



Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

# **Immunterapi mot melanom – är adoptiv immunterapi framtiden?**

*Petra Ödmark*

---

Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp  
Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2013:63  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap  
Uppsala 2013

---





Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

## **Immunterapi mot melanom – är adoptiv immunterapi framtiden?**

Immunotherapy for melanoma – may adoptive immunotherapy be the future?

*Petra Ödmark*

**Handledare:**

Eva Hellmén, SLU, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

**Examinator:**

Eva Tydén, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Omfattning:** 15 hp

**Kurstitel:** Självständigt arbete i veterinärmedicin

**Kurskod:** EX0700

**Program:** Veterinärprogrammet

**Nivå:** Grund, G2E

**Utgivningsort:** SLU Uppsala

**Utgivningsår:** 2013

**Omslagsbild:** -

**Serienamn, delnr:** Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2013:63  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

**On-line publicering:** <http://epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** Immunterapi, melanom, adoptiv celltransfer, mekanismer, tumörinfiltrerande lymfocyter.

**Key words:** Immunotherapy, melanoma, adoptive cell transfer, mechanisms, tumor infiltrating lymphocytes.



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning .....	1
Abstract .....	2
Inledning.....	3
Material och metoder.....	3
Litteraturöversikt.....	3
Immunförsvar mot tumörer .....	3
Melanom.....	4
Immunterapi vid melanom .....	4
Vacciner.....	5
Cytokiner .....	5
Toll-like receptor-9 agonister .....	5
Antikroppar .....	6
Hämning av regulatoriska T-celler.....	6
Adoptiv immunterapi .....	6
Utmaningar med adoptiv immunterapi.....	7
Val av celler.....	7
Förbehandling.....	7
Odling av T-celler .....	9
Diskussion .....	11
Litteraturförteckning .....	13

## SAMMANFATTNING

Melanom är en av de mest immunogena (immunstimulerande) tumörformerna och immunterapi har därför varit en behandlingsform som studerats för att undkomma de svåra biverkningar som erhålls vid de konventionella behandlingsmetoderna, som cytostatika och strålning. Det finns många olika strategier för att inverka på och aktivera immunförsvaret och flera immunterapier finns redan godkända och används idag för behandling av melanom. Flera av dessa terapier verkar dock genom att generellt stimulera immunförsvaret vilket resulterat i betydande biverkningar samt haft förhållandevis liten effekt mot tumörerna. Endast en liten andel (som högst 6%) har uppvisat en så kallad fullständig respons, det vill säga blivit helt fria från tumörer vid dessa behandlingar. Adoptiv immunterapi går ut på att man ”tränar” och aktiverar patientens egna T-celler *in vitro* att känna igen och angripa tumörceller och återinjicerar dem sedan, vilket resulterat i en mer riktad behandling med flera gånger högre effektivitet mot tumörerna jämfört med andra immunterapier och man har nått upp till en fullständig respons på 22 %. Det är en komplex metod med flera olika steg där utvecklingsmöjligheter finns. Först måste man välja vilka T-celler man ska använda sig av. Man har framgångsrikt använt sig av T-celler tagna direkt från tumören, men sitter tumören olämpligt är detta inte alltid möjligt och man har därför även börjat studera möjligheten att genetiskt modifiera T-celler tagna från blodet. För bästa effekt av T-cellerna måste patientens immunförsvaret dämpas före återinjicering. Interleukin 2 (IL-2) injiceras också i samband med återinjiceringen för att stimulera T-cellerna. Denna förbehandling och injektion av IL-2 har visat sig vara toxisk och lett till biverkningar och därför behöver man finna mer specifika sätt att hämma immunförsvaret och stimulera det med IL-2 endast i tumören för att minska toxiciteten. Hur länge och på vilket sätt T-cellerna ska odlas *in vitro* är en annan utmaning och man har bland annat funnit att kortare odlingstid av T-cellerna innan återinjicering har gett effektivare svar. Kortare tid innan återinjicering ger också tumören/tumörerna mindre tid att utvecklas innan behandling. På grund av sin höga effektivitet och specificitet är adoptiv immunterapi en lovande behandlingsform mot melanom för framtiden, men mycket finns att utveckla. Att kombinera adoptiv immunterapi med andra immunterapier kan vara ett sätt att öka effektiviteten ytterligare. Man borde också försöka hitta enklare metoder att framställa T-celler för adoptiv immunterapi. Detta är troligtvis också nödvändigt då många sjukhus inte har de resurser som krävs för att utföra denna typ av behandling.

## ABSTRACT

Melanoma is one of the most immunogenic (immune response evoking) tumours, hence immunotherapy has been of interest as a treatment to escape the severe side effects obtained in the conventional treatments like chemotherapy and radiation. There are many different strategies to influence and activate the immune system and several immunotherapies are already approved and currently used for the treatment of melanoma. Many of these therapies work, however, by generally stimulating the immune system, resulting in substantial adverse effects and relatively little effect on the tumours. Only a small percentage (at most 6 %) has exhibited a so-called complete response that is become completely free from tumours, in these treatments. Adoptive immunotherapy works by “training” and activating the patient’s own T-cells *in vitro* to recognize and attack the tumour cells and then reinject the stimulated T-cells in the patient. This has resulted in a more targeted treatment with several times higher efficacy against tumours compared with other immunotherapies and has reached a complete response of 22 %. However, it’s a complex technique with multiple steps and opportunities for development. First one must decide which T-cells to use. T-cells taken directly from the tumour have successfully been used, but in case the location of the tumour is inappropriate this can be difficult and not always possible. Therefore, the possibility to genetically modify T-cells taken from the patient’s blood to attack tumours has begun to be examined. Before the T-cells are reinjected the patient’s immune system has to be suppressed in order to get the best effect of the stimulated T-cells. Interleukin 2 (IL-2) is also injected in connection with the reinjection to stimulate the T-cells. This pre-treatment and injection of IL-2 has shown to be toxic and led to adverse effects why more specific ways to inhibit the immune system and stimulate with IL-2 only at the tumour site to reduce the toxicity is sought. How long and in what way the T-cells should be cultured *in vitro* is another challenge, for example shorter time in culture before reinjection has generated a better response. Shorter time before reinjection also gives the tumour/tumours less time to develop before treatment. Because of its high efficacy and specificity, adoptive immunotherapy, is a promising treatment for melanoma in the future even though there is still a lot to develop. Combining adoptive immunotherapy with other kinds of immunotherapies could be a way to increase the efficacy further and more research is required. Finding simpler methods for producing T-cells for adoptive immunotherapy is probably also necessary since many hospitals don’t have the resources required to perform this type of treatment.

## **INLEDNING**

Användningen av immunterapi vid bekämpning av tumörer har många fördelar då det är en metod som till skillnad från cytostatika och strålning framförallt attackerar tumörceller och inte normala celler. Då melanomtumörer är en av de mest immunogena tumörformerna (Zito & Kluger, 2012) har jag i denna litteraturstudie valt att studera användningen av immunterapi hos melanom. Många metoder inom immunterapi finns att tillämpa, men i målet att finna en terapiform med så hög effektivitet och specificitet som möjligt och därigenom öka överlevnaden och reducera toxiciteten, har adoptiv immunterapi visat sig i framkant (Rosenberg et al., 2011). Därför ligger fokus i denna litteraturstudie på denna form av immunterapi. I adoptiv immunterapi, eller adoptiv celltransfer som det också kallas, använder man sig av patientens egna T-celler och stimulerar/"tränar" dem utanför kroppen att känna igen och döda tumörceller innan man återinjicerar dem i patienten (Gattinoni et al., 2006). Detta är en komplex process med många olika steg: hur man ska komma åt T-cellerna/vilka T-celler man ska använda sig av, hur T-cellerna ska stimuleras utanför kroppen och hur patienten ska behandlas under tiden för att optimera behandlingen. En rad olika strategier kan tillämpas vid dessa steg och kommer att diskuteras i denna litteraturstudie. Hur kan man utveckla utformningen av behandlingen och hur effektiv är adoptiv immunterapi i förhållande till andra immunterapier mot melanom?

## **MATERIAL OCH METODER**

För att finna artiklar till denna litteraturstudie har främst internetdatabaser använts, huvudsakligen Web of Knowledge, PubMed och Google Scholar. Sökord har varit exempelvis melanoma, adoptive, immunotherapy, cell transfer, mechanisms. Översiktsartiklar har också använts för att hitta referenser.

## **LITTERATURÖVERSIKT**

### **Immunförsvar mot tumörer**

Tumörceller är i grunden är kroppsegna och därför kan det vara svårt för immunförsvaret att upptäcka och eliminera dessa. På senare år har forskning visat att tumörceller faktiskt uppvisar antigen även om många är svagt immunogena, alltså är dåliga på att aktivera immunförsvaret (Zachary & McGavin, 2011). Tumörantigen kan exempelvis vara onormala cellprodukter genererade av mutationer, en överproduktion av kroppsegna antigen eller en överproduktion av antigen som normalt bara ska uttryckas i vissa differentieringsstadier. Glykoprotein 100 (gp100) och Melanoma Antigen Recognized by T-cells (MART) är exempel på differentieringsantigen som vanligtvis överuttrycks vid melanom (Morgan et al., 2006).

Tumörantigenen uppvisas på major histocompatibility complex I (MHC I) som är ett proteinkomplex som uttrycks av alla celler och visar upp peptider av intracellulära proteiner (Zachary & McGavin, 2011). Peptiderna på MHC I läses av cytotoxiska T-celler som uppfattar dem som "själv" eller "icke-själv", alltså kroppseget eller inte, och angriper de celler vars MHC I uppvisar peptider som är "icke-själv". Antigenpresenterande celler (APCs),



exempelvis dendritiska celler, visar upp antigen från tumören med hjälp av MHC I och II för naiva T- och B-celler. MHC II är liksom MHC I ett proteinkomplex som presenterar peptider som kan uppfattas som "själv" eller "icke-själv" men som endast uttrycks av antigenpresenterande celler och lymfocyter. T-cellerna differentieras sedan till cytotoxiska T-lymfocyter (CD8+) och T-hjälparceller (CD4+) och B-cellerna blir antikroppsproducerande plasmaceller. De cytotoxiska T-lymfocyterna känner igen antigen presenterat på MHC I hos tumörerna och tros ha den största effekten mot dessa. Andelen CD8+ T-celler har visat sig spela signifikant roll vid behandling av melanom (Besser et al., 2010). T-hjälparcellerna kräver presentation via MHC II av antigenpresenterande celler och stimulerar sedan cytotoxiska T-celler, Natural Killer (NK)-celler, makrofager och B-celler genom att producera cytokiner som interleukin-2 (IL-2) och interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Zachary & McGavin, 2011). Det cellmedierade svaret tros vara det mest effektiva mot solida tumörer, men det humoral försvar kan också verka mot tumörer bland annat genom att antikroppar bundna till antigen på tumörcellerna hjälper NK-celler och makrofager att hitta dessa. Tumörer har flera strategier att undkomma immunförsvaret. Vissa kan nedreglera MHC I vilket gör att de inte upptäcks av cytotoxiska T-celler, dock exponeras de då för NK-cellerna som framförallt angriper celler som saknar MHC. Tumörer kan även skapa tolerans då de är väldigt lika normala celler och saknar kostimulatoriska molekyler vilka binder mellan cellen och T-cellen och krävs för aktivering av T-celler. Tumörcellerna kan också till viss del maskera sina antigen med andra molekyler. Slutligen har det visat sig att tumörer kan verka immunosuppressivt, bland annat genom att producera transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), Fas-ligand (Zachary & McGavin, 2011) och uttrycka ligander till PD-1 (programmed cell death-1) (Curran et al., 2010) som alla verkar hämmande på T-celler.

## **Melanom**

Melanom är en cancerform som härstammar från kroppens melanocyter. Dessa celler har sitt ursprung i neurallisten och tillverkar kroppens pigment, melanin. De återfinns framförallt i huden där mer än 50% av fallen uppstår, men de förekommer i alla kroppens pigmenterade organ. Metastasering betyder ofta dålig prognos och kan ske överallt i kroppen, lever och lungor är dock ofta utsatta (National Cancer Institute, 2012).

## **Immunterapi vid melanom**

Melanom anses vara en av de mest immunogena tumörformerna och har därför studerats flitigt inom immunoterapiforskningen (Zito & Kluger, 2012). Målet med immunterapi är att stimulera immunförsvaret, både aktiviteten och proliferationen, rikta det specifikt mot tumörcellerna samt att dämpa de regulatoriska signalerna som hämmar immunförsvaret.

Det finns en rad olika angreppspunkter inom immunförsvaret som kan utnyttjas vid utformandet av immunterapi, dessa presenteras nedan. Kombinationer av dessa kan i många fall vara till fördel.

## **Vacciner**

För att stimulera och rikta immunförsvaret mot tumören kan man vaccinera med hela/lyserade tumörceller, med peptider som fungerar som antigen hos tumörerna eller med plasmider/virala vektorer som uttrycker dessa peptider. Genom att använda sig av dendritiska celler och ladda dessa med lyserade tumörceller som uttrycker melanomassocierade antigen exempelvis Melanoma Associated Antigen-A (MAGE-A), tyrosinas, MART-1 och gp100 kommer dessa presenteras på både MHC I och MHC II vilket leder till att antigenen blir synliga för både CD8<sup>+</sup> och CD4<sup>+</sup> T-celler och mediera ett bredare immunsvaret (Salcedo et al., 2006).

## **Cytokiner**

Cytokiner kan användas för att stimulera immunförsvaret. De används ofta postoperativt eller som adjuvans tillsammans med andra tekniker. IL-2 och IFN- $\alpha$  är de cytokiner som idag finns godkända av Food and Drug Administration (FDA) för behandling av melanom. Användningen av andra cytokiner som IL-21, IL-7, IL-15 och IL-18 som också spelar stor roll för aktiveringen av cytotoxiska T-celler undersöks också för behandling av melanom (Zito & Kluger, 2012).

Cytokinen IL-2 används inom immunterapi mot melanom då den aktiverar cytotoxiska T-celler, T-hjälparceller och NK-celler samt ökar proliferationen och cytotoxiciteten (Tizard, 2009) och alltså stimulerar det cellmedierade svaret som är effektivast mot tumörer. IL-2 utsöndras naturligt av Th1-och NK-celler. Behandling med IL-2 har visat sig ge signifikant effekt mot melanom och systemisk behandling godkändes av FDA 1998 (Weide et al., 2010). Nackdelen med IL-2 är att det är väldigt toxiskt och kan ge bieffekter såsom feber, trötthet och illamående.

IFN $\alpha$  produceras av lymfocyter och har en mängd funktioner som bidrar till försvar mot tumörer. Bland annat så stimulerar IFN $\alpha$  makrofager, NK-celler och presentation av antigen för T-celler (Zachary & McGavin, 2011) och på grund av detta används IFN $\alpha$  ofta som adjuvans i samband med vaccinering för att öka svaret mot de antigenen man injicerar. I en studie av Sikora et al., (2009) fann man att användningen av IFN $\alpha$  som adjuvans tillsammans med vaccinering med gp100 gav en signifikant ökning av svaret hos de gp100-specifika CD8<sup>+</sup> T-cellerna, att överlevnaden och proliferationen hos dessa T-celler ökade och att fler CD8<sup>+</sup> T-celler med minnesfenotyp fanns kvar i kroppen under längre tid.

## **Toll-like receptor-9 agonister**

Toll-like receptor 9 (TLR-9) är en receptor som bland annat uttrycks av dendritiska celler. TLR-9 känner igen deoxycytidyl-deoxyguanosin oligodeoxynukleotider som liknar ometylerade sekvenser i bakteriellt DNA (CpG ODNs). Dessa fungerar som pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) och stimulerar mognad av dendritiska celler vid bindning till ligand, vilket leder till antigenpresentation för T-celler. Genom att tillföra en syntetisk ODN (CpG 7909), som adjuvans tillsammans med vaccinering med melanomantigen (Melan-A), erhöll man signifikant fler Melan-A-specifika CD8<sup>+</sup> T-celler reaktiva mot melanomceller som uttrycker detta antigen, jämfört med vaccination med endast

Melan-A. Andelen naiva T-celler var också ovanligt låg efter vaccinering vilket visar att denna TLR-9 agonist har förmågan att stimulera immunförsvaret (Speiser et al., 2005).

### ***Antikroppar***

För att T-celler ska bli fullt aktiverade krävs dels bindning av T-cellsreceptor till peptid presenterad av antigenpresentatörer på MHC, men även bindning av costimulatoriska molekyler från den antigenpresenterande cellen till T-cellens CD28 (Zachary & McGavin, 2011). Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) är en homolog till CD28 som vid bindning till ligand verkar inhibitoriskt på T-cellen. PD-1 (programmed death-1) är en annan receptor på T-cellen som verkar inhiberande och kan leda till anregi (inaktivering) eller apoptos hos cellen. Autologa myeloid-derived suppressor cells (MDSC) samt vissa tumörer kan uttrycka ligander till PD-1 vilket leder till en immunosuppressiv mikromiljö. Att tillföra antikroppar mot dessa receptorer är ett sätt att dämpa de regulatoriska signalerna och öka T-cellsaktiviteten (Curran et al., 2010).

Curran et al. (2010) visade att en kombination av antikroppar mot både CTLA-4 och PD-1 tillsammans med Fvax-behandling ökade andelen T-effektorceller i förhållande till T-regs och MDSC jämfört med behandling med endast Fvax. Man erhöll också fler infiltrerande immunologiska celler samt en ökad andel IFN- $\gamma$  och tumörnekrosfaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-producerande CD8+ T-celler vilket gav upphov till ännu kraftigare immunologiskt svar. Vid Fvax-behandling ger man en ligand som binder till FLT-3 som bland annat stimulerar proliferation och differentiering av lymfocyter.

Ipilimumab är ett CTLA-4 läkemedel som 2011 blev godkänt av FDA för behandling av melanom (Zito & Kluger, 2012).

### ***Hämning av regulatoriska T-celler***

Då många av tumörernas antigen uppfattas som "egna" av CD25+ CD4+ regulatoriska T-celler kommer dessa att skicka regulatoriska signaler som hämmar immunförsvaret. Tolerans mot tumörceller uppkommer också som nämnts tidigare på grund av brist på costimulatoriska signaler som krävs för T-cellsaktivering. Genom att hämma de CD25+ CD4+ regulatoriska T-cellerna ökar chanserna för potent svar mot tumörcellerna i form av ökning av bland annat tumörspecifika CD8+ och CD4+ T-celler. Autoimmunitet är dock en risk vid hämning av dessa (Shimizu et al., 1999).

### ***Adoptiv immunterapi***

Även om många av de ovanstående behandlingarna har visat resultat och genererat ett ökat antal tumörantigenreaktiva celler, så är det en väldigt liten andel av patienterna (som högst 6%) som erhållit complete respons, det vill säga blivit helt fria från tumörer (Rosenberg et al., 2011). Det har därför funnits intresse att finna mer potenta strategier inom immunterapi. Adoptiv immunterapi har i flera studier gett betydligt högre complete respons mot melanom, 22% i en studie av Rosenberg et al. (2011) varav många av dessa dessutom visade varaktiga svar som höll i sig i minst tre år.

Adoptiv immunterapi bygger på att man tar T-celler från den cancersjuka patienten, stimulerar, expanderar och selekterar dem *in vitro* samtidigt som man reducerar det befintliga immunförsvaret hos patienten. Sedan förs T-cellerna tillbaka till patienten tillsammans med IL-2 (se Figur 2) (Gattinoni et al., 2006). På detta sätt kan man stimulera cellerna på önskat sätt och få tillräcklig mängd celler, utan närvaro av regulatoriska signaler från värdens immunförsvaret och från den immunsuppressiva mikromiljön runt tumören. Man har även möjlighet att påverka patientens immunförsvaret medan cellerna odlas och stimuleras utanför kroppen och göra de bästa möjliga förutsättningarna tills att cellerna ska tillbakainjiceras.

## **Utmaningar med adoptiv immunterapi**

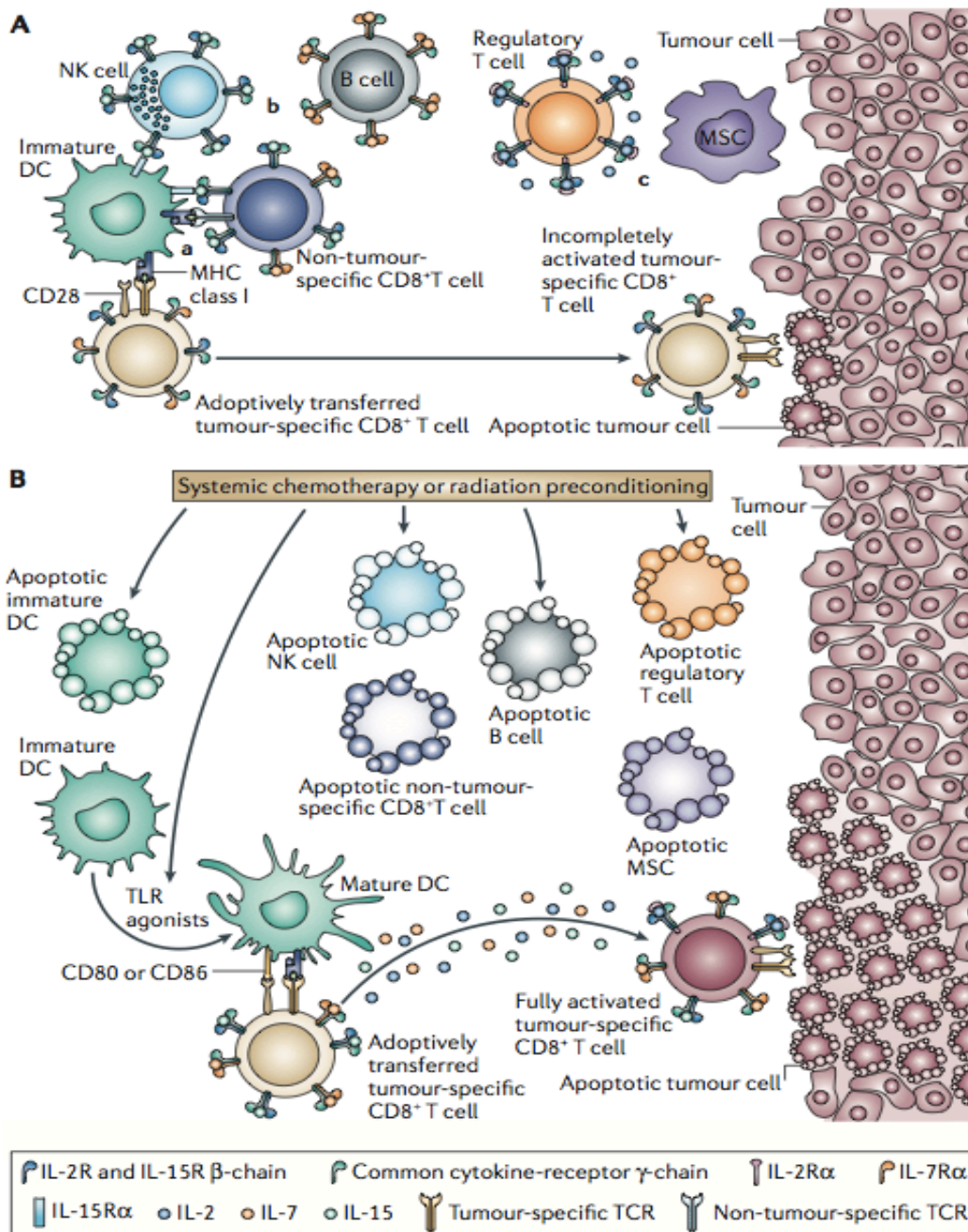
### ***Val av celler***

I de allra flesta studier av adoptiv immunterapi har man använt sig av tumörinfiltrerande lymfocyter, så kallade TILs, som är lymfocyter tagna direkt ur tumören. Fördelen med dessa är att de ofta till viss del redan är aktiverade och känner igen den autologa tumören.

Sitter tumören svåråtkomligt kan det dock vara besvärligt att få tillgång till dessa tumörlymfocyter och en annan svårighet är att urskilja de som är tumörreaktiva (Morgan et al., 2006). Man har därför studerat användningen av perifera blodlymfocyter (PBLs) där man tar T-celler från blodet och gör dessa tumörspecifika genom att använda genetiskt modifierade virus som kodar för tumörspecifika T-cellesreceptorer (TCRs). Med denna teknik uppnåddes en objektiv respons, alltså ett mätbart svar på behandlingen, hos 2 av 15 patienter och höga nivåer av modifierade T-celler uppmättes upp till ett år efter behandling.

### ***Förbehandling***

En viktig del i den adoptiva immunterapin är att först reducera värdens immunförsvaret genom att förbehandla med strålning, kemoterapi eller en kombination av dessa. Detta görs dels för att minska andelen T-regulatoriska celler som verkar inhiberande på immunförsvaret. Men också för att minska andelen endogena, icke-tumörspecifika, celler som tävlar om stimulerande cytokiner såsom IL-2, IL-15 och IL-7 som påverkar aktiviteten och utvecklingen hos CD8<sup>+</sup> T-celler samt öka tillgängligheten av APCs som också bidrar till stimulering (Gattinoni et al., 2005). Syftet är alltså att skapa en gynnsam miljö för de CD8<sup>+</sup> T-celler som ska injiceras.



Figur 1. **A:** mekanismer vid adoptiv immunterapi utan föregående immunreducering och **B:** med föregående immunreducering. På grund av vävnadsskada vid strålning/kemoterapi frigörs TLR-agonister som gör att de dendritiska cellerna mognar och blir antigenpresenterande. Bild från Gattinoni et al., (2006) med tillåtelse av författaren.

Många olika regimer för förbehandling har testats för att finna behandlingsprotokoll som ger så hög respons men liten toxicitet som möjligt. I en studie av Dudley et al., (2008) jämförde man säkerhet och effekt hos tre olika förbehandlingar hos patienter som skulle genomgå adoptiv immunterapi. Den ena gruppen behandlades med endast kemoterapi och de andra två med kemoterapi i kombination med strålning av olika intensitet, 2 respektive 12 Grey (Gy).

Genom att använda sig av strålning på 12 Gy i kombination med kemoterapi erhöles man en objektiv respons hos 72 % av patienterna jämfört med 49 % hos de behandlade med endast

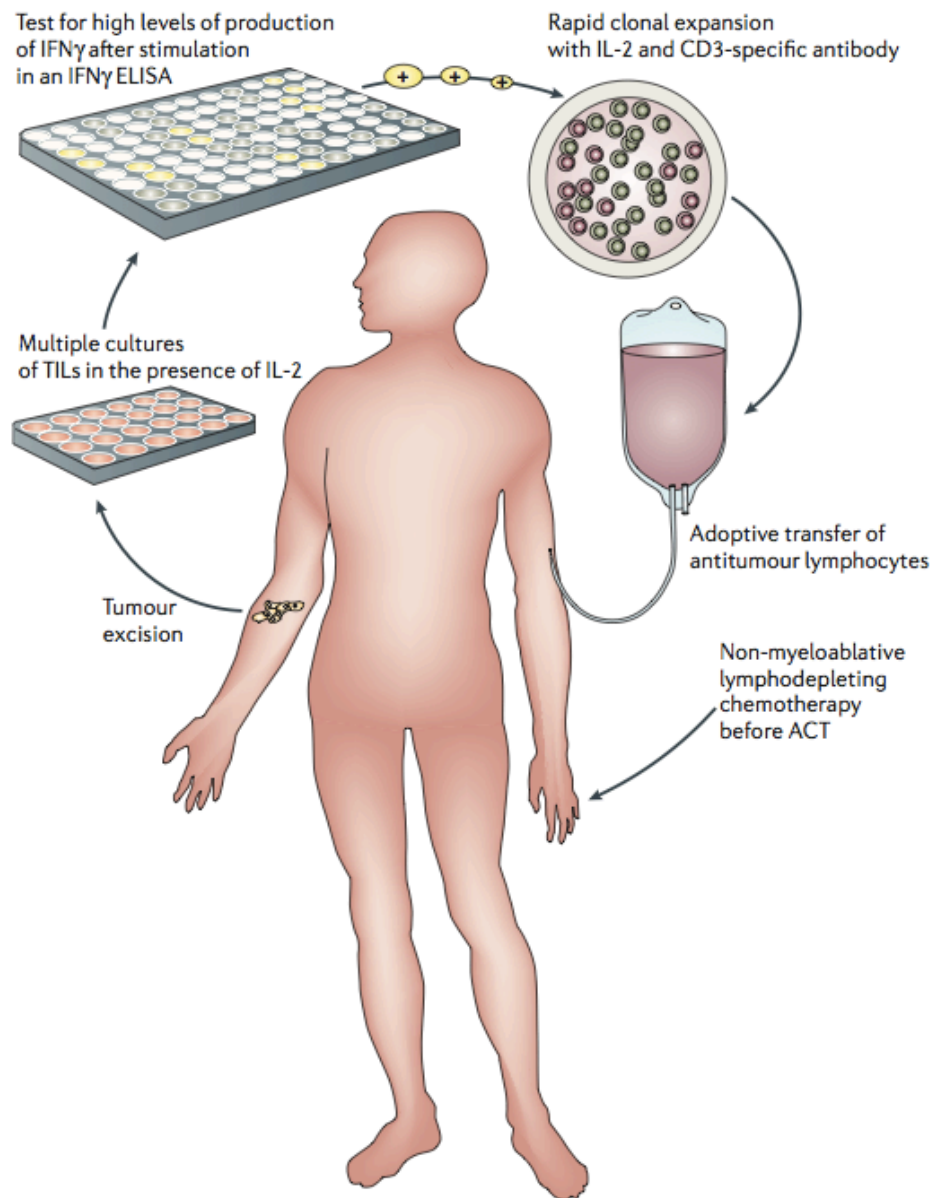
kemoterapi. Mängden fritt cirkulerande IL-7 och IL-15 var också högre än normalt i alla grupper men signifikant högre i 12 Gy-gruppen. Hematologisk toxicitet uppkom i alla grupperna men återhämtningen tog 1-2 dagar längre tid för 12-Gy gruppen trötthet och viktnedgång var också mer uttalad i denna grupp. Ögoninflammation och nedsatt njurfunktion var andra biverkningar som endast registrerades vid användning av den starkare strålningen. Vid uppföljningen av denna studie visade det sig att 20 av de 93 patienterna (22 %) blivit helt fria från tumörer (Rosenberg et al., 2011).

### ***Odling av T-celler***

Odlingen av T-cellerna är viktig för att de ska komma upp i tillräckligt antal samt bli aktiverade och lära sig känna igen tumörantigen.

### ***Tumörinfiltrerande lymfocyter***

I en studie genererade Dudley et al., (2003) tumörinfiltrerande lymfocyter (TILs) genom att dela upp varje tumörfragment i olika kulturer och odla dem på agarplatta med IL-2 som stimulerar tillväxt, proliferation och differentiering. Efter det stimulerades cellerna med två olika melanomcellslinjer och autologa melanomceller om sådana fanns tillgängligt. En del stimulerades också med melanomantigen. Sedan mättes IFN- $\gamma$  produktionen med hjälp av ELISA. De aktiva cellerna expanderades enligt ett Rapid Expansion Protocol (REP-protokoll) tillsammans med IL-2, CD3-antikroppar och allogena, strålade peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) feeder cells. CD-3 är en koreceptor hos T-cellen och ingår i TCR-komplexet och behövs för aktivering av T-cellen. Feeder cells är en slags stödceller som krävs för att T-cellerna ska kunna växa.



Figur 2. Hur adoptiv immunterapi konventionellt går till. Som immunreducering kan dock även strålning användas vilket inte framgår av bilden. Bild från Gattinoni et al., (2006) med tillåtelse av författaren.

T-cellerna på de olika plattorna som hölls separat under hela odlingstiden skilde sig väldigt mycket åt i specificitet och aktivitet och bara de som visade sig vara tumör-reaktiva användes för behandling. Detta är viktigt att ha i åtanke då T-celler från samma tumör kan vara väldigt olika. I 59% av TIL-kulturerna observerades specifik cytokinproduktion i åtminstone en TIL vid stimulans med autologa tumörceller.

#### *Unga tumörinfiltrerande lymfocyter*

Man har upptäckt att telomerlängden (längden av de yttersta ändarna på kromosomerna) har betydelse för den objektiva responsen, då längre telomerer ökar potentialen för proliferation (Dudley et al., 2008). I de flesta protokoll för framställning av TILs sker detta under flera

veckor (5-8 veckor i studien av Dudley et al., (2003) beskriven ovan) och under denna tid hinner telomererna förkortas samt kostimulatoriska receptorer som CD28 och CD27 i viss mån nedregleras (Besser et al., 2010). För att förhindra detta har man i flera studier undersökt möjligheten att använda så kallade unga TILs med minimerad odlingstid.

Besser et al., (2010) visade i sin studie med tillverkning av unga TILs att odlingstiden spelar signifikant roll för den objektiva responsen. Med denna teknik minimerar man odlingstiden, odlar alla celler i en enda kultur (till skillnad från de konventionella teknikerna) samt hoppar över steget där man selekterar för IFN- $\gamma$ -produktion. Med denna teknik uppnåddes en objektiv respons på 50 %.

## **DISKUSSION**

Många tidigare behandlingar mot melanom, till exempel IL-2 och dacarbazine (kemoterapi) har tidigare endast visat objektiv respons i några få procent av fallen (Dudley et al., 2008) och man har också haft svårt att bedöma vilken egentlig påverkan exempelvis behandling med IL-2 har på överlevnaden (Weide et al., 2010). Adoptiv immunterapi har nått upp till 72% i objektiv respons (Rosenberg et al., 2011) vilket tyder på att denna typ av behandling kan vara framtiden inom immunterapibehandling av melanom.

Ett av de största problemen med adoptiv immunterapi är att det kräver avancerad teknik, mycket resurser och kunnig personal, något som inte kan erbjudas på alla sjukhus. Vid framställning av unga TILs krävs inte lika mycket resurser då odlingsprotokollet inte är lika avancerat som i de konventionella protokollen. En annan positiv aspekt med denna metod är att framställningen går snabbare och risken för ytterligare spridning av tumörer före behandling reduceras. Denna korta odlingstid visade sig dessutom i en studie av Besser et al., (2010) ha en signifikant positiv inverkan på den objektiva responsen. Under denna korta odlingstid hinner dock inte lika många T-celler bildas som i de konventionella protokollen (Gattinoni et al., 2006) men enligt Gattinoni et al., (2005) är funktionen hos de tumörreaktiva T-cellerna snarare än antalet viktigast för effekten mot tumörer. Möjligtvis uppvägs då det färre antalet med högre effektivitet. Detta betyder också att mätningar av mängden tumörspecifika T-celler kanske inte enbart räcker som indikation på en effektiv behandling och man borde därför även studera hur effektiviteten hos T-cellerna kan mätas och vilka faktorer som avgör detta.

Toxicitet som följer behandlingen är en annan negativ aspekt med adoptiv immunterapi (liksom med ett flertal andra immunterapier) där utvecklingsmöjligheter finns. Immunreducering med kemoterapi och strålning före behandling har visat sig ge betydande biverkningar (Dudley et al., 2008) samtidigt som denna förbehandling väldigt betydelsefull för ett effektivt immunsvaret och framgångsrik behandling (Gattinoni et al., 2005). Istället för att behandla systemiskt med dessa metoder borde man titta på mer specifika sätt att undanröja de regulatoriska hinder som står i vägen för de tumörreaktiva CD8+ T-cellerna. Hämmning av de T-regulatoriska cellerna skulle kunna vara en metod då det visat sig att immunsvaret väcks



mot autologa tumörer då dessa tas bort (Shimizu et al., 1999). Man bör dock vara försiktig då autoimmunitet är en överhängande risk vid hämning av dessa. Konkurrens med icke-tumörspecifika celler över de stimulerande cytokinerna IL-7 och IL-15 är en annan aspekt man vill undkomma med hjälp av förbehandlingen (Gattinoni et al., 2005). Om man istället injicerade dessa cytokiner i samband med cellöverföringen skulle rimligtvis förbehandlingsintensitet kunna sänkas. IL-2 behandling i samband med injicering av de odlade T-cellerna är den andra huvudsakliga orsaken till toxicitet. I en studie av Weide et al., (2010) om behandling med endast IL-2 undkom man till stor del denna toxicitet genom att injicera IL-2 intratumoralt i stället för systemiskt. Denna metod skulle kanske kunna appliceras vid användningen av IL-2 till adoptiv cellterapi också.

I de fall där man inte har möjlighet att komma åt tumörceller att odla kan man som tidigare nämnt använda sig av genetiskt modifierade perifera blodlymfocyter. Dessa kräver dock mycket resurser och avancerad teknik att tillverka, men de är ett alternativ om tumören sitter illa till. Enligt Morgan et al., (2006) finns mycket kvar att utveckla och förbättra med denna metod, som exempelvis att testa andra virusvektorer, använda TCRer med högre affinitet och försöka hitta mer effektiva subpopulationer av PBLs.

Kan man undanröja de hinder som diskuterats ovan kan adoptiv immunterapi absolut tänkas vara en framgångsrik behandlingsstrategi inom immunterapibehandling mot melanom i framtiden, då effektiviteten hos de övriga immunterapierna lämnar mycket att önska. Behandlingar med exempelvis IL-2 har dessutom visat sig ha sämre effekt i behandling av senare stadier av melanom (Weide et al., 2010). Att kombinera adoptiv celltransfer med andra strategier inom immunterapin som till exempel antikroppar mot regulatoriska receptorer hos T-celler, TLR-9 agonister och vaccinering skulle troligtvis också öka effektiviteten. Mer forskning på sådana kombinationer skulle vara önskvärt. Som slutsats kan man säga att adoptiv immunterapi har visat sig vara en effektiv behandlingsform på frammarsch inom immunterapibehandlingen mot melanom. Mer forskning behövs för att utveckla den komplexa tekniken, vidga möjligheterna att kombinera den adoptiva immunterapin med tidigare beprövade behandlingsstrategier samt förenkla behandlingen och göra den tillgänglig för fler sjukhus.

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Besser, M.J., Shapira-Frommer, R., Treves, A.J., Zippel, D., Itzhaki, O., HersHKovitz, L., Levy, D., Kubi, A., Hovav, E., Chermoshniuk, N., Shalmon, B., Hardan, I., Catane, R., Markel, G., Apter, S., Ben-Nun, A., Kuchuk, I., Shimoni, A., Nagler, A. & Schachter, J. (2010). Clinical responses in a phase II study using adoptive transfer of short-term cultured tumor infiltration lymphocytes in metastatic melanoma patients. In: *Clin Cancer Res*. pp. 2646-55. United States: 2010 Aacr.; 16). ISBN 1078-0432 (Print)1078-0432 (Linking).
- Curran, M.A., Montalvo, W., Yagita, H. & Allison, J.P. (2010). PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(9), 4275-4280.
- Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Shelton, T.E., Even, J. & Rosenberg, S.A. (2003). Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients. *J Immunother* 26(4), 332-42.
- Dudley, M.E., Yang, J.C., Sherry, R., Hughes, M.S., Royal, R., Kammula, U., Robbins, P.F., Huang, J., Citrin, D.E., Leitman, S.F., Wunderlich, J., Restifo, N.P., Thomasian, A., Downey, S.G., Smith, F.O., Klapper, J., Morton, K., Laurencot, C., White, D.E. & Rosenberg, S.A. (2008). Adoptive Cell Therapy for Patients With Metastatic Melanoma: Evaluation of Intensive Myeloablative Chemoradiation Preparative Regimens. *Journal of Clinical Oncology* 26(32), 5233-5239.
- Gattinoni, L., Finkelstein, S.E., Klebanoff, C.A., Antony, P.A., Palmer, D.C., Spiess, P.J., Hwang, L.N., Yu, Z.Y., Wrzesinski, C., Heimann, D.M., Surh, C.D., Rosenberg, S.A. & Restifo, N.P. (2005). Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8(+) T cells. *Journal of Experimental Medicine* 202(7), 907-912.
- Gattinoni, L., Powell, D.J., Rosenberg, S.A. & Restifo, N.P. (2006). Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nature Reviews Immunology* 6(5), 383-393.
- Morgan, R.A., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Hughes, M.S., Yang, J.C., Sherry, R.M., Royal, R.E., Topalian, S.L., Kammula, U.S., Restifo, N.P., Zheng, Z.L., Nahvi, A., de Vries, C.R., Rogers-Freezer, L.J., Mavroukakis, S.A. & Rosenberg, S.A. (2006). Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314(5796), 126-129.
- National Cancer Institute. General Information About Melanoma. [online] 2013-03-29. <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/melanoma/HealthProfessional#Reference1.7> [2013-04-01].
- Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Sherry, R.M., Kammula, U.S., Hughes, M.S., Phan, G.Q., Citrin, D.E., Restifo, N.P., Robbins, P.F., Wunderlich, J.R., Morton, K.E., Laurencot, C.M., Steinberg, S.M., White, D.E. & Dudley, M.E. (2011). Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T Cell Transfer Immunotherapy. *Clin Cancer Res* 17(13), 4550-7.
- Salcedo, M., Bercovici, N., Taylor, R., Vereecken, P., Massicard, S., Duriau, D., Vernel-Pauillac, F., Boyer, A., Baron-Bodo, V., Mallard, E., Bartholeyns, J., Goxe, B., Latour, N., Leroy, S., Prigent, D., Martiat, P., Sales, F., Laporte, M., Bruyns, C., Romet-Lemonne, J.L., Abastado, J.P., Lehmann, F. & Velu, T. (2006). Vaccination of

- melanoma patients using dendritic cells loaded with an allogeneic tumor cell lysate. *Cancer Immunology Immunotherapy* 55(7), 819-829.
- Shimizu, J., Yamazaki, S. & Sakaguchi, S. (1999). Induction of tumor immunity by removing CD25(+)CD4(+) T cells: A common basis between tumor immunity and autoimmunity. *Journal of Immunology* 163(10), 5211-5218.
- Sikora, A.G., Jaffarad, N., Hailemichael, Y., Gelbard, A., Stonier, S.W., Schluns, K.S., Frasca, L., Lou, Y., Liu, C., Andersson, H.A., Hwu, P. & Overwijk, W.W. (2009). IFN-alpha enhances peptide vaccine-induced CD8+ T cell numbers, effector function, and antitumor activity. In: *J Immunol.* pp. 7398-407. United States; 182). ISBN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking).
- Speiser, D.E., Lienard, D., Rufer, N., Rubio-Godoy, V., Rimoldi, D., Lejeune, F., Krieg, A.M., Cerottini, J.C. & Romero, P. (2005). Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J Clin Invest* 115(3), 739-46.
- Tizard, I.R. (2009). *Veterinary Immunology: An Introduction*. 8. uppl. St. Louis. Elsevier
- Weide, B., Derhovanessian, E., Pflugfelder, A., Eigentler, T.K., Radny, P., Zelba, H., Pfohler, C., Pawelec, G. & Garbe, C. (2010). High response rate after intratumoral treatment with interleukin-2: results from a phase 2 study in 51 patients with metastasized melanoma. *Cancer* 116(17), 4139-46.
- Zachary, J. F. & McGavin, M. D. (2011). *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 5. uppl. St. Louis. Elsevier.
- Zito, C.R. & Kluger, H.M. (2012). Immunotherapy for metastatic melanoma. *Journal of Cellular Biochemistry* 113(3), 725-734.