

Inhibitori kontrolnih točaka u terapiji malignih bolesti

Gavran, Lidija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:163:975292>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

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



Lidija Gavran

**Inhibitori kontrolnih točaka u terapiji malignih
bolesti**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Biokemija lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku kemiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod stručnim vodstvom dr. sc. Hrvoja Rimca.

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Imunoterapija raka	1
1.1.1.	Imunosne kontrolne točke	2
1.1.2.	Antitijela.....	6
2.	OBRAZLOŽENJE TEME	9
3.	MATERIJALI I METODE	10
4.	REZULTATI I RASPRAVA	11
4.1.	Anti-CTLA-4	12
4.2.	Anti-PD-1/ Anti-PD-L1	13
4.3.	Ostale molekule kontrolnih točaka	15
4.4.	Prediktivni faktori i biomarkeri.....	18
4.5.	Inhibitori kontrolnih točaka u kombiniranoj terapiji.....	20
4.6.	Nuspojave terapije inhibitorima kontrolnih točaka.....	24
4.6.1.	Prediktivni biomarkeri za toksičnost terapije inhibitorima kontrolnih točaka	26
5.	ZAKLJUČAK	27
6.	LITERATURA.....	28
7.	SAŽETAK/SUMMARY.....	33
8.	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD.....	

Abecedni popis kratica

ADC	Konjugat antitijela i lijeka (ADC) (engl. Antibody-Drug Conjugate)
APC	Antigen prezentirajuća stanica (engl. Antigen Presenting Cell)
CD28	Klaster diferencijacije 28 (engl. Cluster of Differentiation 28)
CDR	Regije koje određuju komplementarnost (engl. Complementarity-Determining Regions)
CEACAM	Molekule adhezije povezane s karcinoembrionalnim antigenom (engl. Carcinoembryonic Antigen-Related Adhesion Molecules)
CSF1R	Receptor 1 faktora stimulacije kolonija (engl. Colony-Stimulating Factor 1 Receptor)
CTCAE	Zajednički terminološki kriteriji za štetne događaje (engl. Common Terminology Criteria for Adverse Events)
CTLA-4	Citotoksični T-limfocitni protein 4 (engl. Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4)
DC	Dendritička stanica (engl. Dendritic Cell)
DNK	Deoksiribonukleinska kiselina
EMA	Europske agencija za lijekove
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove (engl. Food and Drug Administration)
GITR	Glukokortikoidima induciran receptor faktora nekroze tumora (engl. Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor)
GM-CSF	Faktor stimulacije granulocitno–makrofagnih kolonija (engl. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor)
gp100	Glikoprotein 100
HZJZ	Hrvatski zavod za javno zdravstvo

ICOS	Inducibilni T-stanični kostimulator (engl. Inducible T-Cell Co-Stimulator)
IgG	Imunoglobulin G
imAE	Imunitetom posredovana nuspojava (engl. Immune-Mediated Adverse Event)
kDa	kiloDalton
kHL	klasični Hodgkinov limfom
KIR	Receptori slični imunoglobulinu stanica ubojica (engl. Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors)
LAG-3	Gen za aktivaciju limfocita-3 (engl. Lymphocyte Activation Gene-3)
LDH	laktat dehidrogenaza
mAbs	Monoklonska antitijela (engl. Monoclonal Antibodies)
MHC	Glavni kompleks histokompatibilnosti (engl. Major Histocompatibility Complex)
mRNA	Glasnička ribonukleinska kiselina (engl. Messenger Ribonucleic Acid)
MSI-H/dMMR	Neuspjeh popravka neispravnosti / nedostatka i nestabilnosti mikrosatelita (engl. Microsatellite Instability-High /Mismatch-Repair Deficient)
mUCC	Metastatski urotelijalni karcinom
NK	Stanica ubojica (engl. Natural Killer Cell)
NSCLC	Karcinom pluća nemalih stanica (engl. Non-Small Cell Lung Cancer)
PD-1	Programirana smrt-1 (engl. Programmed Death-1)
PD-L1	Ligand programirane smrti-1 (engl. Programmed Death Ligand-1)
PD-L2	Ligand programirane smrti-2 (engl. Programmed Death Ligand-2)
PMBLC	Limfom velikih B stanica (engl. Primary Mediastinal Large B-cell Lymphoma)
PS	Fosfatidilserin (engl. Phosphatidylserine)
TCR	T-stanični receptor (engl. T-Cell Receptor)
TIGIT	T stanični imunoreceptor s Ig i ITIM domenama (engl. T-cell Immunoreceptor with Ig and ITIM Domains)
TIL	Tumor infiltrirajući limfociti (engl. Tumor Infiltrating Lymphocytes)
TIM-3	Molekula koja sadrži T-stanični imunoglobulin i mucin domenu-3 (engl. T-Cell Immunoglobulin- and Mucin-Domain-Containing Molecule-3)
TK	Tirozin kinaza

TKI	Inhibitor tirozin kinaze (engl. Tyrosine Kinase Inhibitor)
TMB	Mutacijsko opterećenje tumora (engl. Tumor Mutation Burden)
TME	Tumorski imunosni mikrookoliš (engl. Tumour Immune Microenvironment)
TNF	Faktor nekroze tumora (engl. Tumor Necrosis Factor)
Treg	Regulatorna T-stanica (engl. Regulatory T cell)
UK	Urotelni karcinom
VISTA	Ig supresor T stanične aktivacije V-domene (engl. V-domain Ig Suppressor of T-cell Activation)

1. UVOD

Broj osoba oboljelih od malignih bolesti u stalnom je porastu, što je u najvećoj mjeri rezultat povećanog očekivanog trajanja života i većeg broja osoba koje dosežu godine života u kojima se maligne bolesti češće pojavljuju. Maligne bolesti drugi su najčešći uzrok smrti u Hrvatskoj, odmah iza srčano-žilnih bolesti. Kao i u svijetu, za očekivati je da će broj slučajeva raka u Hrvatskoj rasti, prvenstveno zbog starenja stanovništva. Samim time, rak predstavlja značajan zdravstveni problem (HZJZ, 2020).

Vrste liječenja raka možemo podijeliti u četiri kategorije: kemoterapiju, hormonalnu terapiju, ciljanu terapiju te imunoterapiju. Kemoterapija predstavlja tretmane citotoksičnim lijekovima koji ometaju diobu i sintezu DNK. Hormonalna terapija ometa signalizaciju rasta putem hormonskih receptora na stanicama raka. Ciljana terapija koristi lijekove koji djeluju specifično na ciljane proteine koji sudjeluju u signalnim putevima rasta stanica raka, a imunoterapija obuhvaća lijekove usmjerene na indukciju imunskog odgovora (Lee i sur., 2016). Tretmani karcinoma često dosegnu refraktorno razdoblje što dovodi do neuspjeha liječenja i razvijanja recidiva bolesti. To može biti posljedica izbjegavanja imunskog odgovora tumorskih stanica i stvaranja imunosupresivnog mikrookoliša (engl. tumour immune microenvironment, TME) koji pospješuje napredovanje raka (Inthagard i sur., 2019).

1.1. Imunoterapija raka

U prošlosti nije bilo jasno izražavaju li tumori antigene koje imunski sustav može prepoznati. Hipoteza imunskog nadzora tvrdi da imunski sustav prepoznaje maligne stanice kao strane, s mogućnošću da ih eliminira (Finn, 2008). Za razliku od ostalih terapijskih koncepata, imunoterapija prvenstveno ima cilj spriječiti metastatsko širenje bolesti i poboljšati kvalitetu života oboljelih. Pristupi koji se primjenjuju u imunoterapiji temelje se na nadopunjavanju ili stimulaciji imunskog sustava preko mnoštva spojeva kao što su limfokini, cjepiva, *in vitro* stimulirane efektorske stanice imunskog sustava ili antitijela (Schuster i sur., 2006). Imunosni sustav prepoznaje tumorske stanice i iskorjenjuje ih višestrukim procesima koji uključuju suradnju urođene i stečene imunosti. Ovaj proces uključuje pozitivne i negativne regulatore. Pozitivni regulatori pojačavaju antitumorsku aktivnost, dok negativni inhibiraju proces ubijanja i pospješuju rast tumora (Inthagard i sur., 2019). Imunoterapija raka mora biti pažljivo konfigurirana kako ne bi došlo do neželjenih autoimunih odgovora. Iako su kontrolne točke i inhibitori ugrađeni u svaki korak i mogu prigušiti ili zaustaviti antitumorski imunski odgovor, najučinkovitiji pristupi uključuju selektivno ciljanje koraka koji

ograničava brzinu odgovora kod pojedinog pacijenta. Mnogi nedavni klinički rezultati sugeriraju da je taj korak najčešće funkcija imunostata, imunosupresije koja se javlja u mikrookolišu tumora (Chen i Mellman, 2013).

Koncept imunoterapije raka seže sve do kraja devetnaestog stoljeća kada je William B. Coley primijetio smanjenje tumora pa čak i nestanak nakon ubrizgavanja bakterijskih proizvoda u i oko tumora. Od tada mnoga zapažanja - poput rijetke, ali dobro dokumentirane pojave spontane remisije, veće učestalosti karcinoma u imunosupresivnih bolesnika i identifikacija tumor specifičnih antigena i limfocita - potiču istraživanje strategija kojima je cilj inducirati specifične antitumorske odgovore. Trenutno su alogena transplantacija koštane srži i monoklonska antitijela koja ciljaju tumorske stanice dva primjera široko korištene i učinkovite imunoterapije (Lesterhuis i sur., 2011).

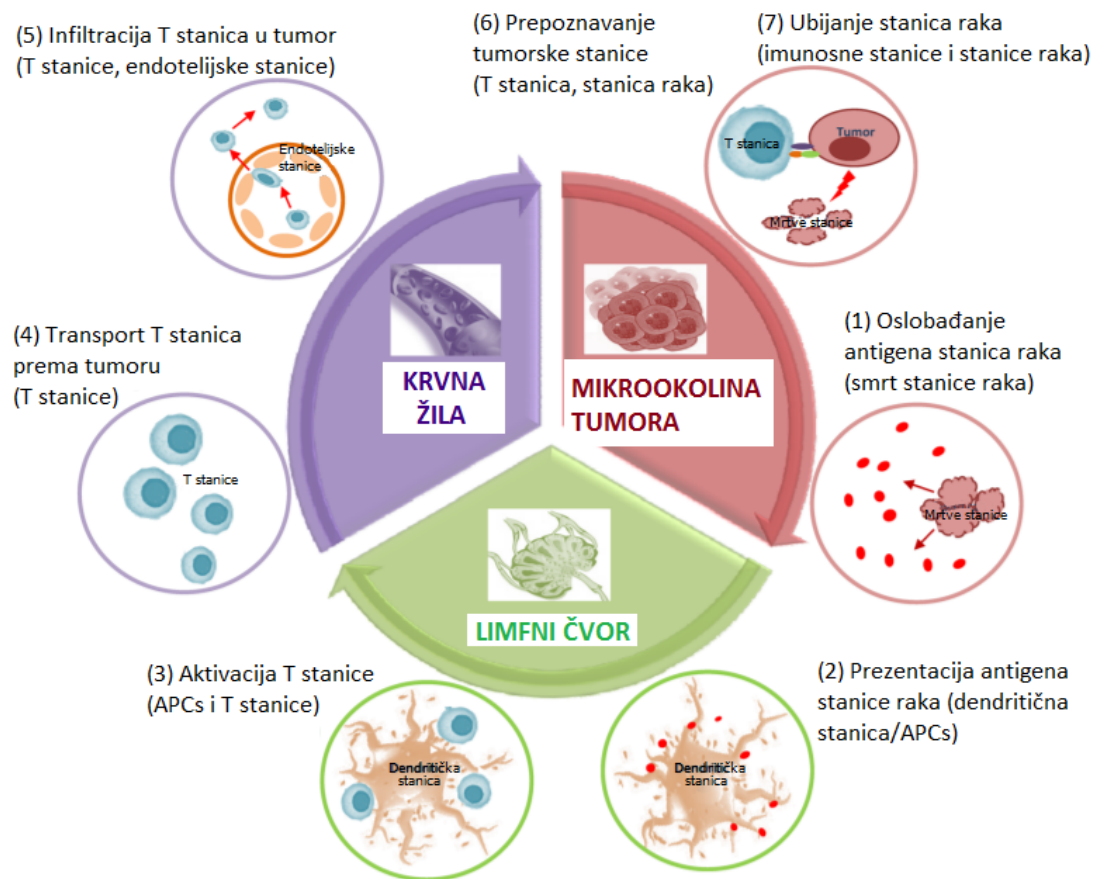
Antikancerogene se imunoterapije obično klasificiraju kao „pasivne“ ili „aktivne“ na temelju njihove sposobnosti da (ponovno) aktiviraju imunosni sustav domaćina protiv malignih stanica. Monoklonska protutijela koja ciljaju tumore i usvojeno prenesene T-stanice smatraju se pasivnim oblicima imunoterapije jer sadrže nužnu antineoplastičnu aktivnost. Antikancerogena cjepiva i inhibitori kontrolnih točaka ispoljavaju antikancerogeni učinak tek nakon aktivacije imunosnog sustava domaćina te zbog toga predstavljaju jasne primjere aktivne imunoterapije (Galluzzi i sur., 2014).

1.1.1. Imunosne kontrolne točke

Aktivna imunoterapija cilja imunosni odgovor domaćina da potakne aktivaciju i obnovi antitumorsku funkciju. Jedan od primjera aktivne imunoterapije su takozvani inhibitori „kontrolnih točaka“ (engl. checkpoint inhibitors). Imunosne kontrolne točke su negativni regulatori imunosnog sustava te su presudne za održavanje samotolerancije i reguliranje trajanja i amplitude fizioloških imunosnih odgovora u perifernim tkivima s ciljem minimiziranja kolateralnih oštećenja tkiva, odnosno igraju presudnu ulogu u ograničavanju antitumorskih imunosnih odgovora (Passardi i sur., 2007; Pardoll, 2012).

U normalnom imunosnom odgovoru protiv raka antigeni na površini tumorskih stanica vežu se za proteinske kontrolne točke na površini T-limfocita koje reguliraju antitumorski odgovor. Međutim, tumor može razviti toleranciju na ovaj mehanizam za suzbijanje antitumorskih funkcija, što pospješuje napredovanje tumora. Stoga su ove imunosne kontrolne točke važne imunoterapijske mete, jer blokada kontrolne točke inhibira ovu modulaciju

imunskog sustava, što rezultira povećanim efektorskim T-limfocitima koje mogu koordinirati antitumorski odgovor (Passardi i sur., 2007).



Slika 1. Ciklus imunosti raka je samopropagirajući ciklički proces koji dovodi do nakupljanja imunostimulacijskih čimbenika koji mogu pojačati i proširiti odgovore T-limfocita. Taj je ciklus koristan okvir za ilustraciju mehanizma imunoterapije raka, gdje svaki korak pruža korak moguće terapijske intervencije (preuzeto od Lee i sur., 2016).

APCs (antigen presenting cells) = antigen prezentirajuće stanice

Da bi T-limfociti učinkovito uništili tumorsku stanicu, moraju prepoznati njene antigene. Antigen prezentirajuće stanice, npr. dendritične stanice u limfnom čvoru, nose tumorski antigen (ligand) na svojoj površini u obliku MHC-molekula, a njih prepoznaje receptor specifičan za antigen (TCR) na T-limfocitima. Takva se receptor-ligand interakcija i prepoznavanje zove „prvi signal“, no za potpunu aktivaciju T-limfocita prema određenom specifičnom antigenu nužna je, osim prve, i dodatna interakcija što se naziva „drugi signal“. Tek tada dolazi do proliferacije i diferencijacije T-limfocita koji može prepoznati i ubiti tumorsku stanicu (Juretić i sur., 2017). Primjer receptora „drugog signala“ je CTLA-4

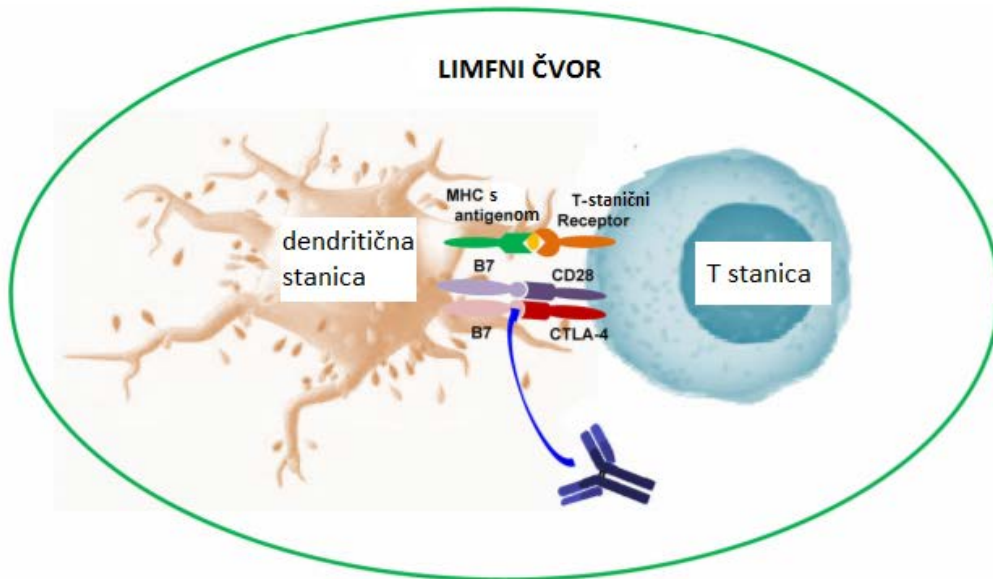
(citotoksični T-limfocitni antigen 4), koji je uz PD-1 (programmed death-1) jedan je od najčešće istraživanih koinhibitorskih proteina, odnosno kontrolnih točaka.

PD-1, poznat i kao CD279, je transmembranski protein tipa I, član porodice CD28 koji se eksprimira na aktiviranim i iscrpljenim T i B limfocitima. PD-1 se eksprimira tijekom efektorske, odnosno kasnije faze na T-stanici u perifernom tkivu i pojačano se eksprimira u mnogim tumorima. Veže se za specifične ligande; ligand za programiranu staničnu smrt PD-L1 (programmed death ligand-1) i PD-L2 na stanicama tumora. PD-L1 je ekspimiran na različitim vrstama solidnih tumora, ali nije ekspimiran u normalnom epitelnom tkivu, gdje je PD-L2 dominantan oblik. Kad se T-limfocit preko PD-1 veže za ligand PD-L1, dolazi do smanjene proizvodnje citokina i inhibicije proliferacije i funkcije T-limfocita unutar perifernih tkiva i tumora, odnosno iscrpljenosti T-limfocita. To igra ključnu ulogu u negativnoj regulaciji imunskih stanica što rezultira uravnoteženjem imunosti tumora i slabljenjem odgovora T-limfocita unutar tumorskog mikrookoliša (Singh i sur., 2015; Robert i sur. 2015).

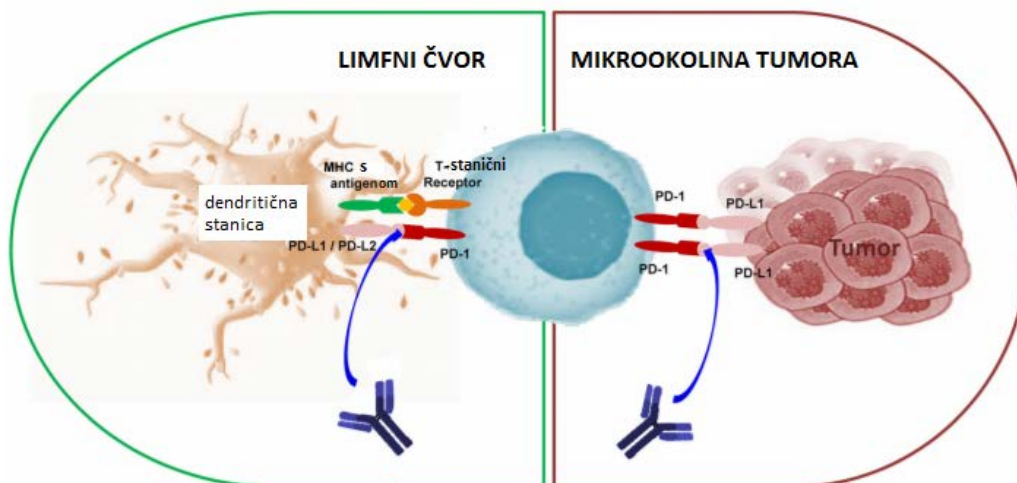
CTLA-4, poznat i kao CD152, je membranski glikoprotein na T-limfocitu. CTLA-4 je homologan kostimulacijskom proteinu T-limfocita CD28 i obje se molekule vežu na ligande CD80 i CD86, također nazvane B7-1, odnosno B7-2, na stanicama koje prezentiraju antigen. CTLA-4 se također nalazi u regulatornim T-stanicama (Tregs) i pridonosi njihovoj inhibicijskoj funkciji. Aktivacija T-limfocita putem receptora T-limfocita i CD28 dovodi do povećane ekspresije CTLA-4 (Magistrelli i sur., 1999). CTLA-4 veže CD80 i CD86 većim afinitetom i avidnošću od CD28, što mu omogućuje da nadvlada CD28 za svoje ligande. CTLA-4 zatim prenosi inhibicijski signal T-limfocitima (Walunas i sur., 1994; Krummel i Allison, 1995; Waterhouse i sur., 1995; Walunas i sur., 1996), dok CD28 prenosi stimulacijski signal (Harding i sur., 1992). Inhibicijsko djelovanje CTLA-4 na T-limfocite koči njihovu daljnju proliferaciju i aktivaciju, što služi sprječavanju pretjerane imunosti i autoimunosti, odnosno održava imunostnu ravnotežu (Naidoo i sur., 2014).

Protutijela koja blokiraju taj inhibicijski mehanizam mogu reaktivirati T-limfocite, odnosno pojačati imunostni odgovor protiv tumora. Prototip inhibitora kontrolne točke, ipilimumab, je prvo monoklonsko protutijelo odobreno 2011. od strane FDA-a. Ipilimumab je potpuno ljudsko protutijelo koje cilja CTLA-4, a odobren je za metastatski melanom temeljem dvije studije (faza III) koje su pokazale poboljšanje stope preživljavanja u odnosu na konvencionalnu terapiju. Nakon početnog kliničkog razvoja, identificirani su i drugi agensi koji moduliraju imunostne kontrolne točke i njihove ligande, kao što su PD-L1, LAG-3 (engl.

Lymphocyte Activation Gene-3), GITR (engl. Glucocorticoid-Induced Tumour Necrosis Factor Receptor) i CD-137, a testiraju se u klinici i kao pojedinačni agensi i kao kombinirana imunoterapija (Naidoo i sur., 2014; Lee i sur., 2016).



Slika 2. CTLA-4 inhibira aktivaciju T-limfocita u limfnom čvoru; pokretanje odgovora na antigen i aktivaciju T-limfocita (preuzeto od Lee i sur., 2016).



Slika 3. PD-1 inhibira korak aktivaciju T-limfocita u limfnom čvoru (rani stadij) i prepoznavanje tumorske stanice (kasni stadij) u mikrookolini tumora (preuzeto od Lee i sur., 2016).

Antitijela se uglavnom nalaze u krvi, slezeni, kostima, koštanoj srži, kao i u intersticijskoj tekućini i egzokrinim izlučevinama. Imunosni sustav ih može učinkovito koristiti za prepoznavanje, ubijanje ili neutraliziranje bakterija, parazita, toksina i virusa te za uništavanje drugih stranih spojeva (Ma i O'Kennedy, 2015). Varijabilni dijelovi Fab regije antitijela jedno su od glavnih područja istraživanja zbog uloge koju imaju u vezivanju antigena. Antigen vežuće mjesto nastaje kombinacijom šest hipervarijabilnih regija koje određuju komplementarnost (engl. Complementarity-Determining Regions, CDR), tri iz teškog lanca i tri iz lakog lanca. Aminokiselinski ostaci varijabilnog područja koji su u izravnom kontaktu s antigenom nazivaju se paratopom, a površinsko područje antigena u izravnom kontaktu s paratopom naziva se epitop (Chiu i Gilliland, 2016).

Budući da je većina antigena vrlo složena, prezentiraju brojne epitope koje prepoznaje velik broj limfocita. Svaki limfocit prolifera i diferencira se u plazma stanice, a rezultirajući odgovor antitijela je poliklonalni, odnosno antitijela su imunokemijski različita. Suprotno tome, monoklonska antitijela (mAbs) su antitijela koja proizvodi jedan klon B limfocita i ona su identična. mAbs su prvi put prepoznati u serumu bolesnika s multiplim mijelomom u kojem je klonska ekspanzija malignih plazmatskih stanica stvorila visoku razinu identičnog antitijela, što je rezultiralo monoklonskom gamopatijom (Lipman i sur., 2005).

Sredinom 1970-ih Köhler i Milstein osmislili su tehniku za stvaranje monoklonskih antitijela željene specifičnosti, za što su dobili Nobelovu nagradu. Spojili su B stanice slezene miša sa stanicama mijeloma od kojih su nastali hibridomi koji proizvode specifična monoklonska antitijela (Lipman i sur., 2005). Na taj se način stvaraju mAbs protiv gotovo bilo kojeg antigena, ali izravna terapijska upotreba mišjih mAbs u ljudi ograničena je velikom učestalošću štetnih imunskih odgovora na mAbs i nedostatkom dovoljne efektorske funkcije. Danas se mišja antitijela namijenjena za terapiju, nakon njihovog generiranja imunizacijom životinja (miševa ili štakora), modificiraju da spriječe imunski odgovor kod pacijenata na mišje, odnosno nehumane sekvence. U početku je to djelomično bilo postignuto kimerizacijom, odnosno zamjenom konstantnih područja antitijela glodavaca onima ljudskog antitijela. Danas se za humanizaciju varijabilne regije često koristi CDR cijepljenje (engl. grafting) u kojem se CDR kombiniraju s ljudskim sekvencama varijabilne regije. Ovaj postupak često smanjuje afinitet mAb pa je stoga potreban dodatan tretman da se pojača afinitet antitijela. Da bi se taj postupak pojednostavio, razvijeni su transgenični miševi i štakori koji izravno generiraju humane mAbs (Chiu i Gilliland, 2016).

Antitijela se intenzivno koriste i kao dijagnostički i kao istraživački reagensi. Koriste se za analizu, pročišćavanje i posredovanje ili moduliranje fizioloških odgovora. Također su postali važnim terapijskim sredstvom u klinici za liječenje raznih bolesti (Lipman i sur., 2005). U početku su mnoga monoklonska protutijela koja su se koristila u klinici bila imunomodulatorna sredstva s aktivnošću protiv specifičnih imunskih stanica, poput CD4 ili CD3 limfocita, koja su važna u patogenezi odbacivanja nakon transplantacije organa. Zatim su razvijena monoklonska antitijela protiv specifičnih citokina, za koja se vjerovalo da igraju ulogu u oštećenju stanica i tkiva u imunsko posredovanim bolestima kao što su reumatoidni artritis, ankilozantni spondilitis, upalne bolesti crijeva, multipla skleroza i psorijaza. Uz to, razvijena su terapijska monoklonska antitijela koja imaju za cilj blokirati ili inhibirati aktivnost specifičnih enzima, transportera na staničnoj površini ili signalnih molekula, a koriste se u kemoterapiji karcinoma i za liječenje teških virusnih infekcija. Upotreba monoklonskih antitijela trenutno se širi i na terapiju teških, nemalignih stanja, uključujući astmu, atopijski dermatitis, migrenske glavobolje, hiperkolesterolemiju, osteoporozu i virusne ili bakterijske infekcije. Dakle, terapijska monoklonska antitijela ne spadaju u jednu klasu lijekova i imaju široku terapijsku upotrebu (Bethesda, 2020).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Maligne bolesti predstavljaju značajan zdravstveni problem, kako u Hrvatskoj tako i u svijetu, a incidencija malignih bolesti u stalnom je porastu. Imunoterapija je jedna od četiri metoda liječenja raka, a obično ju klasificiramo u „aktivnu“ ili „pasivnu“. Stanice imunskog sustava T-limfociti imaju važnu ulogu u imunskom odgovoru protiv raka, međutim zbog prisutnosti određenih antigena na površini T-limfocita spriječen je potpuni potencijal djelovanja T-limfocita protiv tumora. Te autoregulacijske molekule zovemo „kontrolne točke“, a služe održavanju imunosne ravnoteže, odnosno sprječavaju pretjerani imunosni odgovor i autoimune reakcije. Upravo su one postale zanimljiva meta u borbi protiv malignih bolesti pa tako jedna od metoda „aktivne“ imunoterapije obuhvaća antitijela protiv molekula kontrolnih točaka T-limfocita. Osim antigena na T-limfocitima, metama antitijela postale su i neke druge molekule poput liganada prisutnih na različitim vrstama solidnih tumora.

Cilj ovog rada je opisati način djelovanja „aktivne“ imunoterapije koja se bazira na ciljanju molekula kontrolnih točaka i njezinu primjenu te opisati predstavnike inhibitora kontrolnih točaka, s naglaskom na prednostima i nedostacima korištenja takve vrste imunoterapije raka.

3. MATERIJALI I METODE

U izradi ovog rada korišteni su preglednici znanstvene literature citatnih i bibliografskih baza: PubMed, ScienceDirect, Hrčak i Uptodate. Upotrijebljena je dostupna znanstvena literatura, knjige i časopisi te su pregledavane mrežne stranice relevantne tematike.

Ključne riječi korištene pri pretraživanju:

incidencija malignih bolesti,

immunotherapy,

cancer immunotherapy,

immune checkpoints,

checkpoint inhibitors,

CTLA-4,

PD-1,

ipilimumab,

anti-LAG-3,

anti-TIM-3,

OX40,

checkpoint inhibitors toxicity,

checkpoint inhibitors biomarkers,

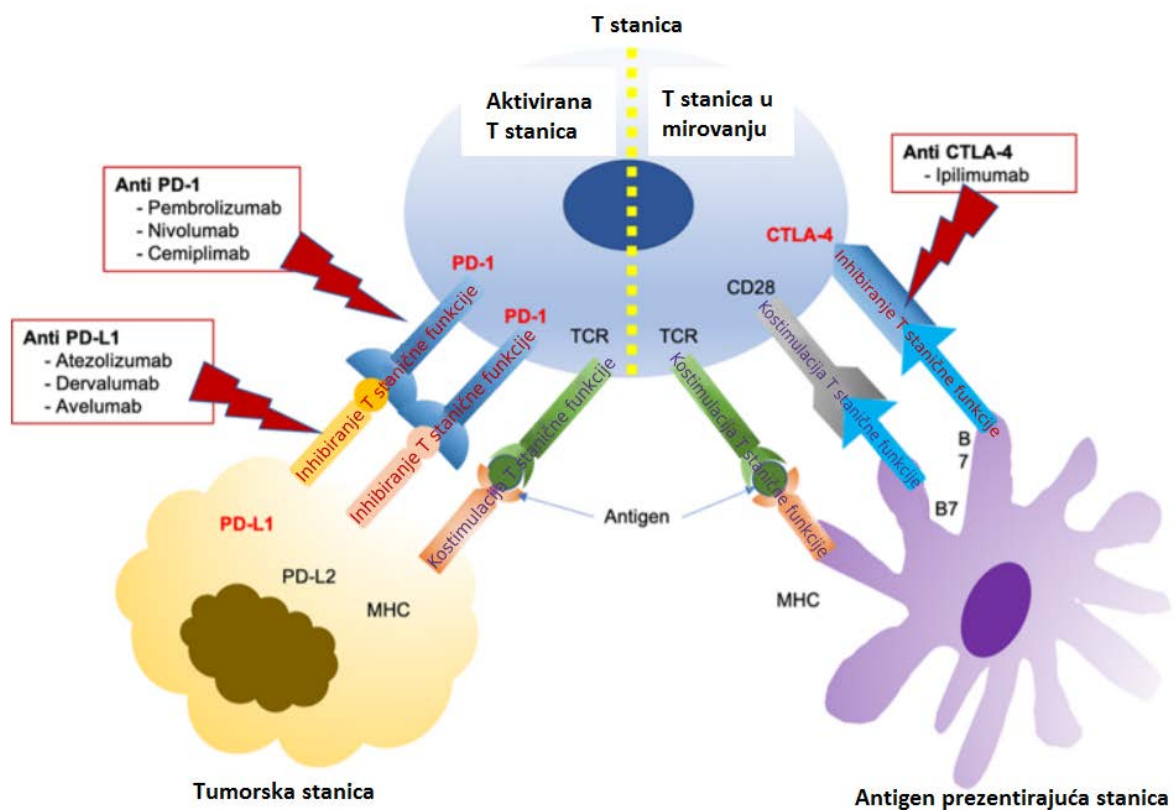
immune checkpoint inhibitor combinations

radiotherapy and immunotherapy

Razdoblje pretraživanja: listopad 2020. – kolovoz 2021.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Kao što je već navedeno, inhibitori imunskih kontrolnih točaka blokiraju vezanje liganda s ciljem poboljšanja antitumorske funkcije T-limfocita. Interakcije imunskih kontrolnih točaka mogu se blokirati anti-PD-1/anti-PD-L1/anti-CTLA-4 antitijelima, što dovodi do ponovne aktivacije imunskih stanica i koordiniranog antitumorskog odgovora T-limfocita. Trenutno su tri inhibitora imunsko kontrolne točke protiv PD-1 odobrena za kliničku upotrebu, a to su: pembrolizumab, nivolumab i cemiplimab. Odobrena su i tri antitijela protiv PD-L1: atezolizumab, durvalumab i avelumab, dok je ipilimumab jedino anti-CTLA-4 antitijelo odobreno za kliničku uporabu (Inthagard i sur., 2019).



Slika 5. Interakcije imunskih kontrolnih točaka koje inhibiraju funkciju T-limfocita i njihovi inhibitori. Imunosna kontrolna točka PD-1 na aktiviranim T-limfocitima veže se za receptore PD-L1 i PD-L2 na stanicama tumora, dok se CTLA-4 na neaktiviranim T-limfocitima veže na B7 na APC-ovima, kako bi inhibirale funkciju T-stanica. Inhibitori imunsko kontrolne točke anti-PD-1, anti-PD-L1 i anti-CTLA-4 mogu blokirati ove komplekse te obnavljaju funkciju T-stanica (slika preuzeta i modificirana od Inthagard i sur., 2019).

Već je ranije spomenuto da su ligandi za T-limfocitne antigene različito locirani; B7 (CD80/86) ligandi za CTLA-4 se uglavnom nalaze na antigen prezentirajućim stanicama u limfnim čvorovima ili slezeni dok je distribucija liganda PD-L1 i PD-L2 mnogo veća; nalaze se na nehematopoetskim stanicama, monocitima, dendritičnim stanicama, ali i mnogim drugim stanicama i tumorima (Robert i sur. 2015; Singh i sur., 2015; Buchbinder sur., 2016). Upravo je zbog toga inhibicija PD-1 važnija za kasniju fazu imunosne reakcije u perifernim tkivima, a inhibicijsko djelovanje na CTLA-4 je vezano uglavnom za limfne čvorove gdje CTLA-4 regulira T-limfocite u početnoj fazi aktivacije i sprječava ili slabi takvu aktivaciju regulacijom proliferacije. Iz toga proizlazi da bi se inhibicijskim djelovanjem antitijela na jednu od te dvije molekule mogli dobiti različiti odgovori u usporedbi s inhibicijom druge molekule. Također, PD-L1 ekspresija na tumorskim stanicama varira ovisno o tipu tumora, ali i unutar određenog tipa tumora, što implicira različit odgovor kod različitih tipova tumora, a čini se da je posebno rasprostranjen u melanomu, karcinomu pluća nemalih stanica i karcinomu jajnika (Buchbinder i sur., 2016).

4.1. Anti-CTLA-4

Glavni i najviše istraživani inhibitor CTLA-4 je ipilimumab, monoklonsko antitijelo, prvi put odobreno za terapiju melanoma (Lee i sur., 2016). Pokazalo se da ipilimumab povećava proliferaciju T-limfocita i vraća antitumorski imunosni odgovor, a u jednoj studiji (faza III) na neresektabilnom melanomu III ili IV stupnja, rezultat je pokazao da je ipilimumab, korišten samostalno, značajno poboljšao cjelokupno preživljavanje pacijenata u usporedbi s peptidnim cjepivom glikoproteina 100 (gp100) ili kombinacijom tih dvaju lijekova (Inthagard i sur., 2019).

Tremilimumab, IgG2 monoklonsko antitijelo, još je jedno CTLA-4 antitijelo koje je pokazalo zadovoljavajući rezultat u studijama faze I/II uznapredovalog melanoma. Međutim, kada je testiran u ispitivanju faze III u usporedbi s kemoterapijom, tremilimumab je inducirao toksičnost i nije pokazao korist za preživljavanje u odnosu na kemoterapiju. Stoga tremilimumab nije odobren, ali su u tijeku daljnja klinička ispitivanja kako bi se proučio ovaj lijek u kombinaciji s trenutnim terapijama i kako bi se procijenili potencijalni biomarkeri za predviđanje odgovora na liječenje (Inthagard i sur., 2019).

4.2. Anti-PD-1/ Anti-PD-L1

Pembrolizumab je humanizirano monoklonsko protutijelo koje se veže na receptor PD-1 i blokira njegovu interakciju s ligandima PD-L1 i PD-L2. Proučavan je na više solidnih tumora i pokazao je antitumorsko djelovanje u kliničkim ispitivanjima pa je tako 2014. godine odobren za liječenje uznapredovalog melanoma na temelju studija faze III koja je usporedila pembrolizumab i anti-CTLA-4 (ipilimumab). Pembrolizumab je pokazao produljeno cjelokupno preživljavanje i manju toksičnost od ipilimumaba (Schachter i sur., 2017). U 2016. godini odobren je za rekurentne ili metastatske bolesnike sa skvamoznim karcinomom glave i vrata, a pokazalo se i da pembrolizumab ima veću efikasnost u odnosu na standardnu terapiju cetuksimabom (Seiwert i sur., 2015). Međutim novije ispitivanje (faza III) nije rezultiralo poboljšanjem ukupnog preživljavanja kao što je to prethodno primijećeno s pembrolizumabom (Cohen i sur., 2015). Ovo otkriće nije utjecalo na prethodno odobrenje, ali je pokazalo varijabilnost rezultata za ovu vrstu raka, što sugerira da je za odabir pacijenata koji bi reagirali na ovu terapiju potreban prediktivan biomarker. Nadalje, 2017. pembrolizumab je odobren za neresektibilne metastatske solidne tumore MSI-H/dMMR (engl. Microsatellite Instability-High/Mismatch-Repair Deficient), uključujući kolorektalni karcinom (O'Neil i sur., 2017). Ovo je bilo prvo odobrenje temeljeno na specifičnim biomarkerima bez obzira na podrijetlo tumora. Pembrolizumab je 2018. odobren kod limfoma velikih B stanica (PMBCL) u djece i odraslih pokazavši postotak odgovora na terapiju (eng. response rate) od 45%. Međutim, 26% pacijenata je razvilo ozbiljne nuspojave sugerirajući da je daljnji rad potreban u tom tipu raka (Inthagard i sur., 2019). O prediktivnim biomarkerima i nuspojavama će biti riječi nešto kasnije.

Nivolumab je drugo PD-1 antitijelo, a između ostaloga je odobren i kod melanoma. Kombinacija nivolumaba i ipilimumaba pokazala se efikasnijom od monoterapije s jednom od ta dva antitijela, što je otvorilo put za traženje učinkovitih kombinacija inhibitora kontrolnih točaka (Larkin i sur., 2015). Međutim, ova kombinacija izaziva više nuspojave od monoterapije ipilimumabom (Heinzerling i sur., 2019) te je stoga potreban poseban oprez. Osim navedenih, u kliničkim ispitivanjima trenutno se istražuju i mnoga druga anti-PD-1 protutijela, ali i mnoge kombinacije s anti-PD-1 o kojima će također biti riječi nešto kasnije.

PD-L1 inhibitori su također odobreni za terapiju solidnih tumora, a avelumab, anti-PD-L1, je prva ciljana terapija koja je odobrena za karcinom Merkelovih stanica, a terapijski odgovor je iznosio 31%. U studiji koja je proučavala učinak avelumaba na metastatski urotelijalni karcinom medijan stope odgovara je bio 11.4 tjedana, međutim gotovo su svi

pacijenti razvili nuspojave (Patel i sur., 2016). Zaključno, inhibitori PD-1 i PD-L1 pokazali su dobru stopu odgovora na razne karcinome, ali je potreban daljnji rad da bi se povećala njihova učinkovitosti i smanjila toksičnost (Inthagard i sur., 2019).

Tablica 1. Inhibitori kontrolnih točaka i njihove indikacije

Antitijelo	Lijek	Indikacija
Anti-PD-1	Pembrolizumab	uznapredovali melanom
		uznapredovali karcinom pluća nemalih stanica (NSCLC)
		rekurentni karcinom skvamoznih stanica glave i vrata
		klasični Hodgkinov limfom (kHL)
		metastatski urotelijalni karcinom (mUCC)
		karcinom bubrežnih stanica
		kolorektalni karcinom
		limfom velikih B stanica (PMBLC)
		neresektabilni/ metastatski tumor s biomarkerima MSI-H/ dMMR
		želučani ili gastroezofagealni adenokarcinom
		ezofagealni adenokarcinom
		rekurentni ili metastatski cervikalni karcinom
		hepatocelularni karcinom
		metastatskim karcinom Merkelovih stanica
	Nivolumab	
rak pluća malih i nemalih stanica		
karcinom bubrežnih stanica		
klasični Hodgkinov limfom		
planocelularni rak glave i vrata te jednjaka		
karcinom urotela		
hepatocelularni karcinom		
Cemiplimab	planocelularni karcinom kože	
Anti-PD-L1	Atezolizumab	uznapredovali urotelni karcinom (UK)
		metastatski karcinom pluća nemalih stanica
	Avelumab	metastatski karcinom Merkelovih stanica
		urotelni karcinom
	Durvalumab	metastatski urotelijalni karcinom
metastatski karcinom pluća nemalih stanica		
Anti-CTLA-4	Ipilimumab	metastatski melanom

Za izradu tablice korišteni su podaci od Inthagard i suradnika (2019), Vaddepally i suradnika (2020) te internet stranice Europske agencije za lijekove (EMA) (www.ema.europa.eu).

4.3. Ostale molekule kontrolnih točaka

Iako su anti-PD/PD-L1 i anti-CTLA-4 u nešto većem fokusu, a dosad odobreni i dostupni lijekovi blokiraju neke od tih molekula, postoje još neke molekule signalnog puta na koje se može djelovati. Jedan takav primjer je gen za aktivaciju limfocita 3 (LAG-3, CD223). To je imunosna kontrolna točka slična PD-1, a ekspirira se na aktiviranim T-limfocitima, NK stanicama (natural killer cells), B-limfocitima i dendritičkim stanicama. LAG-3 stupa u interakciju s MHC-II, jedinim svojim poznatim ligandom, a po strukturi je sličan CD4 receptoru (Diesendruck i Benhar, 2017). Ekspresija LAG-3 povišena je na imunosupresivnim komponentama tumorskog mikrookoliša koje se nalaze u tumorskom ascitesu, a također je i u korelaciji s povećanjem tumorskih mutacija (engl. tumor mutation burden, TMB) (Ruffo i sur., 2019).

Inhibitori LAG-3 pokazali su potencijal u terapiji karcinoma, posebno u kombinaciji s anti-PD-L1. LAG-3 i PD-L1 koekspiriraju se na iscrpljenim limfocitima koji se infiltriraju u tumore, TIL-ima (engl. tumor infiltrating lymphocytes), što bi moglo ukazivati na njihovu ulogu u imunskoj supresiji posredovanoj tumorom. Studije na mišjim modelima pokazale su jasnu sinergiju između receptora u kontroli imunosti homeostaze, sprječavanju autoimunosti i provođenju tolerancije izazvane tumorom (Diesendruck i Benhar, 2017). Trenutno postoji deset eksperimentalnih lijekova usmjerenih na LAG-3 koji se ispituju u kliničkim studijama na različitim tipovima karcinoma kod ljudi, a dominantno se istražuju anti-LAG-3 antitijela. Sedam monoklonskih protutijela je u razvoju, kao i njihove kombinacije s anti-PD-1. Prototip lijeka bio je IMP321 (Immutep; eftilagimod alfa) koji je topljivi kimerni rekombinantni fuzijski protein izvanstaničnog dijela LAG-3 i Fc domene antitijela. U prekliničkim ispitivanjima se pokazalo da IMP321 aktivira APC-ove te promiče proliferaciju dendritičkih stanica, poboljšava Treg imunosupresiju i poboljšava križnu prezentaciju antigena na CD8+ limfocitima. IMP321 je prošao kroz tri klinička ispitivanja, i to za terapiju karcinoma bubrežnih stanica, metastatskog karcinoma dojke i melanoma, ali je pokazao ograničeni uspjeh samo kod manje skupine bolesnika. Međutim, istražuju se kombinacije kemoterapije s IMP321 kao i kombinacije drugih inhibitora kontrolnih točaka s anti-LAG-3, a preliminarni rezultati su optimistični. Trenutno su u tijeku i studije na drugim tipovima raka da bi se dalje evaluirao njegov terapijski potencijal (Ruffo i sur., 2019).

Sljedeća meta od interesa su KIR-ovi (engl. killer inhibitory receptors), receptori na NK stanicama, koje serijom aktivacija u konačnici eliminiraju tumorsku stanicu. KIR-ovi su negativni regulatori NK stanica, slično kao i CTLA-4 i PD-1 kod T-limfocita pa ih se također

smatra imunskim kontrolnim točkama. Trenutno se u fazi I-II nalazi jedno antitijelo, lirilumab, koje je potpuno humano IgG4 antitijelo, a veže se na receptore KIR2DL1/2/3 i KIR2DS1/2 što sprječava njihovo vezanje za MHC-I molekule. Lirilumab se istražuje kao monoterapija i u kombinaciji s nivolumabom ili ipilimumabom za nekoliko hematoloških malignih bolesti kao i za melanom, NSCLC, gastrointestinalne karcinome i hepatocelularni karcinom (Diesendruck i sur., 2017).

TIM-3 (T-stanični imunoglobulin i mucin-3) je još jedna zanimljiva meta u imunoterapiji raka. Genska porodica TIM je otkrivena još 2001., a sastoji se od 3 člana na ljudskom kromosomu: TIM-1, TIM-3 i TIM-4. TIM-3 se, slično kao i LAG-3, se eksprimira na više vrsta imunskih stanica, kao što su T-limfociti, dendritičke stanice, makrofazi i NK stanice (Cheng i Ruan, 2015), a stupa u interakciju s galektinom-9 koji je pojačano reguliran u različitim vrstama karcinoma (Diesendruck i sur, 2017). Također, poznat je i kao receptor za fosfatidilserin (PS), a može inducirati apoptozu T stanica, pojačati sekreciju proinflammatoryh citokina kao što su TNF (faktor nekroze tumora) preko dendritičkih i NK stanica te potaknuti fagocitozu apoptotične stanice. Nedavno, još jedna dobro poznata molekula ekspimirana na aktiviranim T stanicama i uključena u njihovu inhibiciju, CEACAM1 (molekula 1 adhezije karcinoembrionskog antigena), otkrivena je kao heterofilni ligand za TIM-3, a njihova interakcija pokazala je presudnu ulogu u regulaciji autoimunosti (Cheng i Ruan, 2015). Pokazalo se i da TIM-3 inhibira pomoćne T stanice, a antitijela protiv TIM-3 smanjuju tumor. TIM-3 se koeksprimira s PD-1 na TIL-ovima, što sugerira da bi dvostruka blokada oba receptora mogla biti korisna. To je potvrdila i studija na životinjama, gdje je pojačani imunski odgovor postignut kombiniranom primjenom anti-PD-1 i anti-TIM3 za razliku od monoterapije s anti-PD-1 ili anti-TIM-3. Monoklonsko antitijelo TSR-022 se istražuje kao monoterapija i u kombinaciji s antitijelom protiv PD-1 (Diesendruck i sur, 2017). Za razliku od TIM-3, TIM-4 se isključivo eksprimira na antigen prezentirajućim stanicama i služi kao senzor za kontrolu funkcija naivnih i aktiviranih T stanica i fagocitoze apoptotičkih stanica pomoću APC-ova kroz interakciju s PS. Kombinacija anti-TIM-3 i anti-TIM-4 protutijela kod melanoma je značajno povećala antitumorski odgovor povećavajući broj i efektorske funkcije NK i CD8+ T stanica. Iako su ovi rezultati uglavnom u ranim fazama studija, pokazalo se da terapijska manipulacija TIM-3 i TIM-4 može pružiti novu strategiju za poboljšanje kliničke učinkovitosti imunoterapije raka. Zajedno, ova otkrića identificiraju TIM-3 i TIM-4 kao potencijalne ciljeve za induciranje antitumorskog imuniteta zajedno s DNA cjepivima i/ili imunogenom kemoterapijom (Cheng i Ruan, 2015).

Osim već navedenih molekula na koje se inhibitorno djeluje kako bi se pojačala aktivnost T-limfocita, NK stanica ili mijeloidnih stanica, postoje i mnoge druge molekule koje se ciljaju kako bi se ispoljio slični učinak: TIGIT (engl. T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains), VISTA (engl. V-domain Ig suppressor of T-cell activation), B7/H3 (ili CD276), NKG2A, CD39, CD73, CSF1R (engl. colony-stimulating factor 1 receptor), CD47 ili CD172a. Međutim, postoje i druge kontrolne točke koje se farmakološki ciljaju kako bi se, za razliku od prethodno navedenih, izravno amplificirala kostimulacija T stanica. Među tim molekulama je i OX40, koji pripada TNF skupini receptora (Bonney i sur., 2020). OX40 se primarno eksprimira na aktiviranim CD4 i CD8 limfocitima, no može se ekspimirati i na Tregs i aktiviranim NKT stanicama. Njegov ligand je OX40L (CD134L, CD252 ili glikoprotein 34), a ekspresija mu nije ograničena samo na klasične APC-ove kao što su makrofazi, dendritičke stanice i Langerhansove stanice, već se eksprimira i na vaskularnim endotelijskim stanicama, bronhijalnim glatkim mišićima, mastocitima i aktiviranim NK stanicama (McBride i sur., 2021). OX40L nije konstitutivno ekspimiran, već je induciran na aktiviranim APC-ima (Han i Vesely, 2020). S obzirom na to da se OX40 eksprimira isključivo na aktiviranim T stanicama, a ne na naivnim, to implicira da interakcija OX40-OX40L pruža kostimulacijske signale posebno u aktiviranim efektorskim T stanicama (McBride i sur., 2021). Signali vezanja OX40 i njegovog liganda pospešuju efektorsku ekspanziju i preživljavanje T-stanica što znači da bi se na tu metu trebalo ciljati agonistom (Choi i sur., 2020). Jedna od glavnih prednosti ciljanja OX40 je ta što OX40 signalizacija može spriječiti Treg-posredovanu supresiju antitumorskih imunoloških odgovora. Na primjer, pokazalo se da je kod miševa koji nose CT26 transplantirane tumore, intratumoralno ubrizgavanje agonista anti-OX40 monoklonskog protutijela rezultiralo smanjenom Treg funkcijom, ali dovelo je i do veće infiltracije dendritičkih stanica i priljevom tumorspecifičnih citotoksičnih T limfocita (Han i Vesely, 2019). U nekoliko je pretkliničkih istraživanja postignuta regresija tumora korištenjem agonista OX40, a u tijeku su i daljnja klinička istraživanja koja ispituju uspješnost takve vrste terapije (Choi i sur., 2020). Pokazalo se da je toksičnost takvog načina liječenja niža od one nastale inhibicijom CTLA-4. Agonisti OX40 povećavaju ekspanziju T-limfocita koji sadrže PD-1 receptore, pa bi kombinacija OX40 agonista s anti PD-1, ali i anti-CTLA-4 mogla biti korisna. Također, upalni odgovor iniciran OX40 agonistima potiče ekspresiju interferona gama koji pak ponovno potiče ekspresiju PD-L1 na tumorskim stanicama. Tako se može djelovati i inhibitorima PD-1/PD-L1 u kombinaciji sa agonistima OX40 (Lynch i sur., 2015).

Još neke od molekula koje se ciljaju kako bi se izravno amplificirala kostimulacija T stanica su CD28, CD137 (poznata i kao 4-1BB), GITR (engl. Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related protein) i CD40, koji se također testiraju u onkologiji, a najčešće u kombinaciji s antitijelima protiv inhibitornih molekula kontrolnih točaka (Bonney et al., 2020).

4.4. Prediktivni faktori i biomarkeri

Iniciranje terapije inhibitorima kontrolnih točaka općenito je otežano niskom stopom odgovora i imunosnim nuspojava kod nekih pacijenata. Zbog toga je potrebno imati prediktivne biomarkere kojima bi se uspješnije mogli odrediti ishodi terapije (Darvin et al., 2018). Problem koji se s ipilimumabom javljao od početka bio je nemogućnost procijene koji pacijenti će najvjerojatnije imati koristi od liječenja anti-CTLA-4 protutijelom. Niska razina inducibilne ekspresije CTLA-4 i široko rasprostranjena ekspresija njegovog B7 liganda nisu se pokazali korisnima kao prediktivni čimbenici. Retrospektivne studije identificirale su nekoliko prediktivnih faktora povezanih s odgovorom na terapiju, uključujući apsolutni broj limfocita, pojačanu ekspresiju maker-inducibilnog kostimulatora za aktiviranje T-stanica (engl. inducible T-cell co-stimulator, ICOS) CD278 i razvoj polifunkcionalnog odgovora T-stanica na tumorski antigen NY-ESO1 (Buchbinder et al., 2016). Nadalje, smanjeni omjer neutrofila i limfocita (engl. neutrophil to lymphocyte ratio, NLR) tijekom trajanja liječenja pokazao je povezanost s većom stopom preživljavanja. Suprotno tome, visoka razina laktat dehidrogenaze (LDH) u serumu prije liječenja anti-CTLA-4 terapijom bila je povezana s rezistencijom na liječenje (Inthagard et al., 2019). Pokazana je i povezanost između zastupljenosti mutacija kod melanoma (TMB) i kliničke koristi s CTLA-4 blokadom, ali samo to nije dovoljno za predviđanje koji pacijenti će vjerojatno reagirati na liječenje. Međutim, ispitivanja tumorskih neoantigena su se pokazala obećavajućim, identificirajući „potpis“ neoantigena prisutnih u tumorima koji su korelirali s ukupnim preživljavanjem osoba liječenih anti-CTLA-4 (Buchbinder et al., 2016). Nadalje, pokazala se i korelacija između TIL-ova koji su se detektirali intratumoralno i poboljšanog kliničkog benefita anti-CTLA-4 terapije uznapređovalog melanoma (Inthagard et al., 2019).

Nasuprot tome, pojačana regulacija PD-1 na iscrpljenim stanicama i PD-L1 liganda na stanicama tumora ili tumor infiltrirajućim imunosnim stanicama može koristiti kod identifikacije pacijenata koji reagiraju na blokadu PD-1 ili PD-L1. Pokazalo se da pacijenti s tumorima koji ekspresiraju PD-L1 ili infiltrirajućim imunosnim stanicama obično imaju veću

stopu odgovora na terapiju s anti-PD-1 ili anti-PD-L1 i poboljšane ishode preživljavanja u usporedbi s pacijentima s niskom ili negativnom ekspresijom PD-L1. Međutim, u većini studija odgovor na terapiju je viđen i u bolesnika s niskom ili negativnom PD-L1 ekspresijom na tumorima, stoga ti pacijenti ne bi trebali biti isključeni iz liječenja. U ispitivanju koje je uspoređivalo kombinaciju ipilimumaba (anti-CTLA-4) i nivolumaba (anti-PD-1) i svakog od njih kao monoterapije, odgovor na terapiju u PD-L1 pozitivnih bolesnika bili su slični u kombiniranoj terapiji i monoterapiji nivolumabom, dok su PD-L1 negativni bolesnici imali bolji terapijski odgovor na kombinaciju (Buchbinder i sur., 2016). Temeljeno na dvjema studijama u kojima je pembrolizumab prvotno odobren kao druga linija terapije pacijenata s NSCLC-om, a kasnije kao prva linija kod pacijenata s visokom ekspresijom PD-L1 (definirano kao >50% stanica koje su PD-L1 pozitivne) gdje se pokazala superiornija od kemoterapije platinom, PD-L1 je postao ključni biomarker u terapiji naprednog NSCLC-a. TMB je također bio povezan s većom efikasnošću pembrolizumaba u terapiji NSCLC. Kasnije je u jednoj randomiziranoj kliničkoj studiji TMB bio potvrđen kao snažan biomarker, neovisan o PD-L1 ekspresiji, u pacijenata s NSCLC tretiranim nivolumabom, a također i u studijama u kojima su koristile kombinaciju nivolumab + ipilimumab. TMB se još pokazao i korisnim kao prediktivan biomarker u terapiji karcinoma pluća malih stanica (SCLC) (Boumber, 2018).

Transkriptomске i epigenetske studije na NSCLC pokazuju da hipometilacija promotorskih regija CTLA-4, PD-1 i PD-L1 može biti povezana s regulacijom ovih gena u TME. Takvi tumori s demetiliranom DNK mogle bi lakše prepoznati stanice imunskog sustava zbog ekspresije „stranih“ antigena i time bi mogli biti pogodni za liječenje terapijom inhibicije kontrolnih točaka, a pokazano je da su u kroničnoj limfocitnoj leukemiji razine mRNA i PD-1 povišene i značajno hipometilirane u promotorima i regijama pojačivača u usporedbi sa zdravim kontrolama B-stanica (Darvin i sur., 2018).

Nadalje, procjena prediktivnog potencijala LAG-3 područje je aktivnog istraživanja. Trenutna kratkotrajna ekspresija LAG-3 nakon liječenja imunoterapijom može poslužiti kao biljeg infiltracije T stanica i opće imunosne aktivacije, a time i boljeg odgovora na blokadu imunosne kontrolne točke. Također, ekspresija LAG-3, skupa s drugim inhibitorским receptorima kao što je PD-1, bi mogla poslužiti kao prognostički imunosni biomarker za više vrsta tumora (Ruffo i sur., 2019).

4.5. Inhibitori kontrolnih točaka u kombiniranoj terapiji

Iako imunoterapija blokadom kontrolnih točaka unapređuje liječenje raka, ishodi terapije razlikuju se među pacijentima. Razni čimbenici doprinose otpornosti na imunoterapiju blokadom kontrolnih točaka, kao što su promjene u mutacijama tumora, infiltracija T-stanica, supresivna tumorska mikrookolina, nedostaci u prezentaciji antigena i drugi nespecifični čimbenici. Isto tako, terapija usmjerena na kostimulacijske molekule također se razlikuje ovisno o podtipovima tumora, uzorkom ekspresije ciljnih molekula i načinom kombiniranja s drugim inhibitorima kontrolnih točaka ili kemoterapijom (Choi i sur., 2020). Blokada i CTLA-4 i PD-1 ili PD-L1 mogla bi, u teoriji, potaknuti proliferaciju većeg broja T stanica rano u imunosnom odgovoru, vratiti funkciju prethodno aktiviranih T stanica koje su se iscrpile i smanjiti Treg posredovanu imunosupresiju, a to su potvrdila pretklinička ispitivanja gdje je pokazan pojačani antitumorski odgovor korištenjem dvostruke blokade u usporedbi s monoterapijom, kao i inicijalna klinička ispitivanja (Buchbinder i Desai, 2016). U kliničkim ispitivanjima najviše se istražuju kombinacije anti-PD-1/PD-L1 i CTLA-4 lijekova s naglaskom na ipilimumab s nivolumabom ili pembrolizumabom. Do danas su ispitivanja u uznapređovalom melanomu pokazala da smanjena doza nivolumaba u kombinaciji sa standardnom dozom ipilimumaba daje bolju stopu odgovora od samog ipilimumaba, no uzrokuje veću toksičnost. Kombinirana uporaba je u konačnici indicirana za liječenje uznapređovalog (neresektabilnog ili metastatskog) melanoma u odraslih, karcinoma bubrežnih stanica, NSCLC (www.ema.europa.eu) i za MSI-H ili dMMR metastatskog kolorektalnog karcinoma (Vaddepally i sur., 2020). Nasuprot tome, studija (faza I) standardne doze pembrolizumaba u kombinaciji s niskom dozom ipilimumaba u uznapređovalom melanomu pokazala je značajno antitumorsko djelovanje i kontroliranu toksičnost, a daljnje faze ispitivanja su u tijeku (Kirchberger i sur., 2016; Long i sur, 2017).

U jednoj studiji na miševima koji su liječeni anti-PD-L1 antitijelom, anti-LAG-3 antitijelom i njihovom kombinacijom, skupina koja je primala kombiniranu terapiju pokazala je smanjeni rast tumora i povišeni antitumorski imunosni odgovor, više od skupina koje su primale monoterapiju jednim od tih dvaju inhibitora. Zanimljivo je da u ovom i kod sličnih modela nisu primijećene kratkotrajne autoimune nuspojave (Diesendruck i Benhar, 2017). To je otvorilo vrata daljnjim istraživanjima s anti-LAG-3. Tako je anti-LAG-3 relatlimab, u kombinaciji s nivolumabom (anti-PD-1) pokazao preliminarnu učinkovitost u bolesnika s melanomom koji su bili otporni na prethodnu imunoterapiju. Nivolumab i relatlimab su bili dobro podnošeni, s imunosnim nuspojavama povezanim s liječenjem stupnja 3 ili 4 koje su se

javile u 9% bolesnika, što je bilo slično učestalosti zabilježenoj samo kod nivolumaba. Ti rezultati su sugerirali da bi kombinacija nivolumab + relatlimab mogla biti sigurnija od kombinacije nivolumab + ipilimumab (anti-CTLA-4). Na temelju ovih obećavajućih otkrića, u tijeku je ispitivanje faze II/III nivolumaba + relatlimaba naspram samog nivolumaba u prethodno neliječenih pacijenata s neresektabilnim/metastatskim melanomom (Ruffo i sur., 2019).

Osim međusobno, inhibitori kontrolnih točaka se često kombiniraju i s kemoterapijom, iako se dulje vremena smatralo da zbog mijelosupresivnog efekta kemoterapije to neće biti moguće. Tretman kemoterapijom ne samo da utječe na smanjenje tumora i metastaza, već i pojačava imunski odgovor na tumor, na primjer iscrpljivanjem Treg ili ga na to potiče smrt stanice inducirana kemoterapijom (Lesterhuis i sur., 2011). Također, terapijski učinak nekih kemoterapeutika ovisi i o imunskom sustavu. Na primjer, pokazano je da je prisutnost CD4+ T stanica nužna za maksimalni učinak imatiniba (Lesterhuis i sur., 2011). Zbog toga se kombinacijom s kemoterapijom može pojačati efikasnost blokatora inhibicijskih molekula. Kemoterapija može pomoći liječenju inhibitorima kontrolnih točaka i oslobađanjem neoantigena. Nadalje, sugerira se da kemoterapija pomaže imunoterapiji smanjenjem regulacije ekspresije PD-L2 na DC-ima i stanicama tumora, induciranjem sazrijevanja APC-a, vraćanjem vidljivosti tumora i povećanjem ekspresije MHC-I (Kon i sur., 2019). S obzirom na to da je kemoterapija jako imunosupresivna u standardnim dozama, imunoterapija bi se trebale dozirati nakon primjene kemoterapije (Lee i sur., 2016), međutim nisu svi citotoksični agensi isti te su potrebne daljnje studije kako bi se bolje definirali i optimirali vremenski okviri između tih vrsta terapija (Kon i sur., 2019).

Trenutno su odobrene brojne kombinacije anti-CTLA-4 i anti-PD-1/PD-L1 s kemoterapijom kao što su ipilimumab + nivolumab i kemoterapija bazirana na platini (www.ema.europa.eu), pembrolizumab + pemetreksed i karboplatin, pembrolizumab + aksitinib, avelumab + aksitinib, i atezolizumab + bevacizumab, paclitaksel i karboplatin (Vaddepally i sur., 2020). Osim njih, mnoge se kombinacije s drugim metama još istražuju. Primjerice IMP321 (topiva verzija LAG-3) je pokazao ograničeno djelovanje na manjoj skupini bolesnika u početnim studijama, no u završenoj studiji faze I za metastatski karcinom dojke, preliminarna djelotvornost kombinacije IMP321 i kemoterapije (paklitaksel) pokazala je 50% ukupne stope odgovora (engl. overall response rate, ORR) u usporedbi s 25% samo s paklitakselom. Učinkovitost IMP321 je korelirala s povećanom aktivacijom više vrsta

imunskih stanica u bolesnika. Trenutno su u tijeku studije na drugim tipovima raka da bi se dalje evaluirao njegov terapijski potencijal (Ruffo i sur., 2019).

Slično kao kemoterapija, i radioterapija u kombinaciji s imunoterapijom donosi pozitivne rezultate. Prednost radioterapije nad kemoterapijom je dostupnost i manja sistemska toksičnost (Kon i Benhar., 2019). Radioterapija, osim direktnog djelovanja na tumorske stanice može povećati i imunski odgovor protiv tumora. Kada se radioterapijom djeluje na žarište tumora, može doći do smanjenja ili nestajanja metastaza koje nisu bile u snopu zračenja (Hu i sur., 2017). Zračenjem se induciraju proupalni modifikatori tumorskog mikrookoliša, kemokini, koji promiču regrutiranje efektorskih CD8⁺ i pomagačkih CD4⁺ T stanica. Proupalni citokini inducirani zračenjem uključuju interleukin 1 β , TNF α i interferone tipa 1 i 2. Uz to, tumorske stanice koje primaju subletalne doze zračenja podvrgavaju se fenotipskim promjenama koje pojačavaju njihovu osjetljivost na imunski efektore. Pojačana ekspresija receptora smrti, molekula MHC-I, kostimulatornih molekula, adhezijskih molekula i liganada izazvanih stresom na stanicama tumora koje su izložene zračenju, povećavaju njihovo prepoznavanje i ubijanje od strane T stanica (Formenti i sur., 2013). Zbog toga se kombinacijom radioterapije može povećati efikasnost imunoterapije. Kombinacija OX40 agonista s radioterapijom pokazala je kontrolirani rast tumora na mišjem modelu, a trenutno se istražuje optimalni vremenski razmak između ta dva tretmana. U jednoj je studiji pokazano da je davanje anti-OX40 prije radioterapije bila najefikasnija metoda, a optimalno vrijeme je bilo jedan dan prije radioterapije (Choi i sur., 2020), međutim daljnja istraživanja su potrebna kako bi se optimizirala terapija OX40 u kombinaciji s radioterapijom, kao i općenito još mnogo rada u prekliničkim i kliničkim studijama kako bi se odredili doza, fracioniranje, vrijeme, meta i veličina polja zračenja koji će biti najsinergičniji s imunoterapijom (Qian i Schoenfeld, 2020).

Inhibitori kontrolnih točaka se također mogu kombinirati i s antitijelima koja su konjugirana s drugim citotoksičnim lijekom (engl. armed antibodies, AA). Vežanjem AA na stanicu dolazi do lize i imunski smrti stanice, što stimulira regrutiranje T stanica na tumor. Također, kolateralni učinak terapije na okolne stanice može biti koristan kod heterogenih tumora, ali može i spriječiti terapijsku rezistenciju. Takva terapija može smanjiti i negativan učinak kemoterapije, odnosno iscrpljivanje limfoidnih stanica i kolateralnu toksičnost (Kon i sur., 2019). Brentuksimab vedotin je konjugat antitijela i lijeka (ADC) koji se koristi za liječenje refraktornog Hodgkinovog limfoma i sistemskog anaplastičnog limfoma velikih stanica. U kliničkom ispitivanju u kojem su bolesnici s Hodgkinovim limfomom liječeni

kombinacijom brentuksimab vedotina i anti-PD-1, zabilježena je stopa odgovora (engl. complete response rate) od 61%, u usporedbi s 33% samo s brentuksimab vedotinom ili 28% s nivolumabom kao monoterapijom (Herrera i sur., 2018.), međutim potrebno je još studija kojima bi se to potvrdilo, a u tijeku je njih nekoliko studija koje se bave kombinacijom ADC s inhibitorima kontrolnih točaka (Kon i Benhar., 2019).

Inhibitori tirozin kinaze (TK) se također mogu koristiti u kombinaciji s inhibitorima kontrolnih točaka. Oni povećavaju infiltraciju CD8+ T stanica i smanjuju Tregs (Kyi i sur., 2016). Trenutno postoji mnogo TK inhibitora (TKI) odobrenih za liječenje raznih malignih bolesti. Nedavno kliničko ispitivanje faze III pokazalo je da bolesnici s karcinomom bubrežnih stanica imaju koristi od pembrolizumaba i avelumaba (anti-PD-L1) u kombinaciji s aksitinibom. Liječenje pembrolizumabom i aksitinibom rezultiralo je znatno dužim ukupnim preživljavanjem i preživljavanjem bez napredovanja bolesti (Brief, 2019) te se ta kombinacija i kombinacija avelumab + aksitinib odobrene za prvu liniju liječenja metastatskog karcinoma bubrežnih stanica (Vaddepally i sur., 2020).

Antitumorska cjepiva također povećavaju infiltraciju T-limfocita u tumore. Cjepivo se sastoji od tumor specifičnih antigena, a njih prepoznaje imunski sustav koji potom stvara tumor specifične T-limfocite koji djeluju protiv tumora. Povećava se ekspresija nekoliko inhibitornih molekula kontrolnih točaka, uključujući i PD-1 i LAG-3 na limfocitima koji infiltriraju tumor. Zbog takvog mehanizma djelovanja kombinirano korištenje s protutijelima protiv inhibicijskih molekula na limfocitima bi moglo biti korisno (Kleponis i sur., 2015; Mougel i sur., 2019). Kombinacija anti-CTLA-4 protutijela s antitumorskim cjepivom testirala se u prekliničkim studijama. U tumoru koji proizvodi GM-CSF (engl. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) kombinacija je pokazala važne sinergijske učinke u smanjenju veličine tumora i povećanju antitumorskog imunskog odgovora na modelu melanoma i raka prostate. Pokazalo se i da se anti-CTLA-4 treba administrirati nakon cjepiva kako bi se izazvao aditivni efekt. Također, u daljnjim studijama i kombinacija s anti-PD-1 je pokazala pojačani učinak cjepiva. S obzirom na to da se cjepivom inducira nekoliko inhibitornih molekula kontrolnih točaka, uključujući PD-1 i LAG-3, upotreba više inhibitora tih molekula bi mogla dodatno pojačati sinergiju s cjepivom. Kasnije su i kliničke studije pokazale pozitivne učinke kombinacije anti-CTLA-4 s antitumorskim cjepivom na nekoliko tipova raka. Studije koje uključuju anti-PD-1 su nešto manje zastupljene, međutim rani rezultati su obećavajući. Neke studije uključuju i anti-PD-L1, ali i kombinacije s radioterapijom i kemoterapijom. Zaključno, daljnje studije su potrebne kako bi se utvrdilo

poboljšava li se djelotvornost imunskih odgovora izazvanih cjepivom u kombinaciji s inhibicijom kontrolnih točaka. Također će biti potrebno procijeniti imunosne mehanizme uključene u odgovor na liječenje. Ti će parametri tada omogućiti optimalno korištenje kombinirane terapije, ovisno o prirodi korištenog terapijskog cjepiva i inhibitornih molekula (Mougel i sur., 2019).

4.6. Nuspojave terapije inhibitorima kontrolnih točaka

Terapija inhibitorima kontrolnih točaka, poput anti-PD-1, anti-PD-L1 i anti-CTLA-4, pokazala se da može produljiti život oboljelih od raka, međutim poremećaj u funkcioniranju molekula kontrolnih točaka može dovesti i do neravnoteže imunosne tolerancije koja rezultira nekontroliranim imunskim odgovorom. Aktiviranjem imunskog sustava autoimune se nuspojave javljaju u 86–96% bolesnika. U 17–59% bolesnika to su ozbiljne ili čak po život opasne nuspojave (Naidoo i sur., 2015; Heinzerling i sur., 2019). Slično kao i s ostalim imunoterapijama, zbog mehanizma djelovanja same terapije, najteže imunosne nuspojave povezane su s učinkovitijom terapijom (Kon i sur., 2019).

Autoimune nuspojave mogu utjecati na sve organske sustave, no one se u mnogočemu razlikuju od analognih spontanih autoimunih bolesti, i fenotipski, i histološki i serološki. Mehanizmi autoimunih nuspojava uključuju aktivaciju T-limfocita s infiltracijom u određeni organ, izravno vezanje inhibitora kontrolne točke s aktivacijom komplementa (ekspresija CTLA-4 u hipofizi) i imunosne reakcije zbog topivih čimbenika (autoantitijela, citokina) (Lee i sur., 2017; Scott i sur., 2018). Štoviše, čini se da i crijevni mikrobiom utječe na razvoj nuspojava. Teške i po život opasne nuspojave, klasificirane prema CTCAE terminološkim kriterijima za neželjene događaje (engl. Common Terminology Criteria for Adverse Event); stupanj 3/4, javljaju se u 17–21% bolesnika koji su primali monoterapiju protiv PD-1, 20–28% onih koji su primali ipilimumab, 45% onih koji su primali ipilimumab (1 mg/kg) + pembrolizumab i 59% onih koji su primali odobrenu kombiniranu terapiju ipilimumabom (3 mg/kg) i nivolumabom (Heinzerling i sur., 2019). Također, teže nuspojave bile su rjeđe u bolesnika liječenih pembrolizumabom (10,1–13,3%) u usporedbi s ipilimumabom (19,9%) (Dyck i Mills, 2017). Općenito, anti-CTLA-4 je povezan s najvećom frekvencijom imunskih nuspojava (Kon i Benhar., 2019). Česte nuspojave uključuju kolitis, hepatitis, kožne reakcije i endokrinopatije (tiroiditis ili hipofizitis), rjeđe su miozitis, kardiomiozitis i neurološke nuspojave. Nuspojave se obično mogu dobro kontrolirati, međutim problem je prekid terapije, do kojeg obično dolazi kod nuspojava stupnja 3/4 (Kon i Benhar., 2019). Procjenjuje se da 7–

12% bolesnika koji primaju anti-PD-1 terapiju, 9–16% onih koji primaju terapiju ipilimumabom i 39% onih koji primaju kombiniranu terapiju moraju prekinuti terapiju (Heinzerling i sur., 2019).

Primijećeno je da je kod inhibicije PD-1, u usporedbi s inhibicijom CTLA-4, niža učestalost imunitetom posredovanih nuspojava (engl. immune-mediated adverse events, imAE). Razlog tome leži u činjenici da PD-1 regulira već aktivirane T-limfocite u kasnijoj fazi imunskog odgovora, dok CTLA-4 regulira T-limfocite u početnoj fazi aktivacije. Zbog takvog je djelovanja inhibicija anti-CTLA-4 manje selektivna i uzrokuje više nuspojava. Nadalje, PD-1 ima veći afinitet prema PD-L2, nego prema PD-L1, a i PD-L1 i PD-L2 imaju međusobno različite biološke učinke, primjerice različito djeluju u signalizaciji i aktivaciji NK T stanica. Ovi različiti biološki učinci vjerojatno, osim u aktivnosti, pridonose i razlikama u toksičnosti između protutijela usmjerenih na PD-1 (sprječavanje vezanja za oba liganda) za razliku od onih usmjerenih na PD-L1, i stoga imaju potencijalne terapijske implikacije (Buchbinder i sur., 2016). Općenito, PD-1 inhibitori su pokazali manju pojavnost nuspojava u odnosu na druge standardne terapije zbog toga što CD8+ T-limfociti preferiraju prepoznavanje neoantigena, za razliku od vlastitih antigena (Kon i Benhar., 2019).

Na temelju podataka analize pacijenata tretiranih različitim antitijelima otkrivena je i korelacija između određenih vrsta karcinoma i specifičnih irAE. Poremećaji rada štitnjače, artralgijske i mijalgije, vitiligo i osip češći su kod nivolumaba i pembrolizumaba, dok su proljev, kolitis, hipofizitis i pruritus češći kod ipilimumaba. Umor, osip i hepatitis javljaju se podjednako kod obje klase protutijela. Pneumonitis je primjećen u bolesnika s karcinomom pluća, dok bolesnici s melanomom razvijaju kolitis i isključivo razvijaju vitiligo. Vrijeme nakon kojeg se počinju javljati irAE također varira; pacijenti liječeni ipilimumabom razvili su kožne reakcije obično nakon prvih nekoliko tjedana od početka liječenja, dok su drugi simptomi koji su se javljali kasnije uključivali dijareju i kolitis nakon 5-10 tjedana, hepatotoksičnost nakon 7-14 tjedana i hipofizitis nakon 6 tjedana. Kombinacija ipilimumaba i nivolumaba pokazala se toksičnijom od svakog pojedinog agensa; pacijenti su patili od višestrukih irAE, međutim uglavnom su se oporavili od svih osim od kožnih i endokrinih učinaka (86%, odnosno 46% rezolucije). Nadalje, pembrolizumab izaziva umjerenu do ozbiljnu toksičnost s odgodom od oko 9 tjedana, u usporedbi sa 6 tjedana kod ipilimumaba. Također je zabilježen i odgođeni razvoj irAE nakon završetka terapije. Toksični učinak doze primijećen je kod ipilimumaba, međutim nije kod anti PD-1 inhibitora pembrolizumaba ili nivolumaba (Larkin i sur., 2015; Diesendruck i sur., 2017).

Kao što je već spomenuto, nuspojave jesu česte i mogu biti teške, međutim daju se lako kontrolirati i liječiti. Razvijeni su standardni algoritmi liječenja za irAE koji koriste imunosne modulirajuće lijekove, uključujući kortikosteroide, antihistaminike, lijekove protiv faktora nekroze tumora i inhibitore kalcineurina, koji mogu ugušiti upalni odgovor bez uklanjanja antitumorskog imunološkog odgovora (Naidoo i sur., 2015). Ciljevi upravljanja nuspojavama su: detektirati i dijagnosticirati nuspojave, uključujući i rijetke, prevenirati smrtonosne nuspojave, tretirati nuspojave pravilno i bez odgode, obustaviti terapiju ili nastaviti s njom ako je potrebno te pomoći pacijentima da se što bolje nose s posljedicama nuspojava (Heinzerling i sur., 2019).

4.6.1. Prediktivni biomarkeri za toksičnost terapije inhibitorima kontrolnih točaka

S obzirom na to da terapija inhibitorima kontrolnih točaka može uzrokovati ozbiljne životno ugrožavajuće imunosne nuspojave, a koje dovode do prestanka terapije, potrebno je odrediti prediktivne biomarkere kojima bi se odredila toksičnost kod pojedinih pacijenata te poboljšao ishod terapije (Inthagard i sur., 2019). Predloženo je nekoliko potencijalnih čimbenika rizika za ozbiljne irAE, uključujući i obiteljsku anamnezu autoimunih bolesti, infiltraciju i mjesto tumora, prethodne virusne infekcije poput HIV-a ili hepatitisa i istodobnu uporabu lijekova s poznatom autoimunom toksičnošću kao što su antiaritmici, antibiotici, antikonvulzivi ili antipsihotici (Hopkins i sur., 2017).

Biomarkeri povezani s toksičnošću ipilimumaba u bolesnika s melanomom proučavani su u tkivu debelog crijeva kako bi se istražila toksičnost u intestinalnom traktu. Rezultati su pokazali da su infiltracija neutrofila unutar lamine proprije biopsije debelog crijeva i drugi biljezi, uključujući i histološki nalaz, kalprotektin u stolici i antitijela za enteričnu floru, povezani su s toksičnošću gastrointestinalnog trakta. Daljnja istraživanja potvrdila su da bi ovi biomarkeri mogli biti korisni u predviđanju gastrointestinalnih nuspojava kao što je kolitis.

Drugo istraživanje na uzorcima krvi bolesnika s melanomom liječenih ipilimumabom mjerilo je razinu eozinofila prije i nakon liječenja. Rezultat je pokazao da se apsolutni broj eozinofila povećao tijekom liječenja i bio povezan s pojavom irAE. Kasnije je na pacijentima koji su razvili gastrointestinalne irAE pokazana i povećana ekspresija neutrofilnih markera, CD177 i CEACAM1 tijekom liječenja, podržavajući teoriju potencijalne uloge neutrofila u irAE izazvanih ipilimumabom unutar gastrointestinalnog trakta. Međutim, potrebne su daljnje studije na većim skupinama pacijenata, kao i drugi specifičniji prediktivni biljezi kako bi se irAE na vrijeme mogle liječiti (Inthagard i sur., 2019).

5. ZAKLJUČAK

Živimo u eri razvoja imunosne onkologije, gdje se T stanice mogu modulirati antitijelima protiv inhibitornih receptora i stimuliranjem antitijela protiv aktivirajućih receptora. Kroz pregled objavljenih radova o imunoterapiji protutijelima koji ciljaju mete na T limfocitima i tumorske ligande, možemo zaključiti da, osim klasičnih antitijela kao što su anti-CTLA-4/PD-1/PD-L1, raste i broj agonista koji ciljaju neke druge mete kao što su CD137, GITR, OX40 i CD27 te stimuliraju rast T stanica, ali i mete na drugim stanicama kao što su NK stanice, dendritičke stanice i makrofazi, a podaci iz ranih faza kliničkih ispitivanja pokazuju obećavajuće rezultate. Naglasak je na kombiniranoj uporabi takvih antitijela i molekula s drugim metodama liječenja, kao što su antitumorska cjepiva i kemoterapija, ali i mnogim drugim. Na taj će se način povećati terapijske opcije i poboljšati ishodi u liječenju tumora. Međutim, utvrđivanje najprikladnijih podskupina pacijenata i terapije karcinoma te koja je kombinacijska terapija najučinkovitija s najmanjom podnošljivom toksičnošću i dalje ostaje izazov. Daljnja istraživanja razvit će kombinacijske skupove biomarkera za predviđanje ishoda terapije i izbjegavanje imunosno posredovanih nuspojava. Također, potrebno je razviti integriraniji pristup kako bi se identificirale podskupine pacijenta pogodne za pojedini tip terapije.

6. LITERATURA

- Bonnefoy N, Olive D, Vanhove B. Next generation of anti-immune checkpoints antibodies. *Med Sci*, 2019, 35(12), 966-974.
- Boumber Y. Tumor mutational burden (TMB) as a biomarker of response to immunotherapy in small cell lung cancer. *J Thorac Dis* 2018,10(8),4689-4693.
- Brief NIN. Checkpoint Inhibitor-TKI Combos Effective in RCC. *Cancer Discov*, 2019, 9, 460.
- Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am J Clin Oncol*, 2016, 39(1), 98–106.
- Chen DS and Mellman I. Oncology meets immunology: the cancerimmunity cycle. *Immunity*, 2013, 39(1), 1–10.
- Cheng L, Ruan Z. Tim-3 and Tim-4 as the potential targets for antitumor therapy. *Hum Vaccin Immunother*, 2015, 11(10), 2458-62.
- Chiu ML, Gilliland GL. Engineering antibody therapeutics. *Curr Opin Struct Biol*, 2016 , 38, 163-73.
- Choi Y, Shi Y, Haymaker CL, Naing A, Ciliberto G, Hajjar J. T-cell agonists in cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(2).
- Cohen EEW, Machiels JPH, Harrington KJ, Burtness B, Shin SW i sur.: A phase III randomized trial of pembrolizumab (MK-3475) versus standard treatment in patients with recurrent or metastatic head and neck cancer. *J Clin Oncol*, 2015.
- Darvin P, Toor SM, Sasidharan Nair V, Elkord E. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Exp Mol Med*, 2018, 50(12), 1-11.
- Diesendruck Y, Benhar I. Novel immune check point inhibiting antibodies in cancer therapy- Opportunities and challenges. *Drug Resist Updat*, 2017, 30, 39-47.
- Dyck L, Mills KHG. Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *Eur J Immunol*, 2017, 47(5), 765-779.
- European Medicines Agency, 2021, <http://www.ema.europa.eu/ema/>, pristupljeno 25.02.2021.
- Finn OJ. Cancer immunology. *N Engl J Med*, 2008, 358(25), 2704-15.
- Formenti SC, Demaria S. Combining radiotherapy and cancer immunotherapy: a paradigm shift. *J Natl Cancer Inst*, 2013, 105(4), 256-265.
- Garon ERN, Hui R, Leighl N, Balmanoukian A and Eder J. Pembrolizumab for the treatment of non–small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 2015, 372, 11.

Han X, Vesely MD. Stimulating T Cells Against Cancer With Agonist Immunostimulatory Monoclonal Antibodies. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2019, 342, 1-25.

Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulet DH, Allison JP. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature*, 1992, 356 (6370), 607–9.

Heinzerling L, de Toni E, Schett G, Hundorfean G, Zimmer L: Checkpoint inhibitors—the diagnosis and treatment of side effects. *Dtsch Arztebl Int*, 2019, 116, 119–26.

Herrera AF, Moskowitz AJ, Bartlett NL, Vose JM, Ramchandren R, i sur. Interim results of brentuximab vedotin in combination with nivolumab in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Blood*, 2018, 131, 1183–1194.

Hrvatski zavod za javno zdravstvo: Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2017, Bilten 42, 2020, Zagreb, Pristupljeno 24.02.2021.

Hu ZI, McArthur HL, Ho AY. The abscopal effect of radiation therapy: What is it and how can we use it in breast cancer? *Curr Breast Cancer Rep*, 2017 9(1), 45-51.

Inthagard, Edwards, Roseweir. Immunotherapy: enhancing the efficacy of this promising therapeutic in multiple cancers. *Clinical Science*, 182, 2019.

Juretić A, Bašić-Koretić M. Klinička imunoterapija raka blokadom molekularnih interakcija negativne povratne sprege. *Liječ Vjesn*, 2017, 139, 168-172.

Kirchberger, M.C., Hauschild, A., Schuler, G. and Heinzerling, L. Combined low-dose ipilimumab and pembrolizumab after sequential ipilimumab and pembrolizumab failure in advanced melanoma. *Eur J Cancer*, 2016, 65, 182–184.

Kleponis J, Skelton R, Zheng L. Fueling the engine and releasing the break: combinational therapy of cancer vaccines and immune checkpoint inhibitors. *Cancer Biol Med*, 2015, 12(3), 201-8.

Kon E, Benhar I. Immune checkpoint inhibitor combinations: Current efforts and important aspects for success. *Drug Resist Updat*, 2019, 45, 13-29.

Krummel MF, Allison JP) CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *The Journal of Experimental Medicine*, 1995, 182 (2), 459–65.

Kyi C, Postow MA. Immune checkpoint inhibitor combinations in solid tumors: opportunities and challenges. *Immunotherapy*, 2016, 8(7), 821-837.

Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, i sur. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*, 2015, 373, 23-34.

Larkin J, Hodi FS and Wolchok JD. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*, 2015, 373, 1270-1271.

Lee H, Hodi FS, Giobbie-Hurder A, et al.: Characterization of thyroid disorders in patients receiving immune checkpoint inhibition therapy. *Cancer Immunol Res*, 2017, 5, 1133–40.

Lee, Gupta, Sahasranaman. Immune Checkpoint Inhibitors: An Introduction to the next-generation cancer immunotherapy. *The journal of Clinical Pharmacology*, 2016, 157.

Lesterhuis WJ, Haanen JB, Punt CJ. Cancer immunotherapy--revisited. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10(8), 591-600.

Linch SN, McNamara MJ, Redmond WL. OX40 Agonists and Combination Immunotherapy: Putting the Pedal to the Metal. *Front Oncol*, 2015, 16, 5, 34.

Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J*, 2005, 46(3), 258-68.

LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury . Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548844/>, pristupljeno 27.2.2021.

Long GV, Atkinson V, Cebon JS, Jameson MB, Fitzharris BM, McNeil CM et al. Standard-dose pembrolizumab in combination with reduced-dose ipilimumab for patients with advanced melanoma: an open-label, phase 1b trial. *Lancet Oncol*, 2017, 18, 1202–1210.

Ma H, O’Kennedy R. The Structure of Natural and Recombinant Antibodies. *Methods Mol Biol*, 2015, 1348, 7-11.

Magistrelli G, Jeannin P, Herbault N, Benoit De Coignac A, Gauchat JF, Bonnefoy JY, Delneste Y. A soluble form of CTLA-4 generated by alternative splicing is expressed by nonstimulated human T cells. *European Journal of Immunology*, 1999, 29 (11), 3596–602.

McBride MA, Patil TK, Bohannon JK, Hernandez A, Sherwood ER, Patil NK. Immune Checkpoints: Novel Therapeutic Targets to Attenuate Sepsis-Induced Immunosuppression. *Front Immunol*, 2021, 11, 624272.

Mougel A, Terme M, Tanchot C. Therapeutic Cancer Vaccine and Combinations With Antiangiogenic Therapies and Immune Checkpoint Blockade. *Front Immunol*, 2019,10, 467.

Naidoo J, Page DB, Li BT, Connell LC, Schindler K, Lacouture ME, Postow MA, Wolchok JD. Toxicities of the anti-PD-1 and anti-PD-L1 immune checkpoint antibodies. *Ann Oncol*, 2015, 26(12), 2375-91.

Naidoo J, Page DB, Wolchok JD. Immune modulation for cancer therapy. *Br J Cancer*, 2014, 111(12), 2214-9.

O'Neil BH, Wallmark JM, Lorente D, Elez E, Raimbourg J and Gomez-Roca C. Safety and antitumor activity of the anti-PD-1 antibody pembrolizumab in patients with advanced colorectal carcinoma. *PLoS ONE*, 2017.

Papadopoulos KP, Owonikoko TK, Johnson M, Brana I, Martin MG, et al. Cemiplimab (REGN2810): a fully human anti-PD-1 monoclonal antibody for patients with unresectable locally advanced or metastatic cutaneous squamous cell carcinoma (CSCC)-Initial safety and efficacy from expansion cohorts (ECs) of phase I study. *J Clin Oncol*, 2018, 36, 9503

Passardi A, Canale M, Valgiusti M, Ulivi P. Immune Checkpoints as a Target for Colorectal Cancer Treatment. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(6), 1324.

Patel M, Ellerton J, Agrawal M, Gordon M, Dirix L, Lee KW, et al. Avelumab (MSB0010718C; anti-PD-L1) in patients with metastatic urothelial carcinoma progressed after platinum-based therapy or platinum ineligible. *Ann Oncol*, 2016, 27, 6777.

Peggs K S, Quezada S A, Chambers C A, Korman A J and Allison J P. Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J Exp Med*, 2009, 206, 1717-1725.

Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune checkpoint blockade in cancer therapy. *J Clin Oncol*, 2015.

Qian JM, Schoenfeld JD. Radiotherapy and Immunotherapy for Head and Neck Cancer: Current Evidence and Challenges. *Front Oncol*, 2021, 10, 608-772.

Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier, L et al. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med*, 2015, 372, 2521–2532.

Ruffo E, Wu RC, Bruno TC, Workman CJ, Vignali DAA. Lymphocyte-activation gene 3 (LAG3): The next immune checkpoint receptor. *Semin Immunol*, 2019, 42, 101305.

Schachter J, Ribas A, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L. Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study. *Lancet*, 2017, 390, 1853–1862.

Scott ES, Long GV, Guminski A, Clifton-Bligh RJ, Menzies AM, Tsang VH: The spectrum, incidence, kinetics and management of endocrinopathies with immune checkpoint inhibitors for metastatic melanoma. *Eur J Endocrinol*, 2018, 178, 175–82.

Singh PP, Sharma PK, Krishnan G, and Lockhart AC. Immune checkpoints and immunotherapy for colorectal cancer. *Gastroenterol Rep*, 2015, 3, 289–297.

Vaddepally RK, Kharel P, Pandey R, Garje R, Chandra AB. Review of Indications of FDA-Approved Immune Checkpoint Inhibitors per NCCN Guidelines with the Level of Evidence. *Cancers* , 2020, 12(3), 738.

Walunas TL, Bakker CY, Bluestone JA. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 1996, 183 (6), 2541–50.

Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*, 1994, 1 (5), 405–13.

Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctlα-4. *Science*, 1995, 270 (5238), 985–8.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Broj osoba oboljelih od malignih bolesti u stalnom je porastu, a maligne su bolesti drugi najčešći uzrok smrti u Republici Hrvatskoj. Imunoterapija je jedna od metoda liječenja raka, a za razliku od ostalih terapijskih koncepata, prvenstveno ima za cilj spriječiti metastatsko širenje bolesti i poboljšati kvalitetu života oboljelih. Pristupi koji se primjenjuju u imunoterapiji temelje se na nadopunjavanju ili stimulaciji imunosnog sustava preko mnoštva spojeva među kojima su i antitijela protiv kontrolnih točaka T-limfocita. Te autoregulacijske molekule služe održavanju imunosne ravnoteže, odnosno sprječavaju pretjerani imunosni odgovor i autoimune reakcije, no sprječavaju potpuni potencijal T-limfocita u borbi protiv tumora te su stoga postale zanimljiva terapijska meta. U proteklom desetljeću odobreno je nekoliko antitijela koje ciljaju kontrolne točke na T-limfocitima, ali i onih koji ciljaju neke druge molekule kao što su ligandi prisutni na različitim tumorima. U nekim indikacijama, ovakva se terapija može koristiti kao monoterapija, međutim većina indikacija uključuje kombiniranu terapiju dvaju protutijela ili kombinacije s drugim vrstama terapije kao što su radioterapija, kemoterapija bazirana na platini ili s inhibitorima tirozin kinaze. Međutim, zbog samog mehanizma djelovanja antitijela, često se javljaju imunosno posredovane nuspojave. Također, iniciranje terapije inhibitorima kontrolnih točaka općenito je otežano niskom stopom odgovora kod nekih pacijenata. Zbog toga je potrebno imati prediktivne biomarkere kojima bi se uspješnije mogle odrediti skupine pacijenata koji bi odgovorili na takvu terapiju, ali i odrediti toksičnost u pojedinim pacijenata te poboljšao ishod terapije. Nakon inicijalnih odobrenja, daljnja su istraživanja i odobrenja išla u smjeru proširivanja indikacija, kao i istraživanja novih molekula signalnog puta na koje se može djelovati, a koje uključuju i druge stanice osim T-limfocita, kao što su NK stanice, dendritičke stanice i makrofage. Osim na razvoj molekula s inhibitorynim djelovanjem, sve je više istraživanja fokusirano na razvoj agonista kostimulacije T-limfocita poput onih koji ciljaju OX40, CD137 i GITR. Upravo se te nove molekule smatraju potencijalnim novim oružjem protiv raka. Daljnja istraživanja razvit će kombinacijske skupove biomarkera za predviđanje ishoda terapije i izbjegavanje imunosno posredovanih nuspojava. Također, potrebno je razviti integriraniji pristup kako bi se identificirale podskupine pacijenata pogodne za pojedini tip imunosne terapije.

The number of patients suffering from malignant diseases is constantly increasing; malignant diseases are the second most common cause of death in the Republic of Croatia. Immunotherapy is a type of cancer treatment, and unlike the other therapeutic concepts, it primarily aims to prevent a metastatic spread of the disease and improve the quality of life. The approaches used in immunotherapy are based on stimulating the immune system with the variety of compounds, including antibodies against T-cell checkpoints. These molecules are maintaining the immune balance *i.e.*, they prevent an excessive immune response and autoimmune reactions, but they also prevent the full T-cell potential in fighting tumors and have, therefore, become an interesting therapeutic target. In the past decade, several antibodies have been approved that target T-cell checkpoints and other molecules, such as ligands present in various tumors. For some indications, checkpoint inhibitors may be used as a monotherapy; however, most indications involve a combination therapy consisting of two antibodies or combinations with radiotherapy, platinum-based chemotherapy or with tyrosine kinase inhibitors. However, immune-mediated adverse reactions often occur due to the mechanism of action of such therapy. Also, initiating therapy with checkpoint inhibitors is generally hampered by the low response rate in some patients. Therefore, it is necessary to have predictive biomarkers that could more successfully determine the groups of patients who would respond to such therapy, but also to determine toxicity in individual patients and improve the therapy outcome. Following initial approvals, further research and approvals go in the direction of expanding indications as well as studying new molecules that could be targeted beyond T-cells. These molecules include NK cells, dendritic cells, macrophages, and more. In addition, besides on molecules with inhibitory activity, recent research has focused on T-cell costimulation agonists such as those targeting OX40, CD137, and GITR. These new molecules are considered a potential new weapon against cancer. Further research will develop combination sets of biomarkers to predict therapy outcomes and avoid immune-mediated adverse reactions. Also, more integrated approaches should be developed to identify subgroups of patients suitable for each type of the aforementioned immune therapy.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

INHIBITORI KONTROLNIH TOČAKA U TERAPIJI MALIGNIH BOLESTI

Lidija Gavran

SAŽETAK

Broj osoba oboljelih od malignih bolesti u stalnom je porastu, a maligne su bolesti drugi najčešći uzrok smrti u Republici Hrvatskoj. Imunoterapija je jedna od metoda liječenja raka, a za razliku od ostalih terapijskih koncepata, prvenstveno ima za cilj spriječiti metastatsko širenje bolesti i poboljšati kvalitetu života oboljelih. Pristupi koji se primjenjuju u imunoterapiji temelje se na nadopunjavanju ili stimulaciji imunosnog sustava preko mnoštva spojeva među kojima su i antitijela protiv kontrolnih točaka T-limfocita. Te autoregulacijske molekule služe održavanju imunosne ravnoteže, odnosno sprječavaju pretjerani imunosni odgovor i autoimune reakcije, no sprječavaju potpuni potencijal T-limfocita u borbi protiv tumora te su stoga postale zanimljiva terapijska meta. U proteklom desetljeću odobreno je nekoliko antitijela koje ciljaju kontrolne točke na T-limfocitima, ali i onih koji ciljaju neke druge molekule kao što su ligandi prisutni na različitim tumorima. U nekim indikacijama, ovakva se terapija može koristiti kao monoterapija, međutim većina indikacija uključuje kombiniranu terapiju dvaju protutijela ili kombinacije s drugim vrstama terapije kao što su radioterapija, kemoterapija bazirana na platini ili s inhibitorima tirozin kinaze. Međutim, zbog samog mehanizma djelovanja antitijela, često se javljaju imunosno posredovane nuspojave. Također, iniciranje terapije inhibitorima kontrolnih točaka općenito je otežano niskom stopom odgovora kod nekih pacijenata. Zbog toga je potrebno imati prediktivne biomarkere kojima bi se uspješnije mogle odrediti skupine pacijenata koji bi odgovorili na takvu terapiju, ali i odrediti toksičnost u pojedinim pacijenata te poboljšao ishod terapije. Nakon inicijalnih odobrenja, daljnja su istraživanja i odobrenja išla u smjeru proširivanja indikacija, kao i istraživanja novih molekula signalnog puta na koje se može djelovati, a koje uključuju i druge stanice osim T-limfocita, kao što su NK stanice, dendritičke stanice i makrofage. Osim na razvoj molekula s inhibitornim djelovanjem, sve je više istraživanja fokusirano na razvoj agonista kostimulacije T-limfocita poput onih koji ciljaju OX40, CD137 i GITR. Upravo se te nove molekule smatraju potencijalnim novim oružjem protiv raka. Daljnja istraživanja razvit će kombinacijske skupove biomarkera za predviđanje ishoda terapije i izbjegavanje imunosno posredovanih nuspojava. Također, potrebno je razviti integriraniji pristup kako bi se identificirale podskupine pacijenata pogodne za pojedini tip imunosne terapije.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 34 stranica, 5 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 59 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Imunoterapija, rak, inhibitori kontrolnih točaka, CTLA-4, PD-1

Mentor: **Dr. sc. Hrvoje Rimac**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Marijan Marijan**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Kristina Pavić, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Hrvoje Rimac, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

CHECKPOINT INHIBITORS IN THERAPY OF MALIGNANT DISEASES

Lidija Gavran

SUMMARY

The number of patients suffering from malignant diseases is constantly increasing; malignant diseases are the second most common cause of death in the Republic of Croatia. Immunotherapy is a type of cancer treatment, and unlike the other therapeutic concepts, it primarily aims to prevent a metastatic spread of the disease and improve the quality of life. The approaches used in immunotherapy are based on stimulating the immune system with the variety of compounds, including antibodies against T-cell checkpoints. These molecules are maintaining the immune balance i.e., they prevent an excessive immune response and autoimmune reactions, but they also prevent the full T-cell potential in fighting tumors and have, therefore, become an interesting therapeutic target. In the past decade, several antibodies have been approved that target T-cell checkpoints and other molecules, such as ligands present in various tumors. For some indications, checkpoint inhibitors may be used as a monotherapy; however, most indications involve a combination therapy consisting of two antibodies or combinations with radiotherapy, platinum-based chemotherapy or with tyrosine kinase inhibitors. However, immune-mediated adverse reactions often occur due to the mechanism of action of such therapy. Also, initiating therapy with checkpoint inhibitors is generally hampered by the low response rate in some patients. Therefore, it is necessary to have predictive biomarkers that could more successfully determine the groups of patients who would respond to such therapy, but also to determine toxicity in individual patients and improve the therapy outcome. Following initial approvals, further research and approvals go in the direction of expanding indications as well as studying new molecules that could be targeted beyond T-cells. These molecules include NK cells, dendritic cells, macrophages, and more. In addition, besides on molecules with inhibitory activity, recent research has focused on T-cell costimulation agonists such as those targeting OX40, CD137, and GITR. These new molecules are considered a potential new weapon against cancer. Further research will develop combination sets of biomarkers to predict therapy outcomes and avoid immune-mediated adverse reactions. Also, more integrated approaches should be developed to identify subgroups of patients suitable for each type of the aforementioned immune therapy.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 34 pages, 5 figures, 1 table and 59 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Immunotherapy, cancer, checkpoint inhibitors, CTLA-4, PD-1

Mentor: **Hrvoje Rimac, Ph.D.** /*Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Marijan Marijan, Ph.D.** /*Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Kristina Pavić, Ph.D. /*Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Hrvoje Rimac, Ph.D. /*Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2021.