bolnikov z minimalnim ostankom rakavih celic (*minimal residual disease*) ni pokazala razlike med smrtnostjo bolnikov v kontrolni skupini in bolnikov, ki so prejeli cepivo (25). Med razvojem in kliničnimi preskušnji so ugotovili, da ekspresija EGFRvIII ni stabilna, saj 50 % ponavljajočih se glioblastomskih tumorjev spontano preneha izražati EGFRvIII (26). Prav tako neuspešna je bila raziskava personaliziranega peptidnega cepiva, UMIN000006970, usmerjenega proti večjemu številu antigenov (dvem do štirim), izbranih na podlagi analize bolnikovih protiteles IgG (27). Kljub neuspešnosti teh raziskav so v trenutnem razvoju še drugi terapevtski pristopi, med drugimi celice CAR-T, mikrobná cepiva in protitelesa z vezanim toksinom, usmerjena proti EGFR ali EGFRvIII (28, 29).

#### 3.2.2 Celična terapija z dendritičnimi celicami

Dendritične celice so pomembna povezava med prirojenim in pridobljenim imunskim sistemom. Njihova vloga je zajetje, procesiranje in predstavitev potencialnih antigenov celicam T in z usmerjanjem diferenciacije naivnih celic T vplivajo na delovanje celične imunosti. Učinkovito cepivo iz dendritičnih celic sproži imunski odziv, pri katerem pride do eliminacije oz. inaktivacije regulatornih celic T, propada imunosupresivnega tumorskega okolja in aktivacije učinkovitih citotoksičnih limfocitov T in celic pomagalk (30). Raziskave tretjih kliničnih faz preskušanj dendritičnih celic za zdravljenje glioblastoma še niso zaključene. Na voljo so le vmesni rezultati oz. rezultati sekundarnega cilja raziskave NCT00045968. Med klinično raziskavo je 90 % vseh bolnikov, izbranih za sodelovanje, prejelo cepivo, zato rezultate primerjajo s preteklimi raziskavami in kliničnimi praksami. Mediana preživetja vseh bolnikov je bila

Preglednica 1: Seznam imunoterapij za zdravljenje glioblastoma v drugi in tretji klinični fazi.

Table 1: List of immunotherapies for glioblastoma treatment in the second and third phases of clinical trials.

IME IN OZNAKA KLINIČNIH RAZISKAV	FAZA KLINIČNE RAZISKAVE	BOLEZEN	ŠT. UDELEŽENCEV	TERAPIJA	KONTROLA	TARČA	REZULTAT
ACT IV NCT01480479	III	primarni GB EGFRvIII+	745	peptidno cepivo – rindopepimut/ GM- CSF + TMZ	TMZ + KHL	EGFRvIII	neuspešna
ITK-1 UMIN000006970	III	ponavljajoči se GB HLA-A24 pozitivni	78	peptidno cepivo ITK-1	placebo	različni tumorski antigeni	neuspešna
NCT00045968	III	primarni GB	331	cepivo DC z avtolognim tumorskim lizatom + TMZ	placebo +TMZ	različni tumorski antigeni	vmesni rezultati nakazujejo na izboljšanje preživetja
DEN-STEM NCT03548571	II/III	GB nemutiran IDH, MGMT- metiliran promotor	60	cepivo DC	ST	različni tumorski antigeni	ni podatka (v pridobivanju kandidatov)
ADCTA NCT04277221	III	ponavljajoči se GB	118	cepivo DC, bevacizumab kot ST	placebo, bevacizumab kot ST	različni tumorski antigeni	ni podatka (V pridobivanju kandidatov)
INNOCELL NCT00807027	III	primarni GB	180	CIK + ST	ST	tumor	izboljša preživetje brez napredovanja bolezni
CheckMate 143 NCT02017717	III	ponavljajoči se GB	626	nivolumab	bevacizumab	PD-1	neuspešna
CheckMate 498 NCT02617589	III	ponavljajoči se GB MGMT- nemetiliran	550	Radioterapija + nivolumab	ST	PD-1	neuspešna
CheckMate 548 NCT02667587	III	primarni GB MGMT metiliran promotor	693	nivolumab + ST	placebo + ST	PD-1	ne izboljša preživetja brez napredovanja bolezni, celokupno preživetje še testirajo

GB – glioblastom, ST – standardna terapija (temozolomid in radiacija), KHL – hemocianin iz morskih polžev (keyhole limpet hemocyanin), CIK – s citokini inducirani citotoksični limfociti T, EGFRvIII – epidermalni rastni faktor z delecijo 267 aminokisljin zunanje domene receptorja, GM-CSF – granulocitne in monocitne kolonije stimulirajoči faktor, TMZ – temozolomid, HLA-A24 – humani levkocitni antigen A24, DC – dendritične celice, MGMT – metil-gvanin metiltransferaza, IDH – izocitrat dehidrogenaza, PD-1 – receptor programirane celične smrti 1. Podatki za vse klinične raziskave, razen UMIN000006970, so pridobljeni s spletne strani [www.clinicaltrials.org](http://www.clinicaltrials.org) (dostop: junij 2020). Podatki za klinično raziskavo UMIN000006970 so pridobljeni na spletni strani <https://rctportal.niph.go.jp> (dostop: junij 2020).



23,1 meseca v primerjavi z od 15 do 17 mesecev pri kontrolnih bolnikih v preteklih kliničnih raziskavah in 34,7 mesecev v primeru bolnikov z metiliranim promotorjem MGMT (31). V statusu pridobivanja kandidatov sta še dve klinični raziskavi s cepivi iz dendritičnih celic. Pri klinični raziskavi NCT03548571 so bolnikove nezrele dendritične celice, pridobljene iz monocitov, transficirali z mRNA, ki so jo izolirali iz bolnikovih rakavih matičnih celic. Poleg bolnikovih dendritičnih celic, transficiranih z mRNA, so cepivu dodali tudi dendritične celice, transficirane z mRNA survivina in telomeraze (hTERT, *human telomerase reverse transcriptase*). Mediana preživetja dvajsetih bolnikov brez napredovanja bolezni, ki so prejeli cepivo z dendritičnimi celicami z mRNA rakavih matičnih celic, je bila v prvi in drugi klinični fazi (NCT00846456) 694 dni, v primerjavi s kontrolno skupino, kjer je bila mediana preživetja 236 dni. Tretja klinična faza NCT03548571 je namenjena bolnikom z glioblastomom divjega tipa in nemetiliranim promotorjem MGMT (32). Drugo cepivo (klinična raziskava NCT04277221) so pripravili iz avtolognih dendritičnih celic in avtolognih celic tumorja. Namenjeno je bilo bolnikom s ponavljajočim se glioblastomom. Cepivo so v fazi kliničnih preskušanj I/II preizkusili na 17 bolnikih s primarnim ali ponovnim glioblastomom, ki so prestali kirurško odstranitev tumorja, pri čemer so bolniki s primarnim glioblastomom po operaciji prejeli še radioterapijo. Za kontrolno skupino so služili predhodno obravnavani bolniki z glioblastomom, ki so prejeli standardno terapijo, in so se s preiskovano skupino ujeli po spolu in starosti. Glede na kontrolo se je mediana preživetja povečala s 380 dni na 520 dni za bolnike z glioblastomom, preživetje po treh letih se je povečalo s 3,2 % na 37,5 % bolnikov in 18,8 % bolnikov je živel več kot pet let po terapiji. Delež preživetja bolnikov kontrolne populacije po petih letih je bil 0 % (33).

### 3.2.3 Celična terapija s s citokini induciranimi celicami ubijalkami

Za zdravljenje glioblastoma so testirali tudi celično terapijo (klinična raziskava NCT00807027), pri kateri so uporabili s citokini inducirane celice ubijalke (CIK, *cytokine induced killer cells*). To so od poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa neodvisni citotoksični limfociti T, pridobljeni iz perifernih monocitov bolnikov, ki so gojeni *in vitro* z dodatkom interleukina 2 in protitelesa proti CD3. Terapijo so preizkusili na bolnikih s primarnim glioblastomom. Rezultati so pokazali, da terapija ni izboljšala celokupnega preživetja bolnikov v primerjavi s kontrolno skupino, izboljšala pa je preživetje brez napredovanja bolezni (34).

### 3.2.4 Zaviralci imunskih kontrolnih točk

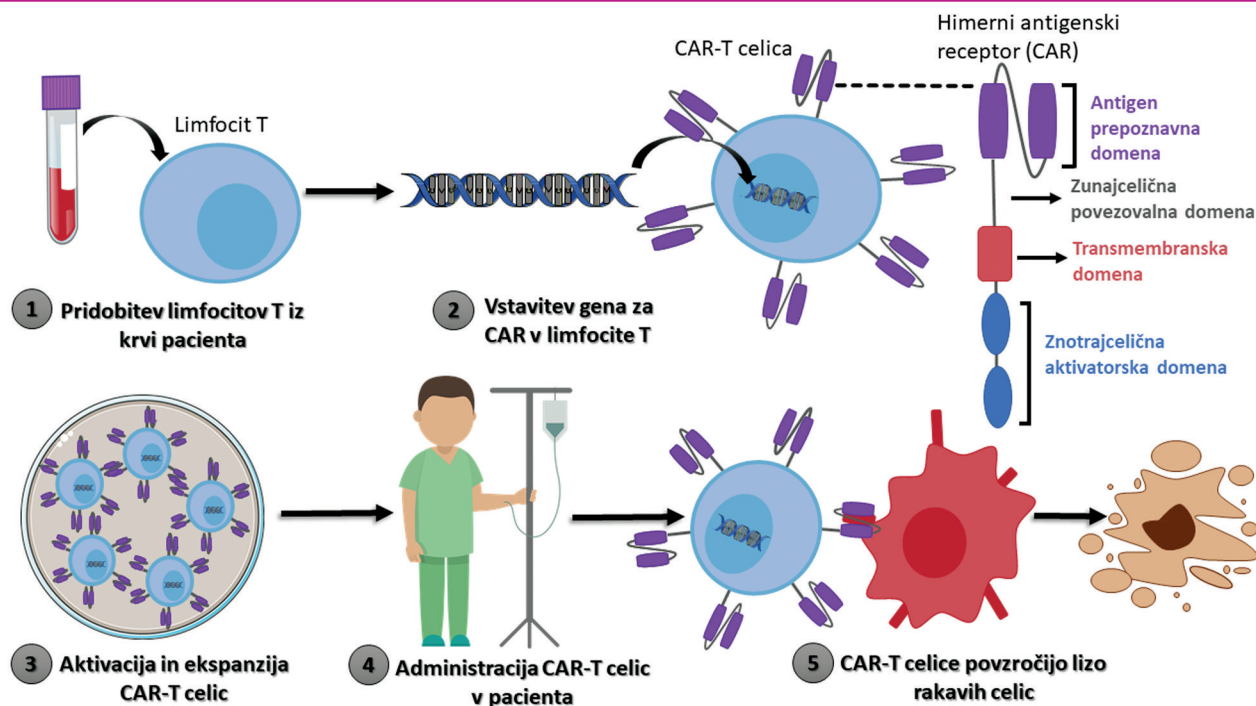
Zaviralci imunskih kontrolnih točk so najpogosteje protitelesa, ki se vežejo na specifične receptorje ali ligande kontrolnih točk z namenom prekinitve zaviralnih signalov. Za glioblastom je značilno izražanje liganda PD-L1 v različnem obsegu. Dokazali so nadizražanje PD-L1 pri 88 % bolnikov s primarnim glioblastomom in 72,2 % bolnikov s ponavljajočim se glioblastomom (35). V klinični raziskavi NCT02017717 so primerjali učinkovitost nivolumaba v primerjavi z bevacizumabom. Razlik v celokupnem preživetju med skupinama bolnikov ni bilo (36). Nivolumab klinično preskušajo tudi pri bolnikih z nemetiliranim promotorjem MGMT, ki so manj odzivni na zdravljenje s temozolomidom. V raziskavi NCT02617589 bodo primerjali celokupno preživetje bolnikov, ki bodo poleg radioterapije prejeli nivolumab, in bolnikov, ki bodo poleg radioterapije prejeli temozolomid. Prav tako poteka raziskava, kjer nivolumab preskušajo na bolnikih s primarnim glioblastomom in metiliranim promotorjem MGMT.

## 4 TERAPIJA S T-CELICAMI S HIMERNIMI RECEPTORJI ZA TUMORSKE ANTIGENE ZA ZDRAVLJENJE GLIOBLASTOMA

Eden izmed najbolj obetavnih imunoterapevtskih pristopov v zadnjih letih je terapija z modificiranimi celicami T, ki izražajo himerne receptorje za tumorske antigene (CAR, *chimeric antigen receptor*). Celična terapija CAR-T je razmeroma nova terapija v onkologiji, ki pa je že splošno priznana za zdravljenje B-celičnega limfoma in levkemije (37).

Avtologne celice T iz bolnikov lahko z genskim inženirstvom modificiramo tako, da izražajo himerne receptorje – CAR za tumorske antigene. Uspešno modificirane celice po ekspanziji vnesemo nazaj v bolnika, kjer povzročajo tarčno uničenje tumorskih celic, ki izražajo specifičen antigen (slika 2). Na sliki je prikazan način uporabe celic CAR-T pri bolniku in sestava receptorja CAR.

CAR so fuzijski proteini, sestavljeni iz zunajcelične domene, ki specifično veže tarčno molekulo, izraženo na površini tumorskih celic, zunajcelične povezovalne in transmembranske domene ter znotrajcelične aktivatorske domene, ki omogoča aktivacijo limfocitov T (slika 2). Zunajcelična domena je v večini primerov antigen prepoznavni enoveržni variabilni fragment protitelesa (scFv), znotrajcelična pa  $\zeta$ -veriga T-celičnega receptorja CD3. Glavna prednost tehnologije CAR-T je ravno modularnost, saj omogoča za-



Slika je narejena s programom SMART – Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>) pod licenco Creative Commons Attribution 3.0 Unported License.

Slika 2: Potek celične terapije CAR-T in sestava CAR.   
 Figure 2: The course of CAR-T cell therapy and the composition of CAR.

menjive in strukturno različne možnosti za vsako funkcionalno domeno ter posledično izgradnjo raznovrstnih receptorjev z različnimi strukturnimi lastnostmi in specifičnostmi za antigene. Novejše generacije receptorjev vsebujejo tudi znotrajcelične kostimulacijske domene iz receptorjev CD28 in 4-1BB, ki ojačajo aktivacijo limfocitov T. Posledično ob vezavi antigena na zunajcelično domeno pride do povečane produkcije citokinov, proliferacije in diferenciacije ter obstojnosti celic T, kar še izboljša delovanje terapije (38). Učinkovitost in uspešnost tehnologije CAR-T temelji na tem, da zaobide dva ključna koraka, ki sta sicer nujno potrebna za aktivacijo pridobljenega imunskega odziva: potrebo po predstavitvi antigenov v kontekstu molekul poglobitvenega histokompatibilnostnega kompleksa in potrebo po kostimulacijskih signalih (14, 37). Antigen prepoznavne domene dajejo celicam CAR-T specifičnost za antigene, ki se pogosto izražajo v tumorskih celicah. Tumorski antigeni, ki so doslej najbolj raziskani kot možne tarče CAR za zdravljenje glioblastoma, so IL-13Ra2 (receptor za interleukin-13 z alfa 2-verigo), EGFRvIII in HER2 (receptor človeškega epidermalnega ravnega de-

javnika 2) (14, 37). Povečano izražanje IL-13Ra2 spodbuja napredovanje tumorja in poveča stopnjo malignosti, zato je receptor tudi negativni prognostični indikator bolezni (39). V prvi klinični fazi, kjer so preskušali varnost in učinkovitost celične terapije CAR-T za IL-13Ra2, so odkrili, da je terapija varna in da obstaja le majhno tveganje za sicer pogoste zaplete tovrstnih terapij, kot je sindrom sproščanja citokinov (40, 41). Pri enem od treh testiranih bolnikov je prišlo do regresije tumorja in povečane koncentracije citokinov v cerebrospinalni tekočini, a se je po 7,5 mesecih tumor ponovno pojavil (40, 42). Najbolj raziskan tumor specifični antigen je EGFRvIII (43). Raziskave infiltracije celic CAR-T v tumorsko tkivo pri desetih bolnikih, so pokazale, da je pri večini bolnikov prišlo do zmanjšanja izražanja EGFRvIII v odstranjenih tumorjih po enkratni periferni infuziji EGFRvIII celic CAR-T. Pri nobenem bolniku ni prišlo do recesije tumorja, kljub temu pa je potrebno poudariti, da je bila to skupina s sicer slabo prognozo (44). Tirozin-kinazni receptor HER2, ki je povečano izražen pri določenih oblikah glioblastoma, je potencialna tarča celic CAR-T (45). Periferna infuzija celic HER2 CAR-T je pokazala relativno

varnost te metode tako kot tudi obstojnost celic CAR-T skozi čas (meritve so bile opravljene v časovnem obdobju enega leta). Sedmim od 16 bolnikov se je bolezen stabilizirala za obdobje osmih tednov do 29 mesecev, pri enem bolniku je prišlo do delne regresije tumorja (46).

Rezultati prvih kliničnih raziskav s celicami CAR-T dokazujejo, da je terapija varna, poleg tega pa se modificirane celice T lahko infiltrirajo v glioblastomsko tkivo, kjer so obstojne in se aktivirajo, in pri enem bolniku so celo odstranile precejšnjo količino malignega tkiva (14, 40). Kljub temu pa je bilo pri številnih raziskavah očitno, da imajo terapije, ki vključujejo samo celice CAR-T, nezadostno protitumorsko aktivnost. Natančni vzroki ostajajo še neznani, predpostavljajo pa, da ciljanje samo enega antigena pri zelo heterogenem tumorju, kot je glioblastom, ni zadostno za odstranitev vseh rakavih celic. To teorijo potrjuje tudi dejstvo, da so bili najboljši rezultati terapije CAR-T doseženi pri rakah, ki so zelo klonalni, kot so levkemije in limfomi. Zato bo v prihodnjih kliničnih raziskavah potrebno preiskati učinke terapije CAR-T, ki ciljajo na več različnih tumorskih antigenov hkrati (14, 37, 47). Trivalentne celice CAR-T, ki ciljajo tri pogoste glioblastomske antigene (HER2, IL-13R $\alpha$ 2, EphA2) so že zasnovane (48). Eden izmed glavnih razlogov za nepopolno učinkovitost terapije bi lahko bil ta, da do sedaj ustvarjene celice CAR-T ne prepoznajo in posledično ne uničijo glioblastomskih matičnih celic, ki lahko nato povzročijo ponovitev bolezni (49). V drugih raziskavah so ugotovili, da so celice CAR-T, ki ciljajo na IL13R $\alpha$ 2, HER2 in EGFRvIII, sposobne odpraviti diferencirane celice glioblastoma in glioblastomske matične celice, kar kaže, da citotoksičnost, ki jo posreduje CAR ni odvisna od matičnosti celic glioblastoma (45, 50–52). Vendar se kljub temu raziskave osredotočajo tudi na celice CAR-T, usmerjene proti antigenom, ki so specifični za glioblastomske matične celice. Eden izmed takih markerjev je transmembranski glikoprotein CD133, pri katerem so CD133-CAR-T pokazale spodbudne rezultate v predkliničnih raziskavah (49). T-celice CD133-CAR so pokazale predklinično citotoksičnost proti glioblastomskim matičnim celicam, pridobljenim iz bolnikov, pa tudi protitumorski odziv pri bolnikih s tumorji v jetrih, trebušni slinavki in debelem črevesu. Vendar pa se CD133 izraža tudi v nevralnih matičnih celicah, s čimer se porajajo varnostni pomisleki pri uporabi CD133-CAR za bolnike z glioblastomom (51, 53).

Raziskujejo tudi učinek dodatnih modifikacij celic CAR-T s sistemom CRISPR/Cas9, kjer bi z delecijo genov, kot je diacylglicerol-kinaza (DGK), dosegli manjšo občutljivost celic CAR-T na imunosupresivne učinke tumorskega mikrookolja (54). Pristopi za izboljšanje učinkovitosti celic CAR-T vklju-

čujejo tudi kombinirane terapije z zaviralci imunskih kontrolnih točk (55). Trenutno potekajo prve klinične raziskave, ki kombinirajo celice EGFRvIII-CAR-T s protitelesom pembrolizumab in IL-13R $\alpha$ 2-CAR-T celice s protitelesoma ipilimumab ter nivolumab.

## 5 ZAKLJUČEK

Pri bolnikih z glioblastomom je zaradi visoke stopnje umrljivosti kljub zdravljenju s standardno terapijo še vedno potreba po iznajdbi učinkovitejšega zdravila. Kljub imunosupresivnemu mikrookolju glioblastoma in prekomernemu izražanju nekaterih antigenov je imunoterapija veljala za obetaven način zdravljenja glioblastoma. Prvi imunoterapevtski pristop je temeljil na ciljanju specifičnih tumorskih antigenov (npr. peptidno cepivo, usmerjeno proti EGFRvIII). Slabost teh cepiv je predvsem, da tumorske celice pogosto nehajo izražati tarčni antigen. Poleg tega so se tudi personalizirana peptidna cepiva, usmerjena proti večjemu številu antigenov, izkazala kot neuspešna.

Drugi pristop temelji na izboljšanju imunskega odziva na tumor, saj glioblastom deluje na svoje okolje imunosupresivno. Največji uspeh zaključenih kliničnih preskušanj v tretji fazi je izboljšanje preživetja bolnikov s primarnim glioblastomom brez napredovanja bolezni pri uporabi celične terapije s s citokini induciranimi citotoksičnimi limfociti T, vendar se celokupno preživetje glede na kontrolno skupino ni podaljšalo. Na odgovor, kako uspešna so cepiva iz dendritičnih celic, je potrebno počakati na zaključek tretje faze kliničnih preskušanj.

Pri pregledu imunoterapij, ki so v tretji klinični fazi, zaključujemo, da trenutno nobena ni uspešno prestala tretje klinične faze in imela dolgotrajnega učinka na preživetje. Zato je poleg izboljšave obstoječih imunoterapij nujno tudi iskanje novih pristopov, kot je npr. terapija z modificiranimi celicami T (CAR-T). Prvi rezultati kažejo, da je terapija uspešna predvsem pri rakah z visoko stopnjo klonalnosti, kot sta levkemija in B celični limfom. Pri glioblastomu, za katerega je značilna visoka stopnja heterogenosti, ciljanje samo enega antigena ni zadostno, zato je pomembno snovanje večvalentnih celic CAR-T, ki bi ciljale različne tumorske antigene hkrati. Raziskujejo tudi modifikacije celic CAR-T in kombinacije terapij, npr. zaviralci imunskih kontrolnih točk skupaj s celicami CAR-T. Poleg kombiniranja različnih terapij bo v prihodnje potrebno iskanje novih tumorsko spe-



cifičnih antigenov in napovednih bioloških označevalcev, kot so mutacijsko breme tumorja in neoantigenski odtis, ki bi lahko predstavljali učinkovite tarče za imunoterapijo.

## 6 IZJAVA

Pregledni članek je rezultat sodelovanja Medicinskega centra za molekularno biologijo, MF UL, v programu Interreg Volunteer Youth v sklopu projekta Interreg EC 2014-2020, ref. št. 146, okrajšava: TRANS-GLIOMA, ter raziskovalnega projekta Z3-2649, programa P1-0390 in programa Mladih raziskovalcev, financiranih s strani ARRS.

## 7 LITERATURA

- Geraldo LHM, Garcia C, da Fonseca ACC, Dubois LGF, de Sampaio ESTCL, Matias D, et al. Glioblastoma Therapy in the Age of Molecular Medicine. *Trends Cancer*. 2019;5(1):46-65.
- Alexander BM, Cloughesy TF. Adult Glioblastoma. *J Clin Oncol*. 2017;35(21):2402-9.
- Weller M, Wick W, Aldape K, Brada M, Berger M, Pfister SM, et al. Glioma. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15017.
- Zanders ED, Svensson F, Bailey DS. Therapy for glioblastoma: is it working? *Drug Discov Today*. 2019;24(5):1193-201.
- Fellner S, Bauer B, Miller DS, Schaffrik M, Fankhanel M, Spruss T, et al. Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo. *J Clin Invest*. 2002;110(9):1309-18.
- Seymour T, Nowak A, Kakulas F. Targeting Aggressive Cancer Stem Cells in Glioblastoma. *Front Oncol*. 2015;5:159.
- Ampie L, Woolf EC, Dardis C. Immunotherapeutic advancements for glioblastoma. *Front Oncol*. 2015;5:12.
- Shahid K, Khalife M, Dabney R, Phan AT. Immunotherapy and targeted therapy-the new roadmap in cancer treatment. *Ann Transl Med*. 2019;7(20):595.
- Huang PW, Chang JW. Immune checkpoint inhibitors win the 2018 Nobel Prize. *Biomed J*. 2019;42(5):299-306.
- Cesano A, Warren S. Bringing the next Generation of Immunology Biomarkers to the Clinic. *Biomedicine*. 2018;6(1).
- Wilcox JA, Ramakrishna R, Magge R. Immunotherapy in Glioblastoma. *World neurosurgery*. 2018;116:518-28.
- Kong Z, Wang Y, Ma W. Vaccination in the immunotherapy of glioblastoma. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2018;14(2):255-68.
- Candeias SM, Gajpl US. The Immune System in Cancer Prevention, Development and Therapy. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2016;16(1):101-7.
- Lim M, Xia Y, Bettegowda C, Weller M. Current state of immunotherapy for glioblastoma. *Nature reviews Clinical oncology*. 2018;15(7):422-42.
- Bloch O, Crane CA, Kaur R, Safaee M, Rutkowski MJ, Parsa AT. Gliomas promote immunosuppression through induction of B7-H1 expression in tumor-associated macrophages. *Clin Cancer Res*. 2013;19(12):3165-75.
- De Felice F, Musio D, Cassese R, Gravina GL, Tombolini V. New Approaches in Glioblastoma Multiforme: The Potential Role of Immune-check Point Inhibitors. *Current cancer drug targets*. 2017;17(3):282-9.
- Kren L, Slaby O, Muckova K, Lzicarova E, Sova M, Vybihal V, et al. Expression of immune-modulatory molecules HLA-G and HLA-E by tumor cells in glioblastomas: an unexpected prognostic significance? *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology*. 2011;31(2):129-34.
- Lottaz C, Beier D, Meyer K, Kumar P, Hermann A, Schwarz J, et al. Transcriptional profiles of CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cell lines suggest different cells of origin. *Cancer research*. 2010;70(5):2030-40.
- Wei J, Barr J, Kong LY, Wang Y, Wu A, Sharma AK, et al. Glioma-associated cancer-initiating cells induce immunosuppression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(2):461-73.
- Wu A, Wei J, Kong LY, Wang Y, Priebe W, Qiao W, et al. Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *Neuro-oncology*. 2010;12(11):1113-25.
- Griffiths G. *Clinical trials in oncology. Medicine*. 2020;48(2):128-31.
- Portier WS. *Cancer Clinical Trials: Implications for Oncology Nurses. Semin Oncol Nurs*. 2020;36(2):150998.
- Verweij J, Hendriks HR, Zwierzina H, Cancer Drug Development F. *Innovation in oncology clinical trial design. Cancer Treat Rev*. 2019;74:15-20.
- Gan HK, Cvrjjevic AN, Johns TG. The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered. *The FEBS journal*. 2013;280(21):5350-70.
- Weller M, Butowski N, Tran DD, Recht LD, Lim M, Hirte H, et al. Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(10):1373-85.
- van den Bent MJ, Gao Y, Kerkhof M, Kros JM, Gorlia T, van Zwieten K, et al. Changes in the EGFR amplification and EGFRvIII expression between paired primary and recurrent glioblastomas. *Neuro-oncology*. 2015;17(7):935-41.
- Terasaki M, Narita Y, Arakawa Y, Sugiyama K, Aoki T, Kanamori M, et al. Randomized, double-blind, phase III trial of a personalized peptide vaccination for human leukocyte antigen-A24-positive glioblastoma multiforme patients refractory to temozolomide-based therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(15\_suppl):2000-.
- Chandramohan V, Bao X, Yu X, Parker S, McDowell C, Yu YR, et al. Improved efficacy against malignant brain tumors with EGFRwt/EGFRvIII targeting immunotoxin and checkpoint inhibitor combinations. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):142.
- Zebertavage L, Bambina S, Shugart J, Alice A, Zens KD, Lauer P, et al. A microbial-based cancer vaccine for induction of EGFRvIII-specific CD8+ T cells and anti-tumor immunity. *PLoS one*. 2019;14(1):e0209153.
- Palucka K, Banchereau J, Mellman I. Designing vaccines based on biology of human dendritic cell subsets. *NIH Public Access*; 2010. p. 464-78.
- Liau LM, Ashkan K, Tran DD, Campian JL, Trusheim JE, Cobbs CS, et al. First results on survival from a large Phase 3 clinical



- trial of an autologous dendritic cell vaccine in newly diagnosed glioblastoma. *Journal of translational medicine*. 2018;16(1):1-1.
32. Vik-Mo EO, Nyakas M, Mikkelsen BV, Moe MC, Due-Tønnesen P, Suso EMI, et al. Therapeutic vaccination against autologous cancer stem cells with mRNA-transfected dendritic cells in patients with glioblastoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2013;62(9):1499-509.
  33. Chang CN, Huang YC, Yang DM, Kikuta K, Wei KJ, Kubota T, et al. A phase I/II clinical trial investigating the adverse and therapeutic effects of a postoperative autologous dendritic cell tumor vaccine in patients with malignant glioma. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2011;18(8):1048-54.
  34. Kong DS, Nam DH, Kang SH, Lee JW, Chang JH, Kim JH, et al. Phase III randomized trial of autologous cytokine-induced killer cell immunotherapy for newly diagnosed glioblastoma in Korea. *Oncotarget*. 2017;8(4):7003-13.
  35. Berghoff AS, Kiesel B, Widhalm G, Rajky O, Ricken G, Wöhrer A, et al. Programmed death ligand 1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes in glioblastoma. *Neuro-oncology*. 2015;17(8):1064-75.
  36. Reardon DA, Brandes AA, Omuro A, Mulholland P, Lim M, Wick A, et al. Effect of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: The CheckMate 143 Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA oncology*. 2020.
  37. McGranahan T, Therkelsen KE, Ahmad S, Nagpal S. Current State of Immunotherapy for Treatment of Glioblastoma. *Current treatment options in oncology*. 2019;20(3):24.
  38. Chang ZL, Chen YY. CARs: Synthetic Immunoreceptors for Cancer Therapy and Beyond. *Trends in molecular medicine*. 2017;23(5):430-50.
  39. Thaci B, Brown CE, Binello E, Werbaneth K, Sampath P, Sengupta S. Significance of interleukin-13 receptor alpha 2-targeted glioblastoma therapy. *Neuro-oncology*. 2014;16(10):1304-12.
  40. Brown CE, Alizadeh D, Starr R, Weng L, Wagner JR, Naranjo A, et al. Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *The New England journal of medicine*. 2016;375(26):2561-9.
  41. Neelapu SS, Tummala S, Kebriaei P, Wierda W, Gutierrez C, Locke FL, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy - assessment and management of toxicities. *Nature reviews Clinical oncology*. 2018;15(1):47-62.
  42. Brown CE, Badie B, Barish ME, Weng L, Ostberg JR, Chang WC, et al. Bioactivity and Safety of IL13Ralpha2-Redirected Chimeric Antigen Receptor CD8+ T Cells in Patients with Recurrent Glioblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015;21(18):4062-72.
  43. Rutkowska A, Stoczynska-Fidelus E, Janik K, Włodarczyk A, Rieske P. EGFR(vIII): An Oncogene with Ambiguous Role. *Journal of oncology*. 2019;2019:1092587.
  44. O'Rourke DM, Nasrallah MP, Desai A, Melenhorst JJ, Mansfield K, Morrissette JJD, et al. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Sci Transl Med*. 2017;9(399).
  45. Ahmed N, Salsman VS, Kew Y, Shaffer D, Powell S, Zhang YJ, et al. HER2-specific T cells target primary glioblastoma stem cells and induce regression of autologous experimental tumors. *Clin Cancer Res*. 2010;16(2):474-85.
  46. Ahmed N, Brawley V, Hegde M, Bielskiowicz K, Kalra M, Landi D, et al. HER2-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified Virus-Specific T Cells for Progressive Glioblastoma: A Phase 1 Dose-Escalation Trial. *JAMA Oncol*. 2017;3(8):1094-101.
  47. Weenink B, French PJ, Sillevs Smitt PAE, Debets R, Geurts M. Immunotherapy in Glioblastoma: Current Shortcomings and Future Perspectives. *Cancers*. 2020;12(3).
  48. Donovan LK, Delaidelli A, Joseph SK, Bielskiowicz K, Fousek K, Holgado BL, et al. Locoregional delivery of CAR T cells to the cerebrospinal fluid for treatment of metastatic medulloblastoma and ependymoma. *Nature medicine*. 2020;26(5):720-31.
  49. Vora P, Venugopal C, Salim SK, Tatari N, Bakhshinyan D, Singh M, et al. The Rational Development of CD133-Targeting Immunotherapies for Glioblastoma. *Cell Stem Cell*. 2020;26(6):832-44 e6.
  50. Brown CE, Starr R, Aguilar B, Shami AF, Martinez C, D'Apuzzo M, et al. Stem-like tumor-initiating cells isolated from IL13Ralpha2 expressing gliomas are targeted and killed by IL13-zetakine-redirected T Cells. *Clin Cancer Res*. 2012;18(8):2199-209.
  51. Akhavan D, Alizadeh D, Wang D, Weist MR, Shepphird JK, Brown CE. CAR T cells for brain tumors: Lessons learned and road ahead. *Immunol Rev*. 2019;290(1):60-84.
  52. Morgan RA, Johnson LA, Davis JL, Zheng Z, Woolard KD, Reap EA, et al. Recognition of glioma stem cells by genetically modified T cells targeting EGFRvIII and development of adoptive cell therapy for glioma. *Hum Gene Ther*. 2012;23(10):1043-53.
  53. Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med*. 2005;353(8):811-22.
  54. Jung IY, Kim YY, Yu HS, Lee M, Kim S, Lee J. CRISPR/Cas9-Mediated Knockout of DGK Improves Antitumor Activities of Human T Cells. *Cancer research*. 2018;78(16):4692-703.
  55. Morales-Kastresana A, Labiano S, Quejglas JI, Melero I. Better performance of CARs deprived of the PD-1 brake. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19(20):5546-8.