

Imunoterapija u onkologiji

Brtn, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:833186>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Lucija Brtan

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

IMUNOTERAPIJA U ONKOLOGIJI

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Morana Dulić

Zagreb, 2020. godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

10. srpnja 2020.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

30. rujna 2020.

Mentor rada: doc. dr. sc. Morana Dulić

Potpis:

Sadržaj

| | |
|---|------------|
| § SAŽETAK..... | VII |
| § 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Imunološki sustav i imunološki odgovor..... | 1 |
| 1.1.1. <i>Sastavnice imunološkog sustava</i> | <i>1</i> |
| 1.1.2. <i>Imunološki odgovor.....</i> | <i>6</i> |
| 1.2. Tumor i kancerogena oboljenja..... | 8 |
| 1.2.1. <i>Rak, neoplazma ili novotvorina.....</i> | <i>8</i> |
| 1.2.2. <i>Vrste tumora.....</i> | <i>9</i> |
| § 2. KONCEPT IMUNOONKOLOGIJE | 11 |
| 2.1. Reakcija imunološkog sustava na rak | 11 |
| 2.2. Imunološki pristupi..... | 15 |
| 2.2.1. <i>Specifična imunoterapija</i> | <i>15</i> |
| 2.2.2. <i>Nespecifična imunoterapija</i> | <i>16</i> |
| 2.2.3. <i>Adoptivna imunoterapija.....</i> | <i>16</i> |
| 2.3. Terapija cjepivom | 16 |
| 2.3.1. <i>Cjepivo na bazi imunoloških stanica.....</i> | <i>17</i> |
| 2.3.2. <i>Cjepivo na bazi peptida.....</i> | <i>17</i> |
| 2.3.3. <i>Cjepivo na bazi tumorskih stanica</i> | <i>18</i> |
| 2.4. Manipulacija imunosnim nadzornim točkama | 19 |
| 2.4.1. <i>CTLA-4 inhibitori.....</i> | <i>20</i> |
| 2.4.2. <i>PD-1 inhibitori (PD-1/PD-L1 inhibitori).....</i> | <i>22</i> |
| 2.5. Stimulacija imunoloških stanica citokinima..... | 24 |
| 2.5.1. <i>Interferoni</i> | <i>24</i> |
| 2.5.2. <i>Interleukini.....</i> | <i>25</i> |
| 2.5.3. <i>Čimbenici rasta.....</i> | <i>25</i> |
| 2.5.4. <i>Ostali citokini.....</i> | <i>26</i> |
| 2.6. Adoptivna imunoterapija | 27 |
| 2.6.1. <i>Infuzija donorskih limfocita</i> | <i>27</i> |
| 2.6.2. <i>Ne-mijeloablative transplatacija.....</i> | <i>27</i> |
| 2.7. Budućnost primjene imunoterapije..... | 28 |
| § 3. LITERATURNI IZVORI..... | XXX |

§ Sažetak

Imunoterapija, poznata još kao biološka terapija, ili bioterapija temelji se na aktivaciji prirodnog imunskog sustava čime se povećava sposobnost organizma da se sam bori sa malignim oboljenjem. Za razliku od tradicionalnih metoda liječenja (zračenje, kemoterapija, operativni zahvati), imunoterapija uništava samo maligne stanice u tijelu čime je zdravo tkivo očuvano, a nuspojave smanjene. Da bi imunoterapija bila djelotvorna, potrebno je uzeti u obzir zdravstveno stanje pacijenata kao i vrstu tumora kojeg je potrebno liječiti. Najvažniji faktor koji utječe na izlječenje je vrijeme. Ovakva vrsta terapije iziskuje dovoljno vremena kako bi se imunski sustav stimulirao ili pojačao te dao pozitivan ishod terapije.

Jedna od prvih metoda imunoterapije bilo je liječenje pomoću citokina. Citokini su proteini male molekularne mase koji djeluju trenutno na maligne stanice tako što koče njihov rast stimuliranjem imunoloških stanica. Drugi oblik imunoterapije je upotreba monoklonskih antitijela koja se vežu na specifične proteine koje proizvode stanice te na taj način zaustavljaju deaktivaciju stanica T čime se povećava protutumorski imunski odgovor. Noviji pristup liječenja je terapija cjepivom koja se temelji na pokušaju da se tumorske stanice lakše učine vidljivima imunološkom sustavu. Metastatski tumori najčešće se tretiraju metodom adoptivne imunoterapije. Takva terapija temelji se na prijenosu (transferu) imunoloških stanica, a najkorištenija metoda je adoptivni celularni transfer (ACT).

§ 1. UVOD

1.1. Imunološki sustav i imunološki odgovor

1.1.1. Sastavnice imunološkog sustava

Ljudsko tijelo svakodnevno se susreće s napadima tijelu nepoznatih tvari, odnosno s napadima stranih antigena. Kako bi se organizam obranio, razvio se imunološki sustav. Glavna uloga imunološkog sustava je razlučivanje stranih antigena od vlastitih te uklanjanje patogena s ciljem očuvanja jedinke.¹

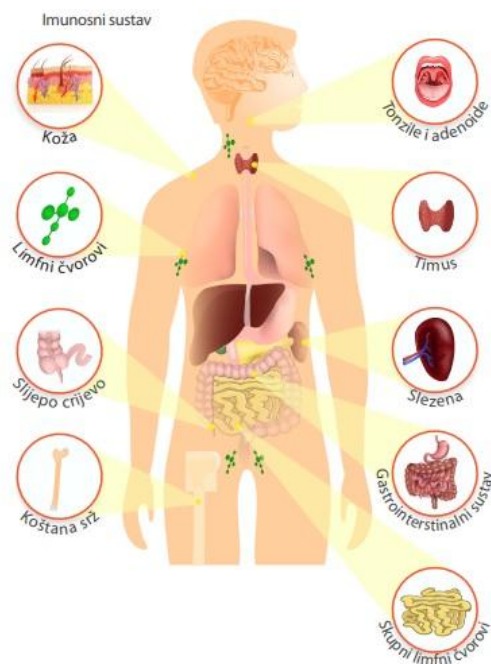
Organizam je složeni sustav koji funkcionira skladno, a time je i imunološki sustav jedna vrlo složena mreža sačinjena od mnoštva stanica i organa koji surađuju zajedno sa jedinstvenim ciljem obrane.²

Možemo razlikovati organe koji proizvode specijalizirane imunološke stanice ili fizičke/kemijske barijere poput kože, rožnice oka te raznih membrana (primjerice onih koje oblažu urinarni sustav, reproduktivni, gastrointestinalni ili respiratorni sustav).

Fizičke/kemijske barijere direktno brane ulazak mikroorganizama u tijelo, dakle zaustavljaju prodor virusa, bakterija, gljivica.^{2,3}

Imunološke stanice proizvode se u limfoidnim organima, odnosno u tkivima u kojima se nalazi velik broj limfocita i različitih drugih stanica koje osiguravaju mikrookolišne uvjete potrebne za razvoj i aktivaciju limfocita. Limfoidni organi dijele se na primarne ili središnje (u kojima limfociti sazrijevaju) i sekundarne ili periferne (u koje se zreli limfociti premještaju i obnašaju svoje funkcije). Primarni su primjerice koštana srž ili timusna žlijezda (prsna žlijezda), dok sekundarni su slezena te limfni sustav (limfni čvorovi te razna limfna tkiva).⁴

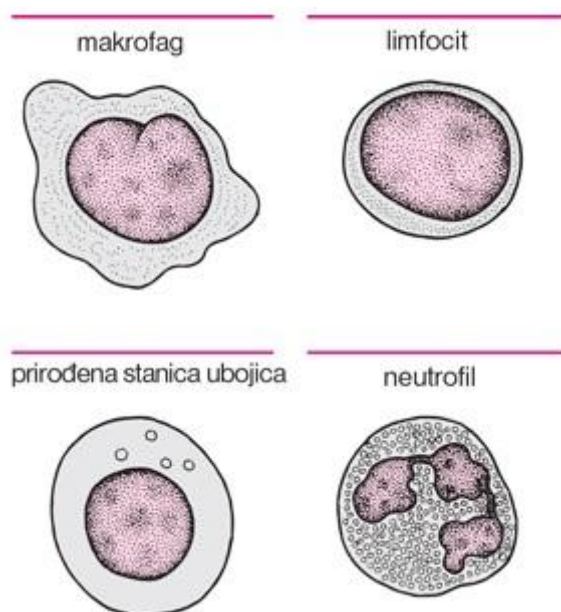
Položaj svih spomenutih organa u ljudskome tijelu prikazan je na slici 1.



Slika 1. Imunosni sustav sastoji se od brojnih komponenti u tijelu, od kojih neke djeluju kao fizičke/kemijske barijere (koža, rožnica, membrane u respiratornom sustavu, gastrointestinalnom sustavu, mokraćnom sustavu i reproduktivnom sustavu), dok druge proizvode i/ili cirkuliraju specijalizirane imunološke stanice (limfni sustav, koštana srž, slezena i timusna žlijezda).³

Stanice imunskog sustava nastaju iz prastanica koje mogu nastajati na dva načina: iz limfoidnih prekursora nastaju limfociti (limfociti T, limfociti B i prirodne stanice ubojice), a iz mijeloidnih prekursora fagociti (monociti/makrofagi, neutrofilni i eozinofilni granulociti, stanice za predočavanje antigena) i posredničke stanice (bazofilni granulociti, mastociti i trombociti).⁵

Najznačajnije stanice imunološkog sustava prikazane su na slici 2.



Slika 2. Makrofagi, limfociti, prirodne stanice ubojice i neutrofil su jedne od najznačajnijih stanica imunološkog sustava. Strukturno se razlikuju što je vidljivo na slici.⁵

Makrofagi (mononuklearni fagociti ili monociti) su velike bijele krvne stanice koje fagocitiraju mikrobe, antigene i druge tvari. Odlaskom u tkiva monociti se preobražavaju u tkivne makrofage. Enzimi i kemijske tvari sadržane u citoplazmi omogućuju makrofagu da razgradi fagocitirani mikroorganizam uništavajući ga. Makrofazi se ne nalaze u krvi, već se nalaze na strateškim mjestima gdje tkiva dolaze u dodir s krvotokom ili vanjskim svijetom (primjerice nalaze se u alveolama tj. mjestima gdje pluća primaju zrak izvana ili gdje su stanice jetre povezane s krvnim žilama). Osim brojnih adhezijskih molekula (površinskih biljega), monociti posjeduju i receptore za Fc-fragment IgG (Fc γ RI ili CD64, Fc γ RII ili CD32, i Fc γ RIII ili CD16), receptor za komponentu komplementa C3b (CR1 ili CD35), MHC-II nužne za predočavanje antigena limfocitima T te receptore za citokine (poput IL-2R).

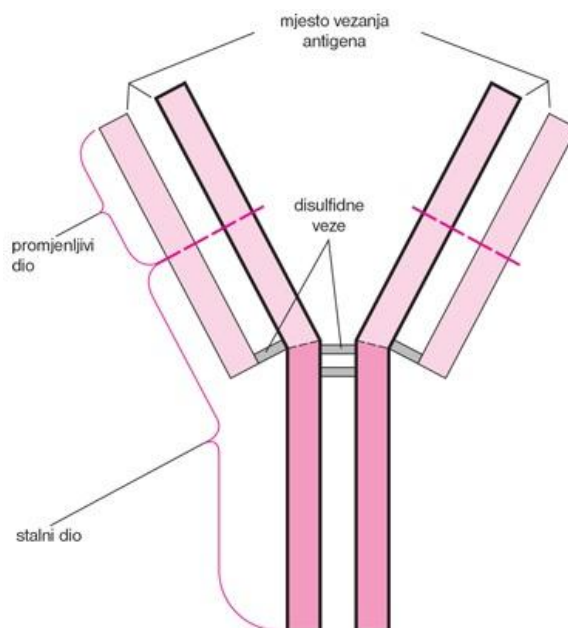
Neutrofil su krupne bijele krvne stanice slične makrofazima, ali za razliku od makrofaga se nalaze u krvi. Uz eozinofile te monocite ubrajaju se u granulocite odnosno fagocite. Kako bi izašli iz krvi i ušli u tkiva potreban im je poseban podražaj, stoga surađuju sa makrofagima koji započinju imunološki odgovor i šalju signale kako bi podražili neutrofile da iz krvi pređu u tkivo te im se pridruže. Ubijanjem te fagocitozom mikroba (neutrofil fagocitiraju mikrobe) dolazi do stvaranja gnoja. Na svojoj površini sadrže adhezijske molekule pomoću kojih stupaju u dodir s endotelnim stanicama krvnih kapilara pri dolasku u tkiva te

putovanju na mjesto djelovanja. Osim brojnih adhezijskih molekula, na sebi sadrže i receptore za Fc-fragment IgG (FcγR).⁵

Limfociti su glavne stanice limfnog sustava. U usporedbi sa makrofagima i neutrofilima su relativno malene stanice. Mogu se podijeliti na tri glavne skupine – B limfocite, T limfocite te prirodene stanice ubojice. U primarnim limfoidnim organima nastaju u velikom broju te migriraju u krvotok i u periferne limfne organe i tkiva.^{5,6}

Limfociti B nastaju u koštanoj srži gdje prolaze i proces sazrijevanja. Prolaze kroz tri stadija tj. stadij pro-B, stadij pre-B i stadij nezrele B stanice. Stanice u stadiju pro-B nose adhezijsku molekulu VLA-4 (VLA-4, engl. *very late antigen 4*) koja ostvaruje interakcije sa stromalnim stanicama koštane srži vezanjem za stromalne stanice VCAM-1 (VCAM-1, engl. *vascular cell adhesion molecule 1*). Nadalje, citokin SCF (SCF, engl. *stem cell factor*) se veže za receptor c-Kit (CD117) (c-Kit, engl. *receptor tyrosine kinaseprotein*) što označava prelazak u stadij pre-B. U ovom stadiju limfocit B proizvodi protutijelo (imunoglobulin) IgM na svojoj površini, te prelazi u slijedeći stadij u kojem IgM postaje funkcionalan te se istovremeno ugrađuje u membranu s novonastalim novim imunoglobulinom IgD. Proizvedeni ugrađeni imunoglobulini na membrani djeluju kao specifični receptori za antigen (BCR, engl. *B-cell antigen receptor*). Većina ljudskih limfocita B nose membranske IgM i IgD dok manji broj nosi preostale razrede (takvi limfociti B mogu se u znatnoj količini specifično pronaći u određenim organima, npr. u sluznici crijeva gdje se većinom nalaze limfociti B s površinskim IgA).^{26,27}

Ranije spomenuti imunoglobulini su proteini građeni u obliku slova Y kod kojega se različiti lanci drže zajedno uz pomoć disulfidnih veza. Razlikujemo varijabilni dio koji će se vezati za specifični antigen te stalni dio koji određuje razred protutijela. Razlikujemo pet razreda protutijela - IgM, IgG, IgA, IgE i IgD koja mogu sudjelovati u imunosnom odgovoru.^{5,8}



Slika 3. Protutijelo ili imunoglobulin, građen je u obliku slova Y, a različiti lanci drže zajedno uz pomoć kemijskih disulfidnih veza. Razlikujemo varijabilni/promjenjivi dio koji će se vezati za specifični antigen te stalni dio koji određuje vrstu protutijela.⁵

Nakon izlaska iz koštane srži, limfociti B se mogu aktivirati nakon čega slijedi daljnja proliferacija¹. Na površini zrelih limfocita B osim BCR receptora nalaze se i brojni drugi biljezi poput antigena MHC-II koji su važni za suradnju s limfocitima T. Osim njih nalaze se i površinski biljezi (CD19, CD20 i CD22), receptori za Fc-fragment imunoglobulina G (FcγRII) te receptori za komponente komplementa C3b i C3d (komplement receptori CR1 i CR2). Vezivanjem komponente komplementa za receptore koji se nalazi na antigenu dolazi do interakcije površinskog biljega CD19 s BCR čime se pokreće niz signala koji će poboljšati proces aktivacije limfocita B.^{6,26,27}

Limfociti T stvaraju se u koštanoj srži odakle putuju u timus gdje sazrijevaju učeći razlikovati strano od vlastitoga, odnosno gdje prolaze proces diferencijacije. Dolaskom u timus, nezrele stanice na sebi imaju specifične površinske molekule odnosno receptor za faktor rasta matičnih stanica (c-Kit, engl. *receptor tyrosine kinaseprotein*), adhezijske

¹ proliferacija (franc. *proliferation*), umnožavanje stanica odnosno uzastopno stvaranje novih stanica tijekom stvaranja novoga tkiva.

molekule CD25 i CD44 (CD, engl. *cluster of differentiation*)ⁱⁱ te nekoliko receptora za IL-2 (IL-2, engl. *interleukine-2*). Sazrijevanjem nastaju zreli limfociti T koji mogu biti CD4⁺ ili CD8⁺. Prije nego li se limfociti T izluče u limfni sustav, prolaze procese pozitivne i negativne selekcije. U procesu pozitivne selekcije svi limfociti T su izloženi molekulama HLAⁱⁱⁱ (HLA, engl. *human leukocyte antigen*), a oni koji nisu sposobni vezati se podliježu apoptozi. Proces negativne selekcije odgovoran je za apoptozu svih limfocita T koji se vežu visokim afinitetom za vlastite antigene predočene HLA molekulama kako bi se izbjeglo pokretanje odgovora na vlastite antigene. Svaki limfocit T na staničnoj membrani posjeduje receptor (TCR, engl. *T-cell receptor*) koji je jedinstven za određeni antigen. Pojavom stranog tijela s antigenom kojeg prepoznaje specifični TCR dolazi do aktivacije limfocita T čiji mehanizam ćemo obraditi u poglavlju 2.1. *Reakcija imunološkog sustava na rak*. Osim stanica zaraženih mikrobima, limfociti T mogu prepoznati i tumorske stanice. Kao i limfociti B imaju sposobnost memorije čime se ubrzava uklanjanje prijetnje (stječe se imunost).^{5,6,26,27}

Prirođene stanice ubojice (često nazivane i NK stanice, engl. *natural killer*) ubijaju određene stanice zaražene mikrobima i stanice raka čim se stvore bez procesa sazrijevanja i diferencijacije kao što je slučaj sa B i T limfocitima. To svojstvo im omogućuju brojni receptori pomoću kojih mogu prepoznati patogene mikroorganizme ili mutirane stanice. One uklanjanju prijetnju puno brže od limfocita T, međutim to čine s manjom učinkovitošću. Prirođene stanice ubojice također mogu stvarati neke citokine odnosno glasničke tvari koje reguliraju neka djelovanja T limfocita, B limfocita i makrofaga.^{6,7,26}

1.1.2. Imunološki odgovor

Imunološki sustav razvio je složenu mrežu provjera i ravnoteža pomoću kojih regulira i održava sigurnost unutar organizma. Imunost može biti urođena ili stečena. Svaki organizam rođenjem razvija urođenu imunost. Takva imunost nije specifična, ali ima vrlo brz imunski odgovor.⁹

ⁱⁱ CD-sustav površinskih biljega je nomenklatura zasnovana na prepoznavanju membranskih biljega monoklonskim antitijelima, razlikujemo biljege karakteristične za određenu liniju stanica, diferencijacijske biljege koji postoje samo privremeno (npr. u određenom razdoblju sazrijevanja stanica) te aktivacijske biljege koji su pristupni samo na stanicama koje su aktivirane antigenom.

ⁱⁱⁱ HLA-sustav (engl. *Human Leukocyte Antigens*), sustav glavnih antigena tkivne snošljivosti u ljudi. Određen je genima glavnoga sustava tkivne snošljivosti (MHC, engl. *Major Histocompatibility Complex*), koji se nalaze na 6. ljudskom kromosomu. Molekule HLA utječu na imunološki odgovor limfocita T specifičan za antigen i na druge stanice kada limfocitima T predočuju antigen.²⁸

Imunosni odgovor je skup izvršnih imunoloških mehanizama kojima se nakon susreta s antigenom i njegova prepoznavanja antigen neutralizira ili uništava. Sastavnice imunološkog sustava uključene u urođenu imunost su, ranije opisane stanice, makrofazi i neutrofilii (granulociti). Njihov odgovor na sve antigene i strane tvari je vrlo sličan te se ne razlikuje od organizma do organizma.⁶

Obrana od patogena tijekom imunosnog odgovora urođene imunosti odvija se na lokalnoj i sistemskoj razini. Lokalna obrana se ostvaruje na mjestu ulaska nekog patogena u organizam (primjerice sluznice ili kože) koja mehanički brani ulazak, ali može djelovati kao fizička i kemijska barijera. Fizički se patogeni mogu uklanjati ljuštenjem, ispiranjem, a kemijski pomoću protuinfekcijskih tvari koje se izlučuju (npr. kiselost sluznica ili normalna bakterijska flora koja brani razvoj patogena u crijevima).

Na sistemskoj razini, obrana se ostvaruje fagocitozom te djelovanjem ostalih nespecifičnih tvari, odnosno tvarima koje nemaju receptore za specifično prepoznavanje antigena. Nakon što je lokalna obrana uništena, aktiviraju se specijalizirani fagociti odnosno ranije opisani granulociti poput neutrofila te makrofaga. Njihova zadaća je prepoznavanje, gutanje te razgradnja stranih tvari. Djeluju putem receptora za Fc-fragment antitijela te komponente komplekta C3b koje nose na svojoj površini (što pokazuje da urođeni i stečeni imunosti susatav surađuju), a zahvaljujući kojima su u mogućnosti uništiti sve čestice koje na sebi nose odgovarajuće biljege.

Proces fagocitoze može se podijeliti u četiri dijela: privlačenje ili kemotaksija, vezanje na površinu fagocita ili adherencija, ulaženje čestice u fagocit ili ingestija te ubijanje čestice odnosno razgradnja. Mehanizam započinje kemotaksijom, najčešće hidrofobnim privlačenjem ili privlačenjem Van der Waalovim interakcijama (moguće su i elektrostatske interakcije, no one su rijetke). Kada je mikrob privučen započinje adherencija, na receptore za Fc-fragment IgG i komponentu komplekta C3 se mogu vezati na čestice koje na sebe nespecifično adsorbiraju IgG ili čestice koje su obložene imunoglobulinima ili komponentama komplekta. Slijedi endocitoza koja započinje uvlačenjem membrane fagocita i okruživanjem čestice prilikom čega se stvara fagocitna vakuola (fagosom). Fagosom se ulaskom u stanicu spaja s jednom ili više fagocitnih granula (lizosoma) koje sadrže hidrolitičke enzime. Ovim korakom nastaje fagolizosom, a zarobljena čestica se izlaže djelovanju hidrolaza. Mehanizam daljnje razgradnje može biti ovisan o kisiku, a to znači da fagocitna granula u sebi sadrži defensine odnosno male kationske proteine bogate cisteinom.

Njihova uloga je povećavanje propusnosti membrana napadnute čestice. Nadalje, mehanizam ovisan o kisiku se temelji na aktivnosti oksidaza koje su ovisne o NADPH, a one pretvaraju molekularni kisik u vodikovu peroksidu. Jedna od prisutnih komponenti u građi fagocita je mijeloperoksidaza, a u njezinu prisustvu nastali vodikov peroksid reagira s kloridnim ionima čime nastaje hipoklorna kiselina. Hipoklorna kiselina je pak vrlo snažno oksidirajuće sredstvo koje trenutno oksidira biološki aktivne molekule čestica. Mogući su i mehanizmi neovisni o kisiku, a oni se odnose na djelovanje baktericidnih enzima poput lizozima, proteaze te laktoferina.

Stečena imunost se zadobiva tijekom života. Nakon rođenja, imunološki sustav organizma nije još došao u dodir s vanjskim svijetom, stoga ne posjeduje razvijen mehanizam obrane. Takav imunološki sustav uči odgovarati na svaki novi antigen s kojim se susreće, on je također specifičan za antigene s kojima organizam dolazi u dodir tijekom života. Specifična imunost ima sposobnost učenja, prilagodbe te pamćenja. Glavno svojstvo specifične imunosti je prepoznavanje antigena putem receptora za antigen na limfocitima B (BCR) te putem receptora za antigen na limfocitima T (TCR).

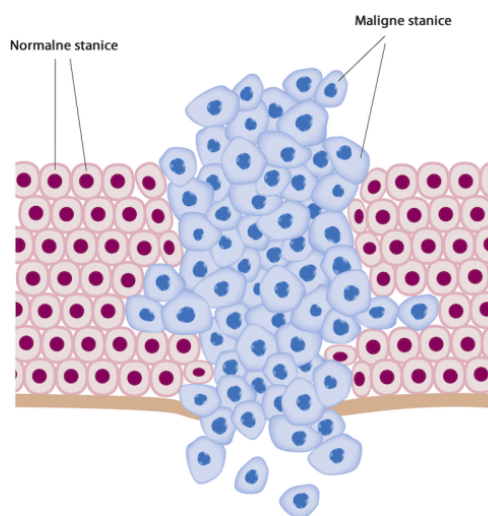
Obje imunosti su međusobno povezane tako što svaki sustav međudjeluje i utječe na drugi neposredno ili putem izlučivanja glasnika citokina. Najčešće podražaj izaziva nekoliko odgovora koji se sastoje od tri osnovna principa – prepoznavanja, pokretanja i napada.^{3,9}

1.2. Tumor i kancerogena oboljenja

1.2.1. Rak, neoplazma ili novotvorina

Rak, neoplazma ili novotvorina su općeniti nazivi za mnoge bolesti čija je zajednička karakteristika da se njihove abnormalne stanice dijele bez kontrole. U svakom organizmu stanice rastu i dijele se na kontrolirani način s ciljem proizvodnje novih stanica koje su tijelu potrebne za očuvanje zdravlja. Budući da je taj proces strogo kontroliran, stare ili oštećene stanice odumiru (ili se uništavaju) te se zamjenjuju novim zdravim stanicama.

Ponekad kontrolni mehanizmi mogu zakazati što rezultira oštećenjem genetskog materijala te dolazi do mutacija koje utječu na rast i diobu stanica. Tada stanice ne odumiru kada bi trebale, a nove stanice se nekontrolirano stvaraju i onda kada organizam nema potrebu za njima. Višak stanica mogu formirati čvrstu masu tkiva koja se naziva tumor (lat. *tumor* – oteklina) kao što je to prikazano na slici 4.¹⁰



Slika 4. Tumor je čvrsta masa tkiva nastala nekontroliranim rastom stanica. Do pojave tumora dolazi oštećenjem ili izmjenom genetskog materijala što rezultira poremećajem u rastu i diobi stanica.¹⁰

1.2.2. Vrste tumora

Razlikujemo maligne (zloćudne) i benigne (dobroćudne) tumore. Pojam zloćudnosti (malignosti) se odnosi na svojstvo tumora da prodre i razori okolno tkivo te da se može proširiti limfnim sustavom ili krvi na udaljena tkiva te tako tvoriti metastaze. Metastatske stanice izgledom i ponašanjem odgovaraju stanicama primarnog sijela raka. Metastazirani tumori su uvijek povezani s prvobitnim, a mogu se razlikovati pomoću pato-histološke identifikacije stanica u tkivu (metastazirane stanice gotovo uvijek odgovaraju stanicama sijela).^{10,11} Tumori svojim rastom mogu vršiti pritisak na okolno tkivo te na taj način mogu istisnuti normalne stanice, što onemogućava normalnu funkciju tkiva. Zbog razvoja svoje vlastite opskrbe krvi tumorsko tkivo oduzima zdravome potrebne hranjive tvari. Prema mikroskopskom izgledu stanica i ostalim specifičnostima koje se otkrivaju raznim dijagnostičkim postupcima određuje se stanično podrijetlo nekog tkiva i tip tumora. Stanica tumora gotov uvijek nalikuje tkivu organa koje je zahvaćeno kancerogenim oboljenjem po genetskom i mikroskopskom izgledu stanice.¹⁰

Druga podjela tumora je na one solidne i hematološke. Solidni tumori su oni koji tvore izraslinu ili višestruke izrasline dok hematološki tumori ugrožavaju normalne stanice koje se nalaze i kruže tijelom putem krvotoka. Solidni tumori se još mogu podijeliti na karcinome i

sarkome. Karcinomi potječu od epitelnih stanica koje se nalaze na površinama tkiva i organa. Oni čine 90% svih tumora tkiva (tumorske izrasline ili stanice raka koje rastu unutar organskih sustava). Sarkomi nastaju iz stanica potpornog, odnosno vezivnog tkiva poput mišića, tetiva, masnog tkiva, živaca i ostalih tkiva koja povezuju, podržavaju ili okružuju strukturu i organe tijela. Ova vrsta tumora je rjeđa u odraslih, dok se češće dijagnosticira kod djece.¹⁰

§ 2. KONCEPT IMUNOONKOLOGIJE

2.1. Reakcija imunološkog sustava na rak

Imunosni sustav svakodnevno nadzire organizam i procese koji se odvijaju u njemu. Ukoliko se pojavi oštećena stanica imunosni sustav trenutno reagira slanjem imunosnog odgovora te uništava potencijalni izvor zaraze.

Tumorske stanice na svojoj staničnoj površini sadrže antigene, međutim ti antigeni nisu poznati imunološkom sustavu stoga se pokreće imunološki odgovor kako bi promijenjene stanice bile uništene. Tumorske antigene možemo svrstati u dvije skupine, one tumorski specifične te one koje su tumoru pridružene. Tumorsko specifični antigeni se pronalaze samo na tumorskim stanicama (npr. antigen HTLV-1 (HTLV-1, engl. *Human T-cell leukemia virus, type 1*) virusa ljudske leukemije T; produkti staničnih gena poput MAGE-1 (MAGE-1, engl. *Melanoma-associated antigen 1*), melanomskog antigena ili produkti mutiranih onkogeno poput mutiranog p21ras). Tumoru pridruženi antigeni su oni antigeni koji su pretežno prisutni kod tumorskih stanica, no mogu se pronaći i kod zdravih stanica. Premda kod njih izostaje tumorska specifičnost, njihova promjena koncentracije u serumu može uputiti na prisutstvo malignih promjena (npr. karcinoembrijski antigen CEA (CEA, engl. *Carcinoembryonic antigen*) sadrže stanice fetalnog crijeva, ali ne i crijevo odrasla čovjeka).⁶

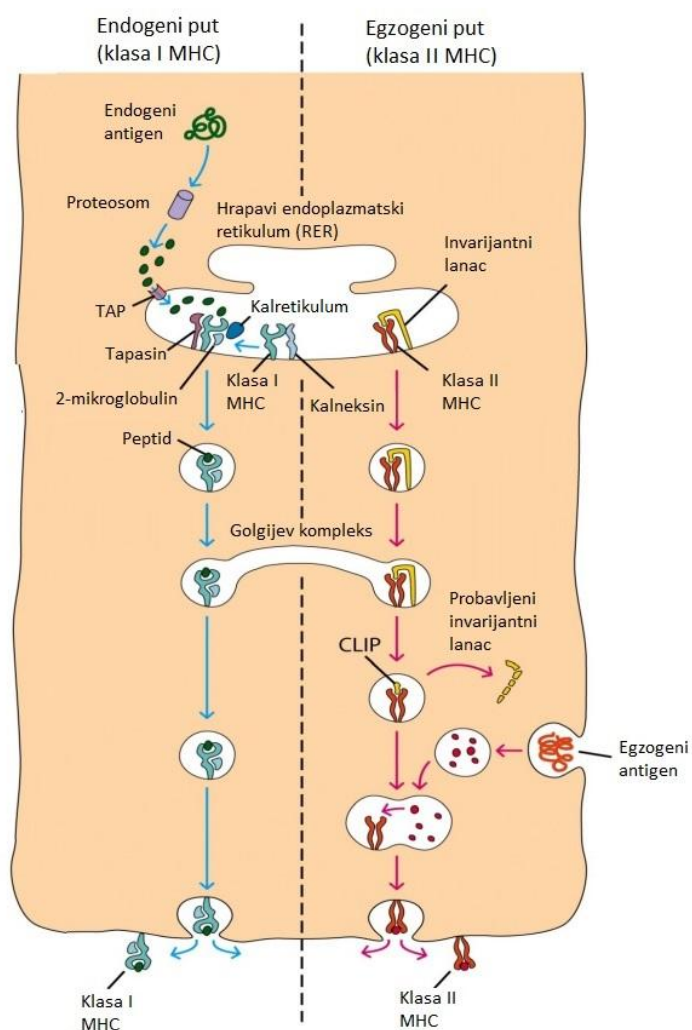
Tumorski antigen se limfocitu T ne predočava u nativnom obliku već on dolazi prerađen odnosno razgrađen u manje fragmente u kompleksu s molekulama MHC.

Glavni sustav tkivne podudarnosti MHC (MHC, engl. *major histocompatibility complex*) čine dvije osnovne klase, MHC-I i MHC-II. Molekule klase I sastoje se od jednog teškog polipeptidnog lanca (45kDa) koji je povezan s molekulom β 2-mikroglobulina (12 kDa). Razlikujemo tri podskupine razreda I: HLA-A, HLA-B i HLA-C. One su zaslužne za prezentiranje citotoksičnim limfocitima T antigena unutar stanice. Molekule koje čine klasu II sastoje se od jednog lakog glikoproteinskog lanca (23-29 kDa) i jednog teškog glikoproteinskog lanca (30-34 kDa), a mogu se podijeliti u tri podskupine: HLA-DR, HLA-DP i HLA-DQ. One su zaslužne za prezentiranje antigena koji potječu od vanstaničnih patogena pomagačkim limfocitima T. Svaka MHC molekula može predočiti mnogo različitih peptida, no predočuje samo po jedan peptid u određeno vrijeme budući da ima samo jedan utor koji ga veže. Da bi se peptid vezao u utor, on mora sadržavati određene aminokiselinske

ostatke na ključnim mjestima koja usidruju peptid u utor. Prerada antigena se zbiva u stanicama za predočavanje antigena, APC (APC, engl. *antigen presenting cell*).^{6,26,29}

Na slici 5. grafički su prikazani procesi prerade antigena. Razlikujemo endogeni i egzogeni put. Endogeni put započinje degradacijom endogenog antigena proteasomom. Nastali peptidi se transportiraju u hrapavi endoplazmatski retikulum pomoću TAP-a. Molekula MHC klase I veže peptid uz pomoć molekula pratilja (tapasin, β_2 -mikroglobulin, kalretikulum). Molekula MHC klase I s vezanim peptidom se transportira iz RER-a (RER, engl. *Rough endoplasmic reticulum*) preko Golgijevog aparata na staničnu membranu. Drugi način stvaranja prerađenog antigena teče egzogenim putem. On započinje vezanjem invarijantnog lanca na molekulu MHC klase II čime se onemogućuje vezanje endogenog peptida. Kompleks MHC se umjerava preko Golgijevog aparata prema površini stanice pri čemu dolazi do razgradnje invarijantnog lanca pri čemu ostaje CLIP fragment (CLIP, engl. *Class II-associated invariant chain peptide*).^{27,29}

Egzogeni antigen se potom unosi u stanicu i razgrađuje se u endosomu. Vezikul s MHC kompleksom spaja se s nastalim endosomima. Molekula HLA-DM katalizira otpuštanje CLIP-a i vezanje antigenskog peptida. MHC molekula klase II s vezanim peptidom se transportira na staničnu membranu.^{27,29}



Slika 5. Prikaz endogenog i egzogenog puta nastanka predočenog antigena.²⁹

Nakon diferenciranja neki limfociti T mogu djelovati kao citotoksične stanice ($CD8^+$) koje imaju sposobnost izravnog uništenja ciljane stanice, dok neki mogu djelovati kao pomagačke stanice ($CD4^+$) koje lučenjem citokina pomažu privlačenje makrofaga te potpomažu i reguliraju lučenje antitijela. Kako bi se limfocit T aktivirao, potrebna su dva signala. Prvi i inicijalni signal odgovara vezanju TCR- $CD3$ s predočenim antigenom. TCR je uvijek povezan sa skupinom od pet polipeptida, koji se zajednički nazivaju biljegom $CD3$, pa se tako razlikuju dvije vrste membranskih receptora limfocita T: $\alpha\beta$ TCR- $CD3$ i $\gamma\delta$ TCR- $CD3$. Drugi signal se događa interakcijom $CD25$ na limfocitu i $B7$ molekulama na predočenim stanicama. Molekule $B7$ postoje u dvije forme, $B7-1$ te $B7-2$. Vezanje $B7-1$ za $CD28$ odašilje signal limfocitima dok vezanje $B7-2$ na $CTLA-4$ ($CD152$) djeluje inhibitory. Nakon aktivacije slijedi primarni odgovor u kojemu limfocit T podliježe mitozama uz istovremenu

povećanu transkripciju gena za IL-2 i receptora za IL-2 čime nastaju efektorske stanice (citotoksični limfociti i pomoćnički limfociti). Pomoćne limfocite ili limfocite T_h možemo podijeliti u dvije subpopulacije ovisno o vrsti citokina koje mogu izlučivati. T_h određuju specifičnost odgovora tako što određuju koji antigen ili koji epitop će se prepoznati, a odlučuju i mehanizam imunoreakcije. Također, potiču funkcije fagocita i ostalih nespecifičnih stanica, a mogu zakočiti imunosti odgovor supresivnim stanicama T_s . T_{h1} potiču celularnu imunost (luče IL-2 i $IFN\gamma$) dok T_{h2} potiču proizvodnju antitijela (luče IL-4, IL-5, IL-6 i IL-10).⁶

Aktivacija limfocita B usko je povezana stanicama T_{h1} , bilo direktnim kontaktom ili citokinima koje izlučuju. Nakon što je aktiviran, limfocit B se može diferencirati u plazma stanicu ili memorijsku B stanicu. Diferencijacija u plazma stanice podrazumijeva mijenjanje transkripcije RNA čime će se prestati proizvoditi membranski imunoglobulini te će se započeti proizvodnja sekrecijskih imunoglobulina. Memorijski limfociti B stječu sposobnost dugog preživljavanja bez antigene stimulacije.⁶

Pojednostavljeno, limfociti T se aktiviraju prilikom prepoznavanja antigena koje im predočavaju APC stanice; stvaraju se limfociti T_h koji stupaju u dodir s limfocitima B koji im predočavaju antigene vezane na svojoj površini na BCR. Time se limfociti B aktiviraju, proliferiraju i pretvaraju u stanice koje luče antitijela odnosno u plazma stanice. Izlučeni imunoglobulini pokreću razne oblike imunosti odgovora. Dakle, da bi stanica bila sposobna pokrenuti imunoreakciju, ona se mora prethodno sresti s antitijelom i aktivirati imunosti odgovor. Međutim, prilagodbom zloćudne stanice razvijaju sposobnost da zaobiđu mehanizme imunosti sustava.¹⁰

Stanice tumora izbjegavaju imunološki napad koristeći dvije glavne strategije: izbjegavaju imunološko prepoznavanje (skrivaju svoj identitet) te potiču imunosupresivni tumorski mikrookoliš TME (TME, engl. *tumor microenvironment*).

Stanice izbjegavaju imunološko prepoznavanje tako što nastoje smanjiti ili potpuno izgubiti ekspresiju tumorskih antigena na staničnoj površini čime se uspješno izbjegava prepoznavanje od strane citotoksičnih stanica T. Primjerice, kod nekih karcinoma pluća dolazi do gubitka heterozigotnosti u HLA, a to vodi do prezentiranja manjeg broja antigena čime se zaobilazi imunološki odgovor. Također, mutacije mogu rezultirati i utišavanjem nastanka predočenih antigena i time se oduprijeti molekulama efektorskih T-stanica poput $TNF-\alpha$ ($TNF-\alpha$, engl. *Tumor necrosis factor alpha*) i $IFN-\gamma$ ($IFN-\gamma$, engl. *natural interferon gama*). Kod stanica

raka dojke i pluća uočeno je kako uklanjaju potencijalne aktivatore za NK stanice na staničnoj površini čime im postaju nevidljive.

Druga često korištena strategija je stvaranje imunološki tolerantnog TME izlučivanjem supresivnih molekula poput IL-10, TGF- β (TGF- β , engl. *Transforming growth factor beta*), prostaglandin E2 i VEGF (VEGF, engl. *Vascular endothelial growth factor*). Drugi način je ekspresija inhibicijskih molekula kontrolnih točaka poput PD-L1 (PD-L1, engl. *Programmed death-ligand 1*), CTLA-4 (CTLA-4, engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) i supresor imunoglobulina V domene aktivacije stanica T (VISTA, engl. *V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation*). Osim navedenih, tolerancija se može postići indukcijom regrucije TAM-a (TAM, engl. *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), MDSC-a (MDSC, engl. *Myeloid-derived-suppressor cells*) i Treg-ova (regulatornih T-stanica) pomću kemokina koji su produkti tumora (neki od kemokina su CCL2, CSF1, CCL5, CCL22, CXCL5, CXCL8 i CXCL12). Kombinacijom ovih strategija tumorske stanice uspješno zavaravaju imunološki sustav te opstaju i nekontrolirano se množe zahvaćajući zdravo tkivo. Imunološke terapije usmjerene su na stimuliranje različitih čimbenika kako bi se izbjegla imunološka tolerancija na maligne stanice odnosno, potrebno je manipulirati stečenim imunološkim sustavom. Razvijeno je nekoliko metoda imunoterapije no istraživanja su pokazala kako njihova kombinacija može dati izvrsne rezultate. Primjerice, blokiranjem TGF- β (TGF- β , engl. *Transforming growth factor beta*) povećava se terapijski odgovor terapije anti-PD-L1, što rezultira regresijom tumora u EMT6 modelima karcinoma dojke i potpunom eliminacijom metastaza u jetri u modelu kolorektalnog karcinoma.^{3,26,30}

2.2. Imunološki pristupi

Imunološki pristupi u onkologiji mogu se podijeliti na dvije glavne kategorije, na specifičnu imunoterapiju i nespecifičnu imunoterapiju, a uz navedene često se dodaje i treća kategorija adoptivne imunoterapije.¹²

2.2.1. Specifična imunoterapija

Razlikujemo aktivnu i pasivnu specifičnu imunoterapiju.

Aktivna specifična imunoterapija usmjerena je protiv određenog tumorskog antigena, a provodi se cijepljenjem inaktivnim tumorskim stanicama ili čistim antigenima.

Pasivna specifična imunoterapija uglavnom se provodi monoklonskim antitumorskim antitijelima koja se nastoje koristiti izravno ili kao specifični nosači djelotvornih protutumorskih tvari poput citokina, kemoterapeutika, toksina i radionuklida. Ovakva vrsta

imunoterapije nailazi na probleme poput vezanja antitijela na imunokompetetne stanice (zreli limfociti B ili zreli limfociti T koji imaju sposobnost pamćenja), dostupnost tumora antitijelima, križna reaktivnost antitijela s drugim, i slično.

Dio problema moguće je prevladati radom s fragmentima imunoglobulinske molekule (Fab) ili radom s humaniziranim antitumorskim antitijelima.^{6,12}

2.2.2. Nespecifična imunoterapija

U nespecifičnu imunoterapiju se ubrajaju terapije citokinima i imunokompetentnim stanicama. Najviše su istraživani interferoni (IFN). Oni su skupina citokina, topljivih posrednika imunosti, što ih luče razne vrste stanica. Primjerice, IFN- α je interferon kojeg luče neutrofili, limfociti T i B te makrofagi, a koristi se kao registrirani lijek u Sjedinjenim Američkim Državama za adjuvantno (pomoćno) imunoterapijsko liječenje melanoma.^{6,12}

2.2.3. Adoptivna imunoterapija

Adoptivna imunoterapija postiže se prijenosom senzibiliziranih imunokompetentnih stanica iz imune u neimunu jedinku. Infuzija donorskih limfocita je takav oblik liječenja.¹²

Svaku od navedenih vrsta imunoterapija ćemo obraditi u daljnjem tekstu.

2.3. Terapija cjepivom

Terapija cjepivom spada u aktivnu specifičnu imunoterapiju. Poznavanje specifičnih tumorskih imunskih odgovora omogućilo je fokusiranije istraživanje protutumorskih terapija. Zadaća terapije je ciljanje individualnih peptida ili grupe antigena koje proizvodi tumor kako bi se tumorske stanice učinile vidljivijima imunološkom sustavu te se tretirale kao strane. Najveće ograničenje ciljanja predstavlja nedostatak antigena. Naime, većina do danas otkrivenih tumorskih antigena nije specifična za pojedini tumor. Antigeni su povezani s tumorom tako što su prirodno postojani u normalnim tkivima, ali maligno transformirane stanice ih više ekspimiraju. Zbog takve razlike u ekspresiji, ciljani pristup bi trebao davati manje nuspojava jer je lakše precizno tretirati maligno područje.

Cjepiva protiv tumora mogu se temeljiti na imunološkim stanicama, na bazi peptida ili na bazi tumorskih stanica. Ovakva terapija se može provesti specifično, kao aktivna

imunizacija – terapija cjepivom ili kao nespecifična aktivna imunoterapija tvarima (bakterije ili njihovi dijelovi) koje izazivaju nespecifičnu stimulaciju imunološkog sustava i time dovodi do povećane otpornosti na tumor. Specifična aktivna imunoterapija, odnosno cjepivo može biti primjenjeno u preventivne svrhe ili kao metoda liječenja postojeće bolesti.^{12,14,19}

2.3.1. Cjepivo na bazi imunoloških stanica

Prvo proizvedeno cjepivo koje je bazirano na imunološkim stanicama odobreno je 2010. godine od strane FDA, a naziva se sipuleucel-T (Provenge). Koristi se u liječenju karcinoma prostate tj. karcinoma prostate rezistentnog na kastraciju (CRPC, engl. *Castrate-resistant prostate cancer*). Sipuleucel-T je cjepivo koje je dizajnirano kako bi stvorilo protutumorski imunitet. Dizajniranje cjepiva započinje tako što je pacijent podvrgnut leukaferezi^{iv} kako bi se iz periferne krvi dobila krv koja prirodno sadrži stanice za predočavanje antigena (APC, engl. *antigen presenting cell*) i dendritičke stanice koje su ključni stanični elementi u protokolu ovog cjepiva. APC stanice i dendritičke stanice se izlože 36-44 sati rekombinantnom antigenu PA2024 koji je sintetički antigen sastavljen od fosfataze prostatske kiseline (PAP), odnosno proteina eksprimiranog u 95% karcinoma prostate i granulocita koji potiču koloniju makrofaga (GM-CSF, engl. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*). PAP/GM-CSF veže APC što rezultira stvaranjem zrelih PAP-specifičnih APC-a koji su spremni aktivirati pacijentove T-stanice kako bi one ciljale izložene PAP-ove na stanicama raka prostate. Tako aktivirani APC-ovi koji nose antigen vraćaju se natrag u organizam injektiranjem, a proces ukupno traje otprilike četiri dana. Iako cjepivo daje skromne rezultate, ima vrlo povoljan toksikološki profil zbog čega su u tijeku dodatna istraživanja o efikasnosti sipuleucela-T u kombinaciji s antihormonalnim terapijama. U kombinaciji s antiandrogenim hormonskim terapijama ovo cjepivo daje vrlo dobre rezultate.^{14,22,23,31,32}

2.3.2. Cjepivo na bazi peptida

Cjepiva na bazi peptida nude najfokusiraniji pristup ciljanju individualne tumorske stanice budući da su dizajnirana tako da izazivaju imunološki odgovor protiv jednog tumorskog antigena. Zbog toga daju vrlo malu vjerojatnost mogućim oštećenjima ostalih zdravih stanica. Međutim, prilikom korištenja ovakvih cjepiva postoje dva potencijalna ograničenja. Peptidna

^{iv} Leukaferaza je postupak odvajanja perifernih matičnih stanica iz cirkulacije davatelja.²⁰

cjepiva su HLA (HLA, engl. *human leukocyte antigen*) ograničena. Iako su većina tumorskih antigena proteini koji imaju visoki stupanj strukturalne homologije između različitih jedinki, imunogeni epitopi^v tih proteina su mali peptidi sačinjeni od 9 do 15 aminokiselina koji se prezentiraju na staničnoj površini tumorskih stanica zajedno s HLA molekulama. Zbog toga primjena peptidnih cjepiva zahtijeva prethodno poznavanje pacijentova HLA tipa. Drugi problem predstavlja nužnost prethodnog poznavanja imunogenih proteina, njihove ekspresije u različitim tumorima te peptidi izvedeni iz tog proteina koji zahtijevaju imunološki odgovor. Unatoč ovakvim ograničenjima, ovakva cjepiva imaju povoljan toksikološki profil.^{14,24}

Većina istraživanja na ovom području odnosi se na HER2 pozitivne karcinome (HER2 engl. *human epidermal growth factor receptor 2*; rak dojke) ili karcinome koji su povezani s Vaskularnim endotelnim faktorom rasta VEGF (VEGF engl. *Vascular endothelial growth factor*). Ukoliko se radi s poznatim proteinima koji se mogu koristiti kao B- ili T- stanični epitopi, dizajn cjepiva se temelji na veznom području antitijela. Ukoliko se radi o nepoznatom proteinu, epitop se može predvidjeti pomoću dostupnih podataka o antigenosti, hidrofilnosti te podacima o sekundarnoj strukturi proteina. Kako bi se taj proces olakšao, dostupni su brojni računalni algoritmi koji mogu olakšati vizualizaciju 3D strukture, odnosno postojanje okreta ili petlji koje se mogu iskoristiti u dizajnu cjepiva. Alternativno, epitopi se mogu eluirati iz MHC proteina APC vezanih antigena. Imunizacijom tako načinjenih epitopa moguće je stimulirati imunološki sustav u smjeru nastanka visoko specifičnih antitijela. Također, peptidi koji su kodirani mutiranim genima u stanicama mogu se iskoristiti kao epitopi T-stanica tzv. m-peptidi.³³

2.3.3. Cjepivo na bazi tumorskih stanica

Drugi pristup cjepivima protiv tumora je uporaba cijelih tumorskih stanica kao izvora imunogenog materijala. Glavna prednost ove vrste cjepiva je ta što ne postoje HLA ograničenja i što je moguće osigurati širok spektar epitopa protiv kojih imunološki sustav može uspostaviti obranu. Ova cjepiva mogu biti autologna (koja koriste tumorske stanice od pacijenata koja će primiti cjepivo) ili alogena (koja koriste standard tumorskih stanica drugog pacijenta). Jednom dobivene autologne ili alogene tumorske stanice mogu biti ozračene i pripremljene za imunizaciju bilo same ili uz korištenje adjuvansa kao što je GM-CSF.^{14,25}

^v Dio antigena koji specifično prepoznaju i vežu limfociti i protutijela²¹

Ovakva cjepiva mogu se pripraviti zračenjem cijelih stanica ili staničnih lizata. Ovom metodom omogućuje se sigurno cjepivo u kojem se nalaze tumorske stanice koje nemaju svojstvo replikacije, no one i dalje prirodno prezentiraju brojne TAA (TAA engl. *Tumor-associated antigens*). Time je izbjegnuto prethodno pročišćavanje, izoliranje te identifikacija antigena (TAA), a pojava TAA dovodi do automatskog pokretanja specifičnog imunološkog odgovora odnosno dovodi do olakšanog stvaranja CD8⁺ i APC antigen kompleksa.

Iako imaju brojne prednosti, postoje i nedostaci pri upotrebi ozračenih cijelih tumorskih stanica u dizajniranju cjepiva. Naime, nakon zračenja stanica, fosfatidilserin (imunosupresivni fosfolipid koji se najčešće nalazi na unutarnjem dvosloju plazmatske membrane) prenosi se na vanjski dvosloj. Ekspresija fosfatidilserina na staničnoj površini ozračenih stanica inducira izlučivanje imunosupresivnih^{vi} čimbenika te tako potiče imunosupresivno tumorsko okruženje. Nadalje, ozračene stanice mogu zadržati sposobnost lučenja imunosupresivnih čimbenika poput izvornih tumorskih stanica. Da bi se prevladala imunosupresivna priroda ovako dizajniranih cjepiva potrebno je generirati i dodati anti-fosfatidilserin antitijelo (npr. IL-2 imunocitokinski kompleks). Cjepiva dizajnirana od lizata tumorskih stanica omogućavaju bolju ekspresiju TAA, no pokazuju lošu imunogenost zbog prisustva imunosupresivnih molekula u lizatu. Ovi nedostaci se mogu donekle popraviti dodatkom adjuvansa, primjerice miješanjem lizata tumorskih stanica pluća s proteinom toplinskog šoka (HSP, engl. *heat shock protein*), a kao rezultat dolazi do inhibicije rasta tumora aktivacijom specifičnih citotoksičnih T limfocita te aktivacijom prirođenog imunološkog sustava. Druga strategija poboljšanja lizatnih cjepiva temelji se na korištenju dendritičkih stanica te njihove sposobnosti da vežu te prezentiraju antigen T-stanicama. Time je omogućena bolja aktivacija specifičnih CD4⁺ i CD8⁺ stanica kroz ranije opisanu interakciju preko MHC molekule.³⁴

2.4. Manipulacija imunosnim nadzornim točkama

Najnapredniji aspekt imunoterapije u onkologiji predstavlja manipulacija imunosnim nadzornim točkama. Imunosne nadzorne točke su prirodna zaštita tijela od autoimuniteta. Funkcioniraju tako što isključuju imunosni odgovor kako bi se spriječilo kolateralno oštećenje zdravih stanica aktiviranim limfocitima, a spadaju u pasivnu specifičnu imunoterapiju.^{12,14}

^{vi} Imunosupresija je smanjenje aktivacije ili efikasnosti imunološkog sustava.

Kao što je ranije spomenuto u radu, u zdravom organizmu život T-stanice započinje u timusu. Ondje se nezrele stanice razmnožavaju te stvaraju raznolike TCR rekombinacijom segmenata TCR gena. Nakon toga prolaze kroz postupak selekcije čime se eliminira autoreaktivnost ili disfunkcionalnost T-stanica (primjerice nedovoljno vezanje za kompleks MHC). Naivne T-stanice se oslobađaju u krv te cirkuliraju kroz slezenu i limfne organe. Tamo stupaju u interakcije s APC-ima koji na sebi nose nepoznate tumorske antigene. Kako bi se spriječio autoimunitet, brojni putevi imunološke kontrolne točke reguliraju aktivaciju T-stanica u više koraka. Središnju kontrolnu ulogu zauzimaju dva tipa inhibitora CTLA-4 (CTLA-4, engl. *Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*) te PD-1 (PD-1, engl. *Programmed cell death protein 1*) inhibitori. Inhibitori djeluju u različitim fazama imunološkog odgovora. CTLA-4 djeluje u početnoj fazi naivne aktivacije T-stanica najčešće u limfnim čvorovima, a PD-1 regulira prethodno aktivirane T-stanice u kasnijim fazama imunološkog odgovora prvenstveno u perifernim tkivima.

Zaraženo tkivo ima tendenciju zavaravanja imunološkog sustava odnosno, u ovom slučaju, najčešće se radi o blokadi ekspresijom ranije navedenih inhibicijskih molekula kontrolnih točaka.

Osnovni koncept imunoterapije manipulacijom nadzornih točaka je uklanjanje inhibicije, odnosno vezanih CTLA-4 i PD-1 primjenom monoklonskih antitijela koja mogu prekinuti inhibiciju nadzornih točaka.^{35,36}

2.4.1. CTLA-4 inhibitori

CTLA-4 (CTLA-4 engl. *cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*) je specijalizirana molekula koju proizvode T-stanice u ranim fazama njihove aktivacije u limfoidnim organima (koštana srž i timus). Nakon toga, CTLA-4 migrira na površinu stanice i deaktivira T stanicu kako bi spriječila prekomjerni imunosni odgovor te neželjenu autoimunost.

Ukoliko se zaustavi deaktivacija stanice T (CTLA-4 inhibitorima) povećava se protutumorski imunosni odgovor.^{3,12}

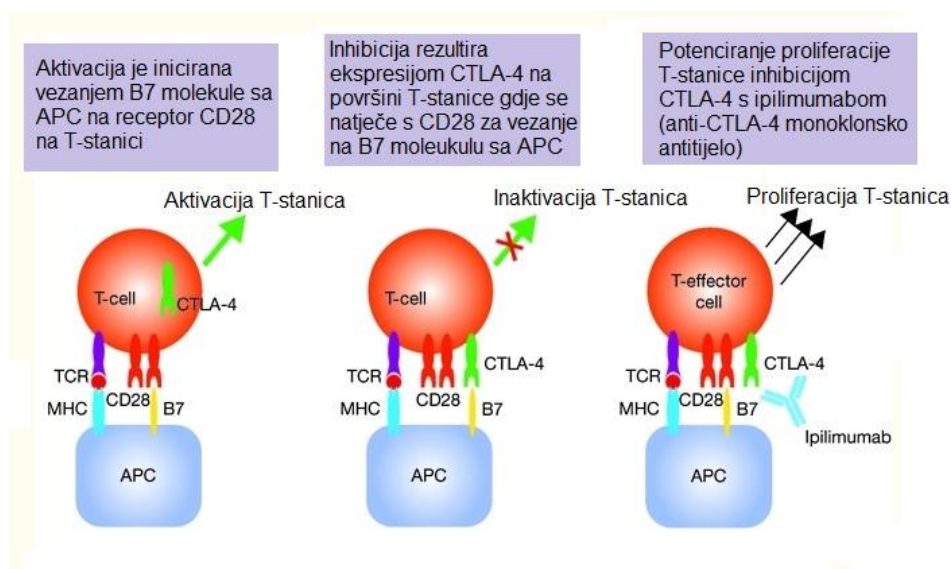
Aktivacija T-stanica je složen proces koji zahtijeva stimulacijski signal, vezanje TCR-a na MHC daje specifičnost aktivacije T-stanica, međutim potrebno je više signala kako bi se omogućila stimulacija. Vezanje molekula B7-1 (CD80) ili B7-2(CD86) na APC-u s molekulama CD28 na T-stanici uzrokuje signalizaciju unutar T-stanice. Signalizacija dovodi do proliferacije T-stanica te diferencijacije produciranjem citokina poput interleukina-2 (IL-

2). Uz navedeno, povećava se metabolizam energije te se reguliraju geni koji omogućavaju dulje preživljavanje stanica. CTLA-4 je CD28 homolog s mnogo većim afinitetom vezanja za B7, međutim za razliku od CD28, vezanje CTLA-4 ne daje stimulatívni signal. Kao takvo, ovo konkurentsko vezanje može spriječiti daljni put signala koji pruža CD28:B7 vezanje. Omjer vezanja CD28:B7 s CTLA-4:B7 određuje hoće li T-stanica doživjeti aktivaciju ili anergiju.^{vii}

Vezanje CTLA-4 na B7 iniciraju inhibicijske signale koji djeluju suprotno od ranije opisanih stimulatívnih signala tako što izravno inhibiraju TCR na imunološkoj sinapsi, inhibira CD28 odnosno njegov signalni put, a mogu prouzrokovati povećanu pokretljivost T-stanica čime se smanjuje sposobnost kemotaksije te ostvarivanja interakcija s APC.

U mirovanju naivnih T-stanica CTLA-4 se nalazi prvenstveno u unutarstaničnom odjeljku. Stimulacijski signali koji proizlaze iz TCR i vezanja CD28:B7 inducira lučenje CTLA-4 egzocitozom vezikula u kojima je pohranjen CTLA-4. Jača TCR signalizacija izaziva više CTLA-4 translokacije na površinu stanice.^{35,36}

Ipilimumab i tremelimumab (CP-675206) monoklonska su antitijela koja blokiraju CTLA-4 tako što se vežu na CTLA-4, time onemogućuju interakcije CTLA-4:B7 i omogućuju da se CD28 veže za B7-1 receptore kao što je to prikazano na slici 5.^{3,12,16}



Slika 5. Aktivacija/inaktivacija T-stanica te mehanizam djelovanja ipilimumaba.

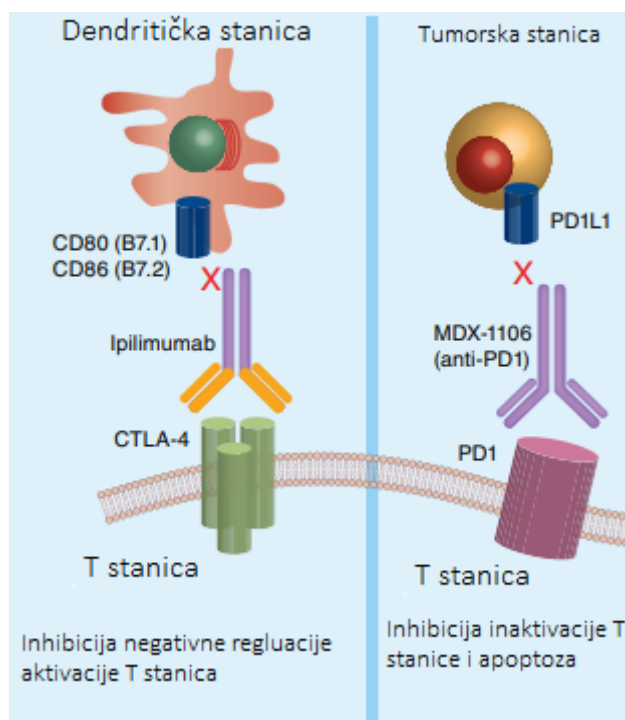
^{vii} Anergija je nesposobnost imune reakcije zbog nemogućnosti stvaranja specifičnih protutijela.³⁷

2.4.2. PD-1 inhibitori (PD-1/PD-L1 inhibitori)

PD-1 (PD-1, engl. *programmed cell death protein 1*) je specijalizirana molekula koja ublažava aktivnost T-stanica u njihovom odgovoru nakon što stignu na mjesto tumora. Sprječavanjem PD-1 („brava“) u vezivanju s PD-L1 („ključ“; *programmed cell death 1 ligand 1*), inhibitor PD-1/PD-L1 može ojačati i prolongirati protutumorski imunski odgovor.

PD-1 regulira aktivaciju T-stanica tako što se veže na ligande PD-L1 (PD-L1, engl. *programmed cell death 1 ligand*) te PD-L2 (PD-L2, engl. *programmed cell death 2 ligand*). Vezivanje PD-1 inhibira proliferaciju T-stanica, lučenje interferona- γ (IFN- γ), faktora nekroze tumora- α (FNT- α) i stvaranje interleukina-2 (IL-2). Ukoliko dođe do vezanja PD-1 na TCR, fosforilacija ključnih TCR signalin međuprodukata je onemogućena čime se gasi rano TCR signaliziranje. Prikazivanje PD-1 proteina je obilježje „iscrpljene“ T-stanice koja je već iskusi visoku razinu stimulacije ili je aktivnost CD4⁺ T-stanica smanjena. Ovakvo stanje se javlja tijekom kroničnih infekcija i karcinoma, a za rezultat daje neoptimalnu kontrolu infekcija ili tumora. Za razliku od CTLA-4 koji je ograničen samo na T-stanice, PD-1 je izražen na aktiviranim T-stanicama, B-stanicama i mijeloidnim stanicama. Dok CTLA-4 ima funkciju tijekom počente faze aktivacije T-stanica, PD-1 funkcionira tijekom efektorske faze. Raspodjela PD-L1 liganda također se razlikuje od one za CTLA-4, B7 ligandi za CTLA-4 prezentirani su na APC-ima dok su PD-L1 i PD-L2 šire izraženi. Ekspresija PD-L1 također se nalazi na mnogim vrstama tumora, a povezana je s povećanom količinom limfocita koji infiltriraju tumor. PD-1 ima veći afinitet vezanja za PD-L2 nego za PD-L1, a ta razlika može biti zaslužna za raznoliku zastupljenost tih liganada u imunološkom odgovoru. Inhibiranje PD-L1, za razliku od PD-1 inhibicije, blokirat će interakcije PD-1:PD-L1, a istovremeno će zadržati interakcije PD-1:PD-L2. To potencijalno može pružiti ciljaniji signal s manje neželjene toksičnosti. Nadalje, kako je poznato da PD-L1 veže CD80 kao i PD-1, PD-L1 inhibicija s odgovarajućim antitijelom može u teoriji također spriječiti PD-L1 reverzno signaliziranje i rezultirajuće smanjenje regulacije T-stanica kroz CD80. Antitijelo usmjereno na PD-L1 moglo bi također prekinuti interakcije PD-L1: CD80 na drugim stanicama u kojima se koeksprimiraju, poput dendritičnih stanica. Inhibicija inaktivacije T-stanice je prikazana na slici 6. pri čemu se jasno vidi da stanica raka ima mogućnost inaktivirati T-stanicu povoljnim PD1:PD-L1 interakcijama.^{35,36}

Monoklonska antitijela poput BMS-936558 (nivolumab) i MK-3475 blokiraju ovu imunološku interakciju PD-1 i PDL-1. Nivolumab je humano monoklonsko antitijelo koje cilja PD-1.^{3,16}



Slika 6. Manipulacija imunskim nadzornim točkama inhibitorima anti-CTLA-4 te anti-PD1/PDL1.¹⁷

Nekoliko CTLA-4 inhibitora i PD-1/PD-L1 inhibitora odobreni su za kliničku uporabu kod različitih tipova malignih oboljenja. Svi CTLA-4 inhibitori i PD-1/PD-L1 inhibitori su komercijalno dostupni kao ranije spomenuta monoklonska antitijela, odnosno kao specijalizirani ciljani proteini koji su izrađeni u laboratoriju, a vežu se za određenu molekulu. Takvi lijekovi se primjenjuju injekcijom ili intravenskom infuzijom, mogu se kombinirati uz neke dodatne metode liječenja (poput kemoterapije) ili mogu djelovati samostalno. U tablici 1. prikazani su svi trenutno odobreni lijekovi od strane FDA.^{3,17}

Tablica 1. Trenutno odobreni lijekovi za imunoterapeutske svrhe.^{3,16}

| Vrsta lijeka (imunoterapeutik) | Naziv |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| CTLA-4 inhibitor | Ipilimumab (Yervoy) |
| PD-1 inhibitor | Nivolumab, Pembrolizumab |
| PD-L1 inhibitor | Atezolizumab, Avelumab, Durvalumab |
| CD52 | Alemtuzumab |
| CD20 | Rituxumab |
| HER-2 | Trastuzumab (Herceptin) |
| | IFN- α (interferon) |
| | IL-2 (internuklin) |
| Prostata-specični antigen | Sipuleucel-T (cjepivo) |

2.5. Stimulacija imunoloških stanica citokininima

Citokini su peptidi ili glikopeptidi nalik na hormone, oni reguliraju intenzitet i trajanje imunološke reakcije. U krvotoku se ne nalaze u mjerljivim koncentracijama te ne djeluju na udaljena tkiva/stanice. Izlučuju se u vrlo niskim koncentracijama i uglavnom djeluju lokalno i kratkotrajno na druge stanice ili na same stanice koje ih luče. Sastavni su dio složenog sustava komuniciranja među imunokompetentnim stanicama, a ubrajamo ih u nespecifične imunoterapijske metode.

Postoji mnogo vrsta citokina, a neki od njih se mogu proizvesti i u laboratoriju. Citokine koristimo pri liječenju nekih tipova malignih bolesti krvi, a to su najčešće interferoni, interleukini, čimbenici rasta i drugi.⁶

2.5.1. Interferoni

Interferoni su skupina citokina koje luče razne vrste stanica, a možemo razlikovati tri osnovne skupine interferona: IFN- α (luče ga neutrofili, limfociti T i B i makrofagi), IFN- β (luče ga fibroblasti i makrofagi) te IFN- γ (luče ga aktivirani limfociti T i stanice NK).

U većini slučajeva, biosinteza interferona pomaže imunološki odgovor tako što inhibira replikaciju virusa u stanici domaćina, aktivira NK stanice i makrofage, pojačava

prezentaciju antigena limfocitima (tako što pojačava izraženost glavnih kompleksa tkivne podudarnosti, MHC) i povećava otpornost stanica prema virusnoj infekciji.

Velike doze interferona α djeluju kao kemoterapeutske agencije, direktno blokiraju rast kancerogenih stanica, povećavaju ekspresiju MHC klase I kompleksa tako što može inducirati višestruku gensku ekspresiju koja je povezana s preradom i prezentacijom antigena MHC klase I. Ekspresija gena je inicirana putem regulativnog faktora IRF-1 (IRF-1, engl. *Interferon Regulatory Factor 1*). IRF-1 se pokreće fosforilacijom STAT1 tako što vezanje IFN pokreće fosforilacijsku kaskadu JAK1/JAK2/STAT1.³⁸ Većom ekspresijom MHC klase I kompleksa omogućeno je bolje prepoznavanje antigena. Odobreni su za liječenje kronične mijeloidne leukemije (CML) i leukemije vlasastih stanica. Također se primjenjuju u liječenju mijeloma i non-Hodkinovog limfoma.^{6,13,14}

2.5.2. Interleukini

Interleukini su velika skupina citokina koje luče limfociti, a dijelom i mononuklearni fagociti te neke tkivne stanice. Njihova glavna funkcija je regulacija rasta i sazrijevanja stanica, a svaki citokin djeluje na određenu skupinu ciljnih stanica koje posjeduju receptor za taj citokin. S obzirom na stanice koje stvaraju interleukine, razlikujemo monokine (luče ih monociti) i limfokine (luče ih limfociti). Izlučuju se da bi aktivirali razmnožavanje i diferenciranje drugih limfocita.⁶

U imunoterapiji najpoznatiji interleukin je IL-2, koristi se u liječenju zloćudnih bolesti poput melanoma te leukemije. On aktivira i stimulira limfocite T te prirodne stanice ubojice (NK stanice). Kao odgovor na IL-2 stimulaciju, ove stanice stječu citolitička svojstva za koja se vjeruje da pojačavaju svoja anti-tumorska svojstva.^{12,14,15}

2.5.3. Čimbenici rasta

Čimbenik rasta ili *Colony stimulating factors*, kao što je GM-CSF ili sargramostim (leukin, prokin) stimulira rast i sazrijevanje mladih bijelih krvnih stanica. Neki čimbenici potiču dalju diferencijaciju stanica i izvan koštane srži. Krvotvorni čimbenici rasta proizvode se rekombinantnom tehnologijom i primjenjuju se u liječenju mnogih bolesti. U imunoterapiji primjenjuju se s ciljem da se smanje ili potpuno uklone štetni učinci citostatika i/ili zračenja te da se na taj način poveća otpornost organizma i omogući daljnje liječenje.^{6,12}

Tretmani koji se koriste u liječenju malignih bolesti mogu dovesti do hematološke toksičnosti, tromboembolije i neurotoksičnosti. Hematološka toksičnost često se manifestira kao manjak

leukocita (leukopenija) ili kao manjak neutrofila (neutropenija). GM-CSF je citokin koji se najviše koristi kao hemopoietin u kliničkoj praksi, a može pospješiti aktivaciju, proliferaciju i diferencijaciju mijeloidnih prekursorskih stanica u tijelu čime nastaju leukociti i neutrofili, a time se popravljaju parametri krvne slike poput WBC-a (WBC, engl. *white blood cells*) i ANC-a (ANC, engl. *absolute neutrophil count*). GM-CSF također može poboljšati funkciju zrelih granulocita i mononuklearnih fagocita što doprinosi bržem oporavku i boljem imunološkom odgovoru.³⁹

2.5.4. Ostali citokini

Najvažniji preostali citokin je čimbenik tumorske nekroze (TNF, engl. *tumor necrosis factor*) koji je važan u regulaciji upala. TNF- α luče makrofagi i NK stanice, a TNF- β limfociti T. Obje vrste TNF mogu djelovati i protutumorski.

TNF igra važnu ulogu u različitim staničnim događajima kao što je preživljavanje stanica, proliferacija, diferencijacija i smrt. TNF izlučuju upalne stanice kao proupalni citokin, a mogu biti uključene u karcinogenezu povezanu s upalom. TNF aktivira različite signalne putove poput nuklearnog faktora κ B (NF- κ B) i c-Jun N-terminalne kinaze (JNK). NF- κ B je glavni antiapoptičan signal, odnosno signal za preživljavanje stanica, dok trajna aktivacija JNK doprinosi staničnoj smrti. Što se tiče raka TNF bi mogao biti endogeni promotor tumora, jer TNF potiče rast, proliferaciju, invaziju i metastaze stanica karcinoma i angiogenezu tumora. S druge strane, TNF bi mogao biti ubojica raka. Svojstvo TNF-a u induciranju smrti stanica raka čini ga potencijalnim terapijskim lijekom protiv raka. TNF može aktivirati kaskadu MAPK (ERK, JNK i p38). U većini stanica JNK je glavni MAPK koji TNF inducira. Aktivacija JNK posredovana putem TNFR-a transducira se pomoću TRAF2 i RIP sekvencionalnom fosforilacijom modula MAP kinaze MAP3K-MAP2-MAPK. MAP3K za JNK uključuje obitelji MAP/ERK kinaza (MEKK) kao što su ASK1 (ASK1, engl. *apoptosis signal-regulating kinase 1*), MLK (MLK, engl. *mixed lineage kinase*) i TAK1 (TAK1, engl. *transforming growth factor activated kinase 1*). Postoje dva MAP2K-a (JNKK1 / MKK4 / SEK1 i JNKK2 / MKK7) koji aktiviraju JNK. Dvije JNK kinaze (JNKK) fosforiliraju JNK na Thr183 i Tyr185, što dovodi do njegove aktivacije i apoptoze.⁴⁰

Također, veliku skupinu citokina čine kemokini čije je glavno djelovanje kemotaksija. Dijele se prema građi na skupinu CC (privlače makrofage) te skupina CXC (privlače neutrofile i limfocite).⁶

2.6. Adoptivna imunoterapija

Adoptivna imunoterapija se temelji na prijenosu (transferu) imunoloških stanica, a najkorištenija metoda je adoptivni celularni transfer (ACT, engl. *adoptive cellular transfer*). ACT je prijenos prirodno prisutnih ili genetski modificiranih populacija T-stanica uzgojenih *ex vivo* u organizam bolesnika koji boluju od metastatskih tumora. U samim začetcima ove metode korišteni su tumorski infiltrirani limfociti u kombinaciji s IL-2. Postotak pacijenata koji su postigli potpunu ili djelomičnu remisiju je i dalje bio vrlo nizak što je dovelo u pitanje životni vijek presađenih stanica. Unatoč velikom broju presađenih stanica, nakon samo tjedan dana pacijenti su imali vrlo malen udio presađenih stanica. Daljnjim istraživanjima dokazano je kako ACT u kombinaciji s kemoterapijom ili radioterapijom daje znatno bolje rezultate.^{3,14}

2.6.1. Infuzija donorskih limfocita

Infuzija doniranih limfocita je oblik adoptivne imunoterapije koji se primjenjuje kod kronične mijeloidne leukemije (CML, engl. *Chronic myelogenous leukemia*). Presađivanju alogene koštane srži prethodi intenzivna kemoterapija/radioterapija s ciljem tretmana raka te sprečavanja imunološkog sustava da odbaci donirane stanice. Osim tretmana radiokemoterapijom, na uspjeh uvelike utječe i učinak doniranih limfocita da napadnu zloćudne stanice. Infuzijom donorskih stanica, imunosni sustav pacijenta se rekonstruira. Donor i pacijent imaju vrlo slično tkivo koje nije isto, a donorski limfociti mogu prepoznati manju razliku u histokompatibilnosti antigena na stanicama raka i definirati ih kao metu za napad.^{12,14}

Prilikom infuzije donorskih stanica oboljeloj osobi javlja se mogućnost napada donorskih limfocita na stanice pacijenta (GvHD, engl. *graft versus host disease*). Kao rezultat GvHD-a pojavljuju se oštećenja kože, jetre i probavnog sustava.¹⁴

2.6.2. Ne-mijeloablativne transplatacija

Ključ uspjeha ne-mijeloablativne transplatacije leži u takozvanom GVM učinku (GVM, engl. *Graft versus malignancy effect*). On se temelji na napadu donorskih limfocita na pacijentove stanice raka. Ovaj efekt se ne pojavljuje prilikom autologne transplantacije (kod koje se koriste vlastite matične stanice) i sigenične transplantacije (koja koristi stanice identičnog blizanca) jer donorske stanice ne prepoznaju stanice raka i ne uništavaju. Ova metoda također koristi kemoterapiju blagog inteziteta prije alogene transplantacije koštane srži, a nakon toga

se daju imunosupresivni lijekovi u visokim dozama kako bi se spriječilo odbacivanje doniranih stanica. Ukoliko se donirane stanice uspješno održe, one postaju dominantne u pacijentovom imunom sustavu i krvi. Postoji mogućnost da se takav ishod ne dogodi. U tom slučaju primjenjuje se infuzija donorskih limfocita kako bi se pospješila promjena matičnih stanica iz pacijentovih u donorske. Istraživanja su pokazala da najjači učinak GVM-a prilikom ove metode liječenja se postiže u pacijenata oboljelih od kronične mijeloidne leukemije. Zbog nešto blažeg pristupa ova metoda je pogodna za starije pacijente i one koji imaju kardiovaskularnih problema. Također i ova metoda nosi rizik od pojave GvHD-a.^{12,14,18}

2.7. Budućnost primjene imunoterapije

Imunoterapija je učinkovita terapija primjenjiva na pacijentima s raznim malignim oboljenjima. Mnogi imunoterapijski pristupi pokazali su se vrlo učinkovitim za terapiju širokog spektra malignih oboljenja, neki od njih se baziraju na široj aktivaciji imunološkog sustava, dok drugi imaju nešto uže područje djelovanja. Nadalje, imunoterapija može biti bazirana na pojedinoj stanici, specifična za svakog pojedinog pacijenta, a može zahtijevati i intervencije staničnog inženjerstva da bi se prilagodila pacijentima. Kako bi imunoterapija bila djelotvorna, nužno je uzeti u obzir zdravstveno stanje pacijenta, vrstu tumora koji je potrebno liječiti, postaviti realni cilj terapije te najnužniji kriterij - vrijeme. Potrebno je procijeniti napredak bolesti jer imunoterapija iziskuje određen vremenski period kako bi počela djelovati, a to može biti presudno u uspješnosti terapije. Vrijeme je tako na žalost presudan kriterij kod liječenja bolesti, no u ranim fazama otkrivanja daje povoljne ishode. Dobra strana imunoterapije leži u mogućnosti usmjerenog ciljanja malignih stanica čime je moguće sačuvati okolno tkivo od oštećenja koja su česta pojava prilikom korištenja drugih onkoloških metoda (primjerice kod kemoterapije ili zračenja). Ipak, imunoterapija izaziva neke od nuspojava ovisno o tipu bolesti, no one mogu izazivati brojne komplikacije (npr. osip, mučnine, gastroenterološki problemi i sl.).

Istraživanja predviđaju da cjepiva imaju snažnu stimulaciju imunoloških stanica na mjestu ubrizgavanja budući da se primjenjuju lokalno. Nuspojave citokina, s druge strane, oponašaju simptome koji se javljaju tijekom infekcije ili u vrijeme visokog imunološkog djelovanja. Slično tome, blokada kontrolnih točaka pokreće široku aktivaciju imunološkog sustava. Kao rezultat, ove metode izazivaju akutne simptome infekcije. Kako bi se ublažile nuspojave primjenjuju se simptomatska sredstva ili imunosupresivi koji će ublažiti hiperimuni odgovor

(načešće steroidni pripravci). Korištenjem imunosupresiva dolazi do slabljenja željenog antitumorskog učinka. Druga važna značajka imunoterapije su dugoročni antitumorski učinci koji se vide zahvaljujući imunološkom pamćenju. Nažalost, imunološka memorija također može uzrokovati dugotrajne probleme i nuspojave ako se nehotično stvori imunitet protiv normalnog tkiva (autoimune bolesti). Trenutno se provode istraživanja kako bi se identificirali i okarakterizirali imunološki mehanizmi koji se mogu precizno prilagoditi imunološkom odgovoru na zloćudne stanice i uspostaviti korisne, široko primjenjive terapije temeljene na imunosti, koje bi jednog dana mogle postati dio rutinskog standarda skrbi u liječenju raka.¹⁴

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. <http://www.msds-prirucnici.placebo.hr/msds-prirucnik/immunologija-i-alergije/biologija-immunosustava> (datum pristupa 15.svibanj 2020.)
2. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=45473> (datum pristupa 15.svibanj 2020.)
3. ESMO serija vodiča za bolesnike , Što su nuspojave imunoterapije, Autorsko pravo 2017 European Society for Medical Oncology (datum pristupa 17.ožujak.2020.)
<https://www.esmo.org/content/download/260621/5028716/1/HR-ESMO-Nuspojave-Povezane-s-Imunoterapijom-i-Njihovo-Zbrinjavanje-Vodic-za-Pacijente.pdf>
4. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=36574> (datum pristupa 15.svibanj 2020.)
5. <http://www.msds-prirucnici.placebo.hr/msds-za-pacijente/poremecaji-immunoloskog-sustava/biologija-immunoloskog-sustava/sastavnice-immunoloskog-sustava> (datum pristupa 18.svibanj 2020.)
6. J. Lukač, Imunologija, Skripta iz predmeta imunologija za studente Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, 2004. str. 7-20, 35, 21-32
7. <https://imunizacija.hr/kako-radi-immunoloski-sustav-u-slikama/> (datum pristupa 18.svibanj 2020.)
8. <http://www.msds-prirucnici.placebo.hr/msds-prirucnik/immunologija-i-alergije/biologija-immunosustava/komponente-immunosustava> (datum pristupa 20.svibanj 2020.)
9. <http://www.msds-prirucnici.placebo.hr/msds-za-pacijente/poremecaji-immunoloskog-sustava/biologija-immunoloskog-sustava/immunost-i-immunoloski-odgovor> (datum pristupa 20.svibanj 2020.)
10. <https://www.onkologija.hr/sto-je-rak/> (datum pristupa 20.svibanj 2020.)
11. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=62675> (datum pristupa 20.svibanj 2020.)
12. <https://www.onkologija.hr/immunoterapija/vrste-immunoterapije/> (datum pristupa 27.srpanj 2020.)
13. <http://www.antimicrobe.org/drugpopup/interferons.htm> (datum pristupa 27.srpanj 2020.)
14. G. Alatrash , H. Jakher, P. D. Stafford, E. A. Mittendorf, Cancer immunotherapies, their safety and toxicity, University Library Utrecht, 2013.

15. J. M. Redman, G.T. Gibney, M.B. Atkins, Advances in immunotherapy for melanoma, *BMC Medicine* **14** (2016.)
16. J. A. Trapani, P. K. Darcy, Immunotherapy of cancer, *Focus, AFP*, vol.46, NO.4, 2017.
17. K. Y. Helmy, S. A. Patel, G. R. Nahas, P. Rameshwar, Cancer immunotherapy: accomplishments to date and future promise, *Ther. Deliv.* (2013) 4(10), 1307–1320
18. M. Sanlorenzo, I. Vujic, C. Posch, A. Dajee, A. Yen, S. Kim, M. Ashworth, M. D. Rosenblum, A. Algazi, S. Osella-Abate, P. Quaglino, A. Daud, S. Ortiz-Urda, Melanoma immunotherapy, *Cancer Biology & Therapy* 15:6, 665–674; Landes Bioscience, 2014.
19. B. Allard, S. Aspeslagh, S. Garaud, F.A. Dupont, C. Solinas, M. Kok, B. Routy, C. Sotiriou, J. Stagg, L. Buisseret, Immuno-oncology-101: overview of major concepts and translational perspectives, *Seminars in Cancer Biology* 52 (2018) 1–11
20. <https://blog.dnevnik.hr/zelimzivot/2006/12/1621835861/cesto-postavljana-pitanja-o-donorstvu-i-mogucnostima-donacije-faq.html> (datum pristupa 8.8.2020.)
21. <http://struna.ihjj.hr/naziv/epitop/25812/> (datum pristupa 8.8.2020.)
22. E. Anassi, U. Anadu Ndefo, Sipuleucel-T (Provenge) Injection, The First Immunotherapy Agent (Vaccine) For Hormone-Refractory Prostate Cancer, *P T.* 2011 Apr; 36(4): 197–202.
23. <https://www.provenge.com/immunotherapy-for-advanced-prostate-cancer#how-provenge-works> (pristupljeno 9.8.2020.)
24. C. L. Slingluff, The Present and Future of Peptide Vaccines for Cancer: Single or Multiple, Long or Short, Alone or in Combination?, *Cancer J.* 2011 Sep; 17(5): 343–350.
25. <https://immuno-oncologynews.com/tumor-cell-vaccines/> (pristupljeno 9.8.2020.)
26. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai, Cellular and molecular immunology, Elsevier saunders, Philadelphia, 2015.
27. R. A. Goldsby, T. J. Kindt, B. A. Osborne, J. Kuby, Immunology, W.H. Freeman & Co Ltd., New York. 2006.
28. <https://enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=25807> (pristupljeno 19.9.2020.)
29. https://www.pmf.unizg.hr/download/repository/11.Imunogenetika_MHC.pdf (pristupljeno 20.9.2020.)
30. Gonzalez, H., Hagerling, C., & Werb, Z. (2018). Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes & development*, 32(19-20), 1267–1284. <https://doi.org/10.1101/gad.314617.118>

31. Carballido, E., Fishman, M. Sipuleucel-T: Prototype for Development of Anti-tumor Vaccines. *Curr Oncol Rep* 13, 112–119 (2011). <https://doi.org/10.1007/s11912-011-0152-5>
32. Anassi E, Ndefo UA. Sipuleucel-T (provenge) injection: the first immunotherapy agent (vaccine) for hormone-refractory prostate cancer. *P T*. 2011;36(4):197-202.
33. Gokhale AS, Satyanarayanajois S. Peptides and peptidomimetics as immunomodulators. *Immunotherapy*. 2014;6(6):755-774. doi:10.2217/imt.14.37
34. Srivatsan S, Patel JM, Bozeman EN, et al. Allogeneic tumor cell vaccines: the promise and limitations in clinical trials. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(1):52-63. doi:10.4161/hv.26568
35. 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. doi:10.1097/COC.0000000000000239
36. Rotte, A. Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 38, 255 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1259-z>
37. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=2709> (pristupljeno 22.9.2020.)
38. Zhou F. Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. *Int Rev Immunol*. 2009;28(3-4):239-60. doi: 10.1080/08830180902978120. PMID: 19811323.
39. Yu WL, Hua ZC. Evaluation of effectiveness of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor therapy to cancer patients after chemotherapy: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2018;9(46):28226-28239. Published 2018 Jun 15. doi:10.18632/oncotarget.24890
40. Wang X, Lin Y. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes?. *Acta Pharmacol Sin*. 2008;29(11):1275-1288. doi:10.1111/j.1745-7254.2008.00889.x