

# Inovativne terapije melanoma - pregled i perspektive

---

**Radatović, Tomislav**

**Professional thesis / Završni specijalistički**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:402057>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-17**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Tomislav Radatović

INOVATIVNE TERAPIJE MELANOMA-PREGLED I  
PERSPEKTIVE

Specijalistički rad

Zagreb, 2020

Poslijediplomski specijalistički studij Razvoj lijekova

Mentor rada: izv.prof. dr.sci. Gordana Maravić Vlahoviček

Specijalistički rad obranjen je dana 11. veljače 2020.godine u Zagrebu, na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu pred povjerenstvom u sastavu:

1. izv.prof.dr.sc. Zrinka Rajić

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

2. izv.prof.dr.sc. Gordana Maravić Vlahoviček

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

3. akademkinja Mirna Šitum

Rad ima 117 listova

## PREDGOVOR

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom izv.prof.dr.sci. Gordane Maravić Vlahoviček.

Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici Gordani Maravić Vlahoviček na pruženoj pomoći, posvećenom vremenu i konstruktivnim savjetima tijekom pisanja ovog rada.

## SAŽETAK

Tema specijalističkog rada je aktualna, važna i korisna obzirom da se bavi problematikom liječenja melanoma, bolesti koja se sve više širi kako u svijetu tako i u Republici Hrvatskoj.

Cilj ovog specijalističkog rada je opisati značajke inovativnih terapija usvojenih u liječenju melanoma te dati prikaz glavnih težišta razvoja novih protokola u liječenju melanoma s naglaskom na imunoterapiju i ciljanu terapiju. Dodatni cilj je i definirati faktore koji su ključni u donošenju odluka o usvajanju inovativnih terapija melanoma u javnozdravstveni sustav u Republici Hrvatskoj. Postavljene su hipoteze da inovativne terapije melanoma pružaju efikasnije metode liječenja melanoma od klasičnih terapija te da opisani faktori učinkovitosti pružaju objektivan dokaz o unaprijeđenju krajnjih ishoda liječenja.

Kao materijal za izradu ovog specijalističkog rada korištena je relevantna znanstvena literatura novijeg datuma u širokom opsegu, koja daje pregled patologije i epidemiologije melanoma te pregled razvoja inovativnih lijekova i terapija melanoma koji su uvedeni u uporabu ili su u razvoju. Problematika specijalističkog rada je opisana i raspravljana temeljem uvida u najnovije spoznaje iz predmetnog područja.

Rezultati ovog rada pokazuju da uvođenjem inovativnih lijekova i metoda liječenja u terapiji melanoma postignut veliki napredak koji je rezultirao produljenjem života pacijenata. Velika prepreka široj dostupnosti inovativnih lijekova/terapija je njihova visoka cijena. Statistički dobivene vrijednosti kao terapijski odaziv, razdoblje do pogoršanja bolesti i prosječno doživljenje, pružaju relevantan dokaz o njihovoj učinkovitosti pa su kao takvi važan argument u raspravi oko potrebe uvođenja ovih lijekova i terapija u Republici Hrvatskoj.

Zaključak je da inovativne terapije melanoma uključuju korištenje monoklonskih protutijela u mono- i kombiniranim terapijama, lijekove koji ciljano djeluju na točno određena mjesta u stanici melanoma i/ili u stanici imunološkog sustava u mono- i kombiniranim terapijama te terapiju genetički modificiranim onkolitičkim virusom.

Uz odobrene lijekove i terapije trenutno su u fazi razvoja ili odobravanja i drugi lijekovi i oblici terapija od kojih su najznačajnija terapija tumor infiltrirajućim limfocitima i genska terapija.

Inovativne terapije melanoma pokazale su znatan napredak u učinkovitosti u odnosu na klasične oblike liječenja što je podiglo standard liječenja melanoma.

Vrijednosti terapijskoga odgovora, preživljenje bez progresije bolesti i prosječno preživljenje pružaju objektivan dokaz o unaprijeđenju terapije melanoma uvođenjem novih, inovativnih oblika liječenja.

## SUMMARY

Thesis of this specialist work is actual, important and useful because it deals with issues regarding melanoma therapy, disease that is gaining in prevalence worldwide and in Republic of Croatia.

The aim of this work is to describe characteristics of innovative therapies already adopted in melanoma treatment protocols and to give the insight into main melanoma development protocols with the emphasis on immunotherapies and targeted therapies. Additional goal is to define key factors that will help contribute to making positive decisions about introducing innovative melanoma treatments in regular use in Republic of Croatia. This work hypothesize that innovative melanoma treatments show increased efficiency of compared with classical approach and that described effectiveness factors provide objective proof for improvement of final treatment outcomes.

Relevant scientific literature of novel date and broad overview of melanoma pathology and epidemiology, overview of melanoma innovative drugs and therapies in use or in research was used in the preparation of this specialist thesis. This specialist thesis is described and discussed by taking an insight into newest scientific knowledge of subject area.

Results of this specialist work are showing that introduction of innovative drugs and therapies in melanoma therapy results in great advance-ments and promotes patients' life expectancy. However, high price of these drugs and therapies presents a great obstacle for a broader usage. Statistically achieved values such as therapeutic response, proggression-free survival and overall survival are providing relevant proof of benefit of use of innovative drugs and therapies in melanoma treatments. These values therefore represent valuable arguments in debates about introduction of advanced therapies in regular use in Republic of Croatia's health system.

In conclusion, innovative melanoma therapies include the use of monoclonal antibodies in mono- and combined therapies, drugs that specifically target certain points in melanoma cells and/or in immune system cells in mono-and combined therapies and oncolytic virus therapies.

With numerous innovative drugs and therapies already in use, there are many others in research phase or approval phase. Among these, most significant are tumor infiltrating lymphocytes and gene therapies. The use of innovative melanoma therapies has shown significant advancement in terms of efficiency compared to established melanoma treatments. As a consequence, standards of melanoma medications are set on a higher scale. Therapeutic

response, progression-free survival and overall survival are providing objective proof of melanoma treatments improvements by use of innovative drugs and therapies.

## Sadržaj

1.	Uvod i pregled područja istraživanja .....	1
1.1.	Melanom .....	4
1.2.	Definicija .....	4
1.3.	Epidemiologija .....	4
1.4.	Patogeneza.....	5
1.5.	Klinička slika melanoma .....	8
1.6.	Liječenje malignog melanoma .....	13
2.	Cilj istraživanja .....	15
3.	Materijali i metode .....	17
4.	Rasprava.....	19
4.1.	Inovativne terapije melanoma uvod .....	20
4.2.	Terapije monoklonskim protutijelima .....	22
4.2.1.	Ipilimumab .....	27
4.2.2.	Nivolumab .....	34
4.2.3.	Pembrolizumab .....	39
4.3.	Ciljane terapije melanoma .....	41
4.3.1.	MAPK/ERK signalni put .....	43
4.3.2.	Vemurafenib .....	45
4.3.3.	Dabrafenib .....	48
4.3.4.	Trametinib .....	49
4.3.5.	Cobimetinib .....	52
4.3.6.	Encorafenib.....	54
4.3.7.	Binimetinib.....	55
4.4.	Adoptivna terapija stanicama T-limfocita .....	57



4.5.	Genske terapije melanoma .....	61
4.5.1.	Terapija melanoma onkolitičkim virusima .....	69
4.6.	Parametri efikasnosti kliničkih studija u onkologiji.....	73
4.7.	Mjere ishoda u kliničkim istraživanjima.....	76
4.8.	Inovativne terapije melanoma – perspektiva i ograničenja .....	77
5.	Zaključak .....	87
6.	Popis literature .....	89
7.	Kratice .....	103
8.	Životopis .....	107

## **1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA**

Prema zadnjim objavljenim podacima Svjetske zdravstvene organizacije (*engl.* World Health Organization, WHO), godišnje se na svjetskoj razini prijavi oko 132 000 novih slučajeva malignog melanoma (1). Iako sačinjava oko 1% od ukupno prijavljenih svih vrsta karcinoma, jedan je od najsmrtonosnijih oblika karcinoma i kao takav odgovoran za veliku većinu smrti uzrokovanih različitim tipovima karcinoma kože. Podatci na globalnoj razini govore o 41 000 smrtnih slučajeva godišnje.

Ono što posebice zabrinjava je dramatičan porast oboljenja na svjetskoj razini - u posljednjih četrdeset godina incidencija je porasla na svjetskoj razini oko petnaest puta s time da su utvrđene značajne razlike obzirom na geografski položaj (Australija i Novi Zeland su posebno ugroženi zbog smanjenja ozonskog omotača uslijed ekoloških promjena na globalnoj razini, rizik oboljenja je 10-20 puta veći nego u Europi), rasu (kod crnaca jedan slučaj oboljenja na 100 000 stanovnika, kod bijelaca 26 slučajeva oboljenja na 100 000 stanovnika), spol i dob (pojavnost je veća u žena do dobi od oko 50 godina, s povećanjem starosti muškarci češće oboljevaju primjerice u dobi od 65 godina dvostruko više a u dobi od 80 godina trostruko više) te gensko naslijeđe (oko 10% oboljelih imalo je slučaj oboljenja u bližjoj obitelji) (6).

Prema procjeni Nacionalnog instituta za rak SAD-a očekuje se u 2018. godini smrt 5990 muškaraca i oko 3300 žena.

Po epidemiološkim podacima broj oboljelih u Republici Hrvatskoj također prati svjetski trend povećane incidencije. Po podacima iz 1988. godine zabilježena su 168 slučajeva oboljenja, da bi u 2016. godini broj oboljenja narastao na razinu od oko 800 novoprijavljenih slučajeva godišnje. Najčešće oboljevaju osobe dobnog razreda 40-60 godina starosti iako se primjećuje statistički porast oboljenja i u mlađoj, adolescentskoj dobi. U svrhu smanjivanja incidencije oboljenja od iznimne su važnosti javnozdravstvene akcije informiranja i opće populacije o opasnostima izlaganja ultraljubičastom zračenju te nužnosti provedbe općih mjera zaštite na individualnoj razini (smanjenje izlaganja dnevnom suncu, nošenje adekvatne odjeće, uporaba zaštitnih dermokozmetičnih sredstava, nužnost redovite i češće medicinske kontrole na razini primarne i sekundarne zdravstvene zaštite, i sl.). Od osobite je važnosti rano otkrivanje malignih promjena jer dramatično povećava stupanj preživljavanja u srednjoročnom razdoblju (17). Danas, uporabom klasičnih metoda liječenja kao i uvođenjem inovativnih metoda liječenja postignut je značajan napredak na tom polju pa tako podatci za razvijene zemlje govore o stopi preživljavanja od 89% - 92% za srednjoročno razdoblje od 5-10 godina bez ponovnog razvoja bolesti za sve tipove melanoma. Dosadašnji protokoli liječenja bazirani su na kirurškoj obradi (primarno; potpuna ekscizija oboljelog dijela kože), uporabom kemoterapeutika (sistemski ili lokalno, mono- ili poli-pristup) te zračenjem (vanjski izvor zračenja ili unutarnji pristup).

Navedeni pristupi su se često kombinirali ovisno o tipu melanoma, zahvaćenosti dijela tijela, lokalizaciji te prisutnosti metastaza. Intenzivnim znanstvenim radom na globalnoj razini, s ciljem razumijevanja patologije melanoma na staničnoj i molekularnoj razini, ostvarila se unazad 15-ak godina svojevrsna revolucija u pristupu liječenja melanoma, što je kulminiralo uvođenjem u uporabu inovativnih oblika liječenja s ogromnim potencijalom razvoja primjene u bliskoj budućnosti: imunoterapija koja koristi imunosni sustav pacijenta kao osnovu za liječenje melanoma (ipilimumab, pembrolizumab, nivolumab), uporaba modificiranih autolognih tumor infiltrirajućih limfocita, te ciljana terapija (*engl.* targeted therapy) koja primarno djeluje na tumorske stanice na više razina (inhibicijom provođenja signala - vemurafenib, dabrafenib, trametinib, cobimetinib) (28, 47). Za spomenuti su i ustrajni pokušaji razvoja genske terapije melanoma - pristupa na razini manipulacije samog gena stanice karcinoma kako bi se deaktivirali onkogeni, ubacio takozvani gen samoubojica ili zamijenili nefunkcionalni supresorski geni. Primjerice, do 2012. godine provedeno je oko 1840 klinička pokusa a 7 njih je došlo u fazu 3 kliničkog ispitivanja. Princip genske terapije kao takav ne isključuje niti jedan gore spomenuti način liječenja, već naprotiv daje dodatnu dimenziju širine kombinirajući postojeće načine liječenja. Do danas jedini odobreni protokol liječenja po principu genske terapije uključuje primjenu lijeka Talimogen laherparepvec (T-VEC u daljnjem tekstu) nastalog genetičkim modificiranjem humanog herpes virusa-1 (HSV-1). Nažalost, primjena inovativnih lijekova i protokola često je ograničena financijskim sredstvima koja su na raspolaganju zdravstvenim osiguravateljima pa je njihovo uvođenje u uporabu usporeno. Primjerice, u Republici Hrvatskoj je lijek vemurafenib (Zelboraf®) od uvođenja u uporabu centraliziranim postupkom na razini čitave Europske unije 17. veljače 2012. godini, do danas ušao među prvih trideset lijekova po ukupnoj bolničkoj potrošnji na godišnjoj razini (17 494 254,00 kn u 2015. godini ili 23. mjesto – Izvješće o potrošnji lijekova u Republici Hrvatskoj Agencije za lijekove za 2015. godinu) (144). U 2017. godini vemurafenib je i dalje među prvih trideset lijekova po financijskoj potrošnji u ukupnom iznosu od 19 971 078,00kn (27. mjesto) (146). S druge strane, primjer lijeka ipilimumaba je krajnje nezadovoljavajući: iako stavljen na listu HZZO-a centraliziranim postupkom na razini Europske unije 13.07.2011. godine, do danas u Republici Hrvatskoj nije odobrena terapija za niti jednog pacijenta. Ohrabruje činjenica da se sve više inovativnih lijekova uvodi u uporabu ne samo za liječenje melanoma već i ostalih tipova zloćudnih bolesti usprkos činjenici da su raspoloživa sredstva u javnozdravstvenom sustavu ograničena. Uzimajući u obzir troškove inovativnih terapija za liječenja melanoma, sve većih zahtjeva za njihovim uvođenjem u uporabu te povećani morbiditet u Republici Hrvatskoj, nameće se potreba za sustavnim oblikom prevencije razvoja melanoma

javnozdravstvenim pristupom kao i sustavnim promišljanjem osiguravanja adekvatne količine financijskih sredstava kako bi nacionalna zdravstvena politika bila u stanju odgovoriti na izazove budućnosti.

## **1.1. MELANOM**

### **1.2. Definicija**

Melanom je zloćudni tumor stanica melanocita koji su odgovorni za proizvodnju zaštitnog pigmenta melanina u koži i najzloćudniji je tumor kože i sluznica. Melanom ima veliki potencijal metastaziranja primarno putem limfe (limfogeno) te putem krvi (hematogeno). S obzirom da melanociti u nevusima i melanomu ne posjeduju međustanične veze, nakon stanične diobe razmjerno lako migriraju, čak i kada je primarni tumor razmjerno malen. Obično nastaje u koži, a vrlo rijetko i na sluznicama.

### **1.3. Epidemiologija**

Maligni melanom je treći po učestalosti zloćudni tumor kože. Godišnje na svjetskoj razini zabilježi se oko 132 000 novih slučajeva, a umire oko 41000 ljudi (podatci Svjetske zdravstvene organizacije)(1). Posljednjih godina se opaža povećana incidencija u svim dijelovima svijeta čak i u državama koje su do sada imale nisku stopu razvoja ove bolesti (Japan). Predominantno su ugrožene osobe u Australiji i Novom Zelandu gdje je zabilježen porast oboljelih od oko dvadeset puta. Od europskih država najviše su pogođene Skandinavske zemlje i Švicarska (veća izloženost UV-zračenju uslijed veće nadmorske visine te oslabjelog ozonskog omotača na sjeveru Europe). Predominantno se pojavljuje u dobnoj skupini od 40-60 godina i to češće kod žena, a s porastom starosti populacije muška populacija razvija više- struko više stope oboljenja (2x više u dobi od 65 godina, 3x više u dobi od 80 godina). Ono što zabrinjava je i porast oboljenja u mlađim dobnim kategorijama, posebno onoj adolescentne dobi. Razlike su uočljive i kod pripadnika određene rase pa bilježimo incidenciju u crnačkoj populaciji jedan slučaj na 100 000 stanovnika, dok u bijeloj rasi imamo incidenciju od 26 slučajeva oboljenja na 100 000 stanovnika. Razlika u pojavnosti oboljenja se može pripisati zaštitnom djelovanju pigmenta

melanina koji je koncentriraniji kod pripadnika crne rase. Kao jedan od bitnih faktora je i nasljedna sklonost razvoju oboljenja opažena u oko 10% slučajeva (1,2,3).

U Republici Hrvatskoj opažen je znatan rast oboljenja tako da danas bilježimo incidenciju od 18,0/100 000 ljudi ili oko 800 novih slučajeva godišnje, dok je taj broj 1988.godine iznosio 168. Sam melanom zauzima 3 % od ukupnih zloćudnih oboljenja godišnje u Republici Hrvatskoj (17). U razvijenim zemljama Europe i Amerike ipak je zamijećen silazni trend incidencije bolesti poglavito zbog vrlo opsežnih mjera primarne i sekundarne prevencije.

#### **1.4. Patogeneza**

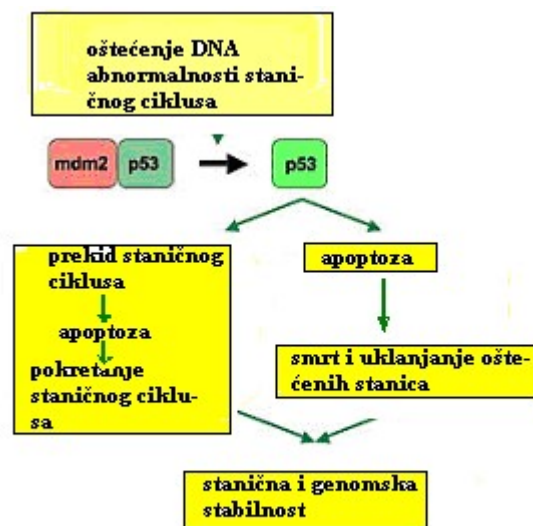
Melanom, kao zloćudni tumor, nastaje kao posljedica genske nestabilnosti i nemogućnosti stanice da popravi oštećenja vlastite DNA. Primarni uzrok nastajanja tih oštećenja jest prekomjerna izloženost ultraljubičastom zračenju (UVB valne duljine od 280-315nm i UVA valne duljine 315-400 nm). Sam izvor zračenja može biti Sunce ili danas sve češće uporaba solarija. Treba dodati da u oko 10% slučajeva znatnu ulogu ima i gensko naslijeđe. Melanom nastaje najčešće na intaktnoj koži (50%) ili iz prekursorskih lezija (30-40 % slučajeva). Oko 5% melanoma se razvija iz lentigo melanoma (oblik melanoma u kojem važnu ulogu ima kumulativni učinak izloženosti UV-svjetlosti). Najveći maligni potencijal imaju prekursorske lezije, tzv. gigantski kongenitalni nevus te displastični nevus (Slika 1).



Slika 1. Primjer displastičnog nevusa  
(Preuzeto i prilagođeno iz 17).

Mehanizam oštećenja DNA UV-zračenjem je sljedeći: apsorpcijom energije fotona UV-zrake dolazi do ekscitacije para elektrona u pirimidinskim bazama pri čemu dolazi do njihove migracije i posljedičnog stvaranja kovalentnih veza između dviju baza (najčešće timin-timin, ali i citozin-citozin te citozin-timin) što naposljetku vodi do stvaranja ciklobutanskih pirimidinskih dimera (CPD). Ako izostane njihov popravak nastaje mutacija. Pokusi na životinjama su pokazali da je nastanak i brojnost tih dimera usko povezan s izloženosti UV-svjetlosti, a sam nastanak bolesti visoko korelira s brojnosti stvorenih mutacija.

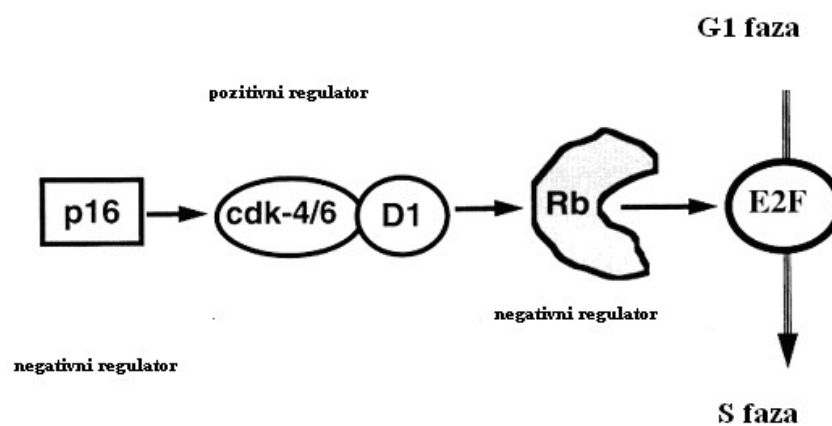
Ta saznanja su dovela do prepoznavanja čimbenika rizika za razvoj melanoma u određenim profesijama (piloti aviona). Mutacijom gena CDKN2A dolazi do destabilizacije tumor supresorskog proteina p53, transkripcijskog faktora u apoptozi (Slika 2) te u oko 50% slučajeva svih karcinoma kod ljudi (11,14).



Slika 2. p53 put: u normalnim stanicama p53 je inaktiviran pomoću svog negativnog regulatora mdm2. Usljed staničnog oštećenja dolazi do njihove disocijacije što dovodi do aktivacije proteina p53 pri čemu može odlučiti hoće li se stanica dovesti u fazu popravka ili će se pokrenuti proces programirane smrti stanice-apoptoza. Način na koji protein p53 donosi odluku o ova dva puta je još nejasan.

(Preuzeto i prilagođeno iz 20).

Nadalje, mutacija gena CDKN2A se odražava i na stvaranje nefunkcionalnog inhibitora enzima CDK4 koji promovira staničnu diobu. Gen CDKN2A kodira protein p16 koji ima važnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa usporavajući progresiju iz G1-faze u S-fazu. Na toj razini se ostvaruje njegov antitumorski efekt opažen ne samo u melanomu, već i u drugim tumorskim oboljenjima. Protein p16 djeluje kao inhibitor ciklin-ovisnih kinaza 4 i 6 koje fosforiliraju retinoblastomni protein (pRB) što rezultira progresijom stanice iz G1 u S-fazu (Slika 3). Posljedično, mutacija gena koji kodira protein p16 rezultira s povećanjem rizika za nastanak raznih vrsta tumora (15).



Slika 3. p16/RB put: proteini koji reguliraju ključnu točku progresije iz G1 u S-fazu  
(Preuzeto i prilagođeno iz 19).

Oko 60 % melanoma ima mutaciju u genu BRAF koji kodira protein B-Raf, enzim iz skupine Raf-kinaza odgovornih za prijenos vanjskih signala koji utječu na rast stanice. Dodatno, mutacije koje su odgovorne za bolest *xeroderma pigmentosum* (rijetki autosomalni deficit u popravku DNA oštećene UV-zračenjem) također značajno povišuju rizik nastanka melanoma. UV-zračenje dodatno proizvodi reaktivne oblike kisika (radikal kisika, superoksid, peroksid, hidroksil radikal) koji dodatno oštećuju DNA oksidacijom pirimidinskih i purinskih baza pri čemu nastaju mutacije (8-oksogvanin je najčešći) te posljedično dolazi do krivog sparivanja baza. Istraživanjem genoma melanoma utvrđena je prisutnost oko 80 000 mutiranih baza i oko stotinjak strukturnih promjena.



## 1.5. Klinička slika melanoma

Melanom nastaje kada se melanociti počnu nekontrolirano dijeliti. Na melanom treba posumnjati odmah kada se uoče pigmentirane lezije koje se intenzivno mijenjaju protokom vremena. U ranoj fazi melanociti se nalaze u dermisu i ta faza se naziva melanoma *in situ*. Daljnjom progresijom tumor se širi u prostor između epidermisa i dermisa i ta faza se zove radijalna faza. Tumor u ovoj fazi nije deblji od 1 mm i obzirom da nije prodro u okolne krvne žile u ovoj fazi nema metastaza. U većini melanoma radijalna faza prevladava mjesecima pa i godinama prije nego postane invazivan. Ako je melanom prepoznat u ovoj fazi moguće je njegovo potpuno uklanjanje kirurškim putem koje se provodi u više od 99% slučajeva. Kada tumor prodre u dermis započinje tzv. faza vertikalnog rasta. U kojoj tumor postaje invazivan, i može započeti njegovo metastasko širenje po tijelu. U ovoj fazi može doći do potpunog uništenja primarnog tumora aktivnošću tumor-infiltrirajućih limfocita.



Slika 4. Prikaz ABCD pravila: na lijevoj strani odozgo prema dolje prikazani su primjeri A-asimetrije, B-nepravilnih rubova, C-promjene boje i D-povećanje promjera nevusa S desne strane su prikazani za usporedbu odgovarajući nevusi bez malignih promjena (preuzeto i prilagođeno iz 1).

U tom slučaju otkriveni tumor je najčešće metastaza. Klinički znakovi (Slika 4), na temelju kojih se postavlja sumnja na melanom su poznati po sustavu ABCDEF pri čemu A predstavlja

asimetriju (*engl. asymmetry*), B rubovi (*engl. border*), C boju (*engl. colour*), D promjer (*engl. diameter*), E promjena veličine, oblika ili pojave krvarenja (*engl. evolving*) te F osjećaj boli, svrbeža ili iritacije (*engl. feeling*).

Melanom se kod muškaraca najviše pojavljuje na trupu, dok je kod žena u najvećem broju slučajeva na nogama. Što ranija dijagnoza je od krucijalne važnosti za uspješan ishod liječenja. Ona uključuje anamnezu, klinički pregled te patohistološku analizu materijala uzetog biopsijom. Molekularna dijagnostika obuhvaća analizu DNA/RNA molekula i njihovih produkata, koji bi trebali pomoći u otkrivanju, klasifikaciji, prognozi, odabiru metode liječenja i praćenju ishoda liječenja. Molekularna dijagnostika se ne koristi rutinski, ali je vrlo važna u individualnom pristupu liječenja. Klasifikacija melanoma se do 2009. provodila metodom po Clarku (mjeri se dubina prodora tumorskih stanica) te po Breslowu (mjeri se debljina tumora). Danas je u uporabi TNM klasifikacija koju preporuča Međunarodna unija za kontrolu raka (*engl. Union for International Cancer Control, UICC*) te Američko zajedničko povjerenstvo za rak (*engl. American Joint Committee on Cancer, AJCC*) (18). TNM sustav za procjenu proširenosti tumora uključuje procjenu primarnog tumora (oznaka T), stanje regionalnih limfnih čvorova (oznaka N) te prisutnost udaljenih metastaza (oznaka M). Svakom od slova se dodaje broj koji u slučaju primarnog tumora označava veličinu ili lokalnu proširenost primarnog tumora, a u slučaju regionalnih limfnih čvorova i udaljenih metastaza broj označava njihovu prisutnost ili odsutnost (tablica 1)(18).

Tablica 1. Tablični prikaz kriterija za TNM klasifikaciju melanoma  
(preuzeto i prilagođeno iz 18).

TNM klasifikacija melanoma Američkog združenog odbora za rak, osmo izdanje 2018.		
T kategorija	Debljina po Breslowu u mm	Status ulceracije
T0 – nema dokaza o postojanju primarnog tumora ili je primarno sijelo tumora nepoznato; npr. metastaza u aksilarnom limfnom čvoru		
Tis (melanom <i>in situ</i> )	ne može se primijeniti	ne može se primjeniti
T1	≤1,0 mm	nepoznata ili nespecificirana
T1a	<0,8 mm	bez ulceracije
T1b	<0,8 mm	ulceracija prisutna

	0,8-1,0 mm	sa ili bez ulceracije
T2	>1,0-2,0 mm	nepoznata ili nespecificirana
T2a	>1,0-2,0 mm	bez ulceracije
T2b	>1,0-2,0 mm	ulceracija prisutna
T3	>2,0-4,0 mm	nepoznata ili nespecificirana
T3a	>2,0-4,0 mm	bez ulceracije
T3b	>2,0-4,0 mm	ulceracija prisutna
T4	>4,0 mm	nepoznata ili nespecificirana
T4a	>4,0 mm	bez ulceracije
T4b	>4,0 mm	ulceracija prisutna
N kategorija	Broj regionalnih limfnih čvorova zahvaćenih tumorom	Prisutnost tranzitnih, satelitskih i/ili mikrosatelitskih metastaza
N0	nisu otkrivene regionalne metastaze	nisu prisutne
N1	metastaze prisutne u jednom regionalnom limfnom čvoru i/ili prisutnost tranzitnih, satelitskih i mikrosatelitskih metastaza bez zahvaćenog regionalnog limfnog čvora	
N1a	jedan čvor zahvaćen klinički nevidljivom metastazom koja je potvrđena biopsijom limfnog čvora čuvara	nisu prisutne
N1b	jedan čvor zahvaćen, klinički vidljiv	nisu prisutne
N1c	regionalni limfni čvorovi nisu zahvaćeni	prisutne

N2	metastaze prisutne u 2-3 limfna čvora i/ili prisutnost tranzitnih, satelitskih i mikrosatelitskih metastaza uz zahvaćenost barem jednog limfnog čvora	
N2a	2-3 zahvaćena limfna čvora potvrđeno biopsijom	nisu prisutne
N2b	2-3 zahvaćena limfna čvora od kojih je barem jedan klinički vidljiv	nisu prisutne
N2c	jedan čvor zahvaćen metastazom, potvrđen biopsijom ili je klinički vidljiv	prisutne
N3	$\geq 4$ zahvaćena limfna čvora, ili prisutnost tranzitnih, satelitskih i/ili mikrosatelitskih metastaza s $\geq 2$ zahvaćena limfna čvora ili bilo koji broj tamnih limfnih čvorova s/bez tranzitnih, satelitskih ili mikrosatelitskih metastaza	
N3a	$\geq 4$ zahvaćena limfna čvora potvrđenih biopsijom	nisu prisutne
N3b	$\geq 4$ zahvaćena limfna čvora od kojih je barem jedan klinički vidljiv ili bilo koji broj tamnih limfnih čvorova	nisu prisutne
N3c	$\geq 2$ zahvaćena limfna čvora	prisutne

	potvrđenih biopsijom ili klinički vidljivih ili bilo koji broj tamnih limfnih čvorova	
<b>M kategorija</b>	<b>Anatomske sjelo</b>	<b>LDH aktivnost</b>
M0	nema dokaza o metastazama	nije primjenljivo
M1	metastaze prisutne	
M1a	metastaze prisutne u koži, mekom tkivu uključujući mišiće	nije zabilježena ili je nespecifična
M1a(0)		nije povišena
M1a(1)	i/ili u neregionalnim limfnim čvorovima	povišena
M1b	metastaze prisutne u plućima s/bez M1a metastaza	nije zabilježena ili je nespecifična
M1b(0)		nije povišena
M1b(1)		povišena
M1c	udaljene metastaze u visceralna mjesta bez središnjeg živčanog sustava s/bez M1a i M1b	nije zabilježena ili je nespecifična
M1c(0)		nije povišena
M1c(1)		povišena
M1d	udaljene metastaze u središnji živčani sustav s/bez M1a, M1b i M1c metastaza	nije zabilježena ili je nespecifična
M1d(0)		nije povišena
M1d(1)		povišena

Sukladno TNM klasifikaciji melanoma (18) određuje se stadij bolesti (tablica 2):

Tablica 2. Tablični prikaz stadija bolesti melanoma (preuzeto i prilagođeno iz 18).

Stadij bolesti	Kada je T=	Kada je N=	Kada je M=
0	Tis	N0	M0
IA	T1a-T1b	N0	M0
IB	T2a	N0	M0

IIA	T2b-T3a	N0	M0
IIB	T3b-T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1a/b-T2a	N1a, N2a	M0
IIIB	T0	N1b, N1c	M0
IIIB	T1a/b-T2a	N1b/c, N2b	M0
IIIB	T2b, T3a	N1a-N2b	M0
IIIC	T0	N2b, N2c, N3b, N3c	M0
IIIC	T1a-T3a	N2c, N3a/b/c	M0
IIIC	T3b, T4a	$N \geq N1$	M0
IIIC	T4b	N1a-N2c	M0
IIID	T4b	N3a/b/c	M0
IV	Tis, bilo koji T	bilo koji N	M1

Glavni tipovi melanoma su sljedeći:

1. Lentigo maligna - melanom *in situ* koji nije probio bazalnu membranu;
2. Lentigo maligna melanoma - karakterizira ga polagan rast i pojavljuje se na dijelovima kože izložene suncu;
3. Površinsko šireći melanom - najčešći oblik melanoma, nastaje češće kod mlađih osoba (30-50 godina starosti), u velikom postotku nastaje iz melanocitnih ili displastičnih nevusa;
4. Nodularni melanom - 15-30% svih melanoma, češće nastaje u starijoj životnoj dobi; nalazi se uglavnom na trupu, licu i vratu te vrlo brzo uđe u vertikalnu fazu rasta pa često metastazira;
5. Akrolentiginozni melanom - češći kod muškaraca u trećoj životnoj dobi;
6. Subungvalni melanom - zahvaća nožni palac;
7. Melanomi sluznice nosne i usne šupljine, vaginalnog i anorektalnog područja.

## 1.6. Liječenje melanoma

Liječenje primarnog melanoma provodi se kirurškim odstranjivanjem u cijelosti s odgovarajućom zonom zdravog tkiva te odstranjivanjem limfnog čvora čuvara. Limfni čvor se

pregleda imunohistokemijski kod debljine melanoma  $\geq 0,8\text{mm}$ . Kod prisutnih metastaza u limfnom čvoru preporuča se limfadenotomija. Adjuvantna terapija uključuje radioterapiju zračenjem, kemoterapiju i imunoterapiju. One često ne mogu promijeniti sam tijek bolesti u smislu potpunog ozdravljenja, ali se može produljiti razdoblje remisije bolesti kod bolesnika s metastazama. Adjuvantna imunoterapija koristi pacijentov imunosni sustav za borbu protiv bolesti stimulacijom pomoću citokina kao što je interleukin-2 ili faktor nekroze tumora  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (23). Noviji pristup su oblici tzv. naprednih terapija koje koriste lijekove ili supstance za identifikaciju ili napad na specifične stanice melanoma bez ugrožavanja zdravih stanica ili koriste izmijenjene, vlastite stanice imunosnog sustava.

Sljedeći tipovi naprednih terapija su u razvoju ili u primjeni:

1. Terapija monoklonskim protutijelima - protutijela se vežu na specifične receptore pri čemu dolazi do deregulacije signalnih putova odgovornih za aktivnost stanica imunosnog sustava dovodeći do njegove aktivacije. Konačni rezultat je spriječavanje rasta i širenja tumorskih stanica; u uporabi je ipilimumab (Yervoy®), pembrolizumab (Keytruda®) i nivolumab (Opdivo®), a veći broj je u raznim fazama kliničkih istraživanja.
2. Ciljana terapija uporabom inhibitora prijenosa signala - oni blokiraju prijenos signala unutar stanice na točno određenim pozicijama i tako uzrokuju smrt tumorske stanice; u uporabi je vemurafenib (Zelboraf®), dabrafenib (Tafinar®), cobimetinib (Cotellic®), trametinib (Mekinist®), encorafenib (Braftovi™) i binimetinib (Mektovi®).
3. Terapija tumor infiltrirajućim limfocitima - u fazi III kliničkih istraživanja.
4. Terapija onkolitičkim virusima - u uporabi (T-VEC), jedini uspješni primjer liječenja melanoma razvijen uporabom genetičkog inženjerstva.

Za napomenuti je i intenzivan istraživački rad na razini manipulacije gena samih stanica melanoma i stanica imunosnog sustava genskom terapijom koji bi doveo do novog pristupa i standarda liječenja(24).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**



Cilj ovog specijalističkog rada je opisati značajke inovativnih terapija usvojenih u liječenju melanoma te dati prikaz glavnih težišta razvoja novih protokola u liječenju melanoma s naglaskom na imunoterapiju i ciljanu terapiju. Dodatni cilj je i definirati faktore koji su ključni u donošenju odluka o usvajanju inovativnih terapija melanoma u javnozdravstveni sustav u Republici Hrvatskoj.

Hipoteze istraživanja su:

1. Inovativne terapije melanoma pružaju učinkovitije mogućnosti u liječenju melanoma u odnosu na klasični pristup liječenja melanoma.
2. Terapijski odaziv, razdoblje do pogoršanja bolesti, prosječno preživljenje, kao mjere efikasnosti, pružaju dokaz o unaprijeđenju liječenja melanoma primjenom inovativnih terapija.

### **3. MATERIЈAL I METODE**

Kao materijal za izradu ovog specijalističkog rada korišteni su relevantni znanstveni članci koji daju pregled patologije melanoma te pregled postojećih metoda liječenja melanoma, kao i pregled metoda liječenja melanoma koje su trenutno u razvoju. Također su obrađeni i podaci o potrošnji lijekova na nacionalnoj razini. U pretrazi su korištene konstruktivne sintakse za identificiranje smjernica uvođenja inovativnih terapija u Republici Hrvatskoj. Zadana problematika specijalističkog rada ciljano je pretraživana korištenjem baza podataka MEDLINE/PubMed, InTechOpen, Halmed, Google pretraživač. Ključni pojmovi korišteni u pretraživanju su: melanom, imunoterapija, genska terapija, ciljana terapija, monoklonska protutijela, receptor, tumor infiltrirajući limfociti, gen, mutacija, metastaza. Članci prikupljeni pretraživanjem razvrstani su od općih prema specijaliziranim, pri čemu su odabrani članci relevantni za temu ovog specijalističkog rada.

Relevantni članci proučavani su na analitički i kritički način s obzirom na definiranje znanstvenog i/ili stručnog problema, istraživanje postojećih znanja o definiranom problemu (literaturni navodi), oblikovanje radne hipoteze, odabir metoda za ispitivanje hipoteze, prikaz i analizu rezultata te izvedene zaključke. Pri proučavanju relevantnih članaka izdvojeni su najvažniji rezultati, rasprave i zaključci koji su zatim prikazani ovim specijalističkim radom.

Kemijske strukture izrađene su u programu MarvinSketch 19.24.

Vlastiti zaključci proučavane teme izvedeni su na temelju odabranih članaka i sastavni su dio rasprave specijalističkog rada.

## **4. RASPRAVA**

## 4.1. Inovativne terapije melanoma - uvod

Pojam biološka terapija tradicionalno se koristi u opisu tehnika koje u terapiji različitih bolesti koriste žive organizme, tvari dobivene iz živih organizama ili laboratorijski dobivene i modificirane tvari koje svoje izvorno porijeklo imaju u živim organizmima. Neke biološke terapije koriste bakterije (bacil Calmette-Guerin u terapiji karcinoma mjehura) ili vakcine kako bi se stimulirao imunosni sustav pacijenta u borbi protiv karcinoma. Takvim oblicima bioloških terapija je osnovna značajka da ne napadaju direktno stanice tumora(24).

Drugi tipovi bioloških terapija su u stanju izravno napasti stanice karcinoma protutijelima, malim molekulama, stanicama imunosnog sustava te fragmentima molekula DNA ili RNA. Obzirom da klasifikacija bioloških terapija nije standardizirana, već se razlikuje od autora do autora, a i sam pojam biološka terapija obuhvaća vrlo široki raspon tehnika, u kontekstu terapije melanoma u ovom radu razlikovat ćemo klasični pristup liječenja melanoma (kirurška obrada, kemoterapija, terapija zračenjem, adjuvantna terapija) te napredne (inovativne) tehnike liječenja.

Iako je u uporabu uveden znatan broj različitih tipova naprednih tehnika, za naglasiti je da su brojni oblici naprednih terapija melanoma još u fazi kliničkih ispitivanja i kao takve su dostupne pacijentima kroz sudjelovanje u kliničkim pokusima. Iako zamisao o praktičnom iskorištavanju integriranih znanja iz genetike, molekularne biologije, biokemije i imunologije u terapiji raznih vrsta karcinoma seže još u osamdesete godine prošlog stoljeća, tek su u zadnjih 15-ak godina opaženi konkretni pomaci u primjeni tih znanja u obliku redovitih protokola liječenja određenih vrsta karcinoma. Razlog tome je ležao u činjenici ostvarivanja nužnih preduvjeta, kako znanstvenih tako i tehnoloških. U tom kontekstu svakako treba spomenuti uspješan dovršetak sekvenciranja ljudskog genoma u travnju 2001. godine. Sve veći razvoj informatičkih tehnologija, posljedično i sve veće umreženosti raznih istraživačkih centara, planiranje javnozdravstvenih politika s posebnim naglascima na istraživanje karcinoma, dovelo je do prave male revolucije u terapiji karcinoma koja traje i danas. Obzirom da ovaj tip terapija u svojoj osnovi teži ka individualnom pristupu (svaki čovjek je genetički jedinstven) u odnosu na dosadašnje terapije zasnovane na klasičnim tehnikama liječenja (kirurški, kemoterapija), opravdano ih možemo nazvati inovativnim. Posebice se to ogleda u terapiji melanoma, gdje u odnosu na terapiju citostaticima alkilirajućeg tipa temozoloamidom i dakarbazinom, inovativne terapije ostvaruju veći uspjeh u uništavanju stanica melanoma, što u konačnici rezultira značajno većom stopom preživljavanja pacijenata. Iako je inovativnim terapijama postignut

značajan uspjeh, on još nije samodostatan pa se sama terapija melanoma i dalje temelji na provjerenim, klasičnim metodama uz dodatak tih novih opcija u arsenalu liječenja (24).

Smatra se da urođena sposobnost imunskog sustava otkrivanja i uništavanja abnormalnih stanica sprječava razvoj raznih vrsta karcinoma. Usprkos tome, neke stanice karcinoma uspijevaju preživjeti djelovanje imunskog sustava primjenom jedne ili više strategija; primjerice stanice karcinoma mogu prolaziti kroz genske promjene koje dovode do uklanjanja tumor specifičnih antigena s površine stanica čineći ih tako manje vidljivima za imunski sustav ili mogu koristiti različite mehanizme supresije imunskog sustava. Cilj inovativnih terapija je nadvladati te prepreke kako bi se postigao učinkoviti odgovor imunskog sustava na način da obnavljaju ili povećavaju aktivnost specifičnih komponenti imunskog sustava te poništavaju učinke imunosupresivnih signala koje stvaraju stanice karcinoma. U terapiji melanoma bilježimo u zadnjih desetak godina značajan napredak u istraživanjima koji su rezultirali konkretnim protokolima liječenja sa značajno povećanim stupnjem preživljavanja pacijenata (24,26).

Ovaj rad dat će prikaz odobrenih inovativnih terapija melanoma, kao i pregled onih koje još nisu odobrene, ali je postignut značajan napredak u njihovoj mogućoj primjeni u budućnosti.

U užem smislu pod imunoterapijom melanoma u radu će biti opisane metode liječenja koje stimuliraju pacijentov imunski sustav kako bi bio što učinkovitiji u prepoznavanju i uništavanju stanica melanoma. U taj pristup ubrajamo inhibitore kontrolnih točaka imunskog sustava (monoklonska protutijela), tumor-infiltrirajuće limfocite te uporabu onkolitičkih virusa (26,74,86).

Kod ciljanih terapija radi se o uporabi malih molekula koje ciljaju na promjene u stanicama melanoma koje im omogućuju da rastu, i nekontrolirano se šire i dijele (96).

Nuspojave koje se javljaju prilikom liječenja razlikuju se ovisno o tipu napredne terapije koja se upotrebljava. Neke nuspojave se javljaju češće od drugih i uključuju bol, oticanje, crvenilo, svrbež i osip i vezane su uglavnom za mjesto aplikacije bilo infuzijom ili injektiranjem.

Specifičnije nuspojave vezane su uz tip napredne terapije i uzrokuju teže posljedice po pacijenta. Primjerice terapije koje stimuliraju imunski odgovor mogu uzrokovati cijeli niz simptoma sličnih onima koji se javljaju kod influence te uključuju povišenu temperaturu, drhtavicu, slaboću, vrtoglavicu, mučninu, povraćanje, bol u mišićima i zglobovima, umor, glavobolju, povremene teškoće u disanju, te hipo- ili hipertenziju. Pojedini oblici ovih terapija povećavaju rizik i od teških pa i fatalnih reakcija preosjetljivosti. Također može doći i do promjene u kemizmu krvi uzrokovanom lizom tumorskih stanica i otpuštanjem staničnog materijala u krvnu plazmu, anemije te do teških oštećenja organa (srce, pluća, bubrezi, jetra i

mozak). Obzirom na učestalost i potencijalno fatalne posljedice primjene inovativnih terapija u liječenju melanoma, potrebno je posvetiti punu pažnju prilikom odabira tipa inovativne terapije s naglaskom na što veću sigurnost pacijenta. Usvojeni protokoli liječenja melanoma inovativnim terapijama su relativno kratko u uporabi pa zahtijevaju detaljno praćenje i u fazi pune primjene lijeka kako bi se prevenirale moguće negativne posljedice po pacijenta, a također postaju vrlo važan izvor informacija koje se mogu iskoristiti u budućnosti za modifikaciju postojećih, razvoj novih terapija te za preciznije oblikovanje javnozdravstvenih politika pogotovu u financijskom smislu.

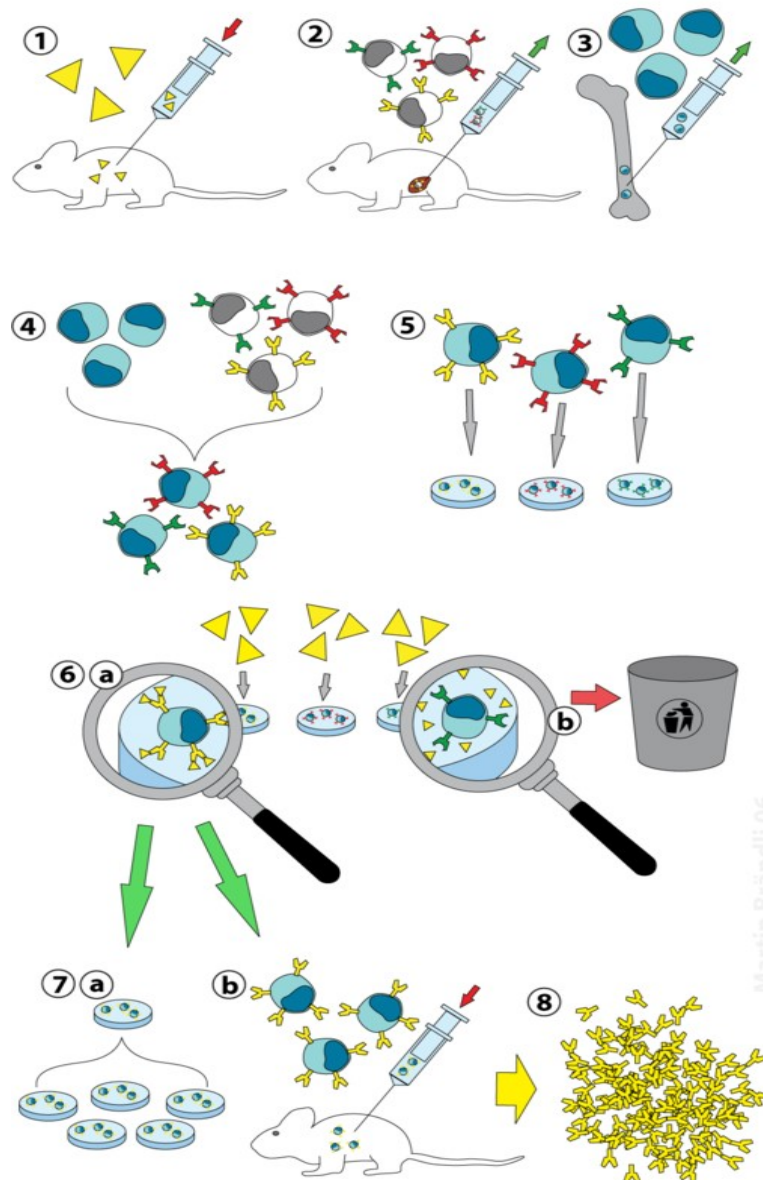
Vrijednost tih podataka u kontekstu razvoja javnozdravstvene politike u Republici Hrvatskoj je nemjerljiv, uzimajući u obzir povećanu incidenciju oboljenja s daljnjom tendencijom rasta u nadolazećem srednjo- i dugoročnom razdoblju te potrebe što točnijeg planiranja financijskih sredstava kako bi zdravstveni sustav bio što spremniji na zadovoljavanje projiciranih potreba korisnika u budućnosti.

## **4.2. Terapije monoklonskim protutijelima**

Monoklonska protutijela su laboratorijski proizvedena protutijela koja se specifično vežu na antigene koje proizvode ciljane stanice. Proizvodnju monoklonskih protutijela otkrili su 1975. godine. Cesar Milstein i Georges J.F. Kohler. Za to otkriće dodijeljena im je Nobelova nagrada iz medicine 1984. godine (32). Najčešće se radi o antigenima koji se nalaze na membranama stanicama karcinoma ali najčešće nisu prisutni u zdravim stanicama organizma ili su prisutni u vrlo niskim koncentracijama. Monoklonska protutijela se proizvode na način da se u laboratorijsku životinju (miš najčešće, kunić rjeđe) injektira antigen na koji želimo stvoriti protutijelo (Slika 5). Daljnji postupak uključuje prikupljanje B-limfocita koje proizvode željeno protutijelo te njihovo pojedinačno spajanje sa stanicama mijeloma (vrsta karcinoma B-limfocita) pri čemu nastaje hibridna stanična linija koju zovemo hibridoma.

Hibridoma stanice tako posjeduju sposobnost proizvodnje protutijela B-limfocita (onih koje želimo) i dugi vijek trajanja te visoke razine dijeljenja stanica mijeloma. Hibridoma stanice se

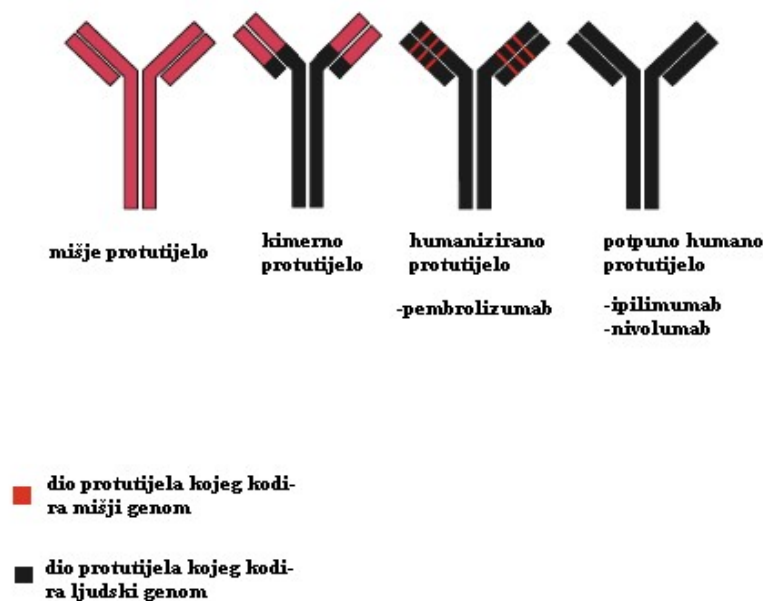
uzgajaju u kulturi koja započinje jednom vijabilnom stanicom pri čemu nastaje populacija genski potpuno identičnih stanica koje proizvode jednu vrstu protutijela po koloniji. Nastala protutijela su identična po kemijskom sastavu pa ih zovemo monoklonska protutijela (32).



Slika 5. Proizvodnja monoklonskih protutijela: 1) Imunizacija miša prikladnim antigenom, 2) Izolacija B-limfocita iz slezene 3) Kultivacija stanica mijeloma, 4) Fuzija stanica mijeloma i B-limfocita 5) Odvajanje staničnih linija, 6) Probiranje prikladnih staničnih linija 7) Umnožavanje in vivo ili in vitro, 8) Prikupljanje željenog protutijela (Preuzeto i prilagođeno iz 21).



Stanice mijeloma su u ovom postupku izabrane jer mogu neograničano rasti u kulturi te ne proizvode vlastita protutijela. Mišja protutijela mogu sama izazvati imunosni odgovor pacijenta (zbog tkivne nepodudarnosti između različitih vrsta), što im znatno smanjuje učinkovitost. Tako dobivena protutijela iz miševa se nastoje što više "humanizirati", odnosno nastoji se što veći dio strukture koju kodira mišji genom zamijeniti onim koji kodira ljudski genom. Tako su vremenom razvijena kimerna, humanizirana i potpuno humana protutijela. Udio humanog genoma u ranim mišjim monoklonskim protutijelima je bio 0 %, dok je u kimernim protutijelima taj udio ~60-70% (konstantna regija lakog i teškog lanca protutijela), humaniziranim ~90-95% (mišjeg podrijetla samo je regija koja određuje komplement u varijabilnoj regiji protutijela), a u potpuno humanim 100% (Slika 6) (32).



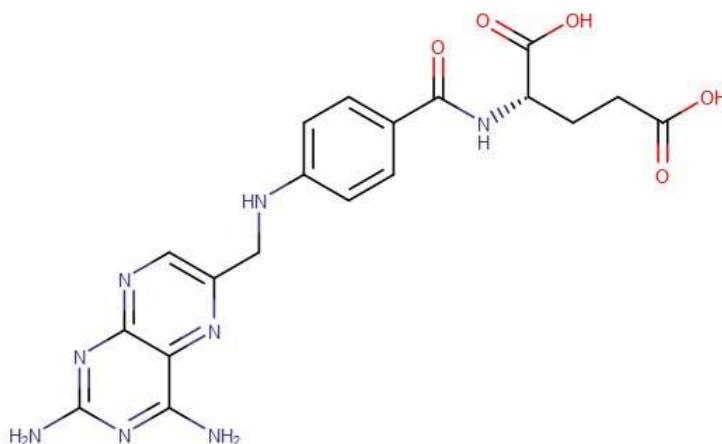
Slika 6. Prikaz udjela ekspresije mišjeg i ljudskog genoma u različitim tipovima monoklonskih protutijela. Navedena su protutijela koja se koriste u terapiji melanoma ( Preuzeto i prilagođeno iz 32).

Razvoj proizvodnje monoklonskih protutijela prema potpuno humanim oblicima imao je za posljedicu povećanje, ionako vrlo visoke, sigurnosti primjene ovih lijekova uklanjanjem mogućnosti da organizam proizvede vlastita antiterapijska protutijela zbog visokog utjecaja

ksenogenog djela strukture monoklonskog protutijela. Do danas su usvojena dva postupka za proizvodnju posve humanih linija protutijela kako bi se smanjile nuspojave humaniziranih ili kimernih protutijela: tehnika koja uključuje transgeničnog miša (13 protutijela do 11/2016. godine) te tehnika prikaza faga (*engl.* phage display) (32).

Uzgoj hibridoma se odvija na selektivnom HAT mediju. HAT medij sadržava hipoksantin, timidin i aminopterin. Stanice mijeloma *per se* nemaju sposobnost sinteze enzima hipoksantin-gvanin-fosforibozil transferaze potrebnog za sintezu nukleinskih kiselina.

Put sinteze purinskih baza *de novo* je onemogućen izlaganjem stanica mijeloma aminopterinom (derivat folne kiseline - Slika 7), kompetitivnim inhibitorom folata na veznom mjestu enzima dihidrofolat-reduktaze. Samo fuzionirane stanice mijeloma i B-limfocita mogu rasti u takvom mediju obzirom da enzim hipoksantin-gvanin-fosforibozil transferaz potječe od B-limfocita. S druge strane, stanice mijeloma omogućuju besmrtnost hibridoma stanica.



Slika 7. Aminopterin (Preuzeto i prilagođeno iz 22).

Pojedine hibridoma stanice se razdvajaju i od svake se uzgajaju njihove klonske linije. Protutijela koja proizvode pojedine klonske linije se ispituju na specifičnost vezanja na antigen od interesa metodom ELISA (*engl.* enzyme-linked immunosorbent assay) ili dot-blot. Klonska

linija koja je najstabilnija i ima najveću sposobnost proizvodnje protutijela se izdvaja i koristi u daljnjoj proizvodnji. Dobivena protutijela najčešće se pročišćavaju ionsko- izmjenjivačkom ili afinitetnom kromatografijom. Naziv svakog dobivenog protutijela sadrži nastavak ovisno o kojem tipu protutijela se radi (34):

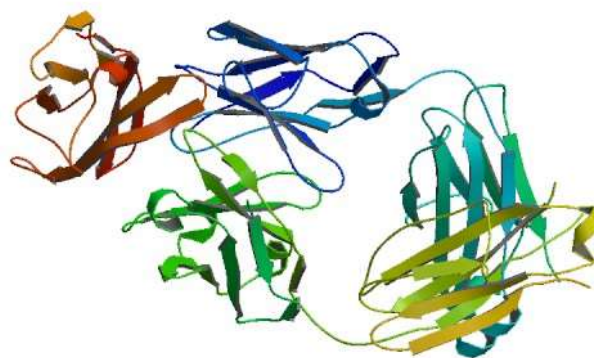
- 1) "momab" - protutijelo mišjeg podrijetla;
- 2) "ximab" - kimerno protutijelo;
- 3) "zumab" - humanizirano protutijelo;
- 4) "mumab" - potpuno humano protutijelo.

Područje primjene monoklonskih protutijela je vrlo široko i uključuje analitičku, industrijsku, dijagnostičku i terapijsku uporabu. U kliničku uporabu 1986. godine uvedeno je prvo monoklonsko protutijelo muromonab-CD-3 (trgovačko ime Orthoclone®) za sprečavanje odbacivanja presađenih organa). Do danas je u uporabu u SAD-u uvedeno preko 70 različitih vrsta monoklonskih protutijela, a prvenstveno se koriste u onkologiji, prilikom transplantacije organa te kod raznih upalnih bolesti (34). U terapiji raznih vrsta karcinoma, monoklonska protutijela imaju više načina djelovanja. Neka od njih se koriste da pojačaju imunski odgovor koji vodi ka uništavanju stanica karcinoma. Primjerice, monoklonska protutijela mogu se vezati na antigene na površini stanice karcinoma povećavajući njenu imunogenost pa shodno tome i jaču reakciju imunskog sustava. Neka monoklonska protutijela ometaju aktivnost proteina koji su potrebni za rast stanica karcinoma, kao bevacizumab koji cilja vaskularni endotelni faktor rasta (*engl.* vascular endothelial growth factor VEGF), protein kojeg luče stanice tumora i stanice u okolini tumora kako bi se stimulirao rast krvnih žila koje opskrbljuju stanice tumora kisikom i hranjivim tvarima potrebnih za rast tumora. Postoje i takozvani imunokonjugati koji se sastoje od protutijela na specifični tumorski antigen i citotoksične supstance koja može biti toksin, kemoterapeutik ili radioaktivna molekula. Sinonimi za ovu grupu lijekova su i imunotoksin i konjugat protutijelo-lijek. Mehanizam djelovanja se sastoji u tome da se nakon vezanja protutijela na specifični antigen na površini stanice tumora, omogućiti da stanica tumora sama preuzme citotoksičnu molekulu što dovodi do njezinog uništenja. U uporabi su primjerice adotrastuzumabemtansin koji cilja HER-2 molekulu kako bi isporučio lijek DM1 koji inhibira diobu stanica u HER-2 pozitivnim metastazirajućim stanicama karcinoma dojke, gemtuzumab ozogamicin koji se koristi u akutnoj mijeloičnoj leukemiji, polatuzumab vedotin koji se koriste u limfomu B-stanica te brojni drugi (34). Sljedeća skupina monoklonskih protutijela djeluje na način da stimuliraju imunski odgovor tako da se vežu na receptore stanica imunskog sustava i time poništavaju inhibirajuće signale koji spriječavaju

imunosti sustav da napadne stanice vlastitog organizma uključujući i stanice tumora. Molekule koje mogu pojačati ili suzbiti signal aktivacije imunostnog sustava zovu se i kontrolne točke imunostnog sustava (*engl.* immune checkpoint). Te molekule luče stanice tumora i time sebi osiguravaju preživljavanje. Kod terapije melanoma od važnosti su imunosuprimirajuće molekule CTLA-4 te PD-1. U kontekstu inovativnih terapija melanoma u ovom radu detaljno će se obraditi monoklonska protutijela ipilimumab, nivolumab i pembrolizumab koja su odobrena za kliničku uporabu relativno nedavno, a ciljaju na supresiju učinka navedenih imunoregulatornih molekula. (35,43,54).

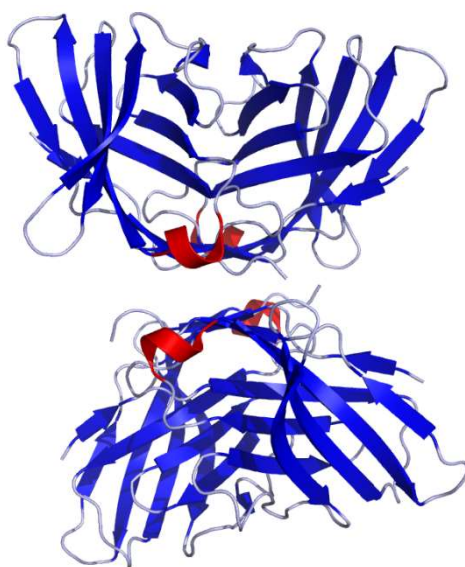
#### 4.2.1. Ipilimumab

Ipilimumab je humano monoklonsko protutijelo koje se veže na površinu stanica T-limfocita i time blokira funkciju proteina CTLA-4 (Slika 8).



Slika 8. Antigen-vezujuća regija (plavo) ipilimumaba povezana s proteinom CTLA-4 (Preuzeto i prilagođeno iz 25).

CTLA-4, ili protein 4 povezan s citotoksičnim T-limfocitima (*engl.* cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) je član superporodice imunoglobulina koji kao receptor ima ulogu inhibicije imunskog odgovora (Slika 9). U regulatornim T-limfocitima njegova funkcija je konstitutivna, dok je u aktiviranim T-limfocitima njegova funkcija regulirana. Kao kontrolna točka imunskog sustava isključuje imunski odgovor ako se veže na molekule CD80 i CD86. CD80 i CD86 su proteini koji se nalaze na površini antigen-prezentirajućih stanica i stvaraju kostimulirajući signal za aktivaciju T-limfocita vezanjem na receptor CD28 i time pokreću njihovu aktivaciju i preživljavanje (26). Receptori CD28 i CTLA-4 su homolozi pri čemu CTLA-4 ima veći afinitet za molekule CD80 i CD86, pa time inhibira odgovor putem aktivacije regulatornih T-limfocita. Smanjena prisutnost ili aktivnost CTLA-4 dovodi do niza bolesti, pretežno autoimunog tipa kao i povećani rizik nastanka limfoma. Kako je prepoznata uloga CTLA-4 u modulaciji imunskog odgovora, razvijen je čitav niz lijekova koji mogu djelovati na njega bilo agonistički ili antagonistički. U kontekstu terapije raznih vrsta tumora, tijekom vremena raslo je zanimanje za moguće terapijske koristi blokadom djelovanja CTLA-4 kako bi se smanjila tolerancija imunskog sustava na stanice melanoma.



Slika 9. Kristalna struktura proteina CTLA-4 (Preuzeto i prilagođeno iz 36.)

Tablica 3 .Nuspojave u bolesnika s uznapredovalim melanomom koji su liječeni ipilimumabom u dozi od 3mg/kg (Preuzeto iz 33).

<b>Infekcije i infestacije</b>	
Manje često	sepsa <sup>b</sup> , septički šok <sup>b</sup> , infekcija mokraćnih puteva, infekcija dišnih puteva
<b>Dobročudne, zloćudne i nespecificirane novotvorine (uključujući ciste i polipe)</b>	
Često	bol zbog tumora
Manje često	paraneoplastički sindrom
<b>Poremećaji krvi i limfnog sustava</b>	
Često	anemija, limfopenija
Manje često	hemolitička anemija <sup>b</sup> , trombocitopenija, eozinofilija, neutropenija
<b>Poremećaji imunološkog sustava</b>	
Manje često	preosjetljivost
Vrlo rijetko	anafilaktička reakcija
<b>Endokrini poremećaji</b>	
Često	hipopituitarizam (uključujući hipofizitis) <sup>c</sup> , hipotireoidizam <sup>c</sup>
Manje često	insuficijencija nadbubrežne žlijezde <sup>c</sup> , sekundarna adrenokortikalna insuficijencija <sup>d</sup> , hipertireoidizam <sup>c</sup> , hipogonadizam
Rijetko	autoimuni tireoiditis <sup>d</sup> , tireoiditis <sup>d</sup>
<b>Poremećaji metabolizma i prehrane</b>	
Vrlo često	smanjen apetit
Često	dehidracija, hipokalemija
Manje često	hiponatremija, alkalozna, hipofosfatemija, sindrom lize tumora, hipokalcemija
<b>Psihijatrijski poremećaji</b>	
Često	stanje smetenosti
Manje često	promjena mentalnog statusa, depresija, smanjeni libido
<b>Poremećaji živčanog sustava</b>	
Često	periferna senzorička neuropatija, omaglica, glavobolja, letargija
Manje često	Guillain-Barréov sindrom <sup>b,c</sup> , meningitis (aseptički), autoimuna centralna neuropatija (encefalitis) <sup>d</sup> , sinkopa, kranijalna neuropatija, edem mozga, periferna neuropatija, ataksija, tremor, mioklonus, dizartrija
Rijetko	miastenija gravis <sup>d</sup>
<b>Poremećaji oka</b>	
Često	zamagljen vid, bol u oku
Manje često	uveitis <sup>c</sup> , krvarenje u staklovinu, iritis <sup>c</sup> , edem oka <sup>d</sup> , blefaritis <sup>d</sup> , smanjena oštrina vida, osjećaj stranog tijela u oku, konjunktivitis
Rijetko	sindrom Vogt-Koyanagi-Harada <sup>e</sup>

<b>Srčani poremećaji</b>	
Manje često	aritmija, fibrilacija atrijska
<b>Krvožilni poremećaji</b>	
Često	hipotenzija, navale crvenila navale vrućine
Manje često	vaskulitis, angiopatija <sup>b</sup> , periferna ishemija, ortostatska hipotenzija
Rijetko	temporalni arteritis <sup>d</sup>
<b>Poremećaji dišnog sustava, prsišta i sredoprja</b>	
Često	dispneja, kašalj
Manje često	respiratorno zatajenje, akutni respiratorni distress sindrom <sup>b</sup> , infiltracija pluća, plućni edem, pneumonitis, alergijski rinitis
<b>Poremećaji probavnog sustava</b>	
Vrlo često	proljevc, povraćanje, mučnina
Često	gastrointestinalno krvarenje, kolitis <sup>b,c</sup> , konstipacija, gastroezofagealna refluksna bolest, bol u abdomenu, upala sluznice <sup>d</sup>
Manje često	gastrointestinalna perforacija <sup>b,c</sup> , perforacija debelog crijeva <sup>b,c</sup> , perforacija crijeva <sup>b,c</sup> , peritonitis <sup>b</sup> , gastroenteritis, divertikulitis, pankreatitis, enterokolitis, ulkus želuca,

To je rezultiralo prvom odobrenom terapijom monoklonskim protutijelom ipilimumabom od strane američke Agencije za hranu i lijekove (engl. Food and Drug Administration, FDA) 25. ožujka 2011. godine za liječenje pacijenata s metastazirajućim, neoperabilnim oblikom melanoma (26). Slijedilo je usvajanje na razini Europske unije 13. srpnja 2011.godine. centraliziranim postupkom putem Europske agencije za lijekove (engl. European Medicines Agency, EMA) pa je tada stavljen i na listu lijekova i u Republici Hrvatskoj pod komercijalnim nazivom Yervoy® tvrtke Bristol-Myers Squibb Pharma. 28. listopada 2015. godine FDA je odobrila uporabu ipilimumaba kao adjuvantne terapije u slučajevima migracije melanoma u susjedne limfne čvorove (27).

U Republici Hrvatskoj je njegova uporaba indicirana za liječenje uznapredovalog (neresektabilnog ili metastatskog) melanoma kod odraslih bolesnika. Trenutno se provode kliničke studije o mogućnosti uporabe ipilimumaba kod karcinoma pluća i prostate (33).

Sam mehanizam djelovanja se sastoji u tome da se ipilimumab veže na CTLA-4 i tako blokira njegovo inhibirajuće djelovanje, što omogućuje citotoksičnim T-limfocitima da napadnu tumorske stanice i tako ih unište. Lijek se primjenjuje u dozi od 3mg/kg jednokratno, intravenski u trajanju od 90 minuta svaka tri tjedna do ukupno četiri doze. Bolesnici moraju primiti cijeli uvodni režim od četiri doze (ukoliko ga podnose) bez obzira na eventualnu pojavu novih lezija ili širenje postojećih. Procjena tumorskog odgovora obavlja se tek nakon završetka uvodne terapije. Nuspojave su česte i javljaju se kod 10-20 % pacijenata i mogu ugroziti zdravlje pacijenta ili čak završiti s fatalnim ishodom (tablica 3). Zbog toga je nužno prije primjene, a i tijekom davanja pojedinih doza lijeka ispitati funkciju jetre i funkciju štitnjače. Istovremeno se mora voditi računa o svakom znaku ili simptomu imunosno uzrokovanih

nuspojava za vrijeme liječenja ipilimumabom, uključujući proljev i kolitis. Liječenje imunosno uzrokovanih nuspojava može odgoditi primjenu sljedećih doza ili čak dovesti do potpunog prekida terapije (tablica 4). Same nuspojave mogu zahvatiti probavni sustav, jetru, kožu, živčani sustav, endokrine žlijezde i druge organske sustave. Većina imunosno posredovanih nuspojava nastane tijekom uvodne terapije, ali se isto tako mogu javiti i mjesecima poslije primjene zadnje doze. Za liječenje teških imunosno posredovanih nuspojava potrebne su visoke doze sistemskih kortikosteroida s dodatnom imunosupresivnom terapijom ili bez nje (33).

Tablica 4 . Nuspojave kod kojih je nužno prekinuti terapiju ipilimumabom (Preuzeto iz 33).

<b><u>Teške ili životno opasne nuspojave</u></b>	<b>NCI-CTCAE v4 stupanj<sup>a</sup></b>
<b>Probavni sustav:</b> Teški simptomi (bol u abdomenu, jaki proljev ili značajna promjena broja stolica, krv u stolici, gastrointestinalno krvarenje, gastrointestinalna perforacija)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ proljev ili kolitis 3. ili 4. stupnja</li> </ul>
<b>Jetra:</b> Jako povišene vrijednosti aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT) ili ukupnog bilirubina ili simptomi hepatotoksičnosti	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ povišenje AST-a, ALT-a ili ukupnog bilirubina 3. ili 4. stupnja</li> </ul>
<b>Koža:</b> Životno opasan kožni osip (uključujući Stevens-Johnsonov sindrom ili toksičnu epidermalnu nekrolizu) ili jaki, prošireni svrbež koji ometa bolesnika u svakodnevnim aktivnostima ili zahtijeva liječničku intervenciju	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ osip 4. stupnja ili svrbež 3. stupnja</li> </ul>
<b>Živčani sustav:</b> Pojava ili pogoršanje teške motoričke ili senzoričke neuropatije	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ motorička ili senzorna neuropatija 3. ili 4. stupnja</li> </ul>
<b>Drugi organski sustavi<sup>b</sup>:</b> (npr. nefritis, pneumonitis, pankreatitis, neinfektivni miokarditis)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ≥ imunološki uzrokovane nuspojave 3. stupnja<sup>c</sup></li> <li>▪ ≥ imunološki uzrokovani poremećaji oka 2. stupnja koji NE odgovaraju na topikalnu imunosupresivnu terapiju</li> </ul>

<sup>a</sup> Stupnjevi toksičnosti su u skladu s zajedničim terminološkim kriterijima za nuspojave Nacionalnog instituta za rak (engl. *National Cancer Institute-Common Terminology Criteria for Adverse Events*)- Verzija 4.0 (NCI-CTCAE v4).

<sup>b</sup> Svaka druga nuspojava za koju postoji dokaz ili sumnja da je imunološki uzrokovana mora se stupnjevat prema CTCAE. Odluka o prekidu primjene lijeka YERVOY treba se temeljiti na težini nuspojave.

<sup>c</sup> Bolesnici s teškom (3. ili 4. stupnja) endokrinopatijom koja se kontrolira hormonskom nadomjesnom terapijom mogu ostati na terapiji.



Kako sigurnost i djelotvornost lijeka u populaciji mlađoj od osamnaest godina nisu ispitivane, ovaj lijek se ne smije upotrebljavati u liječenju djece i adolescenata. Isto tako nije opažena razlika u djelotvornosti između populacija starijih od 65 godina i onih mlađih od 65 godina pa nije potrebno prilagođavati dozu lijeka. Sigurnost i djelotvornost primjene lijeka nisu ispitivani kod bolesnika s oštećenom funkcijom jetre ili bubrega pa s obzirom na rezultate populacijske farmakokinetike nije potrebno prilagođavati dozu, ali je potrebno pratiti funkciju organa (33).

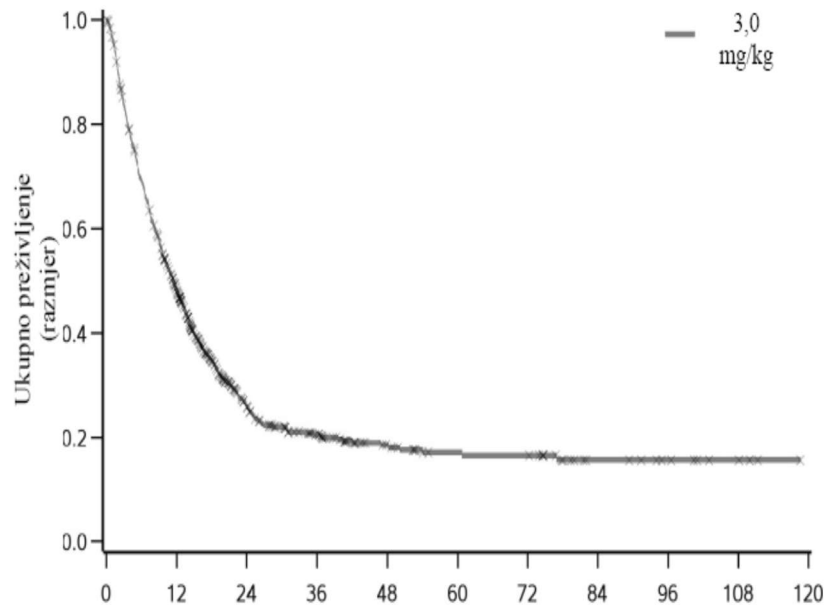
Primijećeno je da neke kombinacije s lijekovima kao što su vemurafenib povećavaju hepatotoksični učinak. Prvi klinički pokusi u terapiji melanoma ipilimumabom započeti su početkom dvijetisućitih. Do 2007. godine razvijena su dva protutijela na CTLA-4 koja su ispitivana u naprednim kliničkim pokusima. Uz ipilimumab ispitivao se i tremelimumab tvrtke Pfizer, no do danas još nije dobio odobrenje za stavljanje u uporabu. Koristan učinak ipilimumaba dokazan je 2010. godini u fazi III kliničke studije koja je obuhvaćala 676 pacijenata s neoperabilnim ili metastatskim melanomom koji su bili tretirani interleukinom-2 i citostaticima (33).

U pokusu se uspoređivao učinak samog ipilimumaba, ipilimumaba primijenjenog s eksperimentalnim sintetskim peptidnim cjepivom gp100 (cjepivo se sastoji od aminokiselinskih ostataka od rednog broja 209 do broja 217 glikoproteina 100 antigena melanoma uz supstituciju metioninom na položaju 210) te monoterapija samog cjepiva. U usporedbi s cjepivom gp100, ipilimumab je postigao ukupno srednje preživljenje od 10,1 mjesec prema 6,4 mjeseca. U drugom pokusu 502 pacijenta, koji prethodno nisu primali nikakvu terapiju, su bili podijeljeni u dvije grupe: jedna je primila ipilimumab+citostatik dakarbazin, dok je druga dobila dakarbazin + placebo. I ovdje je ipilimumab pokazao bolji učinak postigavši rezultat za ukupno srednje preživljenje od 11,2 prema 9,1 mjeseca. U oba pokusa odgovor na primjenu lijeka ipilimumaba je bio relativno nizak (10,9-15%), no učinak terapije je bio osjetno dulji u odnosu na druge terapije, naročito kod pacijenata koji su postigli kompletan terapijski odaziv (33).

Korist liječenja ipilimumabom u dozi od 3mg/kg po pitanju dugotrajnog preživljenja pokazana je u zbirnoj analizi podataka dobivenih iz kliničkih ispitivanja kod bolesnika koji su prethodno bili liječeni i onih koji prethodno nisu bili liječeni. Kaplan-Meireova krivulja za ukupno preživljenje postigla je plato počevši oko 3. godine a u nekih pacijenata produljena je i do 10 godina (Slika 10).

Iako je statistički dokazana učinkovitost monoterapije ipilimumabom (31), zbog relativno niskog terapijskog odaziva ispituju se kombinacije s drugim protutijelima ili s lijekovima koji ciljano djeluju na stanice melanoma (ciljana terapija)(30). Za sada je FDA odobrila kombinaciju s protutijelom nivolumabom koja je pokazala znatno veću učinkovitost i sigurniji terapijski

profil u odnosu na monoterapiju ipilimumabom. Ova kombinacija je odobrena u listopadu 2015.godine (45).

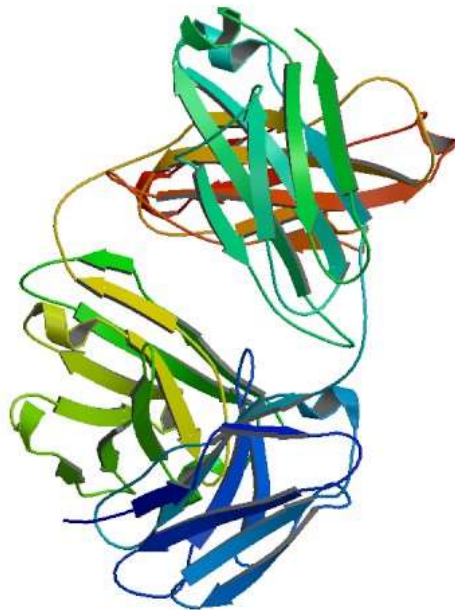


Slika 10. Ukupno preživljenje s ipilimumabom u zbirnoj analizi u dozi od 3 mg/kg (Preuzeto i prilagođeno iz 33).

U fazi I kliničke studije je i kombinacija s protutijelom bavituximab u terapiji melanoma i karcinoma debelog crijeva. Klinički pokusi s lijekovima koji ciljano djeluju na stanice melanoma nisu dali pomak u kvaliteti terapije obzirom na vrlo česte hepatotoksične učinke. Iako je našao svoje mjesto u borbi protiv melanoma, zbog visoke cijene koja dostiže i do 150 000 \$ po terapijskom ciklusu, relativno malom terapijskom odazivu (do 15 %) te visokom učestalosti razvoja nuspojava uporaba ipilimumaba je ograničena čak i u visokorazvijenim zemljama (37). Za očekivati je pad cijena ovog lijeka na globalnoj razini kako će se pojavljivati nove, učinkovitije, sigurnije i financijski prihvatljivije solucije.

### 4.2.2. Nivolumab

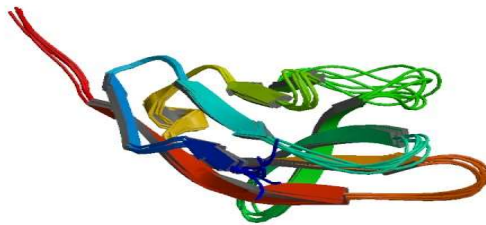
Nivolumab (Slika 11) je monoklonsko, humano IgG4 protutijelo koje djeluje kao inhibitor kontrolne točke imunskog sustava na razini receptora PD-1(48,50,51). Proizvela ga je tvrtka Medarex početkom 2000-ih, a na tržište ga je stavila kompanija Bristol-Myers Squibb i Ono pod komercijalnim imenom Opdivo®. 2012. godine javnosti su predstavljeni obećavajući rezultati kliničkih pokusa koji su pokazali njegovu učinkovitost. Prvo regulatorno odobrenje za njegovu uporabu u liječenju neoperabilnog melanoma bilo je u Japanu u srpnju 2014. godine. U SAD-u je odobren za liječenje u prosincu 2014. godine (53). U Europskoj uniji odobren je za terapiju melanoma centraliziranim postupkom u travnju 2015. godine. Danas se nivolumab može koristiti kao primarna terapija neoperabilnih ili metastazirajućih oblika melanoma u kombinaciji s ipilimumabom ako tumor nema mutacije u genu BRAF(56,57), kao sekundarna terapija nakon terapije s ipilimumabom ili kao sekundarna terapija nakon terapije s BRAF inhibitorom ako tumor ima mutaciju u genu BRAF (94).



Slika 11. Prostorna struktura nivolumaba (Preuzeto i prilagođeno iz 39).

Osim kod terapije melanoma, njegova uporaba je odobrena i kod karcinoma pluća skvamoznih stanica i karcinoma bubrega kao sekundarna terapija. Kao sekundarna terapija koristi se i kod Hodgkinovog limfoma gdje je došlo do relapsa bolesti. Sam mehanizam djelovanja uključuje blokadu proteinskog receptora programirane stanične smrti-1 (*engl.* programmed death-1, PD-

1). PD-1 (Slika 12) je protein izgrađen od 268 aminokiselina koji se nalazi na površini stanica imunskog sustava. Proteinska struktura se sastoji od izvanstanične IgV domene na koju se nastavlja transmembranska regija i unutarstanični rep. PD-1 ima važnu ulogu u suprimiranju imunskog odgovora te u povećanju tolerancije na vlastite stanice organizma i kao takav služi kao kontrolna točka imunskog sustava. Učinak postiže dvojnim djelovanjem: promicanjem apoptoze u antigen specifičnim T-limfocitima u limfnim čvorovima te istovremenim smanjivanjem apoptoze u regulatornim T-limfocitima. Na taj način se sprječavaju autoimune reakcije u vlastitom organizmu, ali isto tako i onemogućuje prepoznavanje tumorskih stanica putem imunskog sustava. Na PD-1 se vežu dva liganda: PD-L1 i PD-L2.



Slika 12. PD-1 receptor (Preuzeto i prilagođeno iz 40).

Ovi ligandi su eksprimirani u antigen-prezentirajućim stanicama, kao što su makrofazi i dendritičke stanice, kao i u tumorskim stanicama te stanicama tumorske okoline. Vežanjem tih liganada na PD-1 receptor dolazi do njegove aktivacije, i kao jedne od posljedica, supresije imunskog odgovora. Mnoge tumorske stanice luče ligand PD-L1 u velikoj količini osiguravajući si na taj način preživljavanje uslijed neaktivnosti antigen-specifičnih citotoksičnih T-limfocita. 40-50 % stanica melanoma luči PD-L1 te je PD-1 receptor prepoznat kao meta za djelovanje lijeka, konkretno monoklonskog protutijela nivolumaba i pembrolizumaba.

Način primjene nivolumaba je intravenski pa se očekuje 100 % bioraspoloživost. Obzirom da se radi o proteinu velike molekulske mase, iz organizma se ne izlučuje renalno, već proteolitičkom razgradnjom na manje peptide i pojedinačne aminokiseline. Kao monoterapija kod melanoma doza iznosi 240 mg intravenski infuzijom kroz jedan sat svaka dva do tri tjedna, te u kombinaciji s ipilimumabom intravenski u koncentraciji od 1 mg/kg tjelesne težine

pacijenta kroz jedan sat nakon čega slijedi intravenski ipilimumab u dozi od 3 mg/kg tjelesne težine kroz 90 minuta (38).

Kao i kod ipilimumaba i ovdje se očekuju imunosno posredovane nuspojave, pa prije primjene treba provjeriti kod pacijenta:

- 1) funkciju jetre - oprez kod umjerenog ili teškog oštećenja jetre;
- 2) promjene u funkciji štitnjače, elektrolitskog statusa, dehidracije, hiperglikemije, endokrinopatije;
- 3) je li pacijent alergičan na djelatnu tvar ili na neku od pomoćnih tvari;
- 4) uzima li pacijent sistemske kortikosteroide, imunosupresive, upravlja li vozilom ili strojevima;
- 5) radi li se o trudnici, dojilji ili se planira trudnoća;
- 6) radi li se o posebno rizičnoj skupini pacijenata.

Od nuspojava u monoterapiji ili u kombinaciji s ipilimumabom možemo očekivati pneumonitis, kolitis, hepatitis, nefritis i disfunkciju bubrega, endokrinopatije, kožne reakcije i druge imunosno uzrokovane nuspojave, kao i rizik od mogućih komplikacija alogene transplantacije hematopoetskih matičnih stanica. Imunosne nuspojave mogu nastupiti i nekoliko mjeseci nakon primanja zadnje doze lijeka (tablica 5). Rana dijagnoza i pravovremeno liječenje nuspojava ključni su čimbenici sprječavanja razvoja i minimiziranja po život opasnih komplikacija. Ovisno o težini nuspojava, primjena se mora ili odgoditi ili trajno prekinuti, a moguće je i sistemsko liječenje visokim dozama kortikosteroida. Nakon poboljšanja, moguće je nastaviti liječenje nivolumabom, ali nakon smanjivanja doze kortikosteroida. Liječenje se mora prekinuti u slučaju ponavljanja bilo koje teške, imunosno posredovane nuspojave ili u razvoju stanja opasnih po život. Vrlo je važno obavijestiti pacijenta o nuspojavama te o važnosti njihovog prijavljivanja liječniku. Nakon primanja zadnje doze, pacijenta se mora nadzirati još pet mjeseci (38). U nizu kliničkih studija dokazana je učinkovitost nivolumaba (44). Prosječan odgovor na terapiju iznosio je 20-30 % i učinci su opaženi i godinu dana nakon uzimanja zadnje doze. Takvo produljenje učinka nije primjerice opaženo kod kemoterapije i smatra se da je posljedica resetiranja imunosne ravnoteže između tumora i stanica imunosnog sustava stvaranjem tumor selektivne imunosne memorije kod nekih pacijenata, na način sličan onome koji se zbiva kod izlaganja antigenima infektivnih mikroorganizama. Medijan srednjeg preživljavanja pacijenata tretiranih nivolumabom iznosio je 16,8 mjeseci, a jedno- i dvogodišnja stopa preživljavanja iznosila je 62% i 43% (Slika 13). Učinci su opaženi i u onim oblicima tumora za koje se smatralo da ne odgovaraju na imunoterapiju. Imunosno uzrokovane nuspojave su bile slične

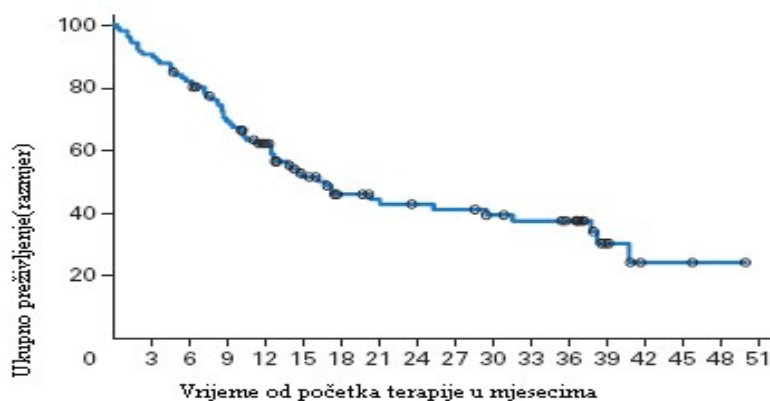
kao i kod ipilimumaba, ali su se pojavljivale u puno blažem obliku. Najčešće se radilo o pneumonitisu i on je bio odgovoran za sve smrtne slučajeve. Najčešće nuspojave su uključivale osip, proljev i umor. Većina nuspojava se pojavila unutar prvih šest mjeseci, a kumulativni učinci nisu opaženi. Sigurnosni profil je, gledano u dugoročnom razdoblju, na osnovi rezultata iz kliničkih pokusa prihvatljiv (44).

Tablica 5. Prikaz imunološki uzrokovanih nuspojava i modifikacija liječenja  
(Preuzeto iz 38).

Imunološki uzrokovana nuspojava	Težina	Preporučena modifikacija liječenja (nivolumab ili nivolumab + ipilimumab)
Pneumonitis (radiografske promjene kao što su fokalna zasjenjenja nalik na mliječno staklo ili mrljasti infiltrati, dispneja, hipoksija)	Pneumonitis 2. stupnja	Odgoditi primjenu. Započeti liječenje kortikosteroidima u dozi od 1 mg/kg/dan i.v. ekvivalenata metilprednizolona ili . Nakon poboljšanja, nastaviti liječenje nakon postupnog smanjivanja doze kortikosteroida. Ako unatoč uvođenju kortikosteroida nastupi pogoršanje ili izostane poboljšanje, povećati dozu kortikosteroida na 2 do 4 mg/kg/dan i.v. metilprednizolona iliekvivalenata i trajno prekinuti liječenje.
	Pneumonitis 3. ili 4. stupnja	Trajno prekinuti primjenu. Započeti liječenje kortikosteroidima u dozi od 2 do 4 mg/kg/dan ekvivalenata metilprednizolona
Kolitis (proljev, bol u abdomenu, sluz ili krv u stolici)	Proljev ili kolitis 2. stupnja	Odgoditi primjenu. Ako proljev ili kolitis potraju, treba ih zbrinuti kortikosteroidima u dozi od 0,5 do 1 mg/kg/dan ekvivalenata metilprednizolona . Nakon poboljšanja, nastaviti liječenje nakon postupnog smanjivanja doze kortikosteroida, ako je potrebno. Ako unatoč uvođenju kortikosteroida nastupi pogoršanje ili izostane poboljšanje, povećati dozu kortikosteroida na 1 do 2 mg/kg/dan ekvivalenata metilprednizolona ili i trajno prekinuti liječenje.
	Proljev ili kolitis 3. stupnja (samo monoterapija nivolumabom)	Odgoditi primjenu. Započeti liječenje kortikosteroidima u dozi od 1 do 2 mg/kg/dan.ekvivalenata metilprednizolona . Nakon poboljšanja, nastaviti monoterapiju nivolumabom nakon postupnog smanjivanja doze kortikosteroida. Ako unatoč uvođenju kortikosteroida nastupi pogoršanje ili izostane poboljšanje, trajno prekinuti monoterapiju nivolumabom.
	Proljev ili kolitis 3. stupnja (samo kombinirana terapija) ili 4. stupnja (monoterapija i kombinirana terapija)	Trajno prekinuti primjenu. Započeti liječenje kortikosteroidima u dozi od 1 do 2 mg/kg/dan ekvivalenata metilprednizolona.
Hepatitis (povišene razine transaminaza ili ukupnog bilirubina)	Povišenje razine transaminaza ili ukupnog bilirubina 2. stupnja	Odgoditi primjenu. Ako povišena laboratorijskih vrijednosti potraju, treba ih zbrinuti kortikosteroidima u dozi od 0,5 do 1 mg/kg/dan i.v. metilprednizolona ili oralnih ekvivalenata. Nakon poboljšanja, nastaviti liječenje nakon postupnog smanjivanja doze kortikosteroida, ako je to potrebno. Ako unatoč uvođenju kortikosteroida nastupi pogoršanje ili izostane poboljšanje, povećati dozu kortikosteroida na 1 do 2 mg/kg/dan. ekvivalenata metilprednizolona i trajno prekinuti liječenje.
	Povišenje razine transaminaza ili ukupnog bilirubina 3. ili 4. stupnja	Trajno prekinuti primjenu. Započeti liječenje kortikosteroidima u dozi od 1 do 2 mg/kg/dan ekvivalenata metilprednizolona.
Koža (osip, svrbež, Stevens-Johnsonov sindrom (SJS),toksična epidermalna nekroliza [TEN])	Osip 3. stupnja	Odgoditi primjenu dok se simptomi ne povuku. Težak osip treba zbrinuti visokim dozama kortikosteroida od 1 do 2 mg/kg/dan. ekvivalenata metilprednizolona ili .
	Osip 4. stupnja	Trajno prekinuti primjenu. Težak osip treba zbrinuti visokim dozama kortikosteroida od 1 do 2 mg/kg/dan ekvivalenata metilprednizolona .
	SJSili TEN	Ako se sumnja na SJS ili TEN, odgoditi primjenu i uputiti bolesnika u specijaliziranu jedinicu radi ocjene i liječenja. Ako se potvrdi SJS ili TEN, trajno prekinuti primjenu.

Imunološki uzrokovana nuspojava	Težina	Preporučena modifikacija liječenja (nivolumab ili nivolumab + ipilimumab)
Nefritis i disfunkcija bubrega (povišenje razine kreatinina u serumu)	Povišenje razine kreatinina u serumu 2. ili 3. stupnja	Odgoditi primjenu. Započeti liječenje kortikosteroidima u dozi od 0,5 do 1 mg/kg/dan ekvivalenata metilprednizolona . Nakon poboljšanja, nastaviti liječenje nakon postupnog smanjivanja doze kortikosteroida. Ako unatoč uvođenju kortikosteroida nastupi pogoršanje ili izostane poboljšanje, povećati dozu kortikosteroida na 1 do 2 mg/kg/dan ekvivalenata metilprednizolona i trajno prekinuti liječenje.
	Povišenje razine kreatinina u serumu 4. stupnja	Trajno prekinuti primjenu. Započeti liječenje kortikosteroidima u dozi od 1 do 2 mg/kg/dan ekvivalenata metilprednizolona .
Endokrinopatije (hipotireoza, hipertireoza, insuficijencija nadbubrežne žlijezde, hipofizitis, dijabetes i dijabetička ketoacidoza)	Simptomatska hipotireoza	Odgoditi primjenu ili trajno prekinuti liječenje u situacijama koje su opasne po život. Po potrebi uvesti nadomjesnu terapiju hormonima štitnjače. Nastaviti pratiti funkciju štitnjače kako bi se osigurala primjena odgovarajuće hormonske nadomjesne terapije.
	Simptomatska hipertireoza	Odgoditi primjenu ili trajno prekinuti liječenje u situacijama koje su opasne po život. Po potrebi uvesti antitireoidni lijek. Ako se sumnja na akutnu upalu štitnjače, treba razmotriti i primjenu kortikosteroida u dozi od 1 do 2 mg/kg/dan ekvivalenata metilprednizolona . Nakon poboljšanja, primjena se može nastaviti nakon postupnog smanjivanja doze kortikosteroida, ako je to potrebno.
	Simptomatska insuficijencija nadbubrežne žlijezde	Odgoditi primjenu u slučaju insuficijencije nadbubrežne žlijezde 2. stupnja. Liječenje se mora trajno prekinuti u slučaju insuficijencije nadbubrežne žlijezde 3. i 4. stupnja. Po potrebi uvesti fiziološku nadomjesnu terapiju kortikosteroidima. Nastaviti pratiti funkciju nadbubrežne žlijezde i razine hormona kako bi se osigurala primjena odgovarajuće kortikosteroidne nadomjesne terapije.
	Simptomatski hipofizitis	Odgoditi primjenu u slučaju hipofizitisa 2. ili 3. stupnja. Po potrebi uvesti hormonsku nadomjesnu terapiju. Ako se sumnja na akutnu upalu hipofize, treba razmotriti i primjenu kortikosteroida u dozi od 1 do 2 mg/kg/dan. ekvivalenata metilprednizolona ili oralnih. Nakon poboljšanja, primjena se može nastaviti nakon postupnog smanjivanja doze. Liječenje se mora trajno prekinuti u slučaju hipofizitisa 4. stupnja. Nastaviti pratiti funkciju hipofize i razine hormona kako bi se osigurala primjena odgovarajuće hormonske nadomjesne terapije.
	Simptomatski dijabetes	Odgoditi primjenu u slučaju simptomatskog dijabetesa. Liječenje se mora trajno prekinuti u slučaju po život opasnog dijabetesa. Po potrebi uvesti inzulinsku nadomjesnu terapiju. Nastaviti pratiti razinu šećera u krvi kako bi se osigurala primjena odgovarajuće inzulinske nadomjesne terapije.

Kombinacije s ipilimumabom su se pokazale kao djelotvornije u odnosu na monoterapiju nivolumabom ili ipilimumabom, te u odnosu na slijednu terapiju ovim monoklonskim protutijelima. Smatra se da takav način primjene vodi do kumulativnih učinaka obzirom da nivolumab i ipilimumab imaju različite mehanizme djelovanja.



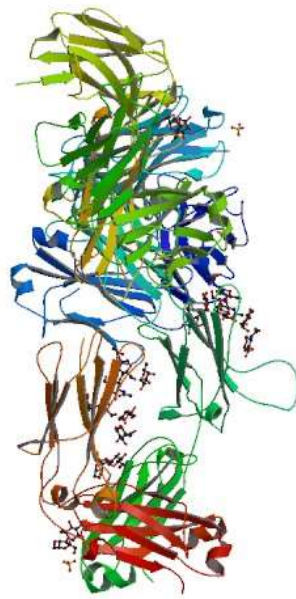
Slika 13. Kaplan-Meier-ov graf prikaza stopa preživljavanja u pacijenata koji su pozitivno reagirali na terapiju nivolumabom (Preuzeto i prilagođeno iz 44).

U kliničkim pokusima postignuta je stopa terapijskog odaziva od 40%. Kod 30% pacijenata opaženo je smanjenje tumorske mase od oko 80% (45,46). To je ukazalo na mogućnosti unaprijeđenja terapije melanoma koje nam pruža racionalno kombiniranje monoklonskih protutijela u okvirima odgovora na terapiju te preživljenja uz podnošljivu toksičnost. Iako je pokazao određene prednosti u odnosu na ipilimumab, visoka cijena ovog lijeka koja dostiže u SAD-u i do 103 000 \$ po terapijskom ciklusu u monoterapiji, predstavlja faktor ograničenja u liječenju melanoma i za visokorazvijene zemlje (49).

### **4.2.3. Pembrolizumab**

Pembrolizumab (komercijalno ime Keytruda®, prethodni naziv lambrolizumab), je humanizirano monoklonsko protutijelo koje se koristi u imunoterapiji raznih vrsta karcinoma. Njegovo korištenje je odobreno u terapiji uznapredovalog, neoperabilnog i metastazirajućeg oblika melanoma kod odraslih osoba, kao monoterapija metastazirajućeg oblika karcinoma plućnih nemalih stanica i refraktornog oblika ne-Hodgkinovog limfoma te kod karcinoma urinarnog trakta koji nemaju pozitivan odgovor na terapiju cisplatinom (61,62,63). Do 2015. godine zabilježeni su rezultati u trinaest različitih tipova karcinoma, a do studenog 2016. godine klinička ispitivanja su obuhvaćala 30-ak tipova karcinoma u oko 270 kliničkih studija od kojih je oko stotinu u kombinaciji s drugim lijekovima. U fazi 3 kliničkih ispitivanja je njegov učinak na karcinom dojke, karcinom jetre, multipli mijelom, karcinom bubrega, mezoteliom i karcinom želuca i debelog crijeva. Pembrolizumab (Slika 14) je IgG4 protutijelo, a njegov varijabilni dio, slično kao kod nivolumaba, se veže na PD-1 receptor koji se nalazi na limfocitima (64,65,71). Vezanjem protutijela na PD-1 receptor omogućuje se aktivacija imunskog sustava u borbi protiv tumora, ali isto tako dolazi i do disfunkcionalnosti imunskog sustava koja se očituje u nuspojavama različitog stupnja pojavnosti. Dodatno pembrolizumab utječe na uklanjanje onih tumora koji su uzrokovani mikrosatelitskom nestabilnošću (stanje hipermutabilnosti gena, preduvjet za mutaciju). Pembrolizumab je razvila tvrtka Organon 2006. godine. 2009.godine konačni vlasnik je postao Merck & Co.





Slika 14. Kristalna struktura pembrolizumaba (Preuzeto i prilagođeno iz 59).

2013. godine su objavljeni prvi rezultati kliničkih pokusa u terapiji melanoma, a 04. rujna 2014. godine FDA je odobrila programom ubrzane procedure njegovu uporabu u liječenju melanoma nakon terapije ipilimumabom ili kombinirane terapije ipilimumabom i BRAF-inhibitorom u slučajevima kada postoji BRAF mutacija (67,68). Centraliziranim postupkom odobren je za uporabu na razini čitave EU 17. srpnja 2015. godine pa shodno tome i u Republici Hrvatskoj. Primjenjuje se intravenski, doza kod melanoma iznosi 2 mg/kg tjelesne težine a kod ostalih tipova tumora 200 mg. Daje se u intervalima od tri tjedna. Kontraindikacije za njegovu uporabu su istovremena uporaba kortikosteroida i imunosupresivnih lijekova. Ovi lijekovi se mogu koristiti nakon terapije pembrolizumabom u slučaju pojave nuspojava uzrokovanih aktivnošću imunskog sustava. Preporuka je da žene u fertilnoj dobi uzimaju kontracepciju, ne smije se primjenjivati na trudnicama obzirom da su studije na animalnim modelima pokazale kako smanjuje toleranciju na fetus i uzrokuje rani pobačaj.

Do 2017. godine ovaj lijek nije ispitan na pacijentima koji su imali infekciju HIV-om te hepatitisom B i C. Pembrolizumab se uklanja iz cirkulacije nespecifičnim katabolizmom pa se ne očekuju metaboličke interakcije s drugim lijekovima. Sistemski klirens je 0,2 L/dan, a vrijeme polueliminacije je 25 dana. Terapija se može odgoditi pa i prekinuti ako nuspojave postanu preteške (70).

Terapija se provodi sve do pogoršanja bolesti ili ako se nuspojave ne mogu zbrinuti. Od češćih nuspojava opaženi su umor (24 % slučajeva), osip (19 %), svrbež (17 %), proljev (12 %), mučnina (11 %) i artralgiya (10 %). U 1-10% slučajeva javljala se anemija, smanjeni apetit, glavobolja, vrtoglavica, promjene osjeta okusa, suhoća oka, povišeni krvni tlak, zatvor, vitiligo, suhoća ustiju, akne, ekcemi, mišićni bolovi, edemi, groznica, drhtavica. Od teških nuspojava javljale su se teška upala pluća (uz fatalne ishode), upale endokrinih žlijezda, pankreatitis uz razvoj dijabetesa tipa 1 i ketoacidoze, upale crijeva, jetre i bubrega (70). Unatoč nuspojavama, učinkovitost pembrolizumaba se u kliničkim pokusima očitovala odgodom pogoršanja tijekom bolesti i povećanom stopom preživljavanja. Rani rezultati, iz studije koja je uključivala 540 pacijenata, pokazali su da nakon šest mjeseci nakon uzimanja terapije nije došlo do pogoršanja bolesti kod 34 % pacijenata. U studiji koja je obuhvaćala 834 pacijenta, u usporedbi s ipilimumabom, pacijenti nisu imali pogoršanje bolesti u prosjeku 5,5 mjeseci dok su pacijenti tretirani s ipilimumabom imali prosjek od 2,8 mjeseci. Pacijenti tretirani pembrolizumabom su živjeli dulje nego pacijenti tretirani ipilimumabom: doživljenje od 12 mjeseci od početka terapije imalo je 71 % pacijenata u odnosu na 58% pacijenata (70). Zbog konzistentnih pozitivnih rezultata Europska agencija za lijekove je odobrila uporabu u terapiji uznapredovalih tipova melanoma. Sigurnosni profil se smatra povoljnim, pogotovu u usporedbi s kemoterapijom, a većina nuspojava se može regulirati. Kao problem uvođenja u širu uporabu je njegova visoka cijena: 51,79 \$/mg ili za pacijenta od 75 kg, cijena ukupne terapije melanoma od 26 ciklusa bi iznosila oko 1 000 000 \$ (71,72). Do danas u Hrvatskoj nije zabilježeno liječenje melanoma ovim lijekom (podaci HALMED-a o potrošnji lijekova 2011.-2017. godine).

### **4.3. Ciljane terapije melanoma**

Ciljana terapija karcinoma (melanoma) je vrsta terapije koja cilja na promjene u stanicama tumora koje im omogućuju da rastu, umnažaju se i šire po organizmu. Ciljane terapije djeluju na drukčiji način od standardne kemoterapije koja u osnovi napada svaku stanicu koja se

ubrzano dijeli. Lijekovi koji se koriste u terapiji melanoma su male molekule. Za uspješno provođenje terapije ovim lijekovima potrebno je ustvrditi postoje li odgovarajuće mete u stanicama melanoma. Konkretno, u terapiji melanoma, radi se o mutacijama na pojedinim genima koji zajedno tvore MAPK/ERK put (također poznat i kao Ras-Raf-MEK-ERK put)(73).

Postupkom biopsije uzima se uzorak tkiva pacijenta i citogenetičkim tehnikama se utvrđuje postojanje ili manjak odgovarajućih mutacija. Vrlo značajne su mutacije na genima RAS, za koje je 1970-ih godina utvrđeno da su vrlo snažni onkogeni. No prava spoznaja o ključnoj ulozi MAPK/ERK puta u razvoju melanoma je došla nakon otkrića mutacija u skupini gena RAF, konkretno genu BRAF 2002. godine (73,77). Razumijevanje uloge ovih mutacija u nastanku melanoma omogućilo je razvoj lijekova koji će za cilj imati vrlo selektivno djelovanje. Kao prvi je razvijen BRAF-inhibitor vemurafenib i uveden u kliničku uporabu u SAD-u 17. kolovoza 2011. godine, a zatim je slijedilo uvođenje dabrafeniba 30. svibnja 2013. godine. Također su razvijeni lijekovi koji ciljano djeluju na gen MEK, koji je u uskoj vezi s genom BRAF i do danas su u kliničku uporabu u terapiji melanoma uvedeni 2013. godine trametinib te 2015. godine cobimetinib. Centraliziranim postupkom, na razini čitave EU, vemurafenib (komercijalno ime Zelboraf®) je uveden u kliničku uporabu 17. veljače 2012. godine, a u Republici Hrvatskoj koristi se od 2015. godine. Dabrafenib (komercijalno ime Tafinlar®) je centraliziranim postupkom uveden u kliničku uporabu na razini čitave EU 26. kolovoza 2013.godine. Na isti način trametinib (komercijalno ime Mekinist®) 30. lipnja 2014.godine, a cobimetinib (komercijalno ime Cotellic®) je uveden 20. studenog 2015. godine (77). Pokazano je, nakon uvođenja u uporabu, da stanice melanoma razvijaju toleranciju na BRAF-inhibitore pa se vrlo intenzivno ispituju kombinacije ovih lijekova s monoklonskim protutijelima, klasičnom kemoterapijom, zračenjem i drugim inhibitorima koji ciljano djeluju na rast stanica melanoma (77). Obzirom da je njihovim otkrićem pokrenuta revolucija u dotadašnjem pristupu proučavanja melanoma, uvođenje ovih lijekova u kliničku uporabu zajedno s drugim tipovima inovativnih terapija melanoma, smatra se prekretnicom koja je kao rezultat postigla značajno unaprijeđenje terapijskog odaziva te time i produljenje života tretiranih pacijenata (78).

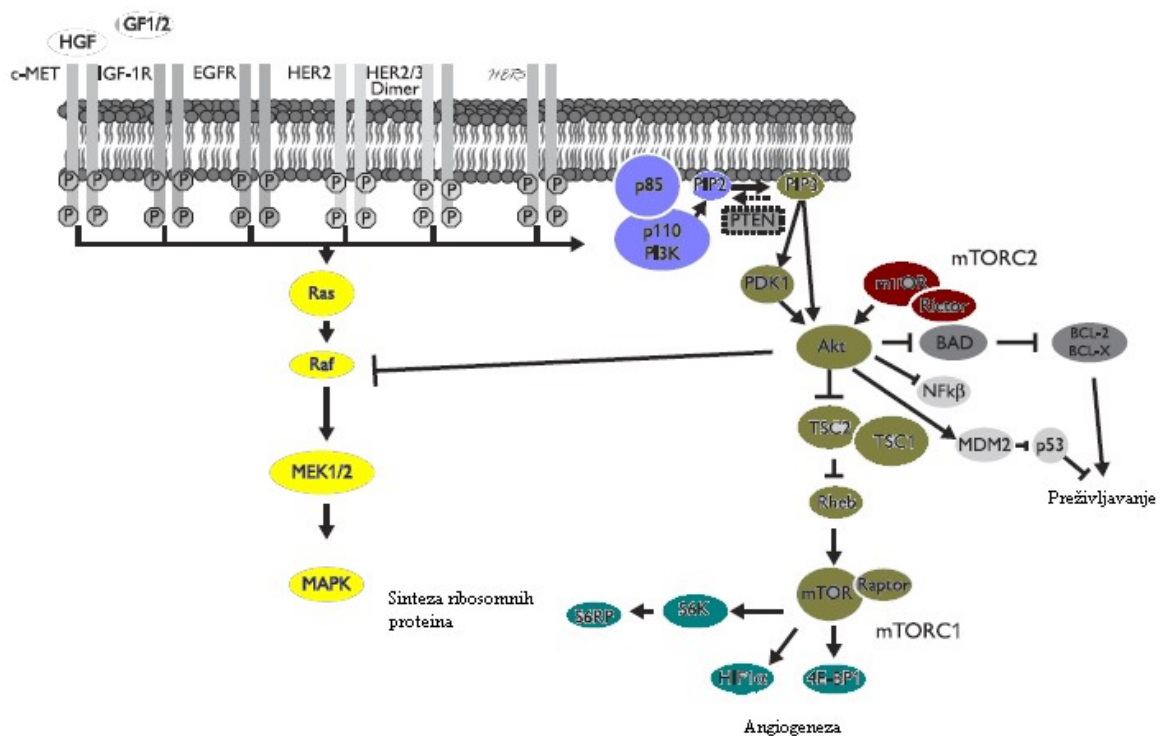
### 4.3.1. MAPK/ERK signalni put

MAPK/ERK signalni put se sastoji od niza proteina u stanici koji prenose signal s receptora smještenog na površini stanice sve do molekule DNA u jezgri stanice (Slika 15). Drugi naziv koji se koristi je Ras-Raf-MEK-ERK put. Otkrićem činjenice da oko 65% melanoma sadrži štetnu mutaciju u ovom signalnom putu učinilo je od njega ključnu točku u istraživanju melanoma. Signal se stvara kada se izvanstanični mitogen, primjerice epidermalni faktor rasta (*engl.* epidermal growth factor, EGF) veže na površini stanice na receptor za epidermalni faktor rasta (*engl.* epidermal growth factor receptor, EGFR). Citoplazmatska domena EGFR se fosforilira i na njega se veže protein Grb2. Grb2 protein veže drugi protein - faktor izmjene gvanin-nukleotida i taj kompleks uzrokuje otpuštanje gvanozin-dinukleotid-fosfata (GDP) s proteina Ras. Ras djeluje kao binarni prekidač u unutarstaničnoj signalnoj mreži (79).

Aktivira se vezanjem gvanozin-trinukleotid-fosfata (GTP) iz citosola stanice. Obzirom da u citosolu ima oko 10x više GTP-a od GDP-a, otpuštanjem GDP-a s proteina Ras posljedično dolazi do njegove aktivacije a time i aktivacije drugih proteina u signalnom lancu. Procesi koji su regulirani aktivacijom proteina Ras uključuju upravljanje integritetom citoskeleta, proliferaciju, diferencijaciju, adheziju i migraciju stanica te apoptozu. Signalni put koji uključuje protein-kinazu aktiviranu mitogenom (*engl.* mitogen-activated protein kinase MAP ili MAPK) rezultira transkripcijom gena koji su odgovorni za diobu i rast stanice. Drugi, vrlo značajni put na koji utječe Ras protein, je signalni put PI3K/AKT/mTOR koji stimulira sintezu proteina i rast stanice, a inhibira apoptozu. Mutacije u genima RAS uzrokuju ekspresiju trajno aktiviranih proteina Ras. Takvi izmijenjeni proteini šalju trajno aktivirajuće signale koji pak uzrokuju tumore. Zbog toga su geni RAS prepoznati kao onkogeni još 1970-ih godina. Otkriveno je da su mutacije koje aktiviraju protein Ras pronađene u 20-25 % svih tumora kod ljudi, a u nekim vrstama tumora taj broj ide i do 90% (79). U melanomu učestalost tih mutacija iznosi od 15-25 %. Aktivirani Ras dalje aktivira Raf-kinaze.

Raf-kinaze kodira gen RAF. Kod melanoma se u oko 45 % slučajeva pojavljuje mutacija u genu BRAF koji kodira B-Raf kinazu. B-Raf kinaza je uključena u prijenos signala koji direktno utječu na rast stanica i 2002. godine je dokazano kako je upravo ta mutacija odgovorna za nastanak nekoliko vrsta tumora uključujući i melanom. Mutacije uzrokuju promjene u katalitičkom mjestu enzima koje je odgovorno za prolazak signala dalje prema Mek-kinazama u signalnom putu i po strukturi i brojnosti uključuju:

- 1) V600E: u 87,3 % slučajeva, nastaje zamjenom aminokiseline valin na poziciji 600 glutaminskom kiselinom;
- 2) V600K : u 7,9 % slučajeva, nastaje zamjenom aminokiseline valin na poziciji 600 lizinom;
- 3) V600D: rijetka mutacija <0,2 % , nastaje zamjenom aminokiseline valin na poziciji 600 aspartatom;
- 4) V600R: rijetka mutacija oko 1 % , nastaje zamjenom aminokiseline valin na poziciji 600 argininom;
- 5) V600M: rijetka mutacija <0,1 % , nastaje zamjenom aminokiseline valin na poziciji 600 metioninom.



Slika15. Prikaz signalnog puta MAPK/ERK (Preuzeto i prilagođeno iz 73).

Prisutnost ovih mutacija utvrđuje se komercijalnim testom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu razvijenom od strane tvrtke Roche pod imenom cobas® 4800 BRAF V600

test mutacije. Test se radi na uzorcima tkiva melanoma fiksiranima u formalinu i uklopljenima u parafin. Uzorci se mogu obraditi već za 8 sati od biopsije i mogu se pregledati i do 94 uzorka tkiva odjednom.

Također je opaženo da se BRAF V600 mutacije i NRAS mutacije međusobno isključuju, no uz NRAS mutacije mogu doći ne-V600 BRAF mutacije (79).

Signal se s B-Raf kinaze prenosi na MEK-kinaze dvostruke specifičnosti (prema MAP-kinaza/ERK-kinaza. Kod ljudi postoji sedam različitih gena MAP koji kodiraju odgovarajuće MEK kinaze. U terapiji melanoma razvijeni su inhibitori MEK-kinaza što rezultira blokadom stanične proliferacije i apoptozom. Signal se dalje prenosi na skupinu proteina koji se zovu kinaze regulirane izvanstaničnim signalima (*engl.* extracellular signal-regulated kinase, ERK) ili noviji naziv protein-kinaza aktivirana mitogenom (*engl.* mitogen-activated protein kinase, MAPK). ERK (MAPK) promovira translaciju mRNA i proizvodnju proteina te regulira aktivnost transkripcijskih faktora.

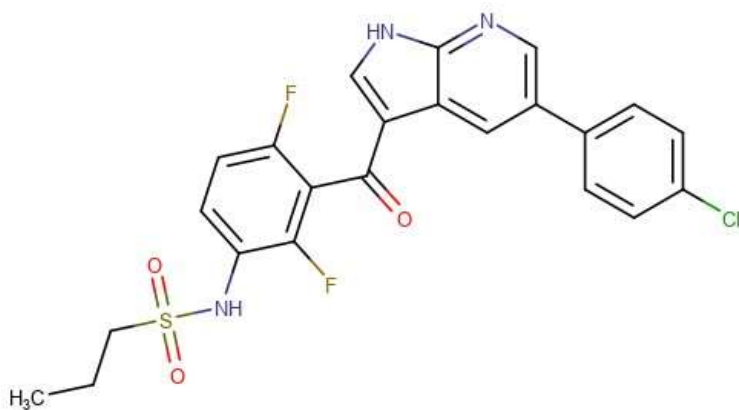
Nekontrolirani rast je nužan preduvjet za razvoj tumora. U melanomu, defekti u MAPK/ERK signalnom putu vode ka nekontroliranom rastu stanica što je prepoznato kao potencijalno mjesto djelovanja lijekova (81). Do danas su u kliničku uporabu za terapiju melanoma uvedeni BRAF-inhibitori vemurafenib i dabrafenib te MEK-inhibitori trametinib i cobimetinib.

Otkriće BRAF mutacija i razvoj ciljanih terapija za BRAF mutacije smatra se prekretnicom u terapiji melanoma koja je imala revolucionarni učinak na prognoze pacijenata oboljelih od tog tipa melanoma. Od 2011. godine, kada je uveden u uporabu vemurafenib, naučene su brojne lekcije o učincima ove grupe lijekova: o različitim učincima lijeka kod različitih mutacija, različitih grupa pacijenata, o mehanizmima rezistencije stanica melanoma te o potencijalu kombinacije ovih lijekova s drugim oblicima terapija. To je dovelo do razvoja kombinacija lijekova od kojih su neke do danas ušle u uporabu a svakako predstavlja veliki potencijal razvoja za terapije koje će biti uvedene u terapiju melanoma u budućnosti .

### **4.3.2. Vemurafenib**

Vemurafenib (Slika 16) je inhibitor serin-treonin-kinaze BRAF koja je sastavni dio signalnog puta MAPK/ERK u stanicama. Mutacije u genu BRAF rezultiraju konstantnom aktivacijom

proteina BRAF što može dovesti do nekontroliranog rasta stanica i kada nisu prisutni faktori rasta stanice kao npr. EGF. Vemurafenib su razvile tvrtke Plexxikon i Genentech, a danas ga proizvodi i distribuira kompanija Roche Pharma AG pod komercijalnim imenom Zelboraf® (88).



Slika 16. Kemijska struktura vemurafeniba (Preuzeto i prilagođeno iz 82).

Vemurafenib je indiciran kao monoterapija u liječenju odraslih osoba s neoperabilnim ili metastatskim oblikom melanoma s pozitivnom mutacijom BRAF V600. Učinkovitost vemurafeniba je dokazana usporedbom s citostatikom dakarbazinom u studiji koja je uključivala 675 pacijenata s dokazanom BRAF V600 mutacijom. Uspješnost lijeka utvrđena je mjerenjem ukupnog vremena koliko su pacijenti živjeli te mjerenjem razdoblja u kojem nije došlo do pogoršanja bolesti u pacijentima uključenima u studiju. Pokazalo se da je vemurafenib učinkovit u produljenju života pacijentima (13,2 mjeseca prema 9,9 mjeseca) kao i u odgađanju pogoršanja same bolesti (5,3 mjeseca prema 1,6 mjeseca) (88,89). Zbog pozitivnih rezultata u kliničkim pokusima, uslijedilo je odobrenje FDA 17. kolovoza 2011. godine za terapiju melanoma. Na razini čitave EU odobreno je njegovo korištenje u veljači 2012. godine (95).

Preporučena doza vemurafeniba je 960 mg dva puta na dan što daje ukupnu dnevnu dozu od 1920 mg. Može se uzimati s hranom ili bez nje, ali treba izbjegavati uzimati lijek trajno na

prazan želudac. Sam lijek je tvar niske topljivosti i niske permeabilnosti pa punomasni obrok povećava njegovu relativnu bioraspoloživost, vrlo se malo metabolizira u jetri (95 % lijeka u plazmi je nepromijenjeno), a vrijeme polueliminacije iznosi 51,6 sati. Većinom se eliminira putem fecesa (oko 94 %) te vrlo malo urinom (1 %). Uzima se do pogoršanja same bolesti ili do nastanka neprihvatljive toksičnosti. Kod primjene lijeka opažen je razvoj sljedećih nuspojava: nastanak reakcija preosjetljivosti uz mogućnost nastanka anafilaktičkog šoka, teške kožne reakcije, pojačana osjetljivost na zračenje uz razvoj upalnih reakcija na ozračenom mjestu, produljenje QT intervala uz povećani rizik nastanka ventrikularnih aritmija, teške oftalmološke reakcije, razvoj planocelularnog karcinoma, novih primarnih melanoma, ostalih vrsta karcinoma vezanih uz mutaciju gena NRAS, pankreatitis, oštećenje jetre i bubrega, nastanak fotosenzitivnosti (95).

Opaženo je da se vremenom (6-7 mjeseci) razvija tolerancija melanoma na terapiju vemurafenibom i do danas su otkrivena tri mehanizma razvoja rezistencije (96):

- 1) stanice karcinoma pojačano proizvode protein PDGFRB (*engl.* platelet derived growth factor receptor beta) odgovoran za razvoj krvnih žila;
- 2) mutacija gena NRAS koji posljedično reaktivira normalan gen BRAF;
- 3) pojačano lučenje hepatocitnog faktora rasta u stromalnim stanicama.

Obzirom da je kompletna remisija bolesti opažena kod samo 5% tretiranih pacijenata, trenutno se provode klinička istraživanja kombinirane uporabe vemurafeniba s MEK- inhibitorom cobimetinibom. Ovime se želi nadvladati sposobnost stanica melanoma da različitim mehanizmima na razini gena razviju toleranciju na djelovanje vemurafeniba. Postignut je rezultat od 9,9 mjeseci razdoblja bez pogoršanja bolesti u usporedbi s 6,2 mjeseca u monoterapiji vemurafenibom. Iako su nuspojave bile jednakog intenziteta, njihova učestalost je bila bitno smanjena (96).

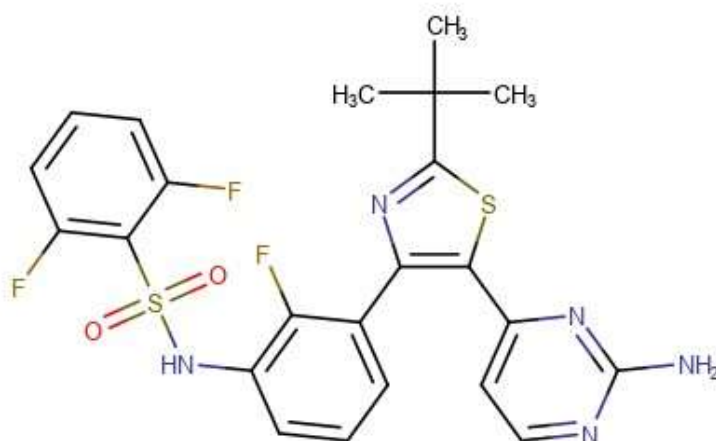
Trenutno je kombinacija vemurafenib/cobimetinib u fazi odobravanja od strane FDA.

Trošak uporabe vemurafeniba je visok: po današnjim cijenama trošak 7-mjesečnog ciklusa iznosi 80000 \$ što je izazvalo kritiku nacionalnih zdravstvenih osiguravatelja u EU. Iako je njegova primjena u RH otpočela u 2015. godine, te iste godine je zasjeo na 23. mjesto po financijskoj potrošnji na bolničkoj listi lijekova u apsolutnom iznosu od 17 500 000 Kn. U 2016. godini je bio na 15. mjestu u apsolutnom iznosu od cca 25 000 000 Kn (154). Uzimajući u obzir epidemiološke podatke o incidenciji melanoma, kako kod nas tako i u svijetu, nameće se potreba osiguravanja sve većih financijskih sredstava kako bi se zadovoljile potrebe sve većeg broja pacijenata što će predstavljati rastući izazov u budućnosti.



### 4.3.3. Dabrafenib

Dabrafenib (Slika 17) je inhibitor serin-treonin-kinaze BRAF koja je sastavni dio MAPK/ ERK signalnog puta u stanicama te mu je djelovanje slično kao i kod vemurafeniba. Razvila ga je tvrtka GlaxoSmithKline, a prodaje se pod komercijalnim nazivom Tafinlar®. Kao i kod vemurafeniba, potrebno je ispitati pacijenta na postojanje BRAF V600 mutacija prije primjene ovog lijeka. Koristi se kod neoperabilnog ili metastazirajućeg oblika melanoma kao monoterapija ili u kombinaciji s MEK-inhibitorom trametinibom te kod uznapredovalog oblika karcinoma ne-malih stanica pluća. Mehanizam djelovanja se sastoji od blokade proteina Braf koji pokazuju konstantnu aktivnost uslijed mutacije gena BRAF (99,102).



Slika 17. Kemijska struktura dabrafeniba (Preuzeto i prilagođeno iz 97).

Blokadom proteina Braf usporava se dioba stanica melanoma i njihovo metastaziranje. Ključni dokaz o njegovoj učinkovitosti donijela je Break-3 studija, gdje je uspoređivan s citostatikom dakarbazinom na uzorku od 250 pacijenata. Rezultati su pokazali da je razdoblje do pogoršanja bolesti iznosilo 5,1 mjesec za dabrafenib te 2,7 mjeseca za dakarbazin. Opaženo je da je terapijski odaziv manji, a razdoblje do pogoršanja bolesti kraće kod pacijenata koji su

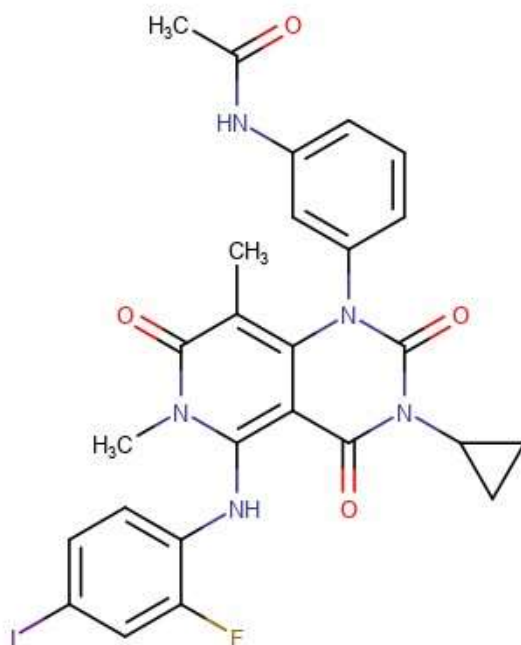
imali V600K mutacije u usporedbi s pacijentima koji su imali V600E mutacije. Zbog tih rezultata FDA je odobrila njegovo uvođenje u uporabu 30. svibnja 2013.godine. Na razini čitave EU, centraliziranim postupkom, njegova uporaba je odobrena 26. kolovoza 2013. godine, ali do danas je u režimu dodatnog nadzora (103). Obzirom da se i kod njega brzo razvija tolerancija (6-7 mjeseci) ispitivana je kombinacija s MEK-inhibitorom trametinibom. U jednoj studiji koja je obuhvaćala 423 pacijenata terapijski odaziv je bio 67 % u kombinaciji dabrafenib/trametinib te 51 % u monoterapiji dabrafenibom. Razdoblje do pogoršanja bolesti je bilo dulje u kombinaciji dabrafenib/trametinib nego u monoterapiji dabrafenibom (9,3 prema 8,8 mjeseci). Ova kombinacija je bila učinkovitija i u odnosu na monoterapiju vemurafenibom, mjereno u razdoblju do pogoršanja bolesti (25,6 prema 18 mjeseci), pa je FDA odobrila primjenu dabrafenib/trametinib 08. siječnja 2014. godine. Ova kombinacija je odobrena za uporabu u travnju 2017. godine od strane Europske agencije za lijekove (103,105).

Dabrafenib se upotrebljava u dozi od 150 mg dva puta na dan, sat vremena prije ili dva sata poslije jela. Dabrafenib se primjenjuje sve dotle dok postoje pozitivni učinci za pacijenta ili do pojave ozbiljnih nuspojava. Najčešće nuspojave su hiperkeratoza, glavobolja, pireksija, artralgiya, stvaranje bradavica na koži, alopecija, osip, bol u leđima, gubitak osjeta na dlanovima i stopalima, zatvor, mijalgija, smanjenje plodnosti u muškaraca i nazofaringitis. Od vrlo teških nuspojava ubrajamo: stvaranje novih karcinoma skvamoznih stanica u koži, novih melanoma, ozbiljne slučajeve vrućice koji mogu dovesti do pada tlaka, otkazivanja funkcije bubrega, teške dehidracije, hiperglikemije uz komplikacije dijabetesa te deficit glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze uz posljedični razvoj hemolitičke anemije. Obzirom na mogućnost razvoja komplikacija prilikom liječenja potrebno je konstantno praćenje pacijenata (103). U odnosu na vemurafenib njegova cijena je nešto povoljnija i iznosi oko 9500 \$ za mjesec dana terapije, no ukupna cijena terapije, računata po osnovi stope doživljenja od prosječnih 9 mjeseci, iznosi visokih 80000 \$. Do danas u Republici Hrvatskoj nije zabilježeno korištenje ovog lijeka (103).

#### **4.3.4. Trametinib**

Trametinib (Slika 18) je inhibitor protein-kinaza MEK1 i MEK2. Razvila ga je tvrtka Glaxo-SmithKline, a na tržištu lijekova prisutan je pod komercijalnim nazivom Mekinist®.

Upotrebljava se u terapiji neoperabilnih i metastazirajućih oblika melanoma koji sadrže BRAF V600 mutaciju kao monoterapija ili u kombinaciji s dabrafenibom. U ovoj kombinaciji odobrena je njegova uporaba i u terapiji karcinoma ne-malih stanica pluća. Mehanizam djelovanja se sastoji od blokade enzima MEK i MEK2 koje promiču diobu stanice što rezultira nekontroliranim umnažanjem stanica melanoma. Blokadom ovih kinaza, sprječava se njihova aktivacija Braf-kinazama što rezultira usporavanjem rasta i širenja melanoma. Rezultati Metric studije faze 3 kliničkih ispitivanja su pokazali njegovu veću učinkovitost u usporedbi s kemoterapeutcima dakarbazinom i paklitakselom. Studija je provedena u razdoblju od studenog 2010. godine do ožujka 2013. godine i uključivala je ukupno 322 pacijenta na 112 lokacija u svijetu (106).



Slika 18. Kemijska struktura trametiniba (Preuzeto i prilagođeno iz 104).

Razdoblje do pogoršanja bolesti za trametinib je iznosilo 4,8 mjeseci, a za kemoterapeutike 1,5 mjeseci. Terapijski odaziv je bio 22 % za trametinib dok su kemoterapeutici postigli terapijski

odaziv od 8%. Klinički pokusi su također pokazali da se razvija tolerancija na lijek nakon primjene od 6-7 mjeseci. FDA je odobrila uporabu ovog lijeka u monoterapiji metastazirajućeg melanoma s BRAF V600 mutacijom u svibnju 2013. godine. Centraliziranim postupkom, na razini čitave EU, odobrena je njegova uporaba, uz dodatno praćenje, 30. lipnja 2014. godine (106). Kako bi se izbjegla pojava tolerancije na monoterapiju trametinibom, ispitivana je njegova kombinacija s BRAF-inhibitorom dabrafenibom (100). U prvoj studiji, koja je uključivala 423 pacijenta, uspoređivana je učinkovitost kombinacije trametinib/dabrafenib s dabrafenibom i utvrđeno je da razdoblje do pogoršanja bolesti iznosi 11 mjeseci i 8,8 mjeseci za dabrafenib. U drugoj studiji, koja je uključivala 704 pacijenta, uspoređivana je učinkovitost kombinacije trametinib/dabrafenib s vemurafenibom kao monoterapijom i utvrđeno je da su pacijenti koji su primali kombinaciju lijekova živjeli dulje nego pacijenti koji su samo primali vemurafenib (25,6 prema 18 mjeseci). Rezultati ove studije doveli su do odobravanja njene uporabe od strane FDA 08.siječnja 2014. godine (106).

Preporučena doza trametiniba je 2 mg uzeta jednom dnevno. Lijek se uzima sve do izostanka pozitivnih učinaka liječenja ili do razvoja nepodnošljivih nuspojava. Lijek se uzima natašte, sat vremena prije ili dva sata poslije jela. Vrijeme potrebno za postizanje vršne koncentracije u organizmu iznosi 1,5 sati. Bioraspoloživost lijeka uzetog oralnim putem iznosi 72 % u usporedbi s intravenskom primjenom. Lijek je podložan akumulaciji, pri čemu se maksimalna koncentracija postiže oko dva tjedna nakon uzimanja. Trametinib se veže na proteine plazme u krvotoku. Trametinib se metabolizira primarno reakcijom deacetilacije ili u kombinaciji s reakcijom monooksigenacije. Deacetilirani metabolit se dalje glukuronizira. Poluvrijeme eliminacije iznosi 127 sati. Primarno se eliminira fecesom (>80 %), a ostatak urinom (106).

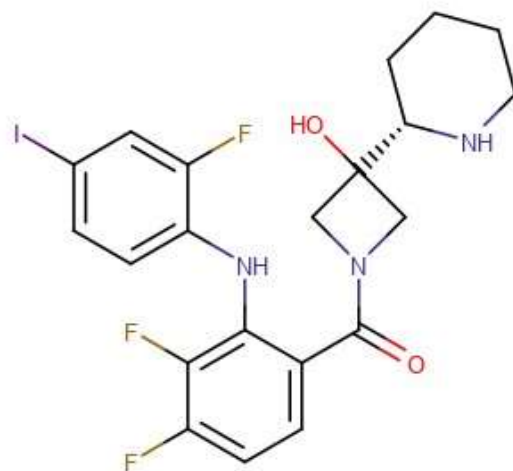
Kod monoterapije trametinibom ili u kombinaciji s dabrafenibom opažene su sljedeće nuspojave: u više od 20 % slučajeva javili su se osip, proljev, svrbež, umor, povišenje temperature, povraćanje, bol u zglobovima, mučnina, povišeni krvni tlak i drhtavica. Po život opasne nuspojave, iako rjeđe, uključivale su nastanak novih tumora (najčešće karcinom pločastih stanica kože), nastanak novih melanoma, krvarenja (pojačana uzimanjem antikoagulanasa), disfunkcija lijeve klijetke, oštećenje jetre, oštećenje vida, upala pluća, upala gušterače, rabdmioliza i zatajenje bubrega. Zbog navedenih rizika potrebno je praćenje pacijenta tijekom čitave terapije (106).

Prosječan trošak mjesečne terapije iznosi oko 10800 \$ po današnjim cijenama što daje ukupan trošak terapije od preko 130000 \$ godišnje. Visoka cijena lijeka ograničava njegovu uporabu i u razvijenim zemljama. Do danas u Republici Hrvatskoj nije zabilježeno korištenje lijeka putem nacionalnog osiguravatelja.

### 4.3.5. Cobimetinib

Cobimetinib (Slika 19) je također inhibitor protein-kinaza MEK1 i MEK2. Inhibicija kinaza MEK uzrokuje blokadu fosforilacije kinaza ERK, što rezultira usporenom diobom ili prestankom diobe stanica. Upotrebljava se u neoperabilnim ili metastazirajućim oblicima melanoma koji sadrže BRAF V600 mutaciju u kombinaciji s BRAF-inhibitorom vemurafenibom (109).

Učinkovitost cobimetiniba je dokazana studijom koja je uključivala 495 pacijenata s neoperabilnim melanomom koji su posjedovali BRAF V600 mutaciju. Ispitivana grupa je dobivala kombinaciju cobimetinib/vemurafenib dok je kontrolna grupa dobivala samo vemurafenib (109).



Slika 19. Kemijska struktura cobimetiniba (Preuzeto i prilagođeno iz 108).

Razdoblje do pogoršanja bolesti bilo je za kombinaciju cobimetinib/vemurafenib 12,3 mjeseca a grupa koja je dobivala samo vemurafenib 7,2 mjeseci. Dodatak cobimetiniba je produljilo prosječno vrijeme preživljenja na 25,6 mjeseci u odnosu na 18 mjeseci prosječno uz uporabu samo vemurafeniba. Pozitivni rezultati ove studije doveli su do odobrenja za stavljanje lijeka u promet centraliziranim postupkom na razini čitave EU, te od strane FDA u SAD-u pod komercijalnim imenom Cotellic® (109).

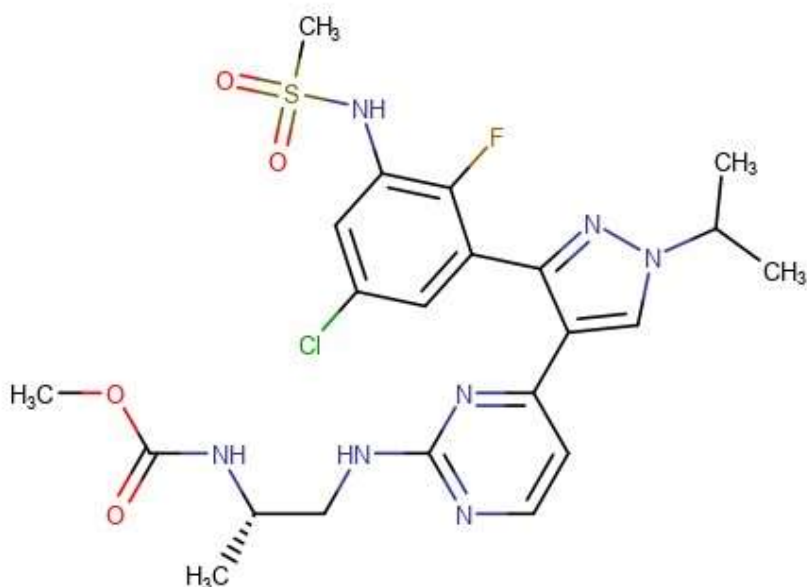
Preporučena doza lijeka iznosi 60 mg/dan jednom dnevno. Cobimetinib se uzima u ciklusima od 28 dana: uzima se 21 dan, nakon čega slijedi pauza od sedam dana kako bi se smanjili toksični efekti. Vemurafenib se cijelo vrijeme uzima kontinuirano u dozi od 960 mg dva puta dnevno. Nisu opažene interakcije između cobimetiniba i vemurafeniba pa se prilagodba doze ne preporučava. Lijek se uzima do prestanka pozitivnih učinaka ili ako nuspojave postanu nepodnošljive ili opasne za pacijenta. Vrijeme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije lijeka u krvi nakon uzimanja doze lijeka iznosi 2,4 sata. Hrana ne utječe na njegovu apsorpciju pa se lijek može uzeti sa ili bez nje. Apsorbira se oko 88% lijeka uz apsolutnu bioraspodivnost od 45,9 %. Veže se u 94 % slučajeva na proteine plazme. Metabolizira se u jetri odmah nakon apsorpcije i u većini izlučuje fecesom. Reakcije biotransformacije uključuju primarno oksidaciju i glukuronizaciju. Vrijeme polueliminacije iznosi 43,6 sati i do njegovog potpunog uklanjanja iz organizma treba oko dva tjedna (109).

Kod terapije cobimetinibom u više od 20 % slučajeva opažene su sljedeće nuspojave: proljev, osip, mučnina, pireksija, fotosenzitivnost, umor povraćanje, povišene vrijednosti jetrenih enzima i kreatin-fosfokinaze. Od rjeđih, ali ozbiljnijih nuspojava pojavljuju se rabdomioliza, teži oblici retinopatije, teži oblici krvarenja naročito uz istovremeno uzimanje antikoagulanasa, disfunkcija lijevog srca, produljenje QT intervala te pojava novih karcinoma pločastih stanica kože i melanoma (iako manje frekventno nego kod monoterapije vemurafenibom). Zbog rizika povezanih s uporabom ovog lijeka potreban je stalni nadzor pacijenata (109).

Cijena mjesečne terapije cobimetinibom iznosi oko 17600 \$ mjesečno ili preko 200000 \$ godišnje. Obzirom da se radi o lijeku pod patentnom zaštitom, kao i kod ostalih inovativnih lijekova koji se koriste u terapiji melanoma, ne očekuje se skori pad cijena. Do danas u Republici Hrvatskoj nije zabilježeno korištenje lijeka putem nacionalnog osiguravatelja.

### 4.3.6. Encorafenib

Encorafenib ( Slika 20) je selektivni inhibitor mutiranog oblika BRAF-kinaze, enzima koji je dio MAPK signalnog puta uključenog u kontroli rasta i proliferacije stanica (110). U kombinaciji s binimetinibom, MEK-inhibitorom, koristi se u terapiji uznapredovalog, neresektabilnog metastatskog melanoma u pacijenata koji posjeduju BRAF mutacije V600E i V600K. Razvile su ga tvrtke Novartis i Array BioPharma. Učinkovitost je dokazana kliničkim pokusom Columbus gdje je u kombinaciji s binimetinibom pokazao bolje rezultate od monoterapije vemurafenibom i samim encorafenibom. Stopa odgovora u kombinaciji s binimetinibom je iznosila 75 %, dok je u monoterapiji encorafenibom iznosila 58 % i monoterapiji vemurafenibom 49 %. Razdoblje bez pogoršanja bolesti iznosilo je za kombinaciju 14,9 mjeseci, a za monoterapije encorafenibom i vemurafenibom 9,6 i 7,3 mjeseci (110).



Slika 20. Kemijska struktura encorafeniba (Preuzeto i prilagođeno iz 110)

FDA je odobrila njegovu uporabu u kombinaciji s binimetinibom u lipnju 2018. godine. Registriran je pod trgovačkim imenom Braftovi™. Centraliziranim postupkom od strane EMA-e, odobreno je njegovo korištenje na razini čitave Europske unije 20. 09. 2018. godine (113). Encorafenib dodatno potiče stanično starenje popraćeno autofagijom (ne apoptozom!) u BRAF V600E mutiranim stanicama melanoma. Smatra se da mehanizam djelovanja uključuje deregulaciju proteina ciklina D1, koji ima važnu ulogu u diobi stanice, putem ATP kompetitivne inhibicije RAF-kinaze. Još nije objašnjeno kako ovaj učinak utječe na djelotvornost samog lijeka (111). Lijek ima visoku bioraspoloživost od 85% a maksimalnu koncentraciju u krvi postiže nakon otprilike dva sata. Vrijeme polueliminacije iznosi oko šest sati.

Metabolizira se putem citokromnih enzima CYP450. Podjednako se izlučuje urinom i fecesom. Otkriveno je oko 20 različitih metabolita, a samo oko 2-5 % uzetog lijeka se izluči nepromijenjeno. Uzimanje hrane odgađa apsorpciju lijeka, ali ne mijenja bioraspoloživost pa se lijek može uzimati s obrokom. U odnosu na vemurafenib (0,5 sati) i dabrafenib (2 sata) poluvrijeme disocijacije od V600E BRAF iznosi oko 30 sati. To je i razlog većeg učinka encorafeniba u odnosu na BRAF-inhibitore prve generacije. Encorafenib dolazi u obliku kapsula jačine 50 i 75 mg (112). Dnevna doza iznosi 450 mg uz binimetinib dva puta dnevno po 45 mg i može se uzimati sve dotle dok pacijent ne osjeti neprihvatljive nuspojave. Uobičajene nuspojave uključuju umor, mučninu, osip, artralgijsku, ćelavost, svrbež, fotosenzitivnost i pojavu papiloma. Rjeđe i potencijalno opasne nuspojave uključuju uveitis, krvarenja, stvaranje novih tumora kutano i supkutano, ablaciju rožnice, hepatotoksičnost, rabdomiolizu, produljenje QT intervala i embriofetalnu toksičnost (113).

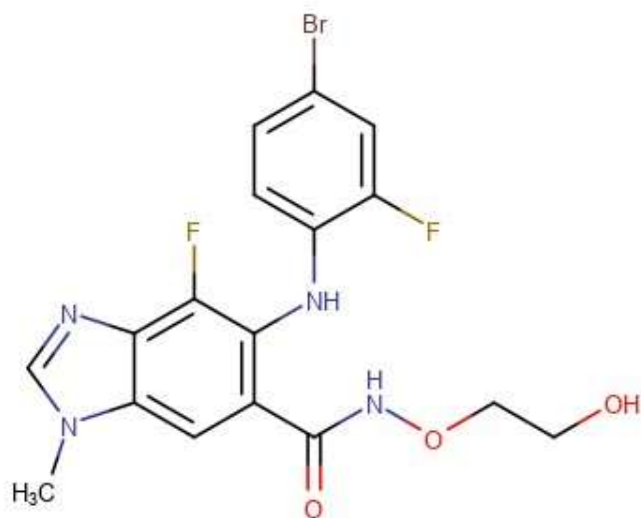
Cijena sedmodnevne terapije u USA iznosi ≈1800 \$. Zastupstvo danas posjeduje kompanija Pierre-Fabre.

#### **4.3.7. Binimetinib**

Binimetinib je MEK-inhibitor i prva molekula koja je pokazala kliničku aktivnost u uznapredovalom melanomu s NRAS mutacijama (Slika 21). Razvila ga je tvrtka Array Biopharma, a poznat je pod komercijalnim nazivom Mektovi® ili prije ARRY-162 (116). U melanomu se dominantno pojavljuju BRAF mutacije (45-50%) dok su druge po učestalosti NRAS tipa (15-20 %). Kako aktivirana NRAS-kinaza ima visoki afinitet prema GTP-u, koji je



potreban za njegovu aktivaciju, direktno ciljanje mutirane NRAS-kinaze do danas nije polučilo uspjeh. Zbog toga se pokušalo indirektno utjecati na tu mutaciju na način da se inhibira signal u sljedećim fazama prijenosa u MAPK/ERK signalnom putu. Binimetinib inhibira homologne kinaze MEK1 i MEK2 što u konačnici izaziva smanjenje rasta tumorskih stanica. U fazi II kliničkih ispitivanja na uzorku od 117 pacijenata koji su posjedovali NRAS mutaciju, objektivni postotak odgovora iznosio je 15 %. Zbog ovog povoljnog rezultata binimetinib je ispitan u studiji NEMO u fazi III kliničkih pokusa na uzorku od 402 pacijenta s NRAS mutacijama. Binimetinib je uspoređivan s antineoplastikom dakarbazinom kao standardom. U tom pokusu binimetinib je pokazao veći postotak odgovora na terapiju (15,2 % prema 6,8 %) i veće preživljenje bez progresije bolesti (2,8 prema 1,5 mjeseci) u odnosu na dakarbazin. Prosječno ukupno preživljenje se nije puno razlikovalo (11 prema 10,1 mjesec). Prosječno trajanje učinka iznosi 6,9 mjeseci. Kako binimetinib nije pružio bitno veći napredak u terapiji melanoma u odnosu na postojeće lijekove, proizvođač je početkom 2017. godine povukao zahtjev za registracijom ovog lijeka. Međutim u pacijenata koji su bili prije tretirani imunoterapijom, pokazani su bolji rezultati: preživljenje bez progresije bolesti iznosilo je 5,5 mjeseci a trajanje učinka je povećano na 11 mjeseci (116).



Slika 21. Kemijska struktura binimetiniba (Preuzeto i prilagođeno iz 114)

Odgovor na terapiju je i u ovom slučaju ostao gotovo isti (15,8 %). Binimetinib je ispitivan i u kombinaciji s encorafenibom u studiji Columbus faze III kliničkih pokusa. Prosječno preživljenje bez progresije bolesti iznosilo je 14,9 mjeseci, postotak odgovora na terapiju iznosio je 63 % a prosječno trajanje učinka iznosilo je 16,2 mjeseci. FDA je odobrila u lipnju 2018. godine korištenje binimetiniba u kombinaciji s encorafenibom u SAD-u, dok je u EU centraliziranim postupkom odobreno njegovo korištenje u kombinaciji s encorafenibom 20. rujna 2018. godine (116).

Binimetinib se uzima peroralno, prosječno vrijeme za postizanje maksimalne koncentracije u plazmi iznosi 1,48 sati. Metabolizira se u jetri a primarno izlučuje fecesom (62,3 %) te urinom (31,4 %). Dolazi u obliku tableta od 15 mg i uzima se dva puta dnevno po tri tablete. Može se uzimati sve dotle dok postoje pozitivni učinci lijeka ili dok ne nastanu ozbiljne nuspojave. Nuspojave nastaju kod gotovo četvrtine pacijenata i uključuju umor, mučninu, proljev, povraćanje, oštećenje mrežnice oka, bolove u abdomenu, zglobovima i mišićima te povećane vrijednosti enzima kreatin-kinaze što ukazuje na probleme u mišićnom tkivu (116). Cijena pakiranja za mjesec dana terapije u ovom trenutku iznosi oko 12 000 \$ (118).

#### **4.4. Adoptivna terapija stanicama T-limfocita**

Adoptivna terapija stanicama T-limfocita je eksperimentalna terapija koja pokušava povećati kapacitet pacijentovih T-limfocita za borbu protiv tumora. Sam proces uključuje prikupljanje T-limfocita koji su napali tumor. Zatim se *in vitro* probiru stanice koje su pokazale najveću antitumorsku aktivnost te se umnažaju u laboratorijskim uvjetima. Pacijenti se zatim tretiraju lijekovima kako bi se postigla potpuna deplecija limfocita (ciklofosamid i fludarabin uz zračenje) te se pacijentu ubacuju prethodno selektirani i umnoženi T-limfociti kako bi se postigao terapijski učinak (121,122). Noviji pristup razvijen je na principu genske terapije i uključuje izolaciju T-limfocita iz uzorka pacijentove krvi. Ti limfociti se genetički modificiraju ubacivanjem gena za receptor koji specifično prepoznaje antigen koji se nalazi na stanicama tumora pacijenta i nakon toga se umnažaju u kulturi u velikom broju. Nakon limfodeplecije, takve stanice se ubacuju u pacijenta gdje pokreću imunosni odgovor na stanice tumora.

Ovaj terapijski pristup je prvo proučavan na stanicama melanoma obzirom da melanom vrlo često uzrokuje znatan imunosni odgovor s puno napadajućih citotoksičnih T-limfocita. Također

se provode istraživanja na drugim tipovima solidnih tumora kao i na hematološkim malignim bolestima. Klinički pokusi su pokazali kako je ovaj način liječenja najučinkovitiji kod pacijenata s metastatskim melanomom. Terapijski odgovor je veći od terapije ipilimumabom, a sam učinak je dugotrajniji od terapije vemurafenibom. Kao takav, ovaj način terapije ima potencijal da trajno promijeni dosadašnje ishode liječenja melanoma te svakako definira način uvođenja imunoterapije na staničnoj razini u redovite protokole liječenja (123).

Prva istraživanja o uporabi imunosnih stanica u liječenju tumora sežu u pedesete godine prošlog stoljeća kada je opaženo da je odbacivanje transplantata uzrokovano stanicama imunskog sustava. 1986. godine pokazano je da uporaba autolognih tumor-infiltrirajućih limfocita (TIL) uz ciklofosamid može pokrenuti smanjivanje metastaza. 1988. godine pokazano je da TIL mogu potaknuti regresiju melanoma. U studiji na 86 pacijenata u razdoblju od 1987-1992. godine, koju je sproveo Nacionalni institut za zdravlje u SAD-u, postignuta je stopa terapijskog odgovora od 34 %. Od tada su poduzeti dodatni naponi u znanstvenim institucijama kako bi se poboljšali postignuti rezultati. Do danas, ti naponi su rezultirali pristupima sa sljedećim vrstama stanica:

- 1) tumor-infiltrirajući limfociti;
- 2) antigen-specifični klonovi autolognih T-limfocita;
- 3) donori antitumorskih limfocita;
- 4) genetički modificirani humani T-limfociti.

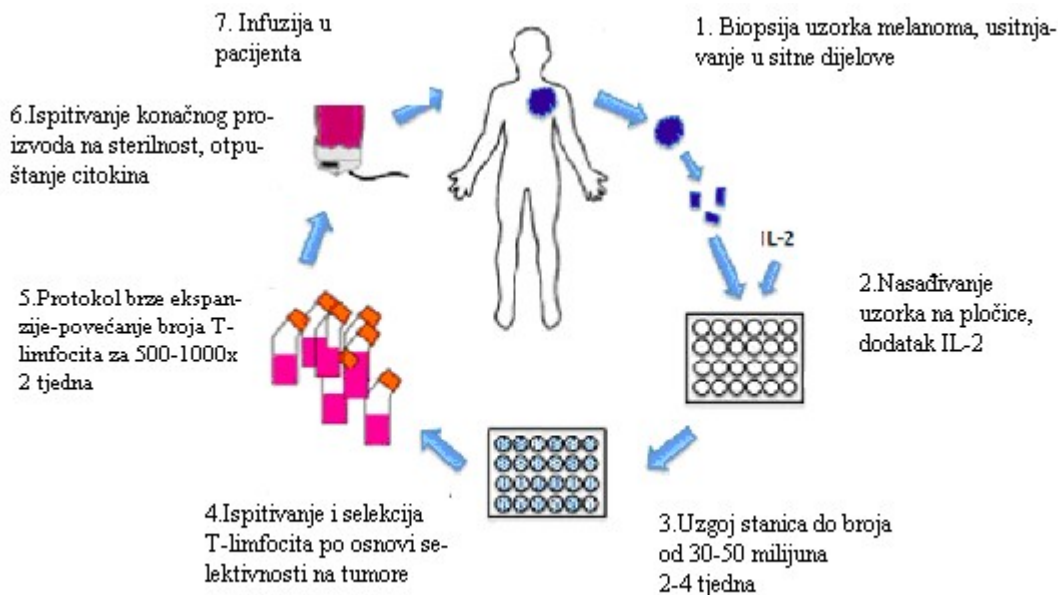
Od svih ovih pristupa tumor-infiltrirajući limfociti su najviše proučavani i kao takvi su pružili najkonzistentnije pozitivne rezultate u terapiji melanoma (123).

Proizvodnja TIL-a se provodi na način da se tumor, dobiven biopsijom, minimalnog promjera 2 cm, usitni i stavi u kulturu medija. Dodaje se IL-2, i kroz nekoliko tjedana, TIL se umnožavaju dok stanice tumora bivaju uništene. Nakon 2-4 tjedna rasta, TIL-ovi se ispituju na T-stanični fenotip citometrijskom metodom te se ispituje njihova reaktivnost na autologne tumorske stanice. Odabiru se one kulture koje pokazuju najvišu razinu citotoksične aktivnosti, te se uzgajaju uporabom protokola brze ekspanzije (*engl.* rapid expansion protocol) u mediju koji sadrži IL-2, protutijelo anti-CD3 te stanice koje podupiru rast T-limfocita dobivene iz mononuklearnih stanica periferne krvi alogenog donora. Ukupno vrijeme potrebno za proizvodnju generacije TIL-a iznosi 5-6 tjedana. Danas se TIL mogu dobiti od 60-90 % uzoraka melanoma u različitim institucijama (Slika 22).

Ustanovljeno je da postoje čimbenici koji utječu na stvaranje uspješne generacije TIL-a: mlađi i ženski pacijenti imaju veće šanse za stvaranje uspješne generacije (94 % uspješnosti kod mlađih od 30 godina, 46 % kod starijih od 60 godina; 71 % uspješnosti kod žena, 57 % kod

muškaraca). Kod pacijenata koji su primili sistemsku terapiju do 30 dana od uzimanja uzorka, uspješnost je iznosila 47 %, za razliku od razdoblja od preko 90 dana od uzimanja sistemske terapije gdje je uspješnost iznosila 66 %. Posebno su zanimljivi mogući učinci BRAF-inhibitora obzirom da pojačavaju ekspresiju antigena u melanomu, što pak povećava sposobnost prepoznavanja imunskog sustava. *In vitro* pokusi na miševima su pokazali da BRAF-inhibitori povećavaju citotoksičnu aktivnost T-limfocita i dovode do povećane sekrecije citokina bez negativnog učinka na njihovu proliferaciju kao i na sposobnost migracije na mjesto lokalizacije tumora. TIL predstavljaju vrlo heterogenu populaciju limfocita koji rastu unutar tumora. Ta populacija kao cjelina je neučinkovita u eradikaciji tumora iz niza vrlo kompleksnih razloga: manjka anti-tumorskih stanica, određeni broj anti-tumorskih stanica postane tolerantan na prisustvo tumora, te prisutnosti velikog broja imunosuprimirajućih stanica kao regulatornih T-limfocita (123).

Logika uporabe tumor-infiltrirajućih limfocita nalaže da ih se ukloni iz takvog imunosupresivnog okruženja, umnoži *in vitro* u dovoljnom broju, vrati u pacijenta gdje će putovati prema mjestu lokalizacije tumora, uništiti stanice tumora kao i stanice koje podupiru rast tumora kao što su vaskularne endotelne stanice.



Slika 22. Stvaranje generacije tumor-infiltrirajućih limfocita  
(Preuzeto i prilagođeno iz 123).

Stoga, važan cilj je identificirati idealan podtip u početnoj mješavini limfocita nastalih u fazi rasta u kulturi. Bitno je razlikovati pojedine faze diferencijacije T-limfocita koje se kreću od mladih, nezrelih CD8<sup>+</sup> stanica s visokim potencijalom umnožavanja i dugim telomerama, do terminalno diferenciranih efektornih memorijskih stanica koje imaju vrlo mali kapacitet umnožavanja ili proliferacije. Kliničke studije u zadnjih pet godina su pokazale kako se tumor-infiltrirajući limfociti u ranim stadijima diferencijacije dulje zadržavaju *in vivo* i posjeduju superiorniji klinički odgovor. To je dovelo do razvoja protokola pod nazivom "mladi TIL" koji prikuplja limfocite iz različitih tumorskih fragmenata enzimskom digestijom, bez dodatne selekcije, skraćujući pri tome vrijeme potrebno za postizanje dovoljnog broja stanica limfocita prije uporabe protokola brze ekspanzije za 20-ak dana. Time se povećava broj limfocita u ranijoj fazi diferencijacije koju karakterizira prisutnost receptora CD27 za faktor tumorske nekroze, prisutnost proteina CD28 (faktor aktivacije limfocita) te duljih telomera. To ubrzanje proizvodnje je vrlo važno u kontekstu smanjivanja broja pacijenata koji se zbog progresije bolesti više ne mogu podvrgnuti ovom tipu terapije. Krajnji cilj je stvaranje TIL-a koji će u sebi objediniti visoki proliferativni kapacitet i dulji životni vijek nediferenciranih limfocita i visoku citotoksičnu aktivnost terminalno diferenciranih limfocita (125).

Jedan od načina je da se proizvedu dvije linije TIL-a: jedna slijedi tradicionalni protokol s IL-2 koji rezultira diferenciranim stanicama visoke citotoksične aktivnosti, ali i kratkog životnog vijeka i slabih proliferativnih mogućnosti, te druga koja koristi citokine IL-15 koji promovira proliferaciju te IL-21 koji omogućuje zadržavanje memorijskih značajki nediferenciranih CD8<sup>+</sup> T-limfocita. Na kraju protokola brze ekspanzije, obje linije se spoje i infuzijom odjednom daju pacijentu. Na ovaj način se postiže brzi učinak na ciljano tumorsko tkivo te njegova dugoročna kontrola. Kritični aspekt koji je uvelike utjecao na uspješnost adoptivne terapije stanicama T-limfocita je uvođenje limfodeplecije pacijenta prije davanja TIL-a. Prije limfodeplecije terapijski odaziv je iznosio oko 39 %. 2002. godine je u nizu kliničkih pokusa pokazano da se davanjem ciklofosfamida i fludarabina prije davanja TIL-a i IL-2 postiže terapijski odaziv od oko 50 %. To je objašnjeno time što je uklanjanjem endogenih regulatornih T-stanica prije infuzije TIL-a uklonjena kompeticija za homeostatske leukine kao što je IL-7. Kako bi se spriječio oporavak T-limfocita *de novo*, posebno onih regulatornih, uvedeno je totalno zračenje tijela. U pokusu su korištene doze zračenja od 2 Gy te 12 Gy na skupinama od po 25 pacijenata. To je rezultiralo terapijskim odazivom u 52% (za 2 Gy količinu zračenja) i 72 % (za 12 Gy količinu zračenja) pacijenata odnosno značajnim povećanjem učinkovitosti terapijskog postupka. U kliničkim pokusima zabilježena je stopa od 13 % potpunog ozdravljenja u razdoblju od pet godina. Iako su stope terapijskog odaziva bile impresivne,

limfodeplecija ima vrlo ozbiljne toksične nuspojave - zabilježena je smrt jednog pacijenta, dok su dva pacijenta zahtijevala hematopoetsku rekonstrukciju autolognim matičnim stanicama. Od ostalih nuspojava zabilježene su pulmonarna hipertenzija te mikroangiopatska nefropatija (125). Klinički benefiti ove vrste terapije melanoma su dobro utvrđeni u brojnim kliničkim pokusima (128). Klinički limiti za širu primjenu uključuju period od 5-6 tjedana potrebnih da bi se proizvela TIL generacija, vrijeme koje je za dobar dio pacijenata zbog brze progresije bolesti predugo. Također vrlo intenzivna limfodeplecijska priprema pacijenta prije infuzije TIL-om isključuje veliki broj pacijenata koji nisu u stanju izdržati toksičnost pripremnog protokola kao i potporne terapije nužne da bi se liječenje obavilo do kraja. Socijalni limiti uključuju visoke troškove proizvodnje TIL-a te troškove pacijenta u pripremi i u toku liječenja. Procjene su da se troškovi kreću u iznosima od nekoliko desetaka tisuća dolara po pacijentu, no u usporedbi s monoklonskim protutijelima koja su u uporabi u terapiji melanoma taj iznos je prihvatljiv (126). Očekuje se da će troškovi opadati sukladno sve široj uporabi u zdravstvenim ustanovama te većom učinkovitošću, što rezultira manjim ukupnim brojem terapijskih ciklusa. Glavna logistička zapreka su tehnički uvjeti koji su potrebni za proizvodnju TIL-a, danas prisutni u relativno malom broju ustanova. Jedan od načina za rješavanje ovog problema je osnivanje određenog broja centara za terapiju ili osnivanje jednog centra za proizvodnju TIL-a koji bi se poštom slao zdravstvenoj ustanovi gdje se obavlja liječenje. Zaključno, adoptivna terapija stanicama T-limfocita zbog svoje učinkovitosti, kao i potencijala razvoja u modernom, individualnom pristupu liječenja pacijenata medicine 21. stoljeća, može u potpunosti transformirati pristup liječenja melanoma kao i mnogih drugih tipova zloćudnih bolesti (127,129,130,131).

#### **4.5. Genske terapije melanoma**

U zadnja dva desetljeća istraživanja karcinoma i njegove genske podloge su zabilježila veliki napredak. 2001. godine dvije istraživačke skupine su neovisno dovršile sekvenciranje ljudskog genoma uz popratnu identifikaciju oko 30000 gena (132,133). Uslijedio je napredak u

razumijevanju uloge gena u organizmu kao i razloga koji dovode do nastanka raznih vrsta karcinoma, te posljedično i ubrzani napredak u razvoju tehnika koje bi mogle dovesti do njihovog izlječenja. Jedan od takvih pristupa je i genska terapija, a ona uključuje svaki oblik liječenja bolesti gdje se genetički modificiraju stanice pacijenta na način da se defektni gen ukloni, modificira ili u potpunosti zamijeni (134). Prednosti ovog pristupa se očituju u činjenici da se stanice tumora napadaju na molekularnoj razini, pri čemu izostaje potreba za kirurškim liječenjem i uporabom zračenja i citostatika, a identificiranjem gena koji bi mogli uzrokovati tumorski rast stanica kod pojedinca ili u obitelji, možemo djelovati preventivno i prije nego se bolest pojavi. Genetički materijal koji se ubacuje u stanicu može biti čitavi gen, dijelovi gena ili oligonukleotidi (134).

Genska terapija se može izvoditi *in vivo* ili *ex vivo*. Kod genske terapije *in vivo* tumorske lezije se tretiraju terapijskom DNA direktno, kao npr. intradermalnim injekcijama. U genskoj terapiji *ex vivo* stanice od interesa se izoliraju iz pacijenta, selektiraju i uzgajaju u kulturi, genetički manipuliraju ubacivanjem gena kojim želimo postići željeni efekt u stanicu te vraćaju natrag u pacijenta. Postoje razne strategije kojim se to želi postići, a krajnji cilj je uništenje tumorskih stanica i stavljanje bolesti pod kontrolu. Najčešće se koriste tumor supresorski geni, geni koji promiču apoptozu, tzv. suicidalni geni koji proizvode enzim koji u stanicama tumora pretvara proljek u aktivni oblik i tako izazivaju smrt tumorske stanice, geni koji čine tumorske stanice osjetljivijima na djelovanje citostatika i zračenja, ispravne verzije gena koji nose mutacije ili su deletirani kod pacijenta, imunomodulirajući geni ili genetički modificirani onkolitički virusi koji specifično uništavaju tumorske stanice. Genska terapija se ne mora primjenjivati samo u tumorskim stanicama, već u tu svrhu mogu poslužiti i komponente imunosnog sustava kao što su dendritičke stanice i T-limfociti (134). Također se razmatraju i kombinacije s postojećim imunoterapijama.

Prvi klinički pokus, koji je uključivao gensku terapiju, proveden je u SAD-u 1990.godine u liječenju teške kombinirane imunodeficijencije. Deficitarni gen za adenzil-deaminazu unesen je putem gama-retrovirusa. Nisu bile primjećene nikakve nuspojave, a kod jednog pacijenta efekt liječenja se zadržao preko jednog desetljeća. Uspjeh ovog pokusa pokrenuo je val istraživanja pa je do 2012.godine izvedeno 1840 kliničkih pokusa na različite bolesti, primarno na karcinome.

Sam koncept genske terapije se temelji na unošenju željenog genskog materijala u stanice od interesa za što nam je potreban odgovorajući nosač ili vektor. Vektori se dijele na dvije skupine: virusne koji se koriste u oko 65 % slučajeva te ne-virusne (molekule DNA i plazmidi) koji se koriste u 35 % slučajeva. Prednost korištenja virusnih vektora je u tome što oni evolucijski već

posjeduju mehanizme ulaska u stanicu domaćina. Međutim, to ih ujedno i ograničava obzirom da je ljudski organizam razvio vlastite obrambene mehanizme (134).

Kod nevirusnih vektora, kao što su plazmidi, koriste se drugi pristupi koji uključuju mehaničke (genski pištolj, elektroporacija, hidrodinamičke metode), kemijske (kationski liposomi) i druge metode prijenosa. Prijenos genskog materijala direktno u stanice naziva se transfekcija, dok se prijenos genskog materijala putem virusa naziva transdukcija. Ne-virusni prijenos ima prednost zbog veće sigurnosti po pacijenta i lakše modifikacije, ali je ukupna efikasnost prijenosa genskog materijala u usporedbi s virusnim vektorima znatno niža. Izbor vektora ovisi o terapijskom pristupu (*ex vivo* ili *in vivo*), traženom trajanju transgenske ekspresije (traži se dugotrajniji učinak kod imunodeficijencija te kratkoročni kod tumora), bolesti i tipu stanice od interesa (stanica koja se dijeli, stanica u postmitozi, stupanj diferencijacije stanice, itd.) te o značajkama samog gena kojeg želimo ubaciti (duljina cDNA, sekrecijski produkt gena, zahtjev za ekspresijom u točno određenom tkivu ili fiziološkom stanju). Idealno, vektor bi trebao biti dizajniran na način da specifično djeluje samo na stanice od interesa čime bi se spriječila infekcija zdravih stanica i povećala sigurnost samog pacijenta. To se postiže na način da proteini virusa reagiraju samo na određene stanične receptore u ciljanoj stanici (transdukcijsko ciljanje) ili selektivnost postizemo uporabom promotora koji je prisutan samo u stanicama od interesa (transkripcijsko ciljanje). Transkripcijsko ciljanje ne ograničava tip stanice u koju ulazi vektor, ali određuje stanicu u kojoj će se eksprimirati terapijski gen. Kako bi se povećao stupanj specifičnosti ova dva principa se mogu kombinirati (134).

Virusni vektori se laboratorijski obrađuju pomoću plazmida koji nose genom koji će se prenijeti u sljedeću generaciju virusa. Taj genom uključuje gen koji će dati krajnji željeni učinak u terapiji te regulatorne elemente koji kontroliraju njegovu ekspresiju. U pravilu se virusi modificiraju na način da se ne mogu razmnožavati izvan laboratorijskih uvjeta pa ne mogu stvoriti aktivnu infekciju u pacijentu čime se limitira njihovo horizontalno širenje. U monogenskoj terapiji virusi mogu prenijeti gen veličine oko 2-10 kb. U kompleksnim genskim terapijama, mogu se dodati i druge podupirajuće molekule kao što su imunostimulirajuće molekule kod DNA virusa, koje se oslobađaju u fazi replikacije virusa *in vitro*. Prednost korištenja virusnih vektora leži u činjenici da se lako pročišćavaju i shodno tome postižu se veliki titri, te postizanju dugotrajnih učinaka kod pacijenata s minimalnim nuspojavama. Adenovirusi i adeno-asocirani virusi se u ciljnoj stanici ponašaju kao ekstrakromosomni episomi dok se retrovirusi ugrađuju u genom domaćina u samoj jezgri stanice. RNA-virusi koji se koriste kao vektori imaju veću stopu mutacije i bolje prodiru u stanice domaćina. Prolazak virusa u stanicu domaćina posredovan je interakcijom između receptora na staničnoj membrani



domaćina i samog virusa što rezultira endocitozom. Virusi koji se najčešće koriste kao vektori su:

1) Retrovirusi: virusi koji pripadaju porodici Retroviridae, koriste se gamaretrovirusi i lentivirusi. Prvi koji je upotrijebljen u kliničkom pokusu odobrenom od strane FDA, bio je retrovirusni vektor izveden iz virusa leukemije Moloney miša, danas su drugi po učestalosti uporabe i virus izbora za *ex vivo* pristup u genskoj terapiji. Genski materijal se sastoji od jednolančane RNA, fuzijom membrana virusa i stanice domaćina dolazi do otpuštanja virusne RNA u citosol domaćina gdje dolazi do stvaranja dvolančane virusne DNA. Kod gamaretrovirusa virusna DNA se ugrađuje u genom domaćina samo za vrijeme diobe stanice domaćina dok lentivirus može proći kroz jezgrinu membranu pa može inficirati i stanice koje se ne dijele. Ugrađenu virusnu DNA u genomu domaćina nazivamo provirus i on je odgovoran za replikaciju i umnažanje samog virusa. Retrovirusni vektori kod genske terapije se modificiraju na način da sljedeća generacija virusa, koja nastaje u stanici domaćina, nema mogućnost daljnjeg umnažanja. Retrovirusi nisu dobri vektori kod genske terapije *in vivo* jer imaju vrlo kratko poluvrijeme života u organizmu uzrokovano uklanjanjem putem sustava komplementa. Zato se uglavnom koriste u staničnim kulturama gdje je njihova uporaba vrlo jednostavna.

Retrovirusi se vrlo često upotrebljavaju u modifikacijama komponenti imunskog sustava kako bi se promovirao antitumorski imunski odgovor (134).

2) Adenovirusi: vektori izbora kod *in situ* genske terapije solidnih tumora. Mogu se proizvesti u visokim koncentracijama i podesni su za uporabu *in vivo*. Genski materijal je dvolančana DNA veličine 36 kb omotana proteinskom ovojnicom. Genom adenovirusa nakon ulaska u stanicu domaćina ostaje episomni, odnosno ne ugrađuje se u genom domaćina. Adenovirusi izazivaju snažan imunski odgovor domaćina što im skraćuje vrijeme trajanja kao vektora. Nisu pogodni za terapije gdje se očekuje dugotrajan učinak, ali su pogodni u genskoj terapiji karcinoma. Modificirane verzije ovog virusa posjeduju puno veću sposobnost infekcije stanica domaćina od divljeg tipa. Inficiraju stanice u diobi i u mirovanju. Učinkovitost transdukcije je visoka i dostiže i 100 %. Nedostatak im je što mogu uzrokovati nestabilnost gena koje prenose (134).

3) Herpes simplex virus: radi se o velikom virusu s dvolančanim DNA genomom veličine 150 kb. Prednost mu je što može prenositi veliku količinu genskog materijala, može izbjegavati imunski sustav domaćina, ne integrira se u genom ciljane stanice, ima veliki afinitet prema ciljanim stanicama te snažno promiče lizu stanica. U slučaju razvoja infekcija dostupni su učinkoviti antivirusni lijekovi. Služi za prijenos gena samoubojice, gena koji pomažu

antitumorski imunosni odgovor, gene koji aktiviraju prolijek i gene koji inhibiraju angiogenezu. Tipični ne-virusni vektori uključuju rekombinantne plazmide, oligonukleotide i molekule siRNA (*engl.* small interfering RNA, mala interferirajuća RNA), najčešće se koriste plazmidi. Prilikom primjene na ljudima, iz plazmidnog vektora se mora ukloniti regulatorna sekvenca te gen koji kodira otpornost na antibiotik kako bi se spriječila ekspresija neželjenih peptida i imunosni odgovor. Iako su ovi geni nužni u laboratorijskoj proizvodnji plazmida, nakon umnažanja do potrebnih količina, tehnikama rekombinantne DNA se izrezuju iz plazmida, pa tako preostane samo mala kružna DNA koja sadržava gen koji želimo (134).

Plazmidi i ostali ne-virusni vektori se ubacuju u stanicu i jezgru stanice različitim fizičkim i kemijskim metodama. Sam prijenos genskog materijala ovim vektorima je relativno siguran, učinkovit i jednostavan, ali ekspresija gena je u ovom slučaju kratkotrajna pa se ne koristi u kroničnim bolestima. Primjena je indicirana kod karcinoma. Melanom je imao vrlo važnu ulogu u povijesti razvoja genskih terapija. Steven Rosenberg, iz Nacionalnog instituta za zdravlje (*engl.* National Institute for Health), je 1986. godine provodio pokuse na oboljelima od melanoma koristeći tumor-infiltrirajuće limfocite dobivene iz tkiva pacijenata. Kako je terapijski odaziv bio malen željeli su saznati što se događa s TIL-ma, pa su ih genetički modificirali ubacujući gen za bakterijski enzim neomicin-fosfotransferazu putem gamaretrovirusnog vektora. Taj gen je poslužio kao marker kojim su se vrlo lako mogli identificirati TIL u perifernoj krvi i uzorcima tkiva dobivenih biopsijom. Iako cilj genetičkog modificiranja TIL-a nije bio terapijski već se htjelo dobiti uvid u distribuciju i kretanje TIL-a, ovime je bilo dokazano da se uporabom gamaretrovirusa mogu na siguran način modificirati TIL-i i vratiti u organizam pacijenta. Nakon toga slijedio je niz pokusa koji su za cilj imali dobivanje informacija o mogućnostima kliničke primjene manipulacijom na razini gena. Kako je Rosenberg znao da TIL selektivno migriraju prema mjestu lokalizacije tumora, pokušao je ubaciti gen u TIL koji kodira faktor tumorske nekroze, protein vrlo snažnog antitumorskog djelovanja. Taj pokus je bio prvi gdje je gen uveden u ljudsku stanicu s isključivom namjerom terapije tumora. Pokus je proveden na dvije grupe pacijenata: prva grupa od tri pacijenta je dobila nepročišćeni uzorak TIL-a, a druga grupa od sedam pacijenata je dobila selektirane TIL-e. U obje grupe radilo se o pacijentima koji su imali metastatski oblik melanoma. Postupak je bio dobro podnošljiv, ali izostali su značajniji učinci (134).

Genske terapije raznih vrsta karcinoma čine oko 65% kliničkih pokusa od ukupno svih kliničkih pokusa koji koriste gensku terapiju. Od tih 65% 10% otpada na pokuse vezane uz melanom što ga čini najistraživanijim tipom karcinoma u pokusima ovoga tipa. U 62%

slučajeva radilo se o prijenosu gena virusnim vektorima dok se ostatak odnosio na ne-virusne vektore.

U ovim pokusima ispitivale su se sljedeće strategije liječenja melanoma genskim terapijama:

#### 1) Uporaba gena samoubojica

U ovom slučaju u ciljanu stanicu se unosi gen koji kodira enzim koji ostvaruje učinak na stanicu tek kada dođe u dodir sa svojim supstratom. Enzim pretvara inaktivni prolijek u aktivni oblik koji dovodi do smrti stanice. U ispitivanju je uporaba gena koji kodira enzim timidilatkinazu izvedenu iz herpes simplex virusa (HSV-TK). HSV-TK fosforilira prolijek ganciklovir koji u modificiranom obliku blokira replikaciju DNA i uzrokuje smrt stanice. Drugi primjer je ubacivanje gena koji kodira bakterijsku citozin-deaminazu (CD) koja prolijek 5-fluorocitidin pretvara u aktivni oblik 5-fluorouracil. 5-fluorouracil također blokira replikaciju DNA i uzrokuje smrt stanice. Prednost ovog pristupa je što omogućuje postizanje visokih koncentracija aktivnog oblika lijeka lokalno. Opažen je i efekt "promatrača" gdje se aktivni oblik lijeka prenosi na ciljanu stanicu koja nije primila vektor, te ako je u fazi diobe uslijed djelovanja lijeka umire. Također dolazi do pojačanog imunskog odgovora što povećava učinak ovog oblika terapije. U fazi I/II kliničkih pokusa upotrijebljen je gamaretrovirus za prijenos gena koji kodira HSV-TK kod pacijenata oboljelih od melanoma. U pacijente su unesene stanice koje proizvode vektor pa su stanice melanoma konstantno bile izložene infekciji vektorima sve do primjene lijeka koji bi ubio stanice melanoma i stanice koje su proizvodile vektor (virus). Sam tretman se dobro podnosio uz umjereno povišenje temperature i upalne reakcije na koži. Opaženo je smanjenje tumorske mase dok je primjenjivan prolijek. Nakon prestanka davanja lijeka tumor se povećao. U pretkliničkim pokusima na miševima, uvođenje gena za citozin-deaminazu te davanja prolijeka također je pokazalo smanjenje tumora (134).

#### 2) Prijenos adoptivnih stanica

Radi se o najviše obećavajućem pristupu liječenja tumora (130). Kako je melanom izrazito imunogen, opaženo je da limfociti spontano migriraju prema mjestu lokalizacije tumora. Cilj genskih terapija u ovom slučaju je stvoriti takve stanične linije TIL-a koje će uspješno prepoznavati stanice melanoma i posljedično stvarati snažan imunski odgovor. Kao i kod redovitog protokola TIL-om, limfociti se izdvajaju iz tumorskog tkiva, selektiraju po aktivnosti na tumorske antigene te genetički modificiraju prije umnažanja i vraćanja u pacijenta. Genske modifikacije su uključivale ubacivanje gena putem retrovirusa koji kodira citokine IL-2, IL-12 i IL-15 (129). Cilj ovih promjena je očuvanje funkcije TIL-a, a ne nužno povećanje

imunoreaktivnosti. Također su isprobavane modifikacije receptora na staničnoj membrani TIL-a (122). U TIL se ubacivao rekombinantni receptor koji se izrazito vezao na specifični antigen melanomskih stanica. Tako je razvijen TIL s afinitetom na MART-1 antigen. U kliničkom pokusu dvoje od 15 pacijenata, koji su dobili ovakve TIL-ove su imali potpuno povlačenje bolesti.

Terapijski odaziv je bio oko 30 %, a TIL-ovi su detektirani u pacijentima i nakon 90 dana. Sličan pristup se koristi u izradi kimernih receptora antigena T-limfocita (CAR-T). CAR-T su molekule dizajnirane tako da sadrže antigen-prepoznajuću domenu izvedenu iz protutijela (134,135) Ta domena se fuzionira na komponentu receptora T-limfocita te se dodaje i kostimulatorna molekula kao što je CD28 (protein na površini T-limfocita odgovoran za aktivaciju i preživljavanje). To omogućuje aktivaciju citolitičke funkcije T-limfocita samim prepoznavanjem antigena pri čemu nije potrebna prezentacija antigena putem glavnog histokompatibilnog kompleksa, uz malu količinu samog antigena. Nadalje, CAR modificirani T-limfociti ne moraju biti autologni (dobiveni iz organizma pacijenta) već se mogu pripremiti unaprijed u dovoljnoj količini. Rezultati pretkliničkih pokusa pokazali su učinkovitost: CAR razvijeni na gangliozid GD2 te na melanom vezani antigen visoke molekularne mase (HMW/MAA) su pokazali učinkovitost dovodeći do lize stanica melanoma *in vitro* i *in vivo* (134).

### 3) Vakcine

Kako je melanom izrazito imunogeni tumor, pokušalo se razviti vakcine koje su trebale izazvati imunski odgovor. Upotrebljavali su se peptidi, čitavi proteini i lizati stanica melanoma. U novije vrijeme pokušava se s genskom modifikacijom samih stanica melanoma: u njih se ubacuje gen koji kodira faktor stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija (*engl.* granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF). Ovaj faktor je izuzetno važan, djeluje kao citokin i ima ulogu promotora diobe matičnih stanica i njihove diferencijacije u granulocite i monocite. Također potiče regrutaciju i sazrijevanje antigen-prezentirajućih stanica (dendritičke stanice). Takve stanice melanoma se dodatno označe radionuklidom te se koriste kao cjepivo. U pokusu je pokazano, da su nakon primjene vakcine limfocitni infiltrati nastali na 11/16 tretiranih pacijenata. Nuspojave su bile blage i uključivale su crvenilo te manja krvarenja. Vakcina je pokazala dugotrajan učinak, pa su zabilježeni pacijenti koji su živjeli 36 mjeseci nakon primjene vakcine. Limitirajući faktor uspješnosti vakcine je potreba za velikim brojem limfocita kako bi izvršili uspješnu citolizu. Nakon vakcinacije, korišten je CTLA-4 inhibitor ipilimumab i rezultati su pokazali smanjenje tumorske mase. Dendritičke stanice su također

bile podvrgnute genskim modifikacijama *ex vivo* vektorima koji su nosili gene za kodiranje tumor specifičnih antigena. U radovima je opisana primjena plazmida u prijenosu gena koji su kodirali proteine gp 100 i melan-A specifične za melanom (134).

#### 4) Uporaba onkolitičkih virusa

Onkolitički vektori koriste životni ciklus litičkih virusa kako bi izazvali smrt stanice. Ovi vektori su dizajnirani na način da je replikacija moguća samo unutar tumorskih stanica, a katkada im se dodaje gen koji pomaže u ubijanju stanice. Dizajn može uključivati transkripcijsko i transdukcijsko ciljanje, mijenjanje gena potrebnih za replikaciju gena ili uvođenje funkcionalnog transgena. U prekliničkim pokusima pokazano je da modificirani adenovirus s genima koji su kodirali IL-24 te protein arestin, snažno inhibira rast melanoma blokadom angiogeneze te imunostimulacijom. U kliničkoj uporabi danas se upotrebljava talimogene laherparepvec (Imlygic<sup>®</sup> ili T-VEC) (137). Radi se o genetički promijenjenom herpes simplex virusu. Uklonjena su dva gena: jedan isključuje individualnu obranu stanice dok drugi pomaže virusu da izbjegne obranu domaćina. Dodan je gen koji kodira GM-CSF. Virus napada zdrave i tumorske stanice, ali se može razmnožavati samo u tumorskim stanicama, što uzrokuje njenu lizu i smrt. Iako je dodan gen koji stimulira imunski odgovor, do danas nisu opaženi takvi efekti. Registriran je za lokalno liječenje melanomskih lezija i odobrenje za stavljanje u promet je izdano od strane FDA u listopadu 2015. godine. Onkolitički virusi se primjenjuju intratumorski. Ovaj lijek je detaljnije opisan u poglavlju 5.5.1.

#### 5) B7.1 faktor

Tumorske stanice često izbjegnu detekciju imunskog sustava iako imunski sustav proizvodi antitumorske stanice. Jedan od razloga je taj, da stanice melanoma nemaju B7-1 i B7-2 faktor koji je nužno potreban za punu aktivaciju T-limfocita. Manjak ovih faktora dovodi do tolerancije na stanice melanoma. Kako bi se nadoknadio manjak ovih faktora, genskom terapijom se omogućava tumor specifična citoliza T-limfocitima. 1993. godine provedeni su pokusi gdje se pomoću plazmida u stanice melanoma ubacio gen koji kodira HLA-B7. Kasnije je dodan gen koji kodira  $\beta$ 2-mikroglobulin i danas je taj lijek u uporabi pod nazivom Allovectin-7<sup>®</sup>. Time se postiglo da stanice melanoma postanu vidljive za stanice imunskog sustava. U studijama je pokazano da je terapijski odaziv iznosio 11,8 %, ali učinci su bili dugotrajni u prosjeku 13,8 mjeseci (141). Nuspojave su uglavnom bile upalnog tipa i podnošljive. Kao vektor je iskorišten i vaccinia virus. Uporabom ovog soja virusa postigao se veći opseg

prezentacije HLA-B7 kompleksa stanicama melanoma, a i sam vektor je poticao imunosni odgovor (134).

#### 6) Prijenos gena za interferon i interleukin

Biokemoterapije rekombinantnim IL-2 ili interferonom su pokazale određenu razinu uspjeha, ali su bile ograničenog dosega zbog potrebe uporabe velikih doza ovih lijekova kako bi se nadomjestio vrlo kratko vrijeme do polueliminacije. Također, visoke doze su bile odgovorne za vrlo neugodne sistemske efekte. Genskom terapijom se pokušalo naći rješenje izbjegavanja sistemskih učinaka, uz istovremeno postizanje visokih koncentracija lijeka isključivo na mjestu lokalizacije melanoma. Provedeni su klinički pokusi s adenovirusnim vektorima koji su za posljedicu stvarali IL-2. Nije bilo uobičajenog kliničkog efekta, ali je u 245 pacijenata prijavljena nepotpuna lokalna regresija tumora. Zapaženo je i povećanje broja CD3+ i CD8+ TIL-a. Nuspojave su bile slične onima kod gripe (134).

Istraživanja primjene genske terapije kod pacijenata oboljelih od melanoma su dobila veliki zamah u posljednjih 10-ak godina. Većina genskih terapija je pokazala dobar sigurnosni profil uz podnošljive nuspojave. Trenutno je dostupan samo jedan lijek u terapiji melanoma, dok ih je nekoliko u kliničkoj fazi ispitivanja. Budući napredak genske terapije melanoma vrlo vjerojatno leži u kombinaciji farmakološkog i genskog pristupa. Npr. moguća je s vremenom kombinacija vektora s monoklonskim protutijelima, inhibitorima prijenosa signala ili kemoterapeuticima. Također tehnološkim napretkom očekuje se i padanje cijena ovakvih terapija, te povećanje dostupnosti za širi broj ljudi, što će neminovno dovesti do potpune individualizacije pristupa liječenja melanoma (134).

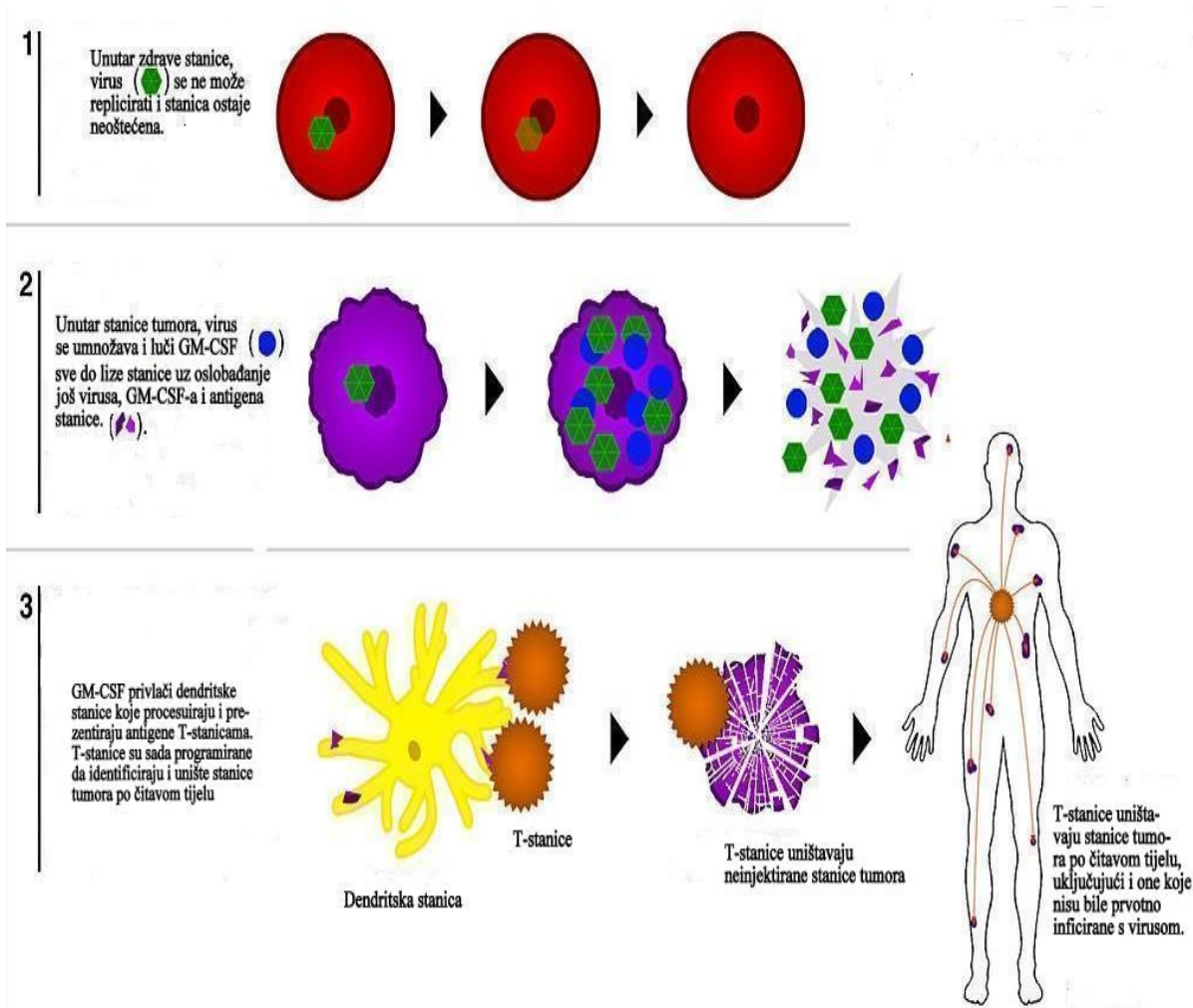
### **4.5.1. Terapija melanoma onkolitičkim virusima**

Terapija onkolitičkim virusima je jedinstveni oblik terapije melanoma koji rezultira potpunim uništenjem stanica melanoma (137,138,142). On uključuje nepatogeni soj virusa koji prodire kako u normalne tako i u stanice karcinoma, ali efekti na zdravim stanicama su vrlo maleni. U stanicama karcinoma (melanoma) efekti su bitno drugačiji: dolazi do masivne replikacije virusa unutar stanice karcinoma, što naposljetku rezultira njihovim uništenjem. U prirodi postoje

sojevi virusa koji su prirodno onkolitički jer ispoljavaju onkotropizam ili svojstvo da preferiraju stanice karcinoma za svoje razmnožavanje te posljedično uzrokuju masovni imunosni odgovor. Ipak, brojni čimbenici spriječavaju njihovu uporabu u borbi protiv karcinoma: visoki patogeni potencijal, suboptimalni onkotropizam, povećana osjetljivost na neutralizaciju imunskim sustavom domaćina te ograničene mogućnosti inicijacije imunskog tumor-specifičnog odgovora. Primjeri takvih prirodnih sojeva virusa uključuju reovirus, virus New Castle bolesti, virus mumps. S druge strane tu su virusi ospica, vaccinia virus i razni tipovi adenovirusa koji se mogu modificirati na način da se mogu replicirati samo unutar stanica karcinoma. Nadalje, pokazalo se da se viruse može genskim tehnikama tako promijeniti da se razmnožavaju unutar stanica karcinoma koje nose samo određeni tip mutacija koje rezultiraju proizvodnjom tumorspecifičnim antigenima kao što su HER-2 i EGFR. Upravo su tehnike genetičkog inženjerstva omogućile proboj ka stvaranju klinički vrlo učinkovitih sojeva virusa.

Talimogene laherparepvec (T-VEC u daljnjem tekstu) je prvi, genetički modificirani onkolitički virus nastao iz humanog herpes virusa-1 (HSV-1). Uveden je u lokalnu terapiju neresektabilnih kožnih, potkožnih i nodalnih lezija u pacijenata s ponavljajućim oblikom melanoma nakon početne kirurške obrade (137). Prodaje se pod komercijalnim nazivom Imlygic<sup>®</sup>, a proizvodi ga tvrtka Amgen Inc. T-VEC se proizvodi na način da je soju JS1 herpes simplex virusa uklonjen gen ICP34.5 odgovoran za virulenciju virusa. Uklanjanjem tog gena prestaje proizvodnja proteina ICP34.5 koji napadnute postmitotičke stanice priprema za replikaciju virusa, pa sam virus nije više u mogućnosti nadvladati obrambene mehanizme u zdravoj stanici i time izostaje njegova daljnja replikacija i umnažanje. Tumorske stanice imaju narušene obrambene sposobnosti, pa se T-VEC umnaža u njima dovodeći posljedično do njihove citolize. Uklanja se i gen ICP47 koji kodira protein ICP47 također odgovoran za virulenciju virusa smanjenjem mogućnosti napadnute stanice da prezentira antigen virusa. Delecija gena ICP47 ujedno dovodi i do rane ekspresije gena US11 koji kodira glikoprotein koji ciljano uništava molekule glavnog kompleksa histokompatibilnosti. Tumorske stanice proizvode protein koji zajedno s glikoproteinom, kojeg kodira gen US11, tvori cjelinu koja uspješno zamjenjuje gen ICP34.5. Time se omogućuje selektivna dioba virusa samo unutar tumorskih stanica. T-VEC-u je dodan i gen GM-CSF koji djeluje kao citokin.

GM-CSF je faktor rasta koji stimulira matične stanice u koštanoj srži na proizvodnju granulocita (neutrofila, eozinofila i bazofila) te monocita. Osim toga aktivira i mobilizira antigen-prezentirajuće stanice koje mogu obraditi i prezentirati antigene oslobođene lizom tumorskih stanica T-limfocitima osiguravajući dugotrajni i sveobuhvatni učinak u organizmu pacijenta (Slika 23) (137).



Slika 23. Predloženi mehanizam djelovanja za sistemski imunosti učinak talimogen laherparepveca (T-VEC) (Preuzeto i prilagođeno iz 128).

Sam T-VEC je osjetljiv na antivirusne lijekove, kao što je aciklovir, što olakšava kontrolu njegove primjene na pacijentima. 19. ožujka 2013. godine Amgen Inc. je javnosti prezentirao rezultate ključne studije iz faze III kliničkih ispitivanja u kojoj je pokazao svoju djelotvornost i na osnovu tih rezultata FDA je 27. listopada 2015. godine dala odobrenje za njegovu uporabu u lokalnoj terapiji melanoma neresektibilnih kožnih, potkožnih i nodalnih lezija (139). Centraliziranim postupkom odobravanja, na razini cjelokupne EU, odobrena je njegova primjena 16. prosinca 2015. godine. U Republici Hrvatskoj do danas nije zabilježena njegova



uporaba. Primjena T-VEC-a ima vrlo malo neželjenih nuspojava koje uglavnom nestaju unutar 72 sata. Najčešće su se pojavljivali umor, drhtavica, mučnina, slabost i bol na mjestu primjene. Od ozbiljnijih nuspojava pojavile su se nekroza i ulceracija tumorskog tkiva, sistemske bakterijske infekcije i celulitis (141).

Poseban oprez je potreban kod imunodeficijentnih bolesnika. Biodistribucija unutar organizma te prisutnost virusa u sekretima, mjerena je kvantificiranjem viralne DNA lančanom reakcijom polimeraze. Rezultati tih istraživanja su pokazali da u krvi, urinu, sekretima te na vanjskom dijelu okluzivnih zavoja nisu pronađeni živi virusi koji bi mogli izazvati kontaminaciju prostora i infekciju medicinskog osoblja. Ipak se preporučuje korištenje zaštitne opreme kao i provođenje mjera dezinfekcije radnog prostora. Lijek se primjenjuje putem intralezijskih injekcija lokalno u kožne, potkožne i nodalne lezije koje su vidljive ili se mogu detektirati opipom ili nekom drugom metodom. Inicijalna doza iznosi  $10^6$  PFU/mL (engl. plaque forming unit ili mjera broja infektivnih virusnih čestica), a sve ostale doze iznose  $10^8$  PFU/mL. Inicijalna doza se aplicira u lezije, od najmanje do najveće, sve dok nije dosegnut maksimalni volumen aplikacije od 4 mL ili nisu tretirane sve lezije. Sljedeće doze se primjenjuju prvo na novostvorene lezije te na postojeće od najveće do najmanje sve dok nije dosegnut maksimalni volumen aplikacije od 4 mL ili nisu tretirane sve lezije. Terapija T-VEC-om traje šest mjeseci, osim ako nije potreban drugi oblik terapije ili su se lezije u potpunosti povukle. Postupak se ponavlja ako se prije potpune remisije pojave nove lezije. Volumen lijeka koji se inicira u leziju ovisi o veličini same lezije kako je navedeno u tablici 6 (141).

Tablica 6. Doziranje genske terapije Imlygic<sup>TM</sup> (Preuzeto i prilagođeno iz 141).

promjer lezije	volumen primjene Imlygica
>5 cm	do 4 mL
2,5-5 cm	do 2 mL
1,5-2,5 cm	do 1 mL
0,5-1,5 cm	do 0,5 mL
<0,5 cm	do 0,1 mL

Lijek se ne bi smio davati imunokompromitiranim pacijentima, pacijentima koji imaju AIDS, limfome, leukemiju, pacijentima koji su na imunosupresivnoj terapiji te trudnicama (143).

Cijena cjelokupne terapije ovim lijekom se kreće prema proizvođaču oko 65 000 US \$ i bitno je manja od troška terapije monoklonskim protutijelom kao što je ipilimumab. Kako je ovaj lijek na samom početku svoje primjene, na razini EU je pod posebnim režimom nadzora. Ostaje da se vidi koji je pravi potencijal ove vrste terapije melanoma, a pogotovu u kombinaciji s tradicionalnim te drugim tipovima inovativnih terapija.

#### **4.6. Parametri efikasnosti kliničkih studija u onkologiji**

Parametri efikasnosti kliničkih studija imaju dvojaku ulogu: u ranim fazama istraživanja lijeka pomoću njih se procjenjuje sigurnost te identificiraju dokazi o učinkovitosti samog lijeka kao što je smanjivanje tumorske mase. U kasnijim fazama istraživanja pomoću njih se vrednuje sposobnost istraživanog lijeka da omogući klinički benefit za pacijenta kao što je produljenje života te poboljšanje simptoma vezanih uz bolest.

Svjetska zdravstvena organizacija i grupa za procjenu kriterija odgovora na terapiju u solidnim tumorima izdaju smjernice pomoću kojih se procjenjuje odgovor na terapiju i klinička učinkovitost pojedinog oblika terapije (144). Prvi set kriterija objavila je Svjetska zdravstvena organizacija 1981. godine, no vrlo brzo se uočila potreba za revizijom. Tako je u veljači 2000. godine, suradnjom između Europske organizacije za istraživanje i liječenje tumora (*engl.* European Organisation for Research and Treatment of Cancer-EUROTEC), Nacionalnog instituta za rak SAD-a (*engl.* National Cancer Institute) te kanadskog Nacionalnog instituta za rak izdan prvi set kriterija za vrednovanje odgovora na terapiju u solidnim tumorima (*engl.* RECIST). Taj set kriterija je dopunjen u 2009. godine. Po tim kriterijima se utvrđuje je li došlo do smanjenja tumora uslijed odgovora na terapiju tumora (*engl.* respond), ostaje li tumor iste veličine tijekom terapije (*engl.* stabilize) ili dolazi do povećanja veličine tumora (*engl.* progress). Ovi kriteriji se odnose na sam tumor i ne daju odgovor na pitanje o poboljšanju zdravstvenog stanja pacijenta (144).

RECIST smjernicama utvrđuje se minimalna veličina za mjerljive lezije, ograničava se broj tumorskih lezija koje se prate i standardiziraju se postupci mjerenja u jednoj dimenziji. U

kliničkim istraživanjima gdje je glavni cilj utvrditi objektivan odgovor tumora na liječenje, uključuju se samo oni pacijenti kod kojih postoji stanje tzv. "mjerljive bolesti" (*engl. measurable disease*) odnosno gdje postoji najmanje jedna mjerljiva tumorska lezija. Ako postoji samo jedna tumorska lezija, njen neoplastični karakter se mora potvrditi citološkim i histokemijskim pretragama. Mjerljiva tumorska lezija je ona koja se može točno izmjeriti u najmanje jednoj dimenziji, promjera  $\geq 20$  mm ako se koriste standardne tehnike mjerenja ili promjera  $\geq 10$  mm ako se koristi skeniranje CT-om. Sva mjerenja se izražavaju u metričkom sistemu.

Mjerenje lezija bi se trebalo obaviti u vremenu što bliže početku terapije, a svakako ne prije četiri tjedna od početka ispitivane terapije. Od početka do kraja terapije koriste se iste metode i tehnike mjerenja tumorskih lezija. U kliničkoj praksi lezije se smatraju mjerljivima samo ako su površinske (npr. palpativni limfni čvorovi, noduli u koži i sl.). U slučaju da su tumorske lezije vidljive na koži, preporuča se njihovo fotografiranje u boji uz priloženu metričku skalu. Za mjerenje lezije se najčešće koriste tehnike kompjutorske tomografije (CT) i magnetne rezonance (NMR), rjeđe se koristi/preporuča uporaba rentgena (144).

Prije početka evaluacije tumorskog odgovora na terapiju potrebno je utvrditi početno stanje prema kojem će se vršiti usporedba. To se radi na način da se odrede tzv. ciljne lezije koje predstavljaju reprezentativni uzorak svih zahvaćenih organa. Ciljne lezije su mjerljive lezije, po dvije za svaki organ ili pet ukupno. Odabiru se po osnovi njihove veličine (one s najvećim promjerom) te pogodnosti za višekratna mjerenja. Zbroj najvećih promjera svih ciljanih lezija čini osnovu po kojoj se mjeri objektivan odgovor tumora na terapiju. Sve ostale lezije i mjesta bolesti označavaju se kao neciljane lezije i također se pridodaju osnovici mjerenja. Tijekom ispitivanja terapije ne postavlja se zahtjev za njihovim mjerenjem, ali se bilježi njihova prisutnost ili nestanak tijekom postupka.

Kriteriji odgovora na terapiju su:

A) Kod ciljanih lezija:

- 1) Potpuni odgovor (*engl. complete response*) - nestanak svih ciljanih lezija;
- 2) Djelomični odgovor (*engl. partial response*) - minimum 30 % u redukciji sume najvećih promjera ciljanih lezija u usporedbi s početnom osnovom;
- 3) Stabilna bolest (*engl. stable disease*) - nedovoljno smanjenje tumora da bi se kvalificirao kao djelomični odgovor niti opaženo povećanje tumorske mase da bi se kvalificirao kao progresivna bolest u usporedbi s najmanjom sumom promjera ciljanih lezija od početka terapije;

4) Progresivna bolest (*engl. progressive disease*) - povećanje od minimalno 20 % u sumi najvećih promjera ciljanih lezija u usporedbi s najmanjom sumom promjera ciljanih lezija od početka terapije;

B) Kod neciljanih lezija:

- 1) Potpuni odgovor - nestanak svih neciljanih lezija i normalizacija nivoa tumorskih markera;
- 2) Stabilna bolest ili nekompletan odgovor - postojanje jedne ili više tumorske lezije uz povećanu razinu tumorskih markera;
- 3) Progresivna bolest - pojavljivanje jedne ili više novih lezija uz nedvosmisleno povećanje postojećih.

Najbolji prosječni odgovor se definira kao najbolji odgovor zabilježen od početka terapije do ponovne progresije bolesti ili njene ponovne pojave. Kao osnova za usporedbu koristi se suma najmanjih promjera lezija zabilježenih od početka terapije. Trajanje prosječnog odgovora se definira kao razdoblje od vremena kada su po prvi put zadovoljeni kriteriji za djelomični ili potpuni odgovor pa sve do trenutka ponovne pojave ili progresije bolesti. Pri tome se uzima kao referenca najmanja zabilježena lezija. U nekim slučajevima je teško razlikovati preostalo bolesno tkivo od zdravog. Kada potvrda potpunog odgovora ovisi o tom tkivu, nužno je izvršiti analizu uzorka tkiva biopsijom (144).

Glavni cilj potvrde objektivnog odgovora na terapiju je izbjegavanje preuveličavanja opaženog odgovora. U slučajevima kada potvrda objektivnog odgovora na terapiju nije moguća, u izvještaju mora pisati da odgovor nije potvrđen. U slučajevima potpunog i djelomičnog odgovora, promjene u veličini tumorskih lezija se moraju potvrditi ponovljenim mjerenjima u intervalima ne kraćim od četiri tjedna od trenutka kada su prvi puta postignuti kriteriji za dobivanje tih statusa. Dulji intervali mogu biti preporučljivi u pojedinim studijama. U slučaju stanja stabilne bolesti ponovljenja mjerenja moraju zadovoljiti kriterije u minimalno jednom slučaju u intervalu ne kraćem od šest tjedana (144).

Po završetku studije preporuča se da je analizira neovisni stručnjak koji ni na koji način nije bio uključen u izradi studije. Prilikom pisanja izvještaja, svim pacijentima uključenima u studiju dodjeljuje se jedan od osam statusa ovisno o odgovoru na tumorsku terapiju:

- 1) potpuni odgovor;
- 2) djelomični odgovor;
- 3) stabilna bolest;
- 4) progresivna bolest;
- 5) rana smrt zbog maligne bolesti;

- 6) rana smrt zbog toksičnosti;
- 7) rana smrt zbog nepoznatih uzroka;
- 8) nepoznato (nije provjerljivo, manjak podataka).

U analizi stope odgovora na terapiju uključeni su svi pacijenti koji zadovoljavaju kriterije. Za pacijente kategorija 4-8 smatra se da nisu dali odgovor na terapiju. Precizne definicije kategorija 4-8 su protokol specifične (150). Interval pouzdanosti u ovim studijama iznosi 95 % (144).

#### 4.7. Mjere ishoda u kliničkim istraživanjima

U kliničkim istraživanjima mjere ishoda (*engl.* clinical endpoints) su u općenitom smislu uključene u entitet od interesa u istraživanju (145). Kao takve se odnose na pojavnost bolesti, simptoma, znakova ili abnormalnih laboratorijskih vrijednosti, a pri tome su dio ciljanih ishoda istraživanja. Primarna mjera ishoda je ona na osnovu koje su ispitanici randomizirani i podvrgnuti statističkoj obradi, dok su sekundarne mjere ishoda one koje se koriste u *post hoc* analizama. U kliničkim istraživanjima raka mjere ishoda uključuju otkriće ili lokalnu pojavnost tumorskih lezija, otkriće regionalnih metastaza, smanjenje ili povećanje boli prilikom liječenja, smrt uslijed bolesti itd. Mjere ishoda se izražavaju u vremenskim jedinicama, obično u mjesecima. Mjere ishoda koje se najčešće koriste su (1):

- 1) Preživljenje bez bolesti (*engl.* disease free survival) - odnosi se na razdoblje u kojem pacijent nakon primarne terapije živi bez ikakvih znakova ili simptoma bolesti. Povratak bolesti (relaps) određuje njenu veličinu. U kliničkom pokusu ova mjera pokazuje koliko je terapija uspješna (145).
- 2) Preživljenje bez pogoršanja bolesti (*engl.* progression-free survival) - razdoblje za vrijeme i nakon terapije bolesti u kojoj pacijent ima simptome bolesti, ali ne dolazi do njenog pogoršanja. Pogoršanje bolesti ili smrt od bilo kojeg uzroka određuje njenu veličinu (145).
- 3) Trajanje odgovora (*engl.* response duration) - povremeno se koristi u analizi uspješnosti terapije kod uznapredovale bolesti. Ova mjera ishoda mjeri duljinu odgovora u podgrupi pacijenata koji su odgovorili na terapiju. Pogoršanje bolesti ili smrt pacijenta određuje njenu veličinu (145).

4) Prosječno preživljenje (*engl.* overall survival) - razdoblje od dijagnoze bolesti ili početka liječenja do konačne smrti pacijenta. Lako se i precizno mjeri te je prihvaćena kao univerzalna mjera direktne dobrobiti. U kliničkim pokusima pokazuje koliko je terapija uspješna. Često se izražava kao postotak preživljenja u petogodišnjem razdoblju. Zahtijeva veći uzorak ispitivane populacije i dulje vrijeme promatranja kako bi se dobila statistička razlika u promatranoj i kontrolnoj grupi. Uključuje i smrt pacijenta zbog uzroka nevezanih za primarnu bolest (145).

5) Objektivni postotak odgovora (*engl.* objective response rate) - mjeri postotak pacijenata sa smanjenjem tumora za unaprijed dogovoreni postotak. Zahtijeva manji uzorak ispitanika, ne zahtijeva kontrolnu grupu i obrada podataka je brža. Ne pruža opsežne podatke o aktivnosti samog lijeka (145).

#### **4.8. Inovativne terapije melanoma – perspektiva i ograničenja**

Istraživanjem relevantne znanstvene literature u ovom radu dan je prikaz inovativnih terapija melanoma u uporabi i razvoju te pokazano da su one učinkovitije, relativno manje toksične uz zabilježene slučajeve potpunog ozdravljenja.

Uvođenje monoklonskog protutijela ipilimumaba kao redovne terapije melanoma 2011. godine označilo je svojevrsnu prekretnicu u terapiji ove bolesti: od dotadašnjeg generaliziranog pristupa, temeljenog na veličini, lokalizaciji i prisutnosti metastaza, otvoreno je novo poglavlje koje uzima u obzir specifično stanje pacijenta na molekularnoj razini. Iako su i prije postojali oblici terapija koji su djelovali na razini imunskog sustava, kao npr. uporaba interleukina-2, nedostajala su specifična znanja o prirodi mutacija, genske podloge i djelovanja stanica melanoma na imunski sustav. Do danas su razvijeni lijekovi i tehnike kojima specifično i ciljano djelujemo na pojedine točke u stanicama melanoma ili stanicama imunskog sustava, a u fazi razvoja ili kliničkih ispitivanja su i drugi lijekovi i tehnike. Uporaba monoklonskih protutijela u terapiji melanoma je sve prisutnija i nije više ograničena na slučajeve neoperabilnog melanoma, već se sve više primjenjuje na kirurški tretirane, visokorizične oblike melanoma.

Sama učinkovitost ovih oblika terapija dokazivana je parametrima poput stopa odaziva na terapiju (engl. therapeutic response), razdoblje do pogoršanje bolesti (engl. progression-free survival) i prosječno doživljenje (engl. overall survival). Ovi parametri su vrlo bitan dio u analizama troškovne učinkovitosti lijeka ili terapija, te čine osnovicu preporuke za uvođenje inovativnih terapija u uporabu nakon što je regulatorno tijelo odobrilo lijek.

Veliku prepreku ipak čini visoka cijena ovih oblika terapija kao i manjak odgovarajućih tehničkih kapaciteta. Dodatnu poteškoću predstavlja i relativno mali terapijski odaziv te imunosno posredovane nuspojave. Kod uporabe BRAF-inhibitora zabilježen je razvoj rezistencije stanica melanoma pa je sama učinkovitost ovih lijekova kraćeg vremenskog trajanja. Istekom patentne zaštite, kao i razvojem novih, konkurentnih oblika terapija, očekuje se pad cijena ovih lijekova što će uvelike ubrzati njihovo uvođenje u široku uporabu pa i u zemljama nižeg ekonomskog standarda. Dodatni problem kod financiranja ovih lijekova predstavlja i činjenica da potrošnja neumitno raste iz godine u godinu a zahtjevi javnosti za učinkovitijim metodama liječenja su sve veći.

Za ispitivanje učinkovitosti inovativnih lijekova u procesu odobrenja za njihovo uvođenje u redovnu uporabu, korišteni su za usporedbu rezultati učinkovitosti terapije melanoma kemoterapeutima. Od kemoterapeutika najčešće se koriste dakarbazin, temozolamid, fotemustin i derivati platine. U retrospektivnoj IMAGE studiji sprovedenoj u EU i u SAD-u, na uzorku od 177 pacijenata, pokazano je da je terapijski odaziv na kemoterapeutike bio 6-8 %, razdoblje do pogoršanja bolesti (PFS) iznosilo je 2,6 mjeseci a prosječno doživljenje (OS) 8,8 mjeseci. Za usporedbu, u kliničkim studijama koje su prethodile izdavanju rješenja o stavljanju u promet od strane regulatornih tijela u SAD-u i EU-u, dobiveni su slijedeći rezultati (tablica 7):

Tablica 7. Usporedni prikaz parametara učinkovitosti kod primjene inovativnih lijekova i njihovih kombinacija u terapiji melanoma.

Lijek	Terapijski odaziv	Razdoblje do pogoršanja bolesti/mjeseci	Prosječno doživljenje/mjeseci
ipilimumab	10,9-15%	4,7	11,2
nivolumab	20-30%	3,7	16,8

pembrolizumab	19,4%	3,7	12
laherparepvec (lokalne lezije)	26%	8,2	23,3
vemurafenib (kod BRAF- pozitivnih pacijenata)	48%	5,3	13,2
vemurafenib + cobimetinib	87%	12,3	25,6
dabrafenib (kod BRAF- pozitivnih pacijenata)	54%	8,8	18
dabrafenib+trametinib	76%	11	25,1
encorafenib+binimetinib	63%	14,9	16,2

Iz priloženih rezultata je jasno vidljiv napredak koji je ostvaren uporabom inovativnih lijekova u usporedbi s rezultatima koji je ostvario kemoterapeutik dakarbazin. U prosjeku, postotak terapijskog odaziva kod monoterapija se kreće u rasponu od 22-53%, razdoblje do pogoršanja bolesti iznosi 4,8-8,8 mjeseci a prosječno doživljenje iznosi oko 12 mjeseci. Kod kombiniranih terapija su te vrijednosti bitno povećane: terapijski odaziv u prosjeku iznosi 66-69%, razdoblje do pogoršanja bolesti iznosi 11-12,6 mjeseci dok prosječno doživljenje iznosi 25--25,6 mjeseci. Kvaliteta inovativnih terapija potvrđena je i povećanim brojem slučajeva potpunog ozdravljenja. U terapiji melanoma inovativnim lijekovima opažene su razlike u učinkovitosti: PD-1 inhibitori (nivolumab) ostvaruju veći terapijski odaziv u odnosu na ipilimumab, ali ipilimumab ostvaruje dugotrajnije učinke. Kombinirane terapije ipilimumab+nivolumab daju bolje učinke u smislu terapijskog odaziva i prosječnog doživljenja, ali je ova kombinacija skuplja. BRAF- i MEK-inhibitori imaju sličnu razinu učinkovitosti kao PD-1 inhibitori, ali melanom relativno brzo razvija rezistenciju. Kombinacije BRAF+MEK-inhibitora imaju najbolje parametre učinkovitosti, ali je cijena terapije izrazito velika (146). U SAD-u su od 2014. godini odobrene sljedeće kombinacije lijekova u terapiji melanoma:

- 1) dabrafenib (Tafinlar®) + trametinib (Mekinist®);
- 2) nivolumab (Opdivo®) + ipilimumab (Yervoy®);
- 3) vemurafenib (Zelboraf®) + cobimetinib (Cotellic®);

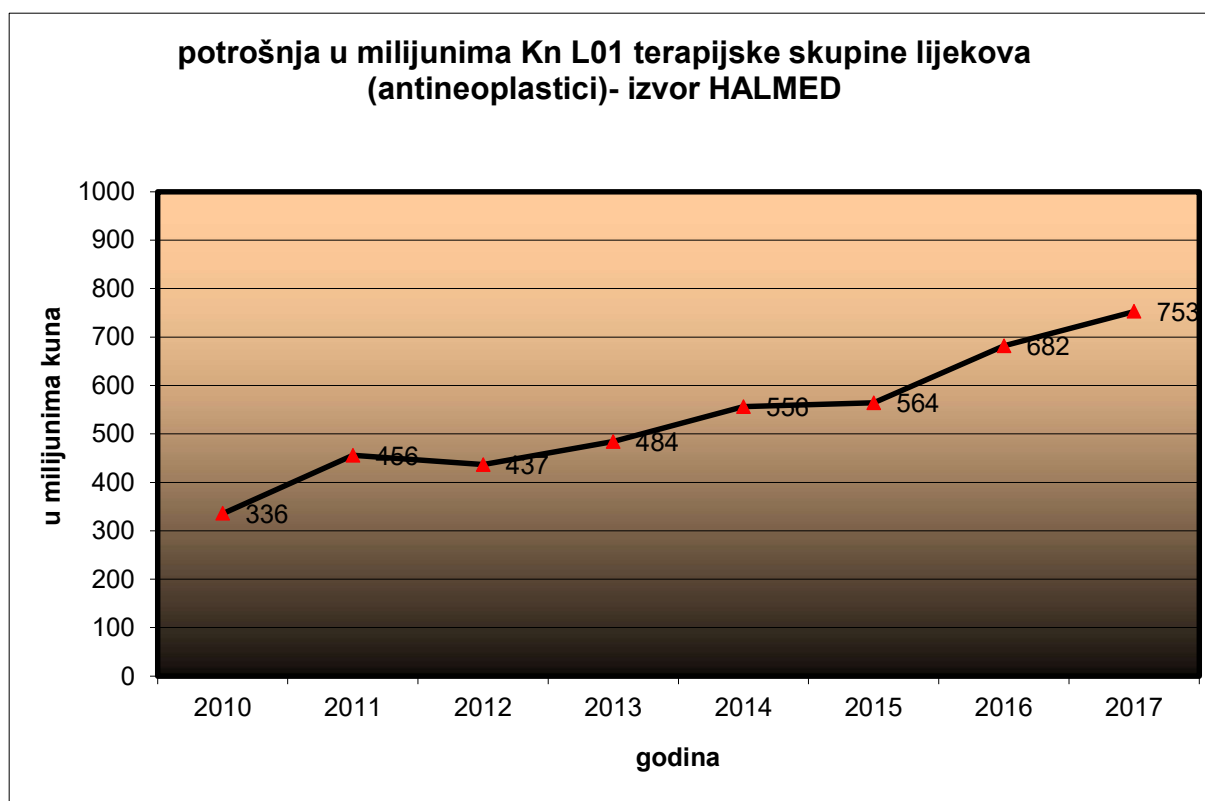


te u 2018. godini:

4) encorafenib (Braftovi <sup>TM</sup>) + binimetinib (Mektovi <sup>®</sup>).

Kao ključni pokazatelji o učinkovitosti su se koristili statistički obrađeni podaci na uzorcima pacijenata u kliničkim pokusima uporabom vrijednosti kao terapijski odaziv, razdoblje do pogoršanja bolesti (vrijeme u kojem dok pacijent uzima terapiju nema simptoma pogoršanja bolesti) te prosječno doživljenje (prosječno trajanje života svih pacijenata u ispitivanoj grupi). Ove vrijednosti su kvantitativna mjera pozitivnih učinaka koje ostvaruje lijek/terapija i što su veće ishod liječenja je bolji, kao u slučaju inovativnih terapija melanoma. Time dokazujemo tezu da ove vrijednosti pružaju dokaz o unaprijeđenju liječenja melanoma inovativnim terapijama. Kako su ovi lijekovi nedavno uvedeni u uporabu, ne postoje još podaci iz faze IV kliničkih ispitivanja koji bi upotpunili sliku po pitanju učinkovitosti.

Osim lijekova i terapija koji su odobreni za kliničku uporabu, rezultati kliničkih pokusa terapijom tumor-infiltrirajućim limfocitima kao i nekim oblicima genskih terapija ohrabruju, a neki su vrlo blizu uvođenja u uporabu. Opisani inovativni lijekovi u redovnoj uporabi kao i oblici terapija u razvoju, a za koje u relevantnoj znanstvenoj literaturi imamo dokaze o njihovoj učinkovitosti, potvrđuju tezu o njihovoj većoj učinkovitosti u odnosu na dosadašnje terapijske protokole kemoterapeutima. Kako se mogućnosti liječenja melanoma brzo mijenjaju, pred nacionalne zdravstvene sustave se postavlja pitanje održivog financiranja liječenja inovativnim terapijama. U Republici Hrvatskoj bilježi se stalan porast troškova za lijekove, a zadnjih devet godina antineoplastici su na prvom mjestu po apsolutnom iznosu (Slika 24). U Hrvatskoj je u posljednjih nekoliko godina postignut napredak u pogledu dostupnosti inovativnih terapija (uključujući biološke lijekove, imunoterapije i oralne protutumorske terapije) uključivanjem velikog broja lijekova u Popis posebno skupih lijekova na Osnovnoj listi lijekova Hrvatskog zavoda za zdravstveno osiguranje. Lijekovi s ovog popisa primjenjuju se većinom na razini bolničke i specijalističko-konzilijarne zdravstvene zaštite u ugovornim bolničkim zdravstvenim ustanovama, a troškovi liječenja terete budžete bolničkih zdravstvenih ustanova. Za potrebe financiranja liječenja sve brojnijih pacijenata, još 2005. godine, osnovan je Fond za posebno skupe lijekove u iznosu od 23 milijuna kuna. Taj fond je u 2018. godini narastao na 1,1 milijardu kuna. Zaključno u Popis posebno skupih lijekova do 2018. godine uvrštena su 114 lijeka, a od toga 51 lijek za rijetke bolesti. U terapiji melanoma od 2015. godine koriste se vemurafenib, dabrafenib (155), a 2017. godine se po prvi puta na osnovnu listu lijekova uvrštava pembrolizumab, trametinib i cobimetinib (157).



Slika 24. Grafički prikaz porasta izdvajanja za L01 terapijsku skupinu lijekova (preuzeto i prilagođeno iz 151-157).

Kako bi se ostvario proklamirani cilj postizanja modernog i financijski održivog sustava koji će građanima Republike Hrvatske osigurati zdravstvenu sigurnost te osigurati kvalitetnu i svima dostupnu zdravstvenu zaštitu, u uvjetima ograničenih sredstava, potrebno je proučiti iskustva razvijenih zemalja koje su uvele ili se spremaju uvesti u uporabu inovativne lijekove u terapiji melanoma. Iako su tradicionalni terapijski postupci (kirurška obrada, kemoterapeutici, radio-terapija) i dalje dominantni, u kontekstu činjenice da se godišnje u Republici Hrvatskoj zabilježi oko 800 novih slučajeva melanoma uz porast incidencije sa sadašnjih 18/100 000 stanovnika, pritisak na uvođenje inovativnih lijekova/terapija raste. Troškovi liječenja inovativnim terapijama uvelike nadmašuju troškove liječenja kemoterapeuticima (tablica 8). U Republici Hrvatskoj je od 2015. godine u uporabi vemurafenib i već je u prvoj godini došao na 23. mjesto po bolničkoj potrošnji sa 17,5 milijuna kuna, 2016. godine se popeo na 15. mjesto po bolničkoj potrošnji sa 21 milijun kuna te na 48. mjesto po ukupnoj potrošnji. Među prvih trideset lijekova po financijskoj potrošnji u 2017. godini uz vemurafenib na 27. mjestu s utrošenih 19 971 078,00 kn, uvrstio se i pembrolizumab na 26. mjestu s utroškom od 20 070 662,00 kn (157).

Tablica 8. Prikaz cijene inovativnih lijekova za liječenje melanoma u Norveškoj (preuzeto i prilagođeno iz 150).

	troškovi u 1. mjesecu terapije u €	troškovi u € za svaki sljedeći mjesec
dabrafenib	9043	9043
dabrafenib+trametinib	18892	18892
dakarbazin	141	141
ipilimumab	82750	
ipilimumab+dakarbazin	82891	141
ipilimumab+nivolumab	78894	3219
nivolumab	9656	9656
pembrolizumab	10377	10377
trametinib	9939	9939
vemurafenib	9331	9331
vemurafenib+cobimetinib	19270	19270

Financijskim analizama učinkovitosti utvrđeno je da čak i za bogate zemlje ovakve cijene predstavljaju financijsko opterećenje (119,147,156). U SAD-u je prosječan udio participacije pacijenta oko 20 % no i taj iznos predstavlja oko 50 % prosječnog nacionalnog dohotka kućanstva (146). U Norveškoj je izračunato da su i uz prag plaćanja od 55 000 € ovi lijekovi preskupi u odnosu na pozitivne učinke koje ostvaruju, pa se predlaže smanjenje cijene ovih lijekova od 60-80 %. Visoke cijene ovih lijekova su često na meti kritika nacionalnih tijela koja reguliraju cijene lijekova pa je tako u Nizozemskoj odbijeno financiranje lijeka nivolumab. U Velikoj Britaniji je također zbog cijene odbijen lijek nivolumab u indikaciji za karcinom pluća. U slučaju terapije melanoma nacionalni osiguravatelj je pristao na cijenu proizvođača.

Shodno tome sve veća pažnja se pridaje edukaciji pučanstva, kako u smislu prevencije tako i razvijanja svijesti o nužnosti obavljanja kontrolnih pregleda, kako bi se melanom uočio u najranijoj mogućoj fazi i time povećao izgled pacijenta za uspješnim ishodom terapije i

istovremeno smanjio pritisak na alocirana financijska sredstva u liječenju melanoma. S druge strane, opravdanje za visoke cijene ovih lijekova, nalazimo u visokim troškovima proizvodnje zbog korištenja biotehnoških metoda kao što su transfekcija gena, proizvodnja monoklonskih protutijela, sinteza rekombinantnih proteina i stvaranje *ex vivo* kolonija imunskih stanica (TIL). Ukupni troškovi razvoja novog lijeka danas se procjenjuju na 2,6 milijardi \$ i kao takvi predstavljaju veliko financijsko opterećenje i za najveće kompanije. U slučaju nemogućnosti pokrivanja troškova istraživanja i razvoja lijeka koji se uvodi u uporabu te financiranja daljnjih istraživanja, uz razumnu zaradu, postoji realna opasnost prestanka rada na istraživanju ovih tipova lijekova i od strane najvećih kompanija. Uzimajući u obzir značajno povećanje terapijskih učinaka te posljedično produljenje trajanja i povećanje kvalitete života pacijenata, ovakav razvoj događaja bio bi više nego neprihvatljiv.

Ukupno gledajući, inovativne terapije melanoma su revolucionalizirale pristup u liječenju ove opake bolesti i danas imamo sve više pacijenata koji su značajno produljili trajanje života uz zabilježene slučajeve potpunog izliječenja. Ipak, unatoč zabilježenim uspjesima, za većinu pacijenata dugoročne prognoze nisu obećavajuće pa se postavlja pitanje daljnjeg unaprijeđenja ovih oblika terapija. Inovacije u medicini na molekularnoj razini dovode do našeg sve većeg razumijevanja biologije tumorskih stanica te vrlo kompleksnih interakcija između tumorskih stanica i imunskog sustava. Također po prvi puta imamo detaljan uvid u genomsku i proteinsku osnovu tumora na razini individualnog pacijenta. Razvoj bioinformatičkih metoda obrade podataka omogućuje sve bolje snalaženje u ogromnoj količini informacija. Tako dobivene informacije se počinju upotrebljavati na svim razinama terapije karcinoma počevši od dijagnostike, odabira najučinkovitijeg lijeka, nadzora tijekom liječenja te analize mehanizama rezistencije stanica tumora nakon započete terapije. Neke od metoda molekularnog profiliranja tumora su danas komercijalno dostupne dok su druge u ranoj fazi istraživanja (tablica 9).

Sve veća količina biološkog materijala, od pacijenata koji reagiraju na primijenjene terapije kao i od onih koji na nju ne reagiraju, dostupnih za takve analize u kombinaciji sa snažnim tehnološkim mogućnostima, dovodi nas sve bliže rasvjetljavanju činjenica ključnih za uspjeh terapija raznih vrsta tumorskih oboljenja. Ovakav razvoj znanja snažno korelira s principom individualizirane terapije. U tijeku su brojni programi karakterizacije tumorskih i imunskih stanica na nacionalnim i lokalnim razinama. Dobar primjer je genomski atlas karcinoma (*engl.* The cancer genome atlas, TCGA) koji teži karakterizaciji velikog broja tumorskih uzoraka na genetičkoj i molekularnoj razini. Do sada su prikupljeni uzorci od oko 11 000 pacijenata na 33 tipa karcinoma pri čemu je u potpunosti provedena analiza eksoma na 1000 uzoraka.

Tablica 9. Analitičke metode koje će utjecati na budućnost dijagnostike i terapije karcinoma (preuzeto i prilagođeno iz 151).

test	svrha	ispitani materijal	potrebna količina
sekvenciranje čitavog eksoma	otkrivanje somatskih mutacija	krv i tumorska DNA	250 ng
MIP slijed	broj kopija gena	tumorska DNA	100 ng
sekvenciranje RNA	kvantitativna analiza transkriptoma	tumorska RNA	250 ng
FusionPlex slijed	otkrivanje poznatih genskih fuzija	tumorska RNA	100 ng
mikro-RNA	profiliranje mikro-RNA	tumorska miRNA	1 μg
reverzno-fazni slijed proteina (RPPA)	profiliranje fosfoproteina, biomarkeri, aktivacija signalnih putova	lizat tumorskog tkiva	5 mg
proteomika zasnovana na masenoj spektrometriji	identifikacija meta za CAR, tumorske proteomike	lizat tumorskog tkiva	50 mg
elucija peptida tkivnog kompleksa kompatibilnosti masenom spektrometrijom	identifikacija meta za T-limfocite imunopeptidna analiza	tumorski peptidi	200 mg
multipleksno imunohistokemijsko bojanje	procjena biomarkera u tumorskom okolišu	biopsija tumora	jedna tumorska sekcija za 8 biomarkera

tumor-infiltrirajući limfociti	generiranje tumor-specifičnih limfocita	biopsija tumora	50 mg
kloniranje i sekvenciranje receptora na T-limfocitima	analiza različitosti receptora T-limfocita, razvoj terapija baziranih na receptorima T-limfocita	biopsija tumorske DNA	20 ng
ksenografti potekli (ili izvedeni) od pacijenta	stvaranje tumorskih staničnih linija ili ksenogeičnog tumorskog modela	biopsija tumora	10 mg
algoritmi predviđanja vezivanja HLA peptida	određivanje vezivanja peptidnog epitopa tumorskog antigena na pacijentove specifične alele	dobivanje informacija o aminokiselinskom slijedu	

Potpuni uvid u mutacijske značajke stanica karcinoma pacijenta omogućit će oblikovanje terapije koja će specifično ciljati genske promjene na individualnoj razini. Takav princip oblikovanja terapija danas sve više dobiva na značaju pri čemu dolazi do sve tješnje suradnje između istraživačkih laboratorija i kliničke prakse.

Nedavni uspjesi inovativnih terapija ukazali su na važnost kontrole tumora od strane imunskog sustava. Svaki novi lijek ili oblik terapije se danas mora objektivno ocijeniti po osnovi učinka na imunski sustav ili na potencijalni sinergistički učinak s postojećim terapijama. Nacionalni osiguravatelji imaju zadane, ograničene budžete i zbog toga se temeljitim procesima evaluacije inovativnih terapija nastoji izbjeći zamka financiranja suboptimalnih terapija ili terapijskih neuspjeha.

Iako se inovativne terapije melanoma sporo razvijaju uz mnoge poteškoće, danas ipak imamo puno bolji uvid u mogućnosti osiguranja učinkovitog i dugotrajnog učinka novih terapija.

Biomarkeri koji nam daju povratnu informaciju o učinkovitosti terapija i dalje su potrebni kako bi bolje stratificirali pacijente i olakšali donošenje odluke o odabiru terapije s najpovoljnijim učinkom za pacijenta uz maksimalnu sigurnost. Otkriće i validacija pouzdanih biomarkera zahtijevat će multidisciplinarni pristup uz tijesnu suradnju kliničara i istraživačkih centara, a ohrabrujuća je činjenica da se u ovom trenutku sprovode brojna takva istraživanja, što daje čvrsti temelj za bolju budućnost kliničke skrbi pacijenata s melanomom.

## **5. ZAKLJUČAK**



Inovativne terapije melanoma uključuju korištenje monoklonskih protutijela u mono- i kombiniranim terapijama, lijekove koji ciljano djeluju na točno određena mjesta u stanici melanoma i/ili u stanici imunskog sustava u mono- i kombiniranim terapijama te terapiju onkolitičkim virusom.

Uz odobrene lijekove i terapije trenutno su u fazi razvoja ili odobravanja i drugi lijekovi i oblici terapija od kojih su najznačajnija terapija tumor-infiltrirajućim limfocitima i genska terapija.

Inovativne terapije melanoma pokazale su znatan napredak u učinkovitosti u odnosu na klasične oblike liječenja što je podiglo standard liječenja melanoma.

Vrijednosti terapijskog odgovora, razdoblje do pogoršanja bolesti i prosječno doživljenje pružaju dokaz o unaprijeđenju liječenja melanoma inovativnim metodama.

## **6. POPIS LITERATURE**

1. Referentni centar za melanom Ministarstva zdravlja Republike Hrvatske, Klinika za kožne i spolne bolesti i Klinika za onkologiju i nuklearnu medicinu, Klinika za tumore, Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice. Liječenje melanoma vodič za pacijente. Available at <https://www.kbcm.hr/wp-content/uploads/2016/06/Lijecenje-melanoma-e-izdanje-2016.pdf>. Accessed June 22, 2017.
2. National Collaborating Centre for Cancer (UK). Melanoma: Assessment and Management. London: National Institute for Health and Care Excellence (UK); 2015 Jul. (NICE Guideline, No. 14.).
3. NICE National Institute for Health and Care Excellence. Melanoma: assessment and management Melanoma: assessment and management NICE guideline. Published: 29 July 2015. str. 2-61.
4. Liu TC, Hwang TH, Bell JC, et al. Development of targeted oncolytic virotherapeutics through translational research. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2008; 8(9): 1381-1391.
5. Liu TC, Kirn D. Gene therapy progress and prospects cancer: oncolytic viruses. *Gene Therapy* 2008; 15(12): 877-884.
6. Anand Rotte, Madhuri Bhandaru, Immunotherapy of melanoma. Springer International Publishing; 2016, str. 13-17.
7. Rosenberg SA. Cell transfer immunotherapy for metastatic solid cancer--what clinicians need to know. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2011;8(10): 577-585.
8. Schlom J. Therapeutic cancer vaccines: current status and moving forward. *Journal of the National Cancer Institute* 2012; 104 (8): 599-613.
9. National Cancer Institute: Biological Therapies for Cancer. Available at: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy/bio-therapiesfactsheet>. Accessed July 22, 2017.
10. Mark Voskoboynik, Hendrik-Tobias Arkenau. Combination Therapies for the Treatment of Advanced Melanoma: A Review of Current Evidence. *Biochemistry Research International* Volume 2014, Article ID 307059, 9 pages.
11. Kasthuber ER, Lowe SW. Putting p53 in Context. *Cell*. 2017 Sep 7;170(6): 1062-1078.
12. Suleymanova N, Crudden C, Worrall C, Dricu A, Girnita A, Girnita L. Enhanced response of melanoma cells to MEK inhibitors following unbiased IGF-1R down-regulation. *Oncotarget*. 2017 Jul 17;8(47): 82256-82267.
13. Chen H, Li Y, Long Y, Tang E, Wang R, Huang K, Xie C, Chen G. Increased p16 and p53 protein expression predicts poor prognosis in mucosal melanoma. *Oncotarget*. 2017 Jun 5;8(32):53226-53233.

14. Choi YS, Fisher DE. UV and melanoma: the TP53 link. *Cell Res.* 2014 Oct;24(10): 1157-8.
15. Box NF, Vukmer TO, Terzian T. Targeting p53 in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014 Jan; 27(1):8-10.
16. Henary H, Hong DS, Falchook GS, Tsimberidou A i sur. Melanoma patients in a phase I clinic: molecular aberrations, targeted therapy and outcomes. *Ann Oncol.* 2013 Aug;24(8): 2158-65.
17. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2016., Bilten 41, Zagreb, 2019. Available at: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/odjel-za-maligne-bolesti/>. Accessed October 10, 2019.
18. American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8th Edition Melanoma Staging System; 2018, str. 1-29.
19. Anand Rotte, Madhuri Bhandaru, Immunotherapy of melanoma. Springer International Publishing; 2016, str. 61-70.
20. Thierry Soussi. Pathways of the p53 protein. Available at [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:P53\\_pathways.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:P53_pathways.jpg). Accessed at July 15, 2017.
21. Martin Brändli. Diagram showing the production of monoclonal antibodies via hybridoma technology. Available at <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hybridomatechnology.png>. Accessed October 31, 2017.
22. Pubchem Open Chemistry Database. Aminopterin Compound Summary. Available at <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/aminopterin#section=Top>. Accessed October 10, 2017.
23. Mark R. Middleton, Stéphane Dalle, Joel Claveau i sur. Real-world treatment practice in patients with advanced melanoma in the era before ipilimumab: results from the IMAGE study. *Cancer Medicine* 2016; 5(7):1436–1443.
24. Garbe, C., T. K. Eigentler, U. Keilholz, A. Hauschild, J.M. Kirkwood. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *Oncologist* 16:5–24.
25. RCSB Protein Data Bank. Structure of the first-in-class checkpoint inhibitor Ipilimumab bound to human CTLA-4 (PDB: 5TRU). Available at: <http://www.rcsb.org/structure/5TRU>. Accessed October 26,2017.

26. Marconcini R, Spagnolo F, Stucci LS i sur. Current status and perspectives in immunotherapy for metastatic melanoma. *Oncotarget*. 2018 Jan 3;9(15):12452-12470.
27. Jindal V. Role of immune checkpoint inhibitors and novel immunotherapies in uveal melanoma. *Chin Clin Oncol*. 2018 Feb;7(1):8.
28. Ascierto PA, Palmieri G, Gogas H. What is changing in the adjuvant treatment of melanoma? *Oncotarget*. 2017 Dec 6;8(67):110735-110736.
29. Wolchok JD, Rollin L, Larkin J. Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*. 2017 Dec 21;377(25):2503-2504.
30. Sachpekidis C, Hassel JC, Dimitrakopoulou-Strauss A. Metastatic melanoma response to combination therapy with ipilimumab and vemurafenib. *Hell J Nucl Med*. 2017 Sep-Dec;20(3):251-253.
31. Karlsson AK, Saleh SN. Checkpoint inhibitors for malignant melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2017 Aug 24;10:325-339.
32. Daan J.A. Crommelin, Robert D. Sindelar, Bernd Meibohm. *Pharmaceutical Biotechnology. Fundamentals and Applications*. Springer; 2013. str. 46-66.
33. Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode. Baza lijekova-Yervoy sažetak opisa svojstva lijeka. Available at: [http://www.ema.europa.eu/docs/hr\\_HR/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/002213/WC500109299.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/hr_HR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002213/WC500109299.pdf). Accessed November 3, 2017.
34. Daan J.A. Crommelin, Robert D. Sindelar, Bernd Meibohm. *Pharmaceutical Biotechnology. Fundamentals and Applications*. Springer; 2013. str. 143-179.
35. Yu Z, Si L. Immunotherapy of patients with metastatic melanoma. *Chin Clin Oncol*. 2017Apr;6(2):20.
36. RCSB Protein Data Bank. Crystal structure of CTLA4 as published in the Protein Data Bank (PDB: 1DQT). Available at <http://www.rcsb.org/structure/1DQT>. Accessed October 12, 2017
37. Institute for Quality and Efficiency in Health Care. Ipilimumab (New Therapeutic Indication) Benefit Assessment According to §35a Social Code Book V [Internet]. Cologne, Germany: Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG); 2014 Mar 13.
38. Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode. Baza lijekova-Opdivo sažetak opisa svojstva lijeka. Available at: [https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2015/20150619132099/anx\\_132099\\_hr.pdf](https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2015/20150619132099/anx_132099_hr.pdf). Accessed November 8, 2017.

39. RCSB Protein Data Bank. Crystal structure of Nivolumab Fab fragment (PDB: 5GGQ). Available at: <http://www.rcsb.org/pdb/results/results.do?tabtoshow=Current&qrid=A7C5A609>. Accessed October 14, 2017.
40. RCSB Protein Data Bank. Human programmed cell death 1 receptor (PDB: 2M2D). Available at: <http://www.rcsb.org/structure/2M2D>. Accessed October 14, 2017.
41. Arvin S. Yang, Paul B. Chapman. The History and Future of Chemotherapy for Melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009 June ; 23(3): 583–x.
42. Daan J.A. Crommelin, Robert D. Sindelar, Bernd Meibohm. *Pharmaceutical Biotechnology. Fundamentals and Applications.* Springer; 2013. str. 179-222.
43. Daan J.A. Crommelin, Robert D. Sindelar, Bernd Meibohm. *Pharmaceutical Biotechnology. Fundamentals and Applications.* Springer; 2013. str. 337-361.
44. Suzanne L. Topalian, Mario Sznol, David F. McDermott i sur. Survival, Durable Tumor Remission, and Long-Term Safety in Patients With Advanced Melanoma Receiving Nivolumab. *Journal of Clinical Oncology* 0732-183X/14/3210w-1020w.
45. Wolchok JD., Chiarion-Sileni V., Gonzalez R. i sur. Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med.* 2017 Oct 5;377(14):1345-1356.
46. Oh A, Tran DM, McDowell LC, Keyvani D, Barcelon JA, Merino O, Wilson L. CostEffectiveness of Nivolumab-Ipilimumab Combination Therapy Compared with Monotherapy for First-Line Treatment of Metastatic Melanoma in the United States. *Manag Care Spec Pharm.* 2017 Jun;23(6):653-664.
47. Hepner A, Salgues A, Anjos CAD i sur. Treatment of advanced melanoma - A changing landscape. *Rev Assoc Med Bras (1992).* 2017 Sep;63(9):814-823.
48. Guo L, Zhang H, Chen B. Nivolumab as Programmed Death-1 (PD-1) Inhibitor for Targeted Immunotherapy in Tumor. *J Cancer.* 2017 Feb 10;8(3):410-416.
49. Carlino MS, Long GV. Ipilimumab Combined with Nivolumab: A Standard of Care for the Treatment of Advanced Melanoma? *Clin Cancer Res.* 2016 Aug 15;22(16):3992-8.
50. Gupta AK, Daigle D. Nivolumab for Metastatic Melanoma. *Skin Therapy* 2016. *Lett.Mar;*21(2):6-9. Review.
51. Voena C, Chiarle R. Advances in cancer immunology and cancer immunotherapy. *DiscovMed.* 2016 Feb;21(114):125-33. Review.
52. Galluzzi L, Eggermont A, Kroemer G. Doubling the blockade for melanoma immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2015 Oct 29;5(1):e1106127.

53. Raedler LA. Opdivo (Nivolumab): Second PD-1 Inhibitor Receives FDA Approval for Unresectable or Metastatic Melanoma. *Am Health Drug Benefits*. 2015 Mar;8(Spec Feature): 180-3.
54. Márquez-Rodas I, Cerezuela P, Soria A, Berrocal A, Riso A, González-Cao M, Martín-Algarra S. Immune checkpoint inhibitors: therapeutic advances in melanoma. *Ann Transl Med*. 2015 Oct;3(18):267.
55. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol*. 2016 Feb;39(1):98-106.
56. Somasundaram R, Herlyn M. Nivolumab in combination with ipilimumab for the treatment of melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2015;15(10):1135-41.
57. John L, Cowey CL. The Rapid Emergence of Novel Therapeutics in Advanced Malignant Melanoma. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2015 Sep;5(3):151-69.
58. Johnson DB, Peng C, Sosman JA. Nivolumab in melanoma: latest evidence and clinical potential. *Ther Adv Med Oncol*. 2015 Mar;7(2):97-106.
59. RCSB Protein Data Bank. Crystal Structure of Pembrolizumab, a full length IgG4 antibody (PDB - 5DK3). Available at: <http://www.rcsb.org/structure/5DK3>. Accessed October 20, 2017.
60. Patnaik A, Kang SP, Rasco D i sur. Phase I Study of Pembrolizumab (MK-3475; AntiPD-1 Monoclonal Antibody) in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 2015 Oct 1;21(19):4286-93.
61. Sullivan RJ, Flaherty KT. Pembrolizumab for Treatment of Patients with Advanced or Unresectable Melanoma. *Clin Cancer Res*. 2015 Jul 1;21(13):2892-7.
62. Tsai KK, Zarzoso I, Daud AI. PD-1 and PD-L1 antibodies for melanoma. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(11):3111-6.
63. Improta G, Leone I, Donia M, Gieri S, Pelosi G, Fraggetta F. New developments in the management of advanced melanoma - role of pembrolizumab. *Onco Targets Ther*. 2015 Sep 14;8:2535-43.
64. Khoja L, Butler MO, Kang SP, Ebbinghaus S, Joshua AM. Pembrolizumab. *J Immunother Cancer*. 2015 Aug 18;3:36.
65. Niezgoda A, Niezgoda P, Czajkowski R. Novel Approaches to Treatment of Advanced Melanoma: A Review on Targeted Therapy and Immunotherapy. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:851387.
66. Rajakulendran T, Adam DN. Spotlight on pembrolizumab in the treatment of advanced melanoma. *Drug Des Devel Ther*. 2015 Jun 4;9:2883-6.

67. Raedler LA. Keytruda (Pembrolizumab): First PD-1 Inhibitor Approved for Previously Treated Unresectable or Metastatic Melanoma. *Am Health Drug Benefits*. 2015 Mar;8(Spec Feature):96-100.
68. Barnhart C. Pembrolizumab: First in Class for Treatment of Metastatic Melanoma. *J Adv Pract Oncol*. 2015 May-Jun;6(3):234-8.
69. Kwok G, Yau TC, Chiu JW, Tse E, Kwong YL. Pembrolizumab (Keytruda). *Hum Vaccin Immunother*. 2016 Nov;12(11):2777-2789.
70. Asmar R, Yang J, Carvajal RD. Clinical utility of nivolumab in the treatment of advanced melanoma. *Ther Clin Risk Manag*. 2016 Feb 26;12:313-25.
71. Marriott E, Praet C, Aguiar-Ibáñez R, Pellissier J, Xu R, Wang J. Cost-Effectiveness of Pembrolizumab for Unresectable Metastatic Melanoma After Progression. *Value Health*. 2015 Nov;18(7):A453.
72. Burns MC, O'Donnell A, Puzanov I. Pembrolizumab for the treatment of advanced melanoma. *Expert Opin Orphan Drugs*. 2016;4(8):867-873.
73. Melanoma and the BRAF V600 Mutation. Available at: [https://mc.vanderbilt.edu/ckm/g1/mutation\\_profiles/pdfopen.php?fnp=melanoma/content/BRAF/Melanoma\\_and\\_BRAF\\_V600](https://mc.vanderbilt.edu/ckm/g1/mutation_profiles/pdfopen.php?fnp=melanoma/content/BRAF/Melanoma_and_BRAF_V600)  
K.pdf. Accessed November 22, 2017.
74. Bhatia P, Friedlander P, Zakaria EA, Kandil E. Impact of BRAF mutation status in the prognosis of cutaneous melanoma: an area of ongoing research. *Ann Transl Med*. 2015 Feb;3(2): 24.
75. Aris M, Barrio MM. Combining immunotherapy with oncogene-targeted therapy: a new road for melanoma treatment. *Front Immunol*. 2015 Feb 9;6:46.
76. Spagnolo F, Ghiorzo P, Orgiano L, Pastorino L, Picasso V, Tornari E, Ottaviano V, Queirolo P. BRAF-mutant melanoma: treatment approaches, resistance mechanisms, and diagnostic strategies. *Onco Targets Ther*. 2015 Jan 16;8:157-68.
77. Muñoz-Couselo E, García JS, Pérez-García JM, Cebrián VO, Castán JC. Recent advances in the treatment of melanoma with BRAF and MEK inhibitors. *Ann Transl Med*. 2015 Sep;3(15):207.
78. Kim A, Cohen MS. The discovery of vemurafenib for the treatment of BRAF-mutated metastatic melanoma. *Expert Opin Drug Discov*. 2016 Sep;11(9):907-16.
79. Fedorenko IV, Gibney GT, Smalley KS. NRAS mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management. *Oncogene*. 2013 Jun 20;32(25):3009-18.



80. Girotti MR, Saturno G, Lorigan P, Marais R. No longer an untreatable disease: how targeted and immunotherapies have changed the management of melanoma patients. *Mol Oncol*. 2014 Sep 12;8(6):1140-58.
81. Sullivan RJ, Flaherty KT. New strategies in melanoma: entering the era of combinatorial therapy. *Clin Cancer Res*. 2015 Jun 1;21(11):2424-35.
82. Pubchem Open Chemistry Database: Chemical Structure of Vemurafenib. Available at:<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vemurafenib#section=Top>. Accessed November 25, 2017.
83. Liskay G. Vemurafenib (Zelboraf) in the therapy of melanoma. *Magy Onkol*. 2013 Jun;57(2):110-3.
84. Luke JJ, Hodi FS. Ipilimumab, vemurafenib, dabrafenib, and trametinib: synergistic competitors in the clinical management of BRAF mutant malignant melanoma. *Oncologist*. 2013 Jun;18(6):717-25.
85. Batus M, Waheed S, Ruby C, Petersen L, Bines SD, Kaufman HL. Optimal management of metastatic melanoma: current strategies and future directions. *Am J Clin Dermatol*. 2013 Jun;14(3):179-94.
86. Haq R, Fisher DE. Targeting melanoma by small molecules: challenges ahead. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2013 Jul;26(4):464-9.
87. Goldinger SM, Murer C, Stieger P, Dummer R. Targeted therapy in melanoma - the role of BRAF, RAS and KIT mutations. *EJC Suppl*. 2013 Sep;11(2):92-6.
88. Swaika A, Crozier JA, Joseph RW. Vemurafenib: an evidence-based review of its clinical utility in the treatment of metastatic melanoma. *Drug Des Devel Ther*. 2014 Jun 16;8:775-87.
89. Kim DW, Barcena E, Mehta UN, Rohlf ML, Kumar AJ, Penas-Prado M, Kim KB. Prolonged survival of a patient with metastatic leptomeningeal melanoma treated with BRAF inhibition-based therapy: a case report. *BMC Cancer*. 2015 May 13;15:400.
90. Rissmann R, Hessel MH, Cohen AF. Vemurafenib/dabrafenib and trametinib. *Br J Clin Pharmacol*. 2015 Oct;80(4):765-7.
91. Eroglu Z, Ribas A. Combination therapy with BRAF and MEK inhibitors for melanoma: latest evidence and place in therapy. *Ther Adv Med Oncol*. 2016 Jan;8(1):48-56.
92. Shelledy L, Roman D. Vemurafenib: First-in-Class BRAF-Mutated Inhibitor for the Treatment of Unresectable or Metastatic Melanoma. *J Adv Pract Oncol*. 2015 Jul-Aug;6(4):361-5.
93. Kim A, Cohen MS. The discovery of vemurafenib for the treatment of BRAF-mutated metastatic melanoma. *Expert Opin Drug Discov*. 2016 Sep;11(9):907-16.

94. Hassel JC, Lee SB, Meiss F, Meier F, Dimitrakopoulou-Strauss A, Jäger D, Enk AH. Vemurafenib and ipilimumab: A promising combination? Results of a case series. *Oncoimmunology*. 2015 Oct 29;5(4):e1101207.
95. Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode. Baza lijekova-Zelboraf sažetak opisa svojstva lijeka. Available at: [http://www.ema.europa.eu/docs/hr\\_HR/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/002409/WC500124320.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/hr_HR/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/002409/WC500124320.pdf). Accessed November 29, 2017.
96. Manzano JL, Layos L, Bugés C, de Los Llanos Gil M, Vila L, Martínez-Balibrea E, Martínez-Cardús A. Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma. *Ann Transl Med*. 2016 Jun;4(12):237.
97. Pubchem Open Chemistry Database: Chemical Structure of Dabrafenib. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/44462760#section=Top>. Accessed November 30, 2017.
98. Kainthla R, Kim KB, Falchook GS. Dabrafenib for treatment of BRAF-mutant melanoma. *Pharmgenomics Pers Med*. 2013 Dec 31;7:21-9.
99. McGettigan S. Dabrafenib: A New Therapy for Use in BRAF-Mutated Metastatic Melanoma. *J Adv Pract Oncol*. 2014 May;5(3):211-5.
100. Luke JJ, Ott PA. New developments in the treatment of metastatic melanoma - role of dabrafenib-trametinib combination therapy. *Drug Healthc Patient Saf*. 2014 Jun 24;6:77-88.
101. Glitza IC, Davies MA. Genotyping of cutaneous melanoma. *Chin Clin Oncol*. 2014 Sep; 3(3):27.
102. Liskay G. Dabrafenib (Tafinlar) therapy - effect and side effect]. *Magy Onkol*. 2015 Dec; 59(4):361-4.
103. Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode. Baza lijekova - Tafinlar sažetak opisa svojstva lijeka. Available at: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002604/human\\_med\\_001683.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002604/human_med_001683.jsp&mid=WC0b01ac058001d124) Accessed November 30, 2017.
104. Pubchem Open Chemistry Database: Chemical Structure of Trametinib. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11707110#section=Top>. Accessed December 01, 2017.
105. Lugowska I, Kosela-Paterczyk H, Kozak K, Rutkowski P. Trametinib: a MEK inhibitor for management of metastatic melanoma. *Onco Targets Ther*. 2015 Aug 25;8:2251-9.
106. Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode. Baza lijekova - Mekinist sažetak opisa svojstva lijeka. Available at: <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/me->

dicines/human/medicines/002643/human\_med\_001772.jsp&mid=WC0b01ac058001d124. Accessed December 01, 2017.

107. Palumbo G, Di Lorenzo G, Ottaviano M, Damiano V. The future of melanoma therapy: developing new drugs and improving the use of old ones. *Future Oncol.* 2016 Nov;12(22): 2531-2534.

108. Pubchem Open Chemistry Database: Chemical Structure of Cobimetinib. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound?term=%22Cobimetinib%22>. Accessed December 07, 2017.

109. Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode. Baza lijekova - Cotellic sažetak opisa svojstva lijeka. Available at: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/003960/human\\_med\\_001925.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/003960/human_med_001925.jsp&mid=WC0b01ac058001d124). Accessed December 07, 2017.

110. Koelblinger P, Thuerigen O, Dummer R. Development of encorafenib for BRAF-mutated advanced melanoma. *Curr Opin Oncol.* 2018 Feb. 8; 30(2): 125-133

111. Barysch MJ, Mangana J, Dummer R. A new B-Raf inhibitor for advanced melanoma. *Oncotarget* 2018 Oct 2; 9(77): 34457-34458

112. Binimetinib plus encorafenib for metastatic melanoma. *Aust.Prescr.* 2019 Oct; 42(5):168

113. European Medicines Agency. Baza lijekova – Braftovi sažetak opisa svojstva lijeka. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/braftovi>. Accessed November 27, 2019.

114. Koelblinger P, Dummer H. Targeted treatment of advanced NRAS-mutated melanoma. *Oncotarget* 2017 Oct 17; 8(49); 84616-84617

115. Woodfield Sarah E, Zhang L, Scorsone Kathleen A i sur. Binimetinib inhibits MEK and is effective against neuroblastoma tumor cells with low NF1 expression. *BMC Cancer* 2016; 16:172

116. European Medicines Agency. Baza lijekova – Mektovi sažetak opisa svojstva lijeka. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/mektovi>. Accessed November 28, 2019.

117. Koelblinger P, Dornbierer J, Dummer R. A review of binimetinib for the treatment of mutant cutaneous melanoma. *Future oncology* 2017; vol 13, no 20.

118. Drugs.com. Mektovi Prices, Coupons and Patient Assistance Programs. Available at: <https://www.drugs.com/price-guide/mektovi>. Accessed November 28, 2019.

119. Pike E, Hamidi V, Saeterdal I, Odgaard-Jensen J, Klemp M. Multiple treatment comparison of seven new drugs for patients with advanced malignant melanoma: a systematic

- review and health economic decision model in a Norwegian setting. *BMJ Open*. 2017 Aug 21;7(8): e014880.
120. Richard Wu, Marie-Andree Forget, Jessica Chacon i sur. Adoptive T-cell Therapy Using Autologous Tumor-infiltrating Lymphocytes for Metastatic Melanoma: Current Status and Future Outlook. *Cancer J*. 2012 March ; 18(2): 160–175.
121. Sylvia Lee, Kim Margolin. Tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma. *Curr Oncol Rep*. 2012 October ; 14(5): 468–474.
122. Dudley ME, Yang JC, Sherry R i sur. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol*. 2008 Nov 10;26(32):5233-9.
123. Oble DA, Loewe R, Yu P, Mihm MC Jr. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. *Cancer Immun*. 2009 Apr 2;9:3
124. Rosenberg SA, Dudley ME. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr Opin Immunol*. 2009 Apr;21(2):233-40.
125. Gyorki DE, Callahan M, Wolchok JD, Ariyan CE. The delicate balance of melanoma immunotherapy. *Clin Transl Immunology*. 2013 Aug 9;2(8):e5.
126. Besser MJ. Is there a future for adoptive cell transfer in melanoma patients? *Oncoimmunology*. 2013 Oct 1;2(10):e26098.
127. Khammari A, Knol AC, Nguyen JM i sur. Adoptive TIL transfer in the adjuvant setting for melanoma: long-term patient survival. *J Immunol Res*. 2014;2014:186212.
128. Rahbar M, Naraghi ZS, Mardanpour M, Mardanpour N. Tumor-Infiltrating CD8+ Lymphocytes Effect on Clinical Outcome of Muco-Cutaneous Melanoma. *Indian J Dermatol*. 2015 Mar-Apr;60(2):212.
129. Kim JS, Kim YG, Pyo M, Lee HK, Hong JT, Kim Y, Han SB. Adoptive Cell Therapy of Melanoma with Cytokine-induced Killer Cells. *Immune Netw*. 2015 Apr;15(2):58-65.
130. Geukes Foppen MH, Donia M, Svane IM, Haanen JB. Tumor-infiltrating lymphocytes for the treatment of metastatic cancer. *Mol Oncol*. 2015 Dec;9(10):1918-35.
131. Kelderman S, Heemskerk B, Fanchi L i sur. Antigen-specific TIL therapy for melanoma: A flexible platform for personalized cancer immunotherapy. *Eur J Immunol*. 2016 Jun;46(6): 1351-60.
132. Swadesh K. Das, Mitchell E. Menezes, Shilpa Batia i sur. Gene Therapies for Cancer: Strategies, Challenges and Successes. *J Cell Physiol*. 2015 February ; 230(2): 259–271.

133. Dulbecco R: A turning point in cancer research: sequencing the human genome. *Science*(New York, NY). 1986, 231 (4742): 1055-1056.
134. Bryan E. Strauss, Eugenia Costanzi-Strauss. *Gene Therapy for Melanoma: Progress and Perspectives*. U: Lester M. Davids. *Recent Advances in the Biology, Therapy and Management of Melanoma*. IntechOpen; 2013. str. 283-316.
135. Leisegang M, Kammertoens T, Uckert W, Blankenstein T. Targeting human melanoma neoantigens by T cell receptor gene therapy. *J Clin Invest*. 2016 Mar 1;126(3):854-8.
136. Daan J.A. Crommelin, Robert D. Sindelar, Bernd Meibohm. *Pharmaceutical Biotechnology. Fundamentals and Applications*. Springer; 2013. str. 477-509.
137. Explanation of the mechanism of action of talimogene laherparepvec, an oncolytic immunotherapy. Available at: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Talimogene\\_laherparepvec\\_MOA.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Talimogene_laherparepvec_MOA.jpg). Accessed November 15, 2017.
138. Russell SJ, Peng KW, Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol*. 2012 Jul 10;30(7): 658-70.
139. Ott PA, Hodi FS. Talimogene Laherparepvec for the Treatment of Advanced Melanoma. *Clin Cancer Res*. 2016 Jul 1;22(13):3127-31.
140. Ancuceanu R, Neagu M. Immune based therapy for melanoma. *Indian J Med Res*. 2016 Feb;143(2):135-44.
141. J.M.Richards, A.Bedikian, R.Gonzales i sur. High-dose Allovectin-7 in patients with advanced metastatic melanoma: final phase 2 data and design of phase 3 registration trial. *Journal of Clinical Oncology* 23. 2016 December 12; 7543-7543.
142. Jonathan Pola, Aitziber Buquea, Fernando Arandaf i sur. Trial Watch—Oncolytic viruses and cancer therapy. 2016, VOL. 5, NO. 2, e1117740 (15 pages).
143. Package Insert - IMLYGIC - FDA . Available at: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM469575.pdf>. Accessed November 15, 2017.
144. Patrick Therasse, Susan G. Arbuck, Elisabeth A. Eisenhauer i sur. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*; Vol. 92, No.3, February 2, 2000.
145. Efficacy Endpoints in Oncology Clinical Trials. Available at: <https://www.biooncology.com/clinicl-trials/efficacy-endpoints.html>. Accessed February 8, 2018.
146. Curl P, Vujic I, van 't Veer LJ, Ortiz-Urda S, Kahn JG. Cost-effectiveness of treatment strategies for BRAF-mutated metastatic melanoma. *PLoS One*. 2014 Sep 8;9(9):e107255.

147. Krammer R, Heinzerling L. Therapy preferences in melanoma treatment--willingness to pay and preference of quality versus length of life of patients, physicians and healthy controls. *PLoS One*. 2014 Nov 4;9(11):e111237.
148. Jensen IS, Zacherle E, Blanchette CM, Zhang J, Yin W. Evaluating cost benefits of combination therapies for advanced melanoma. *Drugs Context*. 2016 Jul 15;5:212297.
149. Jérôme Fernandes, Bruno Bregman, Patrick Combemale i sur. Hospitalisation costs of metastatic melanoma in France; the MELISSA study (MELanoma In hoSpital coSts Assessment). *BMC Health Services Research* (2017) 17:542.
150. Eva Pike, Vida Hamidi, Ingvil Saeterdal, Jan Odgaard-Jensen, Marianne Klemp. Multiple treatment comparison of seven new drugs for patients with advanced malignant melanoma: a systematic review and health economic decision model in a Norwegian setting. *BMJ Open* 2017;7:e014880.
151. Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode. Izvješće o potrošnji lijekova u Republici Hrvatskoj u 2011. godini. Available at: <http://www.halmed.hr/Novosti-i-edukacije/Publikacije-i-izvjesca/Izvjesca-o-potrosnji-lijekova/Izvjesce-o-prometu-lijekova-u-Republici-Hrvatskoj-u-2011/>. Accessed January 8, 2018.
152. Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode. Izvješće o potrošnji lijekova u Republici Hrvatskoj u 2012. godini. Available at: <http://www.halmed.hr/Novosti-i-edukacije/Publikacije-i-izvjesca/Izvjesca-o-potrosnji-lijekova/Izvjesce-o-prometu-lijekova-u-Republici-Hrvatskoj-u-2012/>. Accessed January 8, 2018.
153. Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode. Izvješće o potrošnji lijekova u Republici Hrvatskoj u 2013. godini. Available at: <http://www.halmed.hr/Novosti-i-edukacije/Publikacije-i-izvjesca/Izvjesca-o-potrosnji-lijekova/Izvjesce-o-prometu-lijekova-u-Republici-Hrvatskoj-u-2013/>. Accessed January 8, 2018.
154. Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode. Izvješće o potrošnji lijekova u Republici Hrvatskoj u 2014. godini. Available at: <http://www.halmed.hr/Novosti-i-edukacije/Publikacije-i-izvjesca/Izvjesca-o-potrosnji-lijekova/Izvjesce-o-prometu-lijekova-u-Republici-Hrvatskoj-u-2014/>. Accessed January 8, 2018.
155. Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode. Izvješće o potrošnji lijekova u Republici Hrvatskoj u 2015. godini. Available at: <http://www.halmed.hr/Novosti-i-edukacije/Publikacije-i-izvjesca/Izvjesca-o-potrosnji-lijekova/Izvjesce-o-potrosnji-lijekova-u-Republici-Hrvatskoj-u-2015/>. Accessed January 8, 2018.
156. Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode. Izvješće o potrošnji lijekova u Republici Hrvatskoj u 2016. godini. Available at: <http://www.halmed.hr/Novosti-i-edukacije/Publikacije-i-izvjesca/Izvjesca-o-potrosnji-lijekova/Izvjesce-o-potrosnji-lijekova-u-Republici-Hrvatskoj-u-2016/>. Accessed January 8, 2018.

kacije-i-izvjesca/Izvjesca-o-potrosnji-lijekova/Izvjesce-o-potrosnji-lijekova-u-Republici-Hrvatskoj-u-2016/. Accessed January 8, 2018.

157. Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode. Izvješće o potrošnji lijekova u Republici Hrvatskoj u 2017. godini. Available at: <http://www.halmed.hr/Novosti-i-edukacije/Publikacije-i-izvjesca/Izvjesca-o-potrosnji-lijekova/Izvjesce-o-potrosnji-lijekova-u-Republici-Hrvatskoj-u-2017>.

158. Anand Rotte, Madhuri Bhandaru, Immunotherapy of melanoma. Springer International Publishing; 2016, str. 420-421.

159. Anand Rotte, Madhuri Bhandaru, Immunotherapy of melanoma. Springer International Publishing; 2016, str. 428-431.

160. Howard L. Kaufman, Janice M. Mehnert, Melanoma. Springer International Publishing; 2016, str. 373-399.

## **7. KRATICE**



AJCC	američki združeni odbor za rak ( <i>engl.</i> American Joint Committee on Cancer)
Akt	protein-kinaza B
BRAF	gen koji kodira enzim B-Raf
CAR-T	receptori kimernog antigena T-limfocita ( <i>engl.</i> chimeric antigen receptor T-cell)
cDNA	citosolna DNA
CDK4	ciklin-ovisna kinaza 4 ( <i>engl.</i> cyclin-dependent kinase 4)
CDK6	kinaza 6 stanične diobe ( <i>engl.</i> cell division kinase 6)
CDKN2A	inhibitor 2A ciklin-ovisne kinaze ( <i>engl.</i> cyclin-dependent kinase inhibitor 2a)
CPD	gen cpd
CR	potpuni odgovor ( <i>engl.</i> complete response)
DC	dendritička stanica ( <i>engl.</i> dendritic cell)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
dsDNA	dvolančana DNA ( <i>engl.</i> double stranded DNA)
EGFR	receptor epidermalnog faktora rasta ( <i>engl.</i> epidermal growth factor receptor)
ELISA	enzimski vezani imunosorpcijski test ( <i>engl.</i> enzyme-linked immunosorbent assay)
ERK	kinaza regulirana vanstaničnim signalom ( <i>engl.</i> extracellular signal regulated kinases)
FDA	Agencija za hranu i lijekove ( <i>engl.</i> food and drug administration)
GDP	gvanozin-difosfat
GM-CSF	faktor stimulacije granulocitne-makrofagne kolonije ( <i>engl.</i> granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
GTP	gvanozin-trifosfat
HALMED	Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode
HER-2	receptor 2 ljudskog epidermalnog faktora rasta ( <i>engl.</i> human epidermal growth

	factor receptor 2)
HLA	ljudski leukocitni antigen ( <i>engl.</i> human leukocyte antigen)
HMW-MAA	ljudski antigen visoke molekularne mase povezan s melanomom ( <i>engl.</i> human high molecular weight-melanoma-associated antigen)
HSV-1	herpes simplex virus 1
HZZO	Hrvatski zavod za zdravstveno osiguranje
IgG	imunoglobulin G
IL-2	interleukin-2
INF	interferon
MAB	monoklonsko protutijelo ( <i>engl.</i> monoclonal antibody)
MAPK	mitogenom aktivirana protein kinaza ( <i>engl.</i> mitogen-activated protein kinase)
mTOR	kinaza mTOR ( <i>engl.</i> mechanistic target of rapamycin)
NIH	Nacionalni institut za zdravlje ( <i>engl.</i> National institute for health)
ORR	udio objektivnog odgovora ( <i>engl.</i> objective response rate)
OS	prosječno doživljenje ( <i>engl.</i> overall survival)
PD-1	protein 1 programirane smrti stanice ( <i>engl.</i> programmed cell death protein 1)
PD-L1	ligand 1 programirane smrti ( <i>engl.</i> programmed death-ligand 1)
PD-L2	ligand 2 programirane smrti stanice 1 ( <i>engl.</i> programmed cell death 1 ligand 2)
PI3K	fosfatidil-inozitol-4,5-bisfosfat 3-kinaza ( <i>engl.</i> phosphatidylinositol- 4,5 -bisphosphate 3-kinase)
PFS	razdoblje do pogoršanja bolesti ( <i>engl.</i> progression-free survival)
PR	djelomični terapijski odgovor ( <i>engl.</i> partial response)
p16	inhibitor 2A ciklin ovisne kinaze ( <i>engl.</i> cyclin-dependent kinaze inhibitor 2A)
p53	tumorski protein p53
Raf	kinaza Raf ( <i>engl.</i> rapidly accelerated fibrosarcoma)

Ras	GTP-aza Ras ( <i>engl.</i> rat sarcoma)
RECIST	kriteriji procjene odgovora u solidnim tumorima ( <i>engl.</i> response evaluation criteria in solid tumors)
RNA	ribonukleinska kiselina
SD	stabilna bolest ( <i>engl.</i> stable disease)
ssDNA	jednolančana DNA
TCGA	atlas tumorskog genoma ( <i>engl.</i> the cancer genome atlas)
TIL	tumor infiltrirajući limfociti
TNF	faktor tumorske nekroze
UICC	Unija za međunarodnu kontrolu raka ( <i>engl.</i> Union for International Cancer Control)
vDNA	virusna DNA
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta ( <i>engl.</i> vascular endothelial growth factor)
QUALY	godina života prilagođena kvaliteti života ( <i>engl.</i> quality adjusted life year)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija ( <i>engl.</i> World Health Organisation)

## **8. ŽIVOTOPIS**