

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

IMUNOTERAPIJA KARCINOMA PLUĆA
LUNG CANCER IMMUNOTHERAPY

SEMINARSKI RAD

Paula Štancl

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Zagreb, 2018.

Sadržaj

1. Uvod	2
2. Karcinom pluća.....	3
2.1. Karcinom pluća malih stanica.....	3
2.2. Karcinom pluća ne-malih stanica.....	3
3. Molekularni biljezi u karcinomu pluća.....	4
4. Imunosni sustav i tumori.....	6
4.1. Protutumorski imunosni odgovor.....	6
4.2. Poticanje rasta tumora imunosnim sustavom.....	7
4.3. Receptori kontrolnih točaka.....	8
5. Uloga imunosnog sustava u poticanju karcinoma pluća.....	9
6. Imunoterapija karcinoma pluća.....	11
6.1. Imunoterapija karcinoma pluća pomoću cjepiva.....	11
6.1.1. Cjepivo protiv tumorskih stanica.....	12
6.1.2. Antigen specifična cjepiva.....	12
6.2. Blokada kontrolnih točaka.....	14
6.2.1. Blokada CTLA-4.....	14
6.2.2. Blokada PD-1.....	15
6.3. Kombinirana terapija.....	17
6.4. Krio-imunoterapija.....	18
7. Literatura.....	20
8. Sažetak.....	25
9. Summary.....	26

1. Uvod

Karcinom pluća je maligni tumor pluća čije stanice dišnog epitela se nekontrolirano dijele. Dijeli se na rak pluća malih stanica (engl. *small-cell lung cancer*, SCLC) koji čini 15% svih karcinoma pluća i rak pluća ne-malih stanica (engl. *non-small-lung cancer*, NSCLC) koji čini 85% (Sher i sur., 2008). Karcinom pluća vodeći je uzrok smrti od raka u oba spola i predstavlja ozbiljan zdravstveni problem (Torre i sur., 2015). Česti simptomi su kašalj uz moguće iskašljavanje krvi, bol u prsima, nedostatak daha i gubitak težine.

Karcinom pluća bio je rijetka bolest krajem 19. i početkom 20. stoljeća. Zloćudni tumori pluća sačinjavali su samo 1% svih zloćudnih tumora pronađenih obdukcijama 1878., ali se njihov broj u ranim 1900-tim godinama povećao na 10–15% (Witschi, 2001). Nagli porast učestalosti i mortaliteta vezan uz karcinom pluća je u porastu od 1930-tih godina. U zadnjih 100 godina je karcinom pluća od rijetke bolesti postao globalni zdravstveni problem. Poveznica porasta karcinoma pluća je s porastom konzumacije cigareta. Pušenje je glavni čimbenik rizika za razvoj raka, dok pasivna izloženost duhanskom dimu također može uzrokovati karcinom pluća (Alberg i sur., 2016). Karcinom bronha i pluća najčešći rak u muškaraca, a u žena je na trećem mjestu u Republici Hrvatskoj. Rizik obolijevanja za dob između 30–74 godine za muškarce je iznosio oko 14%, a za žene nešto manji od 10%. Bolest se najčešće javlja iza četrdesete godine života, i to u pušača (Jakopović, 2007). Rano otkrivanje bolesti nije uspješno jer se simptomi često javljaju tek kod uznapredovale bolesti. Zbog toga je preživljenje bolesnika kratko. Ukupno petogodišnje preživljenje za sve tipove i stadije bolesti je iznosilo oko 16,8% u 2004. godini.

U posljednjih par godina, došlo je do povećanih spoznaja u ulozi imunskog sustava u razvoju tumora i njegovoj progresiji. S tom spoznajom razvija se imunoterapija u kliničkoj primjeni za melanom (ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab), rak prostate (sipuleucel-T) i stanica raka bubrega (interleukin-2 i interferon alfa). Iako se povijesno smatralo da karcinom pluća spada u neimunodne bolesti, pojavljuje se sve više dokaza koji pokazuju da u nedostatku učinkovitog imunskog sustava dolazi do proliferacije tumora. Bitno je razumijevanje imunologije i onkologije kako bi se stimulirao vlastiti imunski sustav u obrani od tumora prilikom čega ne dolazi do štetnog djelovanja na vlastite stanice kao kod kemoterapije.

2. Karcinom pluća

Karcinomi pluća mogu se klasificirati s obzirom na histološki tip (Lu i sur., 2010). Postoje dva glavna histološka tipa koja su bitna za terapijske svrhe, a to su rak pluća malih stanica (engl. *small-cell lung cancer*, SCLC) i rak pluća ne-malih stanica (engl. *non-small-lung cancer*, NSCLC). Oba tipa rastu i šire se drugačije. Stadij karcinoma pluća označava koliko se rak pluća proširio u tijelu. Koristeći TNM opisnu klasifikaciju (engl. *TNM Classification of Malignant Tumours*) može se odrediti koji je stadij karcinoma pluća što može pomoći u odabiru načina obrade i u procjeni dijagnoze (Rami-Porta i sur., 2009). Najopasniji i najrazvijeniji stadij je posljednji, 4. stadij, u kojem tumor metastazira u druge dijelove tijela.

2.1. Karcinom malih stanica pluća

Karcinom pluća malih stanica najzloćudniji je histološki tip karcinoma pluća. Radi se o neuroendokrinom tumoru koji čini oko 15% svih karcinoma pluća, visokog je proliferativnog indeksa i izrazite sklonosti ranom metastaziranju (William i sur., 2011; Siegel i sur., 2012). Histološki su stanice male, okrugle ili ovalne s rijetkom citoplazmom. Mitotski indeks je visok i stanice rastu u klasterima koje nemaju organizaciju žljezdanih tkiva. Većina svih SCLC je imunoreaktivna za keratin, tiroidni transkripcijski faktor 1. Dok se preinanzivne i *in situ* maligne promjene često pronalaze kod karcinoma pluća ne-malih stanica, one su vrlo rijetke u malim stanicama raka pluća (Sher i sur., 2011). Najpoznatiji uzrok raka malih stanica pluća jest pušenje cigareta, i to je zabilježeno u 95% slučajeva. Sve je više zabilježenih slučajeva patogeneze SCLC-a povezano s proto-onkogenima i tumor supresorkim genima TP53, RB1. Nekoliko kromosomskih i onkogenih abnormalnosti je otkriveno u svježim SCLC tkivima poput delecije kratkog kraka kromosoma 3 zabilježenog u više od 95% slučajeva SCLC-a. Neke genetičke promjene se pojavljuju rano u bolesti poput inaktivacije tumor supresorkih gena na kromosomu 3 (Graziano i sur., 1991). Postoji velika heterogenost tumora na genetičkoj razini što otežava klinička istraživanja novih lijekova.

2.2. Karcinom pluća ne-malih stanica

Prema histološkoj slici, razlikujemo više tipova karcinoma pluća ne-malih stanica: adenokarcinom (40 do 50%), karcinom pločastih stanica (engl. *squamous cell carcinoma*, SCC) (30%) te krupnostanični karcinom (engl. *large cell anaplastic carcinoma*, LCAC ili engl. *not otherwise specified*, NSCLC NOS) koji je zastupljen oko 10%. Adenokarcinom pluća jedan je od najbolje genetički istraženih ljudskih epitelnih zloćudnih novotvorina. Razvija se iz alveolarnih stanica tipa II koje su odgovorne u sekreciju surfaktanta. Pojavljuje se u periferiju

pluća (Travis i sur., 1995) i raste sporije od ostalih tipova karcinoma te zbog toga ima veću mogućnost biti otkriven prije negoli se proširi na ostale dijelove tijela.

Prve mutacije koje uzrokuju NSCLC su otkrivene u *KRAS* i *TP53*. Tek 2004. godine je otkrivena prva mutacija od velikog kliničkog značaja, a to je mutacija u receptoru epidermalnog čimbenika rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR). Osim EGFR-a, ostali ciljni biomarkeri za terapije uključuju reorganizaciju gena *ALK*, *ROS1* i *RET*, amplifikaciju *MET*-a i mutacije u genima *BRAF*, *HER2* i *KRAS* (Zappa i Mousa, 2016).

3. Molekularni biljezi u karcinomu pluća

Personalizirana medicina temelji se na napadanju odgovarajućih molekularnih biljega u tumorima kako bi se poboljšalo preživljenje pacijenata s karcinomom pluća, većinom djelujući na ne-male stanice raka pluća. Tumorski biljezi mogu biti prognostički i prediktivni. Prognostički biljezi jesu oni koji ukazuju na bolji ili gori ishod bez obzira na način obrade. Prediktivni biljezi pokazuju bolji ili gori ishod s obzirom na obradu. Karcinogeneza pluća je dugotrajan proces u kojem se akumuliraju genetska oštećenja. Molekularne promjene koje se pojavljuju prilikom razvoja karcinoma pluća kao posljedicu imaju deregulaciju signalnog puta bitnog za rast stanice i apoptozu. Najčešće zahvaćeni signalni put jest PI3K/ATK/mTOR signalni put.

Receptor epidermalnog čimbenika rasta, EGFR, naziva se još HER1 te ErbB1. Jedan je od četiri člana porodice ErbB receptora tirozin kinaze. Nalazi se na površini stanice i aktivira signalne puteve koji dovode do rasta i proliferacije stanice te supresiju apoptoze. Receptor prelazi iz neaktivnog oblika monomera u dimer vezanjem izvanstaničnih čimbenika rasta poput EGF. Dimerizacijom dolazi do autofosforilacije tirozinkinazne domene EGFR koja dalje aktivira unutarstanične signalne kaskade RAS-RAF-MEK-ERK, PI3K-AKT-mTOR i JAK-STAT (Paez i sur., 2004). Postoje tri glavna mehanizma koje dovode do EGFR aktivacije, a to su: povećana ekspresija EGFR na malignim stanicama; maligne stanice imaju povećanu proizvodnju liganda za EFGR, te mutacije u EGFR, koje će stalno poticati prijenos signala, unutar malignih stanica. Prekomjerna ekspresija EGFR-a je prisutna u 40-80% NSCLC-a i primarni terapijski cilj je upravo mutacija koja uzrokuje aktiviranje EGFR-a umjesto prekomjerne ekspresije samog receptora. Mutacije u genu EGFR dovode do nekontrolirane stanične diobe stalnom aktivacijom i nisu preklapajuće s ostalim onkogenim mutacijama u karcinomu pluća. Mutacija gena EGFR je prisutna oko 15-20% u bijelaca (Rosell i sur., 2009) dok je u Azijata prisutna oko 40-60% (Mitsudomi i sur., 2005). Delecija na egzonu 19 i L858R

točkasta mutacija na egzonu 21 su najčešće EGFR mutacije (Shigematsu i sur., 2005) koje su povezane s osjetljivošću na EGFR tirozin kinazne inhibitore (TKI) poput erlotiniba, gefitiniba i afatiniba. Oni su reverzibilni kompetitivni inhibitori ATP-a za tirozin kinaznu domenu EGFR i rezultiraju blokadom daljnjih signalnih puteva.

KRAS (K-ras ili Ki-ras) je proto-onkogen. Normalni KRAS protein je G-protein na staničnoj površini koji sudjeluje u RAS/MAPK signalnom putu koji dovodi do rasta i proliferacije stanice. Mutacijom gena dolazi do stalne aktivacije signalnog puta te proliferacije stanice koja dovodi do formiranja tumora. KRAS je čest mutiran onkogen povezan s NSCLC-om zbog pogrešnih mutacije koja rezultira supstitucijom aminokiseline na poziciji 12,13 ili 61. Otprilike 10-25% pacijenata s adenokarcinomom imaju KRAS mutaciju (Riely i sur., 2008). Direktna inhibicija RAS-a sa salirasibom je neuspješna, pa se danas pokušava inhibirati molekule nizvodnih reakcija u RAS/RAF/MEK/ERK i PI3K/AKT/ mTOR signalnom putu.

Gen ALK kodira za ALK receptor tirozin kinaze koji je član porodice receptora tirozin kinaze (RTK). Receptor se nalazi na površini membrane stanice i aktivacija ide na isti način kao i EGFR. Otprilike 3-7% svih karcinoma pluća sadrži ALK mutaciju (Koivunen i sur., 2008). Češće su kod mlađih pacijenata, nepušača oboljelih od adenokarcinoma. Preuređivanje u EML-4-ALK je najčešće preuređenje zabilježeno u NSCLC pacijenata. Ovo preuređenje se odvija na kromosomu 2p23 zbog fuzije 5' kraja gena *EML-4* i 3' kraja gena *ALK* u kojoj postoji barem devet različitih fuzijskih varijanti. Fuzija EML4-ALK rezultira kimeričnim proteinom koji djeluje tumorigeno preko PI3K-AKT, MAPK i JAK-STAT signalnih puteva. *EML-4* mutacije su česte u adenokarcinomima pacijenata koji nikada nisu pušili ili u pušača čiji tumori nemaju *EGFR* i *KRAS* mutacije (Soda i sur., 2007). Ostale mutacije koje ne uključuju EML-4 su također pronađene, poput KIF5B-ALK i TGF-ALK mutacija. Trenutačno odobreni klinički testiran lijek je crizotinib koji je inhibitor tirozin kinaza ALK, ROS1 i cMET.

BRAF je proto-onkogen koji kodira za serin/treonin protein kinazu B-raf. Odgovoran je za prijenos signala koji promovira staničnu proliferaciju. Somatske mutacije gena BRAF su pronađene u 1-4% svih NSCLC-a, većinom prisutne kod pacijenata s adenokarcinomom (Brose i sur., 2002). Većina tih mutacija povezana je sa sadašnjim i bivšim pušačima (Paik i sur., 2011). BRAF mutacija je jak prediktivni i prognostički biljeg.

4. Imunosni sustav i tumori

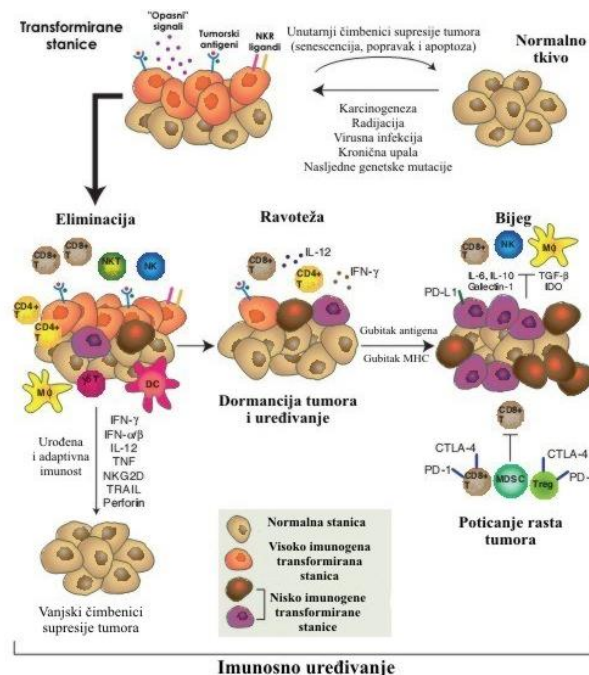
4.1. Protutumorski imunosni odgovor

Imunosni sustav ima mogućnost prepoznavanja i uništavanja tumorskih stanica te može inhibirati njegov rast. Odgovori urođene imunosti su antigen nespecifični, odvijaju se brzo i posredovani su različitim stanicama, poput NK stanicama (engl. *natural killer cells*), polimorfnonuklearnim leukocitima i antigen predočnim stanicama (engl. *antigen presenting cells*, APC) poput makrofaga i dendritičnih stanica, koje sve dovode do lučenja interferona γ , perforina, upalnih citokina koji svi induciraju apoptozu tumorske stanice (Liu i sur., 2012). Specifični imunosni odgovor su antigen specifični, sporo se razvijaju, omogućuju imunološko pamćenje i obuhvaćaju stanice humoralne i stanične imunosti posredovane limfocitima B i T. Također dendritične stanice, makrofagi i NK stanice igraju bitnu ulogu u specifičnom imunosnom sustavu. Specifična više nego urođena imunost daje bolji potencijal za izdržljiviji, robusniji protutumorski imunosni odgovor.

Specifični imunosni odgovor započinje s aktivacijom dendritičkih stanica koje hvataju otpuštene antigene tumorskih stanica. Dendritične stanice zatim predočavaju antigen preko proteina glavnog sustava tkivne podudarnosti II (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) molekule s TCR na nezrelom limfocitu T u limfnom čvoru za isušivanje tumora. Aktiviraju se specifični CD4⁺ pomoćnički limfociti T i CD8⁺ citotoksični limfociti T. Za pravilnu aktivaciju limfocita T, osim signala kompetencije, potreban je i kostimulacijski signal spajanja CD80/86 na dendritičnim stanicama s CD28 na stanicama T. Ova pojava križnog predočivanja koristan je koncept u praktičnoj primjeni u izolaciji i uzgoju dendritičnih stanica dobivenih od bolesnika s tumorom te njihova inkubacija sa stanicama ili antigenima koji potječu od tumora bolesnika. Takve potaknute dendritične stanice mogu se koristiti u proizvodnji cjepiva u svrhu poticanja protutumorskog T-staničnog odgovora. Aktivirani citotoksični limfociti T sposobni su prepoznati i ubiti tumor preko MHC molekula. CD4⁺ pomoćničke stanice T osiguravaju izvor citokina potrebnih za diferencijaciju naivnih CD8⁺ stanica T u memorijske CTL. Također, odgovorni su za lučenje TNF (engl. *tumor necrosis factor*) i IFN- γ koji povećavaju izražaj MHC-I na tumorskim stanicama povećavajući njihovu osjetljivost na CTL. Dendritične stanice mogu inducirati aktivaciju proizvodnje antitijela B-stanicama, kao i NK staničnu aktivnost (Carbone i sur., 2015).

4.2. Poticanje rasta tumora imunskim sustavom

Imunosni sustav može i poticati rast tumora preko selekcije tumorskih stanica koje su bolje prilagođene da prežive u imunokompetentnom domaćinu ili kreiranju uvjeta u mikrookolišu tumora koji potiču njegov rast. Imunosno uređivanje (engl. *immunoediting*) označava dinamičnu međureakciju imunskog sustava i tumorskih stanica. Podrazumijeva uklanjanje više imunogeničnih stanica, a sastoji se od tri faze: eliminacije, ravnoteža i bijega kao posljedice razvoja rezistencije na eliminaciju imunskim odgovorom prikazanim na Slici 1. U procesu eliminacije urođeni i specifični sustav prepoznaju i uništavaju tumorske stanice prije negoli se razviju u klinički vidljiv tumor. Tumorske stanice prolaze promijene i neke varijante stanica mogu preživjeti eliminacijski proces i ulaze u ekvilibrij. U ekvilibriju ne dolazi do rasta tumora, ali imunogeničnost tumorskih stanica je dalje oblikovana selekcijskim imunskim pritiskom urođene imunosti. S vremenom dolazi do pojave populacije tumorskih stanica koje više nisu prepoznate specifičnim imunskim sustavom (varijanta antigena se izgubi ili tumorske stanice razvijaju oštećenja u obradi antigena i njegovom predočavanju), ili postaju neosjetljive na mehanizme imunskog učinka; ili mogu inducirati imunosupresivno stanje unutar tumorskog mikrookoliša npr. proizvodeći topljive imunosupresivne tvari. Tumorske stanice koje ulaze u fazu bijega sposobne su razviti imunosupresivno stanje unutar tumorskog mikrookoliša koristeći iste mehanizme koji pomažu u regulaciji imunskog sustava i sprečavanju zdravog tkiva (Schreiber i sur., 2011).



Slika 1. Imunosno uklanjanje raka - eliminacija, ravnoteža i bijeg (preuzeto i prilagođeno na temelju Schreiber i sur., 2011)

Glavne immunosupresivne stanice u tumorskom mikrokolišu su regularne stanice T, (T_{reg}), supresijske stanice mijeloidnog podrijetla (engl. *myeloid-derived suppressor cells*, MDSC) i makrofagi pridruženi tumoru (engl. *tumor-associated macrophages*, TAM). T_{reg} stanice, koje su pozitivne za CD4, CD25 i Foxp3 transkripcijski faktor, supresiraju funkciju i proliferaciju tumor-specifičnih CD4+ i CD8+ T stanica i NK stanica. MDSC su heterogena skupina stanica koja obuhvaća prethodnike dendritičnih stanica, monocite i neutrofile. Induciraju T_{reg} stanice i ograničavaju proliferaciju efektorskih stanica T lučeći razne immunosupresivne molekule poput interleukina-10 (IL-10), koji sprječava razna upalna djelovanja aktiviranih makrofaga i dendritičnih stanica, i proizvode slobodne radikale poput peroksinitrita koji sprječavaju aktivaciju limfocita T. Makrofagi pridruženi tumoru su fenotipa M2 i luče citokine kao što su IL-10 i prostaglandin E₂ koji narušavaju aktivaciju i izvršne funkcije stanica T. Tumorske stanice i okolne stanice prisutne u tumorskom mikrokolišu, uključujući MDSC, mogu lučiti immunosupresivni enzim indolaminsku-2,3-dioksigenazu, enzim koji razgrađuje triptofan inače esencijalan za funkciju stanica T, povećava populaciju T_{reg} stanica i inducira deaktivaciju tumor-specifičnih stanica T (Zou 2005).

4.3. Receptori kontrolnih točaka imunskog odgovora

Tumori mogu iskoristiti posebne fiziološke regulatorne mehanizme ili kontrolne točke, koje su odgovorne u održavanju normalne tolerancije na vlastito i limitiraju opseg imunskog odgovora na infekciju, kao oblik imunskog restriktivnog mehanizma. Dva najproučavanija receptora kontrolnih točaka su citotoksični T-limfocitni antigen 4 (CTLA-4) i receptor programirane stanične smrti-1 (PD-1) koji suprimiraju aktivaciju, proliferaciju i funkciju stanica T.

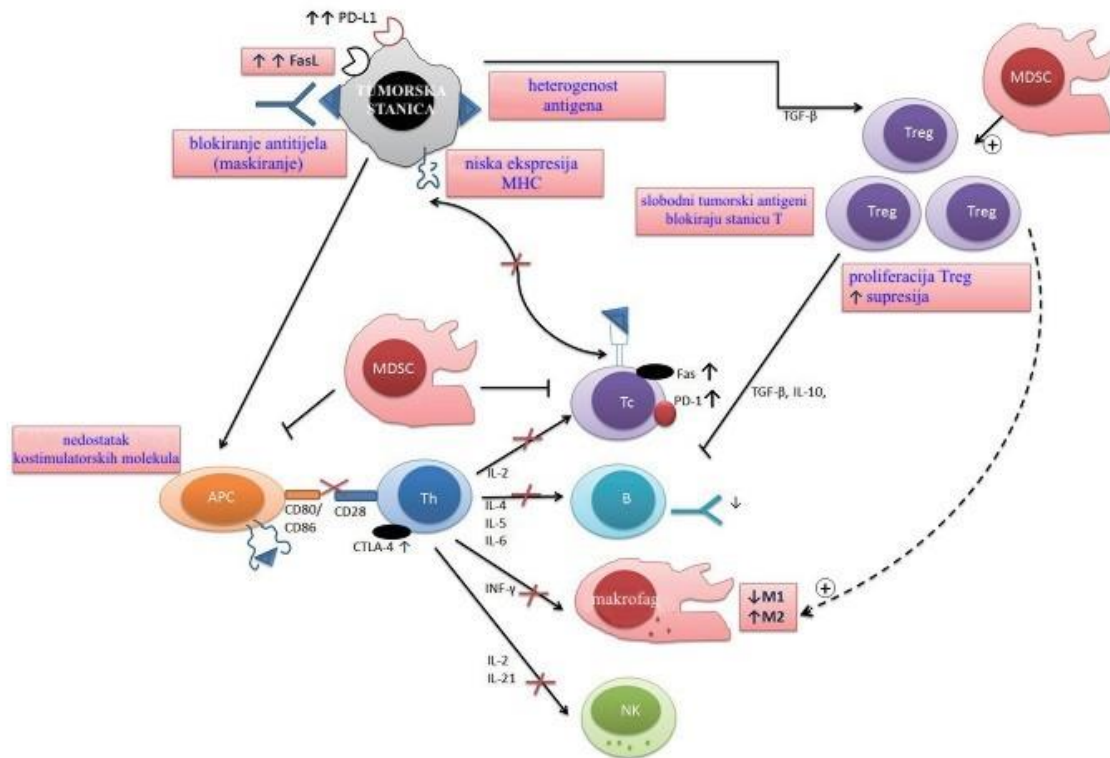
Receptor CTLA-4 eksprimiran je na površini aktiviranih stanica T. Predstavnik je inhibitornog receptora iz porodice CD28. Ima sposobnost inhibicije odgovora stanica T potaknutog u aktiviranim stanicama te ima veći afinitet vezanja za CD80/86 na antigen predočnim stanicama nego molekula CD28. CTLA-4 je uključen u smanjenju aktivnosti pomoćničkih CD4+ stanica T i povećava immunosupresivnu funkciju T_{reg} stanica. CTLA-4 je ciljani gen krvnog faktora transkripcije (engl. *forkhead transcription factor*, FOXP3) čija ekspresija određuje T_{reg} staničnu liniju, i T_{reg} stanice stoga konstitutivno izražavaju CTLA-4 (Pardoll, 2012). Kod tumora inhibicija T staničnog odgovora preko CTLA-4 koristi preživljenje tumora, a ne njegovoj eliminaciji.

Receptor PD-1 eksprimiran je na CD4+ stanicama T, B limfocitima, NK stanicama, monocitima i dendritičnim stanicama. Također jako je eksprimiran na T_{reg} stanicama i bitan je za povećanje njihove proliferacije. Prilikom vezanja na svoj ligand, PD-L1 i PD-L2, receptor PD-1 inhibira kinaze koje su uključene u proliferaciju stanica T. Dolazi do smanjene proliferacije stanica T, izmijenjene sinteze citokina i inicijacije apoptoze stanica T. Sve ove funkcije objašnjavaju imunosupresivnu ulogu PD-1 koje smanjuju protutumorski odgovor aktivnošću CD8+ limfocita (Jin i sur., 2011). PD-L1 i PD-L2 su eksprimirani na raznim hematopoetskim i nehematopoetskim stanicama kao i na tumorskim stanicama pružajući im prednost u preživljenju (Pardoll, 2012). Povećana ekspresija PD-L1 na tumorskim stanicama još je i inducirana sekrecijom IFN- γ iz Th1 pomoćničkih stanica.

5. Uloga imunskog sustava u poticanju karcinoma pluća

Karcinom pluća može uspostaviti imunosupresivni tumorski mikrookoliš kako bi promovirao tumorski rast (Slika 2). Pokazano je da sadrže veliki broj T_{reg} stanica koje konstitutivno eksprimiraju visoke razine CTLA-4 na svojoj površini i direktno inhibiraju proliferaciju stanica T (Woo i sur., 2001). CD8+ stanice T pokazuju povišenu ekspresiju PD-1 koja je povezana s oslabljenim imunskim funkcijom. Pokazano je da povećana ekspresija PD-1 promovira rast karcinoma pluća i korelira sa supresijom sazrijevanja tumor infiltrirajućih dendritičnih stanica kao i reduciranje infiltraciju stanica T (Carbone i sur., 2015). PD-L1 eksprimiran u 50-60% slučajeva NSCLC, te je prediktivni biljeg (Peters i sur., 2017). Tumorske stanice mogu smanjiti ekspresiju MHC-I molekula i na taj način pobjeći imunološkom sustavu u razaranju. Nemogućnost predočavanja tumorskih antigena također smanjuje uspješnost imunskog odgovora u tumorskom mikrookolišu kao i lučenje supresivnih citokina poput IL-10 i TGF- β (Domagala-Kulawik i sur., 2014). TGF- β je povezan s progresijom tumora: inhibira se funkcija NK i CD8+ stanica T, potiče se diferencijacija Th u Th2 stanice i s očuvanjem diferenciranih T_{reg} stanica. IL-10 i IL-2 pokazuju sličan učinak, te još induciraju ekspresiju CTLA-4 receptora. M2 makrofagi sa svojim supresivskim funkcijama čine oko 70% TAM populacije u NSCLC i potiču angiogenezu, zacjeljivanje rana, oslobađanje IL-10 (Mantovani i sur., 2002). U NSCLC se MDSC-ova definiraju s CD11+CD14-CD15+CD33+ biljezima. Tumorske stanice luče GM-CSF, IL-6, IL-1 koji podržavaju preživljenje MDSC-ova u tumorskom mikrookolišu. MDSC inhibira aktivaciju stanica T, diferencijaciju dendritičnih stanica i promovira T_{reg} stanice. Mehanizam njihovog djelovanja koji kontrolira T-stanični odgovor uključuje aktivnost arginaze i sintaze dušikovog oksida, te sintezu ROS-ova i potrošnje cisteina (arginin, cistein i NO su potrebni za pravilnu aktivaciju i diferencijaciju stanica T te

memorijsku aktivnost). MDSC sposobni su za proizvodnju IL-10, MMP9 i TGF- β koji pogoduju angiogenezi, vaskulogenezi i metastaziranju (Srivastava i sur., 2012). SCLC reducira transkripciju HL-A, B i C te beta 2m gena čime još bolje bježi imunom odgovoru na tumore za razliku od ostalih tipova karcinoma pluća (Li i sur., 2016).



Slika 2. Mehanizmi bijega stanica raka pluća od imunostustava. Skraćenice: APC, stanica koja predočava antigen; CTLA-4, Citotoksični T limfocitni antigen-4; Fas, receptor apoptoze; Fas-L, Fas ligand; PD-1, programirani receptor smrti stanica; PD-L1, ligand na PD-1; MDSC, supresijske stanice mijeloidnog porijekla; Th, T pomoćna stanica; Tc, citotoksični limfocit; B, limfocit B; Treg, regulatorna T stanica; NK, prirodni ubojica; TGF- β , transformirajući faktor rasta β (preuzeto i prilagođeno na temelju Domagala-Kulawik i sur., 2014)

6. Imunoterapija karcinoma pluća

Povećano zanimanje za razvoj imunoterapija je zbog činjenice da većina suvremenih načina liječenja raka uključuje primjenu lijekova koji uništavaju stanice koje se brzo dijele, ali takvo liječenje štetno djeluje i na normalne stanice. Zbog toga povećano je poboljšavanje i smrtnost prilikom liječenja raka. Imunosni odgovor na tumor je specifičan za tumorske antigene i ne uzrokuje oštećenje vlastitih stanica. Cilj imunoterapije tumora jest pojačanje slabog imunskog odgovora domaćina ili primjena jednog od oblika pasivne imunosti primjenom protutijela ili stanica T specifičnih za tumor. Postoji veliki izazov za razvoj imunoterapija u SCLC zbog njihove kompleksne genetičke heterogenosti. Također, još se ne razumije kompleksa biologija SCLC-a, te je zato velika većina provedenih kliničkih istraživanja i razvijenih cjepiva i lijekova usmjerena prema NSCLC-u.

6.1. Imunoterapija karcinoma pluća pomoću cjepiva

Cilj terapije cjepivom u NSCLC-u je poticanje aktivacije imunskog odgovora kako bi došlo do odgovora na tumorske antigene (Slika 3). Antigeni koji su jedinstveni za pojedini tumor, kao što su oni koji su nastali točkastom mutacijom, se testiraju putem personaliziranog pristupa cijepljenju. Peptidna cjepiva su jeftina, visoko specifična, lagano se i primjenjuju, mogu prodrijeti u staničnu membranu i sigurna su u kliničkoj primjeni s vrlo malo nuspojava (Parmiani i sur., 2002). Kratki peptidi, od 8-11 aminokiselina, se direktno vežu na MHC-I molekule, dok duži sintetski peptidi, od 25-50 aminokiselina, moraju biti uneseni, procesirani i predloženi od strane antigen predložnih stanica kako bi poticali T stanični odgovor. Primjenom imunogeničnih dugih peptida zajedno s adjuvansom potiču se CD8⁺ citotoksični i CD4⁺ pomoćnički T limfociti što daje bolji uspjeh u liječenju tumora.

Postoje dvije strategije u korištenju cjepiva u obradi NSCLC-a: cjepivo protiv tumorskih stanica i antigen specifična cjepiva. Cjepivo protiv tumorskih stanica (engl. *whole-cell vaccine*) dobivaju se iz autolognih ili alogenskih tumorskih stanica. Ova cjepiva izlažu imunosni sustav domaćina raznim tumorskim antigenima. Antigen specifična imunoterapija podrazumijeva poticanje specifičnog protutumorskog odgovora na određeni antigen koji je eksprimiran na tumoru. Pošto ova cjepiva napadaju specifični antigen, ne smiju se primjenjivati u svim pacijentima.

6.1.1. Cjepivo protiv tumorskih stanica

Belagenpumatumucel-L (Lucanix, NovaRX Corp.) je alogensko tumor stanično cjepivo dobiveno korištenjem genetički modificiranih cijelih tumora. Sastoji se od četiriju NSCLC staničnih linija od kojih su dvije od adenokarcinoma (H460 i H520), jedna je od karcinoma pločastih stanica (SKLU-1) i posljednja je od krupnostaničnog karcinoma (RH2). Stanične linije su transfektirane s plazmidom koji eksprimira antisense RNA molekulu za TGF- β čime se inhibira sinteza TGF- β molekule koja inače koči protutumorski odgovor (Zappa i Mousa, 2016). Klinička ispitivanja Belagenpumatumucel-L kao lijeka nisu pokazala poboljšanje pacijenata nakon primljene terapije.

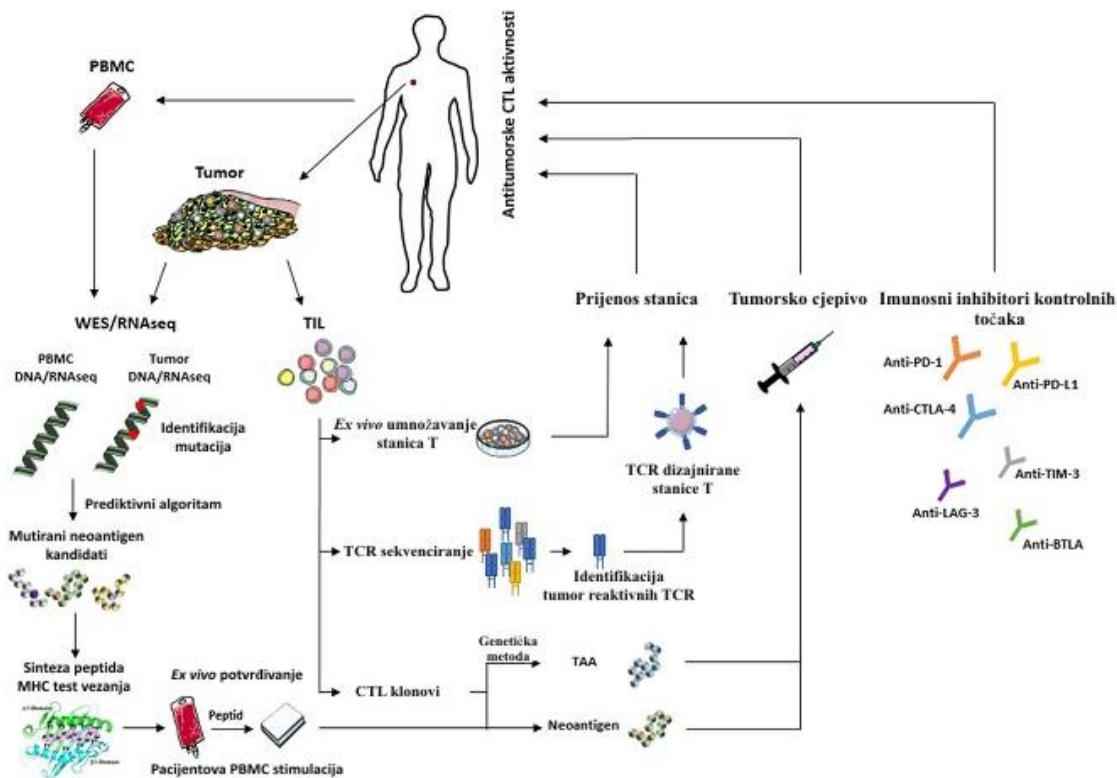
6.1.2. Antigen specifična cjepiva

Melanom-povezujući antigen-A3 (engl. *melanoma-associated antigen-A3*, MAGE-A3) je ekspimiran samo na tumorskim stanicama, osim na stanicama placentarnog trofoblata i zametnim stanicama testisa kod kojih njegova povećana ekspresija dovodi do pojave bolesti (Zappa i Mousa., 2016). MAGE-A3 prekomjerno je ekspimiran u 35%-55% slučajeva kod NSCLC-a (Jang i sur., 2001). Razvijen je niz adjuvansa kako bi se ciljao MAGE-A3. Jedan razvijen adjuvans, AS02, je emulzija vode i ulja koja sadrži peptid i dvije stimulatorne molekule. Prva molekula je monofosforil lipid A koji aktivira dendritične stanice preko TLR4 receptora (engl. *Toll-like receptor 4*, TLR4), a druga molekula je QS21 koja pojačava uzimanje proteinskog antigena dendritičnim stanicama. Kliničko testiranje faze II nije uspjelo pokazati korisne rezultate na stadij IB/IIA MAGE-A3-pozitivnih NSCLC pacijenata obrađenih s rekombinantnim MAGE-A3 proteinom. Također, kliničko ispitivanje faze III MAGE-A3 pozitivnih IB/IIA NSCLC pacijenata je zaustavljeno u 2014. godini zbog neostvarenja primarnog cilja, a to je preživljenju bez progresije (engl. *progression-free survival*, PFS) (Valsamo i Brahmer, 2015). Ova klinička istraživanja pokazala su da se cjepiva dobro toleriraju te da dolazi do blagih ili nikakvih povećanja u imunskim poremećajima.

Tecemotid (L-BLP25) je mucin 1 (MUC-1) antigen specifično peptidno cjepivo koje potiče T stanični odgovor na MUC-1. MUC-1 je membranski glikoprotein prisutan na apikalnoj strani epitelnih stanica respiratornog, probavnog i urinogenitalnog sustava. Prekomjerna ekspresija MUC-1 i njegova abnormalna glikozilacija su povezani sa 60% karcinoma pluća i s velikom imunosupresijom i lošom dijagnozom u pacijenata s adenokarcinomom (Zappa i Mousa, 2016). Tecemotid je usidren, zajedno s adjuvansom monofosforil lipidom A, u membrani liposoma. Klinička istraživanja faze III NSCLC-a ne ispunjavaju primarne ciljeve.

No, postoji značajno preživljenje u pacijenata obrađenih s L-BLP25 i istovremenom kemoterapijom i radijacijom.

Glikosfingolipidni antigen GD3 je izrazito eksprimiran na SCLC-u, a vrlo rijetko je eksprimiran na normalnom tkivu. BEC2 je monoklonalno antitijelo koje oponaša GD3 i potiče protutumorski imunski odgovor specifično napadajući GD3. Umrtnjene bakterije *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) aktiviraju makrofage, čime pospješuju uništavanje tumorskih stanica posredovano makrofagima. Također, služi kao adjuvans za poticanje odgovora stanica T na tumorske antigene. Kliničko istraživanje provedeno na maloj grupi od 15 SCLC pozitivnih pacijenata pokazuje bolje preživljenje primjenom BEC2/BCG cjepiva. No, provedbom većeg kliničkog testiranja ne dolazi se do bitne statističke razlike u preživljenju bez progresije, te se dolazi do zaključka da primjena ovog cjepiva protiv SCLC-a nije učinkovita (Li i sur., 2016).



Slika 3. Glavni pristupi za imunoterapiju raka temeljenog na stanicama T: otkrivanje imunogenih tumorskih antigena korištenjem WES/RNAseq i prediktivnih programa (lijevo) ili CTL i genetskog pristupa za razvoj učinkovitih terapijskih cjepiva protiv raka. Prihvaćeni prijenos odabranih limfocita koji infiltriraju tumore (TIL) ili dizajniranje autolognih stanica T kako bi imale povećanu ekspresiju T staničnog receptora (TCR) (srednji). Ti se pristupi mogu kombinirati s inhibitorima imunskih kontrolnih točaka (desno) da se preokrene iscrpljenost T-stanica i optimiziraju antitumorske T-stanice (preuzeto i prilagođeno na temelju Durgeau i sur., 2018)

6.2. Blokada kontrolnih točaka

Blokiranje inhibitornih molekula stanica T pokazalo se kao jednom od najuspješnijih metoda za učinkovito pojačanje imunskog odgovora bolesnika na tumor. U NSCLC nekoliko sredstava, koja blokiraju imunski inhibitorne putove, su nivolumab i pembrolizumab; monoklonska protutijela usmjerena protiv programirane smrti stanica 1 (PD-1); atzolizumab, durvalumab i avelumab, usmjerani na programirani ligand-1 receptora smrti stanica (PD-L1); ili ipilimumab i tremelimumab, usmjereni protiv citotoksičnog T-limfocitnog antigena 4 (CTLA-4), su već procijenjeni i neki od njih su odobreni u kliničkoj primjeni (Remon i sur., 2018).

6.2.1. Blokada CTLA-4

Blokada CTLA-4 rezultira pojačanjem imunskih odgovora koji ovise o pomoćnim stanicama T i smanjenjem supresivne funkcije stanica T_{reg} (Slika 4). Allison i suradnici pokazali su koristeći predkliničke modele kako je moguća terapija blokadom CTLA-4 antitijelima. Početna istraživanja pokazala su značajni porast protutumorskih odgovora bez imunološke toksičnosti za organizam kada su miševi s djelomično imunogenim tumorom bili obrađeni s CTLA-4 antitijelima kao pojedinačnim reagensom. Slabo imunogeni tumori nisu reagirali na anti-CTLA-4 kao pojedinačni reagens, nego su reagirali kad je anti-CTLA-4 kombiniran s faktorom stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF)-unešenim staničnim cjepivom (van Elsasi sur., 1999). Ova pretklinička istraživanja potiču proizvodnju i testiranje dvaju potpuno humaniziranih CTLA-4 antitijela, ipilimumaba i tremelimumaba, koji su započeli kliničko testiranje 2000. godine. Tremelimumab je dao znatno lošije rezultate od ipilimumaba.

Ipilimumab je potpuno humanizirano IgG1 anti-CTLA-4 mAb koje onemogućava međureakciju između CTLA-4 i njegovog liganda (CD80/CD86), čime se dobiva blokada inhibirajućeg signala koji osigurava CTLA-4 i pojačava djelovanje i proliferaciju tumorskih specifičnih T-stanica (Mackay i sur., 2005). Druga faza kliničkog ispitivanja paklitaksela i karboplatina s ili bez ipilimumaba u obradi faze IV NSCLC-a je pokazala poboljšanje imunskog preživljenja bez progresije (irPFS) s ipilimumabom, kada je ipilimumab davan nakon kemoterapije. Davanje kemoterapije prije ipilimumaba omogućuje otpuštanje antigena prije početka imunološke modifikacije s ipilimumabom. Također, došlo je do poboljšanja ukupnog preživljenja (engl. *overall survival*, OS) u pacijenata koji su primali kemoterapiju s ipilimumabom u usporedbi s pacijentima koji su primali samo kemoterapiju. Preživljenje bez progresije i ukupno preživljenje bolje je kod karcinoma pločastih stanica. Uobičajene

toksičnosti uključuju anemiju, proljev i umor; te 3/4 imunosni posredovanih toksičnosti (kolitis, transaminitis i hipofizitis) najčešće su se pojavljivale kod bolesnika koji su primali ipilimumab (Valsamo i Brahmer, 2015).

6.2.2. Blokada PD-1

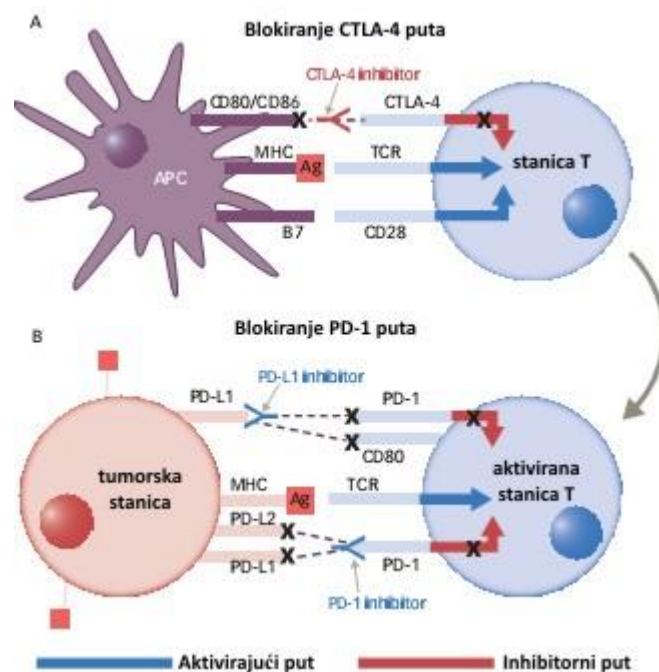
Povećana ekspresija PD-1 pomoću tumor infiltrirajućih limfocita i povećane ekspresije PD-1 liganada tumorskih stanica pružili su važan razlog za sposobnost blokade antitijela ovog puta radi poboljšanja intratumoralnih imunosnih odgovora. To je pokazano kroz mnoga istraživanja pomoću mišjih modela karcinoma koji su pokazali pojačani protutumorski imunosni odgovor blokiranjem protutijela PD1 ili njegovih liganda (Iwai i sur., 2002). Nadalje, relativno blagi fenotipovi *Pdl*, *Pdl1* i *Pdl2* „knockout“ miševa pokazuju da blokada ovog puta dovodi do manje imunološke toksičnosti nego kod blokade CTLA-4, što je i slučaj u kliničkim ispitivanjima. Prvi dokaz o djelotvornosti inhibitora kontrolnih točaka u naprednom NSCLC došao je iz četiri klinička ispitivanja faze III u drugoj liniji s nivolumabom, pembrolizumab (ograničeno na pacijente s najmanje 1% PD-L1 ekspresija na tumorskim stanicama) i atzolizumab (Moya-Horno i sur., 2017). Ova istraživanja su potaknula Američku agenciju za hranu i lijekove (FDA) na odobrenje svih triju inhibitora kontrolnih točaka.

Nivolumab je potpuno humanizirano monoklonalno IgG4 antitijelo za PD-1. Nivolumab kao lijek je odobrila FDA u listopadu 2015. U jednom glavnom ispitivanju koje je obuhvatilo 272 bolesnika s prethodno liječenim karcinomom pločastih stanica NSCLC-om, koji je uznapredovao ili se proširio kroz tijelo, utvrđeno je da nivolumab poboljšava preživljenje bolesnika. Terapija lijekom nivolumab uspoređena je s drugim lijekom protiv raka, doketakselom, a glavna mjera djelotvornosti bilo je cjelokupno preživljenje. Prosječno preživljenje među 135 bolesnika koji su primili lijek nivolumab iznosilo je otprilike 9 mjeseci, dok je u slučaju 137 bolesnika preživljenje bilo 6 mjeseci (Brahmer i sur., 2015).

Pembrolizumab je monoklonatsko antitijelo koje se veže na ligand PD-1, PD-L1, i time zaustavlja rak tako što isključuje te imunosne stanice, čime povećava sposobnost imunosnog sustava da ubija stanice raka (Slika 4). Pembrolizumab je dostupan u više od 60 zemalja za najmanje jedno od sljedećeg: napredni melanom, NSCLC koji ekspresionira PD-L1, karcinom pločastih stanica glave i vrata, i odraslih i pedijatrijskih bolesnika s refraktornim klasičnim Hodgkinovim limfomom. FDA ga je odobrio 2015, te EMA 2016., kao lijek za NSCLC s povećanom ekspresijom PD-L1 s ili poslije kemoterapije s platinom (Sul i sur., 2016). Tijekom ispitivanja koje je obuhvatilo oko 1 000 prethodno liječenih bolesnika duže su živjeli oni

liječeni pembrolizumabom (oko 11 mjeseci) nego bolesnici liječeni docetakselom (oko 8 mjeseci). Razdoblje bez pogoršanja bolesti trajalo je oko 4 mjeseca uz obje terapije. Ti su bolesnici u prosjeku živjeli 15 mjeseci, od čega 5 mjeseci bez pogoršanja bolesti ([http://www.ema.europa.eu/docs/hr_HR/document_library/EPAR - Summary for the public/human/003820/WC500190993.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/hr_HR/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/003820/WC500190993.pdf)).

Treći odobreni lijek je atezolizumab, IgG1 monoklonalno antitijelo usmjereno na PD-L1. Za razliku od ostalih inhibitora, njegova učinkovitost je zabilježena i kod niske ili nikakve ekspresije PD-L1. Dok su pembrolizumab i nivolumab bolji za liječenje PD-L1 pozitivnih pacijenata, atezolizumab je bolji izbor u liječenju PD-L1 negativnih pacijenata (Jean i sur., 2017).



Slika 4. Mehanizam djelovanja imunskih inhibitora kontrolnih točaka. A) Blokiranje CTLA-4 puta B) Blokiranje PD-1 puta (preuzeto i prilagođeno na temelju Nguyen-Ngoc i sur., 2017)

Pored njihovih prepoznatljivih mehanizama djelovanja, imunski inhibitori kontrolnih točaka pokazali su specifične karakteristike toksičnosti. Te toksičnosti općenito su povezane s aktivacijom imunskog sustava i mogu se pojaviti kao kožni osip, kolitis, hepatitis, pneumonitis, endokrini, nopatije i reakcije infuzije. Također pokazuju drugačiji uzorak što se tiče njihovog vremena nastanka; toksičnosti kože pojavljuju se ranije, a endokrinopatije mogu se pojaviti relativno kasnije. Uz praćenje učinkovitosti, vrlo je važno temeljito pratiti i upravljati tim specifičnim toksičnostima kroz praćenje i liječenje bolesnika koji su liječeni pomoću inhibitora kontrolnih točaka (Kazaz i Öztop, 2017).

6.3. Kombinirana terapija

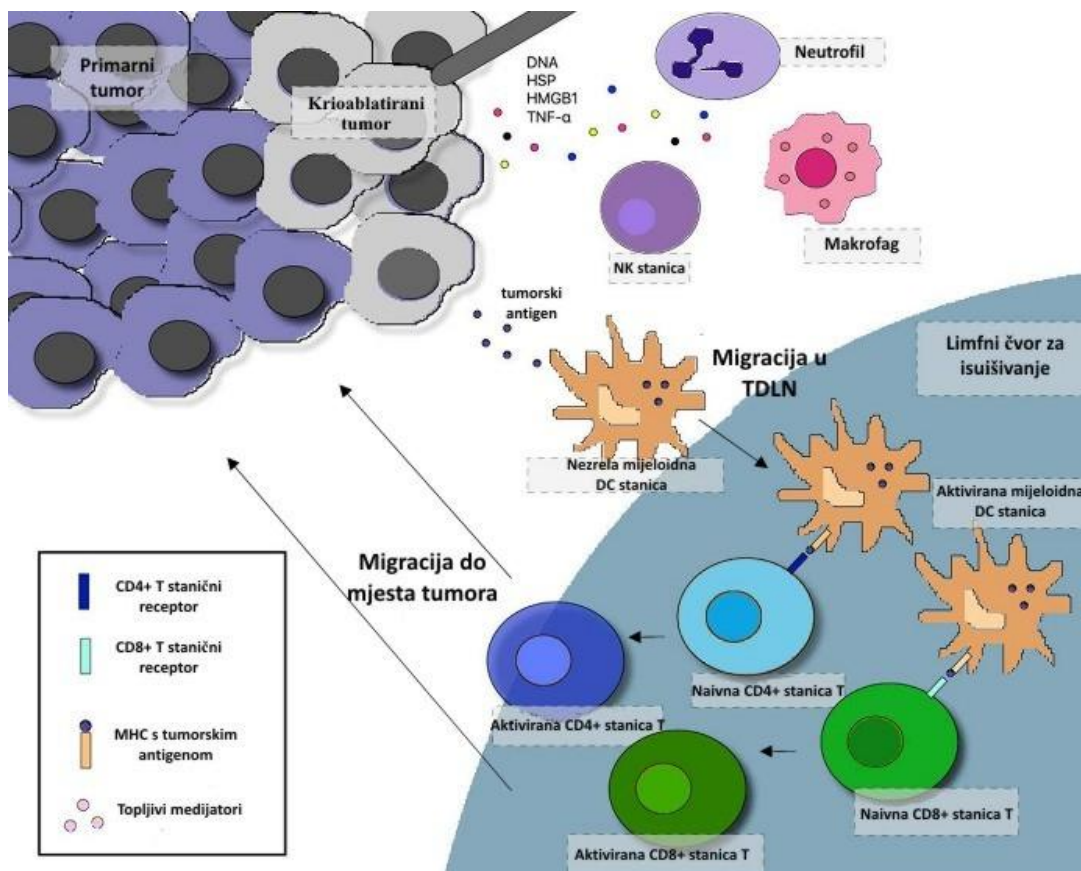
Mutacijsko opterećenje u uznapredovanom NSCLC utječe na imunogenost tumora. Smrt stanica tumora potaknuta kemoterapijskim i ciljnim sredstvima jača antitumorski imunski odgovor oslobađanjem neoantigena (Pilotto i sur., 2015). Ovo pruža jedinstvenu priliku za kombinacijske pristupe liječenja sa sinergističnom antitumorskom aktivnošću, korištenjem imunoterapije kao partnera za kemoterapiju, ciljanih sredstava i drugih inhibitora imunskog kontrolnog tijeka. Rezultati sigurnosti i učinkovitosti takvih kombinacija još uvijek su preliminarni i nedovoljno istraženi, uglavnom zasnovani na pretkliničkim modelima i kliničkim ispitivanjima u ranoj fazi.

Čini se da NSCLC koji je povezan s pušenjem ima kliničku korist od imunoterapijskih pristupa, što je vjerojatno zbog visokog mutacijskog tereta koji generira imunogene neoantigene. U EGFR mutiranim staničnim linijama, postoji korelacija između aktivacije puta EGFR i imunosupresije pomoću pojačane regulacije PD-1, PD-L1, CTLA-4 i proupalnih citokina. Slično tome, prekomjerna ekspresija ALK fuzijskog proteina pokazala je da dolazi do povećane ekspresije PD-L1. Rezultati kombiniranja imunskih inhibitora kontrolnih točaka s EGFR TKI su dobiveni iz triju istraživanja. Ove analize ukazuju da bolesnici s EGFR mutacijama su manje osjetljivi na blokadu imunskog nadzora u usporedbi s EGFR populacijom divljeg tipa, ali s nekim ograničenjima. Nijedan podatak iz ovih ispitivanja faze III s imunoterapijom za prethodno obrađenu naprednu NSCLC nije dostupan za podskupinu pacijenata s ALK preuređenjem (Jean i sur., 2017).

Trenutačno se provodi nekoliko istraživanja da se procijeni dugotrajan učinak EGFR i ALK TKI dostupnih u kliničkoj praksi u kombinaciji s imunoterapijskim sredstvima u odabranim TKI naivnim ili TKI-prethodno obrađenim EGFR ili ALK mutiranim NSCLC populacijama. Rani rezultati koji proizlaze iz tih kombinacija su pokazali da takvi pristupi izazivaju povećane antitumorske odgovore kroz sinergizam uključenih lijekova, iako u nekim slučajevima zabrinutost za sigurnost nije bezazlena. Očekuju se daljnji dugoročni podaci o sigurnosti i učinkovitosti. Za sada se još ne provode klinička testiranja koja kombiniraju imunoterapiju sa specifičnim lijekovima za onkogene koji uključuju ROS1 i RET fuzije, MET i FGFR amplifikacije, HER2 i BRAF mutacije (Moya-Horno i sur., 2017).

6.4. Krio-imunoterapija

Imunosni učinci krioablacije prepoznati su od kasnih šezdesetih. U krio-imunoterapiji, krioablatirani tumor ostaje unutar ciljnog organa i može potencijalno funkcionirati kao *in situ* cijepljenje, stimulirajući i urođeni i stečeni imunitet (Slika 5). Predloženi mehanizam temelji se na oslobađanju antigena tumora iz krioablatiranih stanica raka pluća. Tumorski antigeni su potom preuzeti od stanica koje predočavaju antigen, koje djeluju zajedno s tumorskim specifičnim stanicama T koje pokreću njihovu aktivaciju i proliferaciju. Aktivirane tumor-specifične stanice T imaju sposobnost prepoznavanja i citotoksičnog djelovanja protiv rezidualnog lokalnog tumora, kao i na udaljenim makroskopskim i mikroskopskim mjestima metastaza. Osim toga, mirujuće stanice tumora mogu osloboditi "signale opasnosti", uključujući proupalne citokine i nuklearne proteine, koji privlače i aktiviraju neutrofile, makrofage i NK stanice. Aktivirana NK stanica sposobna je izravno lizirati ciljne tumorske stanice. U mišjem modelu, krioablacija raka pluća s peritumoralnim lipopolisaharidom (LPS) izazvala je snažni protutumorski imunosni odgovor (Tkahashi i sur., 2016). Dodavanje krioablacije na određene regije raka pluća pokazalo je pojačanu učinkovitost liječenja.



Slika 5. Međureakcije između krioablatiranog tumora i adaptivnog i urođenog imunosnog sustava (preuzeto i prilagođeno na temelju Katzman i sur., 2018)

U malom, nasumičnom kontroliranom pokusu, 36 nepušačkih bolesnika NSCLC sa stadijima IIIB i IV, s aktivirajućim mutacijama EGFR-a primilo je krio-terapiju prije početka terapije gefitinibom ili su primali samo gefirininib pokazano je da osobe koje su primale krio-imunoterapiju u kombinaciji s gefitinibom imale su produženo preživljenje bez progresije i povišenu stopu preživljavanja od 1 godine (66,7% u odnosu na 33,3%) u usporedbi sa samim gefitinibom. Imunološka analiza prije i nakon liječenja nije provedena te mehanizmi ove sinergističke terapije još nisu istraženi. Veća prospektivna klinička ispitivanja koja istražuju krioabliranje s inhibitorom EGFR tirozin kinaze, icotinib, za liječenje NSCLC s aktivirajućim EGFR mutacijama trenutno je u tijeku.

Krioablacije NSCLC-a u kombinaciji s imunskim inhibitorima kontrolnih točaka ima mogućnost povećanja odgovora na ove nove i visoko učinkovite imunoterapije. U teoriji, krioablacija bi mogla potaknuti anti-tumorsku specifičnu aktivnost i proliferaciju stanica T, a inhibicija PD-1 spriječiti da tumorske specifične stanice T postanu "iscrpljene" ili razviju anergiju blokiranjem međureakcije PD-1/PD-L1. Učinci krioablacije na PD-L1 ekspresiju tumora pluća još nisu istraženi, a učinkovitost kombinacije imunskim inhibitorima kontrolnih točaka i krioablacije u naprednom NSCLC nije poznata (Katzman i sur., 2018).

7. Literatura

Alberg, AJ, Brock, MV, Samet, JM, 2016. Chapter 52: Epidemiology of lung cancer. Murray & Nadel's Textbook of Respiratory Medicine (6th ed.). Saunders Elsevier. ISBN 978-1-4557-3383-5.

Allison, J.P, Leach, DR, Krummel MF, 1996. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* **271**:1734–1736.

Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WEE, Poddubskaya E, Antonia S, Pluzanski A, Vokes EE, Holgado E, Waterhouse D, Ready N, Gainor N, Arén Frontera O, Havel L, Steins M, Garassino MC, Aerts JG, Domine M, Paz-Ares L, Reck M, Baudelet C, Harbison CT, Lestini B, Spigel DR, 2015. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. *The New England Journal of Medicine* **373**:123–135.

Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Gerrero R, Einhorn E, Herlyn M, Minna J, Nicholson A, Roth JA, Albelda SM, Davies H, Cox C, Brignell G, Stephens P, Futreal PA, Wooster R, Stratton MR, Weber BL, 2002. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Research* **62**:6997-7000.

Carbone DP, Gandara DR, Antonia SJ, Zielinski C, Paz-Ares L, 2015. Non–Small Cell Lung Cancer: Role of the Immune System and Potential for Immunotherapy. *Journal of Thoracic Oncology* **10**: 974–984.

Durgeau A, Virk Y, Corgnac S, Mami-Chouaib F, 2018. Recent Advances in Targeting CD8 T-Cell Immunity for More Effective Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology* **9**:14

Domagala-Kulawik J, Osinska I, Hoser G, 2014. Mechanisms of immune response regulation in lung cancer. *Translational Lung Cancer Research* **3**:15–22.

Graziano SL, Pfeifer AM, Testa JR, Mark GE, Johnson BE, Hallinan EJ, Pettengill OS, Sorenson GD, Tatum AH, Brauch H, Zbar B, Flejter WL, Ehrlich GD, Poiesz BJ, 1991. Involvement of the RAF 1 locus, at band 3p25, in the 3p deletion of small-cell lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **3**:283-293.

http://www.ema.europa.eu/docs/hr_HR/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/003820/WC500190993.pdf

Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N, 2002. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1

blockade. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United states of Ameruca* **99**:12293–12297.

Jakopović M, 2007. Posljedice disfunkcije inzulinu sličnih čimbenika rasta i njihovih receptora u karcinomu pluća nemalih stanica Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

Jang SJ, Soria JC, Wang L, Hassan KA, Morice RC, Wash GL, Hong WK, Mao L, 2001. Activation of Melanoma Antigen Tumor Antigens Occurs Early in Lung Carcinogenesis. *Cancer research* **61**:7959-7963.

Jean F, Tomasini P, Barseli F, 2017. Atezolizumab: feasible second-line therapy for patients with non-small cell lung cancer? A review of efficacy, safety and place in therapy. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* **9**:769-779.

Jin HT, Ahmed R, Okazaki T, 2011. Role of PD-1 in regulating T-cell immunity. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **350**:17-37.

Katzman D, Wu S, Sterman DH, 2018. Immunological Aspects of Cryoablation of Non-Small Cell Lung Cancer: A Comprehensive Review. *Journal of Thoracic Oncology* **13**:624-635

Kazaz SN, Öztop İ, 2017. Immune checkpoint inhibitors in advanced-stage non-small cell lung cancer. *Turkish Thoracic Journal* **18**:101-7.

Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K, Murphy C, Lifshits E, Holmes AJ, Choi HG, Kim J, Chiang D, Thomas R, Lee J, Richards WG, Sugarbaker DJ, Ducko C, Lindeman N, Marcoux JP, Engelman JA, Gray NS, Lee C, Meyerson M, Jänne PA, 2008. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clinical Cancer Research* **14**:4275-83.

Li Q, Yuan D, Ma C, Liu Y, Ma L, Lv T, Song Y, 2016. A new hope:immunotherapy in small cell lung cancer. *Neoplasma* **63**:342-350.

Liu Y, Zeng G, 2012. Cancer and innate immune system interactions: translational potentials for cancer immunotherapy. *Journal of Immunotherapy* **35**:299–308.

Lu C, Onn A, Vaporciyan AA, 2010. Chapter 78: Cancer of the Lung. Holland-Frei Cancer Medicine (8th ed.). People's Medical Publishing House. ISBN 978-1-60795-014-1.

Maker AV, Attia P, Rosenberg SA, 2005. Analysis of the cellular mechanism of antitumor responses and autoimmunity in patients treated with CTLA-4 blockade. *The Journal of Immunology* **175**:7746-54.

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A, 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology* **23**:549-55.

Mitsudomi T, Kosaka T, Endoh H, Horio Y, Hida T, Mori S, Hatooka S, Shinoda M, Takahashi T, Yatabe Y, 2005. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small-cell lung cancer with postoperative recurrence. *Journal of Clinical Oncology* **23**:2513-20.

Moya-Horno I, Viteri S, Karachaliou N, Rosell R, 2018. Combination of immunotherapy with targeted therapies in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *Therapeutic Advances in Medical Oncology* **10**:1-12.

Nguyen-Ngoc T, Reck M, Tan DSW, Peters S, 2017. Immunotherapy and targeted therapies in the treatment of non-small cell lung cancer. *European Oncology & Haematology* **13**:35–52

Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, 2004. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* **304**:1497-500.

Paik PK, Arcila ME, Fara M, Sima CS, Miller VA, Kris MG, Ladanyi M, Riely GJ, 2011. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *Journal of Clinical Oncology* **29**:2046-5.

Pardoll DM, 2012., The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* **12**:255-264.

Parmiani G, Castelli C, Dalerba P, Mortarini R, Rivoltini L, Marincola FM, Anichini A, 2002. Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: what have we achieved? Where are we going? *Journal of the National Cancer Institute* **94**:805–18.

Peters S, Kerr KM., Stahel R, 2017. PD-1 blockade in advanced NSCLC: a focus on pembrolizumab, *Cancer Treatment Reviews Cancer Treatment Reviews* **62**:39-49.

Pilotto S, Molina-Vila M, Karachaliou N, Carbognin L, Viteri S, González-Cao M, Bria E, Tortora G, Rosell R, 2015. Integrating the molecular background of targeted therapy and immunotherapy in lung cancer: a way to explore the impact of mutational landscape on tumor immunogenicity. *Translational Lung Cancer Research* **4**:721–727.

Rami-Porta R, Crowley JJ, Goldstraw P, 2009. The revised TNM staging system for lung cancer. *Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. **15**: 4–9.

Remon J, Vilarino N, Reguart N, 2018. Immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer (NSCLC): Approaches on special subgroups and unresolved burning questions. *Cancer Treatment Reviews* **64**:21-29.

Riely GJ, Kris MG, Rosenbaum D, Marks J, Li A, Chitale DA, Nafa K, Riedel ER, Hsu M, Pao W, Miller VA, Ladanyi M, 2008. Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research* **14**:5731-4.

Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, Majem M, LopezVivanco G, Isla D, Provencio M, Insa A, 2009. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *The New England Journal of Medicine* **361**:958-67.

Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ, 2011. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **331**:1565–1570.

Sher T, Dy GK, Adjei AA, 2008. Small cell lung cancer. *Mayo Clinic Proceedings* **83**:355-67.

Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, Fong KM, Lee H, Toyooka S, Shimizu N, Fujisawa T, Feng Z, Roth JA, Herz J, Minna JD, Gazdar AF, 2005. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *Journal of the National Cancer Institute* **97**:339-46.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A, 2012. Cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **62**:10-29.

Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara SI, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Bando M, 2007. Identification of the transforming EML4–ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* **448**:561-6.

Srivastava MK, Andersson Å, Zhu L, Harris-White M, Lee JM, Dubinett S, Sharma S, 2012. Myeloid suppressor cells and immune modulation in lung cancer. *Immunotherapy* **4**:291-304

Sul J, Blumenthal GM, Jiang X, He K, Keegan P, Pazdur R, 2016. FDA approval summary:pembrolizumab for the treatment of patients with metastatic non-small cell lung cancer whose tumors express programmed death ligand 1. *Oncologist* **21**:643–50.

- Takahashi Y, Izumi Y, Matsutani N, Dejima H, Nakayama T, Okamura R, Uehara H, Kawamura M, 2016. Optimized magnitude of cryosurgery facilitating anti-tumor immunoreaction in a mouse model of Lewis lung cancer. *Cancer immunology, immunotherapy:CII*. **65**:973-82.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A, 2015. Global Cancer Statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **65**:87-108.
- Travis WD, Travis LB, Devesa SS, 1995. Lung cancer. *Cancer* **75**:191-202.
- Valsamo AK, Brahmer JR, 2015. Cancer Immunotherapy: A Future Paradigm Shift in the Treatment of Non–Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research* **21**:976-982.
- van Elsas A, Hurwitz AA, Allison JP, 1999. Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *Journal of Experimental Medicine* **190**:355–366.
- William WN, Glisson BS, 2011. Novel strategies for the treatment of small-cell lung carcinoma. *Nature Reviews Clinical Oncology* **8**:611-9.
- Witschi H, 2001. A short history of lung cancer. *Toxicological Sciences* **64**:4–6.
- Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, Rubin SC, Kaiser LR, June CH, 2001. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Research* **61**:4766–4772.
- Zappa C, Mousa SA, 2016. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Translational Lung Cancer Research* **5**:288-300.
- Zou W, 2005. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nature Reviews Cancer* **5**:263–274.

8. Sažetak

Karcinom pluća jedan je od vodećih uzroka smrti u svijetu. Dijeli se na rak pluća malih stanica i rak pluća ne-malih stanica. Osim po histološkim karakteristikama, ova dva tipa dijele se i po karakterističnim molekularnim biljezima, najzastupljeniji je EGFR. Imunosni sustav ima bitnu ulogu u protutumorskom odgovoru, ali može biti i odgovoran za rast i proliferaciju karcinoma pluća. Receptori kontrolnih točaka su citotoksični T-limfocitni antigen 4 (CTLA-4) i receptor programirane stanične smrti-1 (PD-1) koji suprimiraju aktivaciju, proliferaciju i funkciju stanica T čime pospješuju proliferaciju tumora. Razvijaju se imunoterapije koje ciljano djeluju na stanice imunskog sustava kako bi se pojačao protutumorski odgovor. Imunoterapija primjenom imunskih inhibitora kontrolnih točaka, poput ipilimumaba i nivolumaba, pokazala se uspješnom u usporedbi s imunoterapijom primjenom cjepiva. Za razliku od klasičnih metoda liječenja, poput kemoterapije, imunoterapija napada ciljane stanice bez oštećivanja zdravih stanica. Kombinirana terapija uključuje imunoterapiju zajedno s kemoterapijom, ciljanim sredstvima i drugim inhibitorima imunskog kontrolnog tijeka. Takav pristup ima povećani antitumorski odgovor kroz sinergistički učinak lijekova, kao i primjena krio-imunoterapije. Potrebna je dublja karakterizacija međureakcija između imunskih i tumorskih stanica, te utvrđivanje pouzdanih prediktivnih biomarkera i potpuno razumijevanje mehanizama uključenih u razvoj stečene rezistencije s ciljem poboljšanja selekcije odgovarajućih pacijenata i ukupne terapijske učinkovitosti.

9. Summary

Lung cancer is one of the leading causes of death in the world. It is part of small cell lung cancer and non-small cell lung cancer. Except for histological characteristics, these two types are also divided by characteristic molecular markers, the most common being EGFR. The immune system plays an important role in the antibody response but can also be responsible for the growth and proliferation of lung cancer. Control points receptors are cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) and programmed death-1 (PD-1) receptor suppressing T cell activation, proliferation, and function, thereby enhancing tumor proliferation. Immunotherapy targets the immune system cells in order to enhance the anti-tumor response. Immunotherapy using immune checkpoint inhibitors, such as ipilimumab and nivolumab, has been shown to be successful in comparison with immunotherapy using a vaccine. Unlike classic treatment methods, such as chemotherapy, immunotherapy attacks target cells without damaging healthy cells. Combined therapy includes immunotherapy together with chemotherapy, targeting agents and other immune control flow inhibitors. Such an approach has an increased anticancer response through synergistic drug effects as well as the use of cryo-immunotherapy. Deeper characterization of interactions between immune and tumor cells is required, as well as the determination of reliable predictive biomarkers and a complete understanding of the mechanisms involved in the development of acquired resistance with the aim of improving the selection of appropriate patients and overall therapeutic efficacy.