

AZ ELSŐ, TÚLÉLÉST MEGHOSSZABBÍTÓ IMMUNTERÁPIA,
AZ IPILIMUMAB KLINIKAI ÉS IMMUNPATOLÓGIAI PREDIKTÍV
MARKEREINEK VIZSGÁLATA

Doktori (PhD)-értekezés

Dr. Balatoni Tímea

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Pécs

2019

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Bogár Lajos

Programvezető: Prof. Dr. Kiss István

Témavezetők: Dr. Ladányi Andrea

Prof. Dr. Liszkay Gabriella

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. BEVEZETÉS	6
2.1. A melanoma malignum.....	6
2.1.1. Epidemiológia.....	6
2.1.2. A melanoma kialakulásának rizikófaktora.....	6
2.1.3. A melanoma klinikai és hisztológiai osztályozása (22).....	7
2.1.4. Szövettani és molekuláris jellemzők	8
2.1.5. A melanoma biológiai viselkedését befolyásoló tényezők és a TNM-stádiumbeosztás	9
2.2. Az immunrendszer szerepe a daganatok kialakulásában.....	9
2.2.1. A gyulladásos környezet szerepe a karcinogenezisben	10
2.2.2. A tumorinfiltráló immunsejtek szerepe	10
2.2.3. A daganat elleni immunválasz.....	14
2.2.4. Az immunválasz elkerülése	15
2.3. A melanoma terápiája.....	16
2.3.1. Sebészi kezelés.....	16
2.3.2. Sugárkezelés.....	16
2.3.3. Gyógyszeres kezelés	17
3. CÉLKITŰZÉSEK	26
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	27
4.1. Az ipilimumabterápia klinikai hatékonyságának vizsgálata	27
4.1.1. A betegbevonás kritériumai és a terápia kivitelezése	27
4.1.2. A vizsgálatok kivitelezése és értékelése	27
4.1.3. Statisztikai elemzés.....	28
4.2. Az ipilimumab toxicitásának vizsgálata	28
4.3. A klinikai markerek vizsgálata.....	29
4.3.1. A vizsgálatok kivitelezése és értékelése	29
4.3.2. Statisztikai elemzés.....	29
4.4. A tumorinfiltráló immunsejtek vizsgálata	30
4.4.1. A betegbevonás kritériumai és a terápia kivitelezése	30
4.4.2. A vizsgálatok kivitelezése és értékelése	30
4.4.3. Statisztikai elemzés.....	32
5. EREDMÉNYEK.....	33
5.1. Az ipilimumabterápia klinikai hatékonyságának vizsgálata	33

5.1.1. Beteganyag-jellemzők	33
5.1.2. A terápiás válasz.....	33
5.1.3. A progressziómentes és a teljes túlélés.....	34
5.2. Az ipilimumab toxicitásának vizsgálata	34
5.3. A klinikai markerek vizsgálata.....	35
5.3.1. Az LDH-értékkel összefüggést mutató klinikai paraméterek.....	35
5.3.2. A terápiás válasz és a klinikai markerek kapcsolatának vizsgálata	35
5.3.3. A progressziómentes túlélés és a klinikai markerek kapcsolatának vizsgálata.....	35
5.3.4. A teljes túlélés és a klinikai markerek kapcsolatának vizsgálata	36
5.4. A tumorinfiltráló immunsejtek vizsgálata	36
5.4.1. Beteganyag-jellemzők	36
5.4.2. Az immunsejtek denzitásának meghatározása a betegek kezelés előtt eltávolított nyirokcsomó- és kután/szubkután áttéteinek mintáiban	37
5.4.3. A terápiás válasz és a tumorinfiltráló immunsejtek kapcsolatának vizsgálata	37
5.4.4. A teljes túlélés és a tumorinfiltráló immunsejtek kapcsolatának vizsgálata.....	38
6. MEGBESZÉLÉS.....	40
6.1. A biomarkerek jelentősége a melanoma immunterápiájában	40
6.2. Az ipilimumabterápia klinikai hatékonyságának vizsgálata	40
6.3. Az ipilimumab toxicitásának vizsgálata	41
6.4. A klinikai markerek vizsgálata.....	42
6.5. A tumorinfiltráló immunsejtek vizsgálata	44
6.6. A kutatás korlátai és értéke	47
7. KÖVETKEZTETÉSEK	49
8. ÖSSZEFOGLALÁS	50
9. IRODALOMJEGYZÉK	52
10. TÁBLÁZATOK ÉS ÁBRÁK.....	63
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	79

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADCC	ellenanyagfüggő citotoxikus reakció (antibody-dependent cellular cytotoxicity)
AEC	abszolút eozinofilszám
AJCC	American Joint Committee of Cancer
ALC	abszolút limfocitaszám
ALM	akrolentiginózus melanoma
ANC	abszolút neutrofilszám
APC	antigénprezentáló sejt
BCG	Bacillus Calmette–Guérin
BCR	B-sejt-receptor
BORR	legjobb terápiás válasz ráta (best overall response rate)
CAR	kiméra antigénreceptor
CR	komplett válasz
CTLA-4	citotoxikus T-limfocita-asszociált antigén 4
DC	dendritikus sejt
DCR	betegségkontroll-ráta
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
ELR	eozinofil/limfocita arány
EMA	European Medicines Agency (Európai Gyógyszerügynökség)
ESR	vérsüllyedés (erythrocyte sedimentation rate)
FDA	Food and Drug Administration (amerikai gyógyszer- és élelmiszerellenőrző hatóság)
GM-CSF	granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor
IDO	indolamin-2,3-deoxigenáz
IF	interferon
IL	interleukin
LDH	laktát-dehidrogenáz
LMM	lentigo maligna melanoma
MAA	melanomaasszociált antigén
MAPK	mitogénaktivált proteinkináz
MHC	major hisztokompatibilitási komplex
NLR	neutrofil/limfocita arány

NK	természetes ölő (natural killer)
NM	noduláris melanoma
OS	teljes túlélés (overall survival)
PD-1	programozott sejthalál receptor 1
PFS	progressziómentes túlélés (progression-free survival)
PR	parciális válasz
RECIST	a tumorválasz értékelésének kritériumrendszere (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors)
RR	válaszadási arány (response rate)
SD	stabil betegség
SLN	őrszemnyirokcsomó (sentinel lymph node)
SSM	szuperficiálisan terjedő melanoma
TCR	T-sejt-receptor
TIL	tumorinfiltráló limfocita
TNF	tumornekrózis faktor
ULN	normáltartomány felső határa (upper limit normal)
WHO	World Health Organisation

2. BEVEZETÉS

2.1. A melanoma malignum

2.1.1. Epidemiológia

A malignus melanoma az ektodermális eredetű, pigmentet termelő sejtek rosszindulatú daganata. Bár az esetek túlnyomó többségében, mintegy 90 százalékában a bőr melanocitáiból indul ki, a nyálkahártyákon, uveálisan és meningeálisan is előfordulhat (1).

A kiemelkedő áttétképző képességű, agresszív kórlefolyású daganat incidenciája a fehér bőrű populáció körében folyamatosan növekszik, az elmúlt 50 évben gyorsabban növekedett minden más daganaténál, az incidencia növekedése 4-6% évente (2, 3). Magyarországon a Nemzeti Rákregiszter adatai szerint meghaladja a kétezret, és mintegy 350 beteg kerül IV-es stádiumba évente (4).

Az incidencia növekedését a környezetszennyezés következtében megváltozott minőségű napfénnel és az egészségtelen napozási szokások széles körű elterjedésével magyarázzák (5). A kután melanoma keletkezésével kapcsolatban az UV-sugarak patogenetikai szerepe bizonyított (6).

Bár az incidenciagörbe csúcspontja a hatodik évtizedre esik (7), 40 éves kor alatt sem ritka, sőt, az egyik leggyakrabban előforduló fiatalkori rosszindulatú daganatként tartják számon (8,9), a 20-29 év közötti nők második leggyakoribb rosszindulatú daganata (7).

A melanoma nem egyformán érinti a két nemet: míg 40 éves kor alatt nőknél, 40 év felett férfiaknál, és a legújabb amerikai, ausztrál és új-zélandi adatok alapján összességében is férfiaknál gyakoribb. Ezt részben a fiatal nők fokozottabb arteficiális UV-fény-használatával, részben hormonális okokkal magyarázzák (9–11).

Míg az összes bőrdaganat kevesebb mint 5%-át képezi, a bőrdaganatok okozta halálozás túlnyomó többségét a melanoma okozza (7, 12, 13). Az incidenciával párhuzamosan a daganat mortalitása is lassan, de fokozatosan növekszik, a növekedés mértéke 1,5% volt világszerte az elmúlt 10 év során (10, 14, 15).

Magas metasztatikus potenciálja és az a tény, hogy jelentős számban érint fiatal betegeket is, a malignus melanomát jelentős egészségügyi és egészséggazdasági kockázati tényezővé léptette elő az elmúlt évtizedekben (7, 12, 16).

2.1.2. A melanoma kialakulásának rizikófaktorai

A melanoma kialakulásának legfontosabb környezeti hajlamosító tényezője az UVA- és UVB-sugárzás, melyek egyrészt direkt mutagén hatásúak, másrészt az immunvédekezés csökkenését, növekedési faktorok termelődését okozva és reaktív szabadgyökök képződését generálva további mutációk

létrehozásával okozhatnak daganatképződést. Az UV-sugárzás karcinogén hatásának harmadik faktora a javító (repair) mechanizmusok károsítása az apoptózisregulátor p53 gén funkciójának gátlása útján (17). A kután melanoma kialakulásával elsősorban az anamnézisben szereplő intermittáló erős napfény-expozíció és a gyermekkori hólyagos napégések hozhatók összefüggésbe (18–20). Rizikófaktornak számít az I-II-es bőrtípus, a nagyszámú (50-100) anyajegy, az atípusos naevus szindróma, az anamnézisben szereplő egyéb bőrtumor és elsőfokú rokonoknál diagnosztizált melanoma, az immunszupprimált állapotok és bizonyos öröklődő betegségek, a hibás repairmechanizmussal jellemezhető xeroderma pigmentosum, illetve egyes genetikai eltérések, úgymint a CDKN2A és a CDK4 mutációja, a melanokortin-1-receptor gén és egyes repair gének mutációi, melyek azonban csak a melanomás esetek mintegy 10%-ánál mutathatók ki (21).

2.1.3. A melanoma klinikai és hisztológiai osztályozása (22)

In situ melanoma

A melanoma kezdeti, legjobb prognózisú formája, a daganatsejtek kizárólag az epidermizt infiltrálják, ezért metasztázis nem alakulhat ki. Idővel az esetek jelentős részében invazív, áttétképzésre képes daganattá alakul.

Szuperficiálisan terjedő melanoma (SSM)

Az SSM a leggyakoribb altípus, az europid rassznál az esetek 60-70%-a. Jellemzője a kezdeti felszínes, sugárirányú (radiális) tumornövekedés, ilyenkor a sejteknek még nincs áttétképző képességük. Idővel vertikális növekedési fázisba megy át, a mélybe törő sejtek már rendelkeznek metasztatikus potenciállal.

Noduláris melanoma (NM)

Az europid rassz második leggyakoribb altípusa. Ellentétben az SSM-mel, ez a típus azonnal a bőr vertikális irányú infiltrációjával kezdődik, gyorsan növekszik, prognózisa rosszabb az SSM-énél.

Lentigo maligna melanoma (LLM)

Elsősorban fénynek kitett testfelületeken, leginkább a fej-nyaki régióban fordul elő, az in situ melanomából (lentigo maligna) az átmenet az LMM-be általában lassan következik be.

Akrolentiginózus melanoma (ALM)

Elsősorban a tenyéren, a talpon, vagy subungualisan fordul elő. Gyakran hipopigmentált vagy amelanotikus, amely késleltetheti a klinikai diagnózist. Az afrikai és ázsiai populáció leggyakoribb melanomatípusa, az europid rassznál ritka.

Dezmoplasztikus melanoma

Általában amelanotikus, kifejezett kötőszöveti komponenssel rendelkező tumor. Metasztatikus potenciálja kisebb, lokális recidívahajlama nagyobb a fentieknél.

Extrakután melanoma (23)

A nem bőr eredetű tumorok legnagyobb részét az okuláris melanoma alkotja, általában véletlenül, rutin szemvizsgálat során kerülnek felfedezésre, prognózisuk rosszabb a kután melanomáénál. A másik nagy csoportot alkotó nyálkahártya-melanoma leggyakrabban az anális és a vaginális nyálkahártyán, a szájüreg, az orrüreg és az orrmelléküregek nyálkahártyáján fordul elő. Mivel ezek a daganatok a vizuális vizsgálat számára szintén nem vagy nehezen hozzáférhetők, a diagnózis általában csak akkor születik meg, amikor a nagymértékű daganatnövekedés már tüneteket okoz.

2.1.4. Szövettani és molekuláris jellemzők

A melanoma diagnózisának aranystandardja jelenleg is a szövettani vizsgálat, amelynek során meg kell adni mm-ben a tumor maximális vertikális átmérője (Breslow-érték) és az invázió szintje (Clark-érték) mellett a főbb kiegészítő hisztológiai prognosztikai faktorokat: a tumor növekedési fázisa, a regresszió, exulceráció, szatelliták, nyirok- és vérérinvázió jelenléte, mitotikus index, tumorinfiltráló limfociták (TIL) jelenléte a dermiszben.

Bár a legtöbb melanoma konvencionális hisztológiával diagnosztizálható, nehézség esetén immunhisztokémiai vizsgálattal meghatározhatók a melanomaasszociált antigének. Leggyakrabban az amelanotikus melanomák egyéb rosszindulatú daganattól való elkülönítése céljából az S-100 és a HMB-45 antitesttel kimutatható gp100 differenciálódási antigén kerül meghatározásra (22).

A RAS-RAF mitogénaktivált proteinkináz (MAPK) intracelluláris jelátviteli kaszkádról bebizonyosodott, hogy kritikus jelentőségű a melanomák többségében a sejtek túlélésének, differenciálódásának és proliferációjának befolyásolása szempontjából. A BRAF szomatikus missense mutációi a MAPK-útvonal aktivációját és emelkedett kinázaktivitását okozzák és a melanomás betegek 40-60%-ában jelen vannak. A BRAF-mutációk 80-90%-a V600E, 10-20%-uk V600K mutáció. A BRAF mutációi leggyakrabban kután melanomában fordulnak elő, és szignifikánsan ritkábban akrolentiginózus melanomában (15-20%) és nyálkahártya-melanomában (0-0,9%), uveális melanomában pedig egyáltalán nem mutathatók ki (24, 25).

Az NRAS-mutáció a daganatok 15-20%-ában fordul elő és a BRAF-mutációhoz hasonlóan a túlélés negatív prediktora (26, 27). A CKIT receptor a tirozinkinázok csoportjába tartozó fehérje, liganduma az intracelluláris jelátviteli kaszkádot aktiválja, ezáltal serkentve a proliferációt és gátolva az

apoptózist. A CKIT-mutációk a nyálkahártya-melanoma esetén 20-39%-ban, krónikus napártalomnak kitett bőrterületen kialakuló melanoma esetén 15-28%-ban vannak jelen, és szintén negatívan befolyásolják a betegség kimenetelét (28–30).

Az uveális melanoma jellegzetes mutációi a GNAQ- és a GNA11-mutációk, amelyek a daganatok mintegy 80%-ában kimutathatók, prognosztikai értékük nem bizonyított (31–33).

2.1.5. A melanoma biológiai viselkedését befolyásoló tényezők és a TNM-stádiumbeosztás

A fent említett hisztológiai prognosztikai faktorok mellett klinikai tényezők is befolyásolják a melanoma prognózisát: a fej-nyaki és a felső testfélen előforduló daganatok túlélése rosszabb az alsó testféli lokalizációval összehasonlítva, az idősebb kor és a férfi nem is a rövidebb túlélés független prediktora (34, 35). Azoknál a betegeknél azonban, akiknek lokális vagy regionális áttétük van, az in-tranzit és a nyirokcsomó-metasztázisok száma és mérete válik a legfontosabb prognosztikai faktorrá, háttérbe szorítva a primer tumor jellegzetességeit, míg távoli áttétek esetén a tumortömeg nagysága, a beteg általános klinikai állapota és a szervinfiltráció helye határozza meg elsősorban a beteg életkilátásait.

Az AJCC (American Joint Committee on Cancer) legújabb, 2017-es ajánlatára a stádiumbeosztás alapjaiban megegyezik a 2009-ben a WHO által elfogadott rendszerrel, kiegészítve néhány elemmel. Primer melanománál a mitotikus indexet már nem veszik figyelembe és a T1a stádiumot a 0,8 mm-nél vékonyabb, nem ulcerált melanoma jelenti.

A prognosztikus staging III-as stádiumban a nyirokcsomóstátusz mellett a T kategóriát is figyelembe veszi, a nyirokcsomó-érintettség nélküli III-as stádium (szatellita, in-tranzit metasztázis) pontosabban lett karakterizálva (okkult/klinikailag manifeszt).

Új kategóriát vezettek be IV-es stádiumban központi idegrendszeri érintettség esetén (M1d), és az emelkedett LDH-érték nem jelent minden esetben M1c kategóriát, hanem M stádiumban "0" vagy "1" jelöléssel fel kell tüntetni, hogy az érték "nem emelkedett" vagy "emelkedett" (36).

2.2. Az immunrendszer szerepe a daganatok kialakulásában

A szervezet sejtjei egy meghatározott program szerint működnek. Amennyiben egy sejt kiszabadul ez alól a program alól, korlátlan szaporodási képességgel rendelkező rosszindulatú daganat jöhet létre, amely az egész szervezet működését veszélyezteti.

A daganatot ugyanakkor nem pusztán kórosan burjánzó sejtek halmazaként, hanem daganatszövetként kell értelmezni, amely a tumorsejteken kívül kötőszövetet, ereket, fehérvérsejteket és egyéb sejteket tartalmazó funkcionális egységet képez. A daganat fennmaradása ennek a speciális mikrokörnyezetnek a függvénye, és a daganat elpusztítását célzó törekvések is erre kell, hogy irányuljanak. Az immunrendszer működése és a daganatok kialakulása közötti összefüggést bizonyítja az a tény, hogy immunhiányos egyéneknél nagyobb eséllyel keletkeznek daganatok, ez különösen az erősen immunogén tumorok esetén megfigyelhető (37).

2.2.1. A gyulladós környezet szerepe a karcinogenezisben

Régi megfigyelés, hogy a krónikus gyulladás sok daganattípus kockázatát növeli, így többek között a kután laphámrák, méhnyakrák, májrák, húgyhólyagrák, pajzsmirigy-karcinóma, prosztatarák is gyakrabban alakul ki a fenti szerveket érintő gyulladós környezetben. Azt is tapasztalták, hogy a nem-szteroid gyulladásgátlók csökkentik bizonyos daganatok (kolonkarcinóma, tüdőrák, prosztatarák, emlőrák) kialakulásának esélyét és javítják a túlélést (38).

Bár a gyulladás szerepe éppen a szöveteket károsító tényezők eliminálása lenne, a daganat környezetében megfigyelhető gyulladás sok esetben paradox módon a tumor fennmaradásának és terjeszkedésének kedvez. Ebben a mechanizmusban a tumorszövetet infiltráló makrofágok egyik típusa játszik központi szerepet, melyeket korábban tumorelles hatáú sejteknek gondoltak. A feltételezett mechanizmus szerint a daganatsejtek által termelt kemotaktikus anyagok (CCL2, M-CSF, VEGF, IL-10, IL-6) által odavonzott monociták tumorasszociált makrofágokká alakulva olyan anyagokat termelnek (EGF, TGF- β , FGF, VEGF, IL-1, TNF- α , IL-6), amelyek a tumor növekedése és új erek képződése mellett a kötőszöveti mátrix átalakításával a daganat környező szövetekbe való betörését és az áttétképződést segítik elő, valamint a helyszíntre érkező limfociták szuppresszív vagy tolerogén sejtekké történő átalakulását is elősegítik (39).

2.2.2. A tumorinfiltráló immunsejtek szerepe

2.2.2.1. T-limfociták

A daganatok elleni immunválaszban elsődlegesnek tekintett celluláris immunválasz központi sejtjei, a T-sejtek a csontvelőben képződnek és a perifériás nyirokszervekbe már az antigéneket fajlagosan felismerni képes receptorstruktúrájukkal (TCR) jutnak be. A TCR valamennyi T-limfocita felszínén kifejeződő, antigénfelismerésre képes receptorkomplex, amely az antigént felismerő alfa-béta láncból és a jeltovábbító CD3-ból áll. A T-limfociták a fehérjetermészetű antigéneket csak az

antigénprezentáló sejtek (APC) membránján megjelenő MHC molekulákhoz kötött formában ismerik fel. A klonális szelekció elve alapján, minden limfocita csak egy adott epitóp felismerésére képes receptort hordoz, az antigén pedig a nagyszámú különböző limfocita közül csak azzal lép kölcsönhatásba, amelynek antigénreceptorával specifikusan kapcsolódni tud, így csak a megfelelő receptort hordozó limfociták osztódása és differenciálódása indul meg, melynek során az effektor sejtek mellett hosszú életű, antigénspecifikus memóriasejtek is képződnek.

Az tumor elleni immunválasz szabályozásának szempontjából a Th (helper), a Tc (citotoxikus) és a Treg (regulátor) T-sejtek játszanak legfontosabb szerepet. A Th- és a Treg-sejtek specifikus koreceptora a CD4, a Tc-sejteké pedig a CD8. A Treg-sejtek jellemző sejt felszíni molekulái a CD25 és a CTLA-4, valamint fontos transzkripciós faktora a FOXP3.

A Th-sejtek antigénreceptora az APC felszínén levő MHC-II-peptidkomplexhez kapcsolódva kisméretű glikoproteinek, limfokinek termelődését indítja el, melyek többek között T- és B-sejteknek, valamint makrofágoknak a reakció helyszínére vonzását valamint aktivációját indítják el. A Th-sejtek közül a tumorelles immunválasz szempontjából az IL-2, IL-12 és IFN-alfa termelő Th1 sejtek a legfontosabbak.

A Tc-sejtek a tumorsejt felszínén az MHC-I-peptidkomplexet ismerik fel és e kölcsönhatás valamint citokinek hatására aktiválódnak és elpusztítják a célsejtet.

A Treg-sejtek gátolják az autoreaktív, potenciálisan veszélyt jelentő limfociták aktiválódását és funkcióját, így az immunológiai tolerancia fenntartásában játszanak szerepet. A Treg-sejtek a konvencionális T-sejteket aktiváló stimulusokra anergiával reagálnak, amely azonban megfelelő citokinekkal (pl. IL-2) áttörhető.

A primer melanoma T-limfociták általi infiltrációjának prognosztikus

értékével kapcsolatban ellentmondó tanulmányok láttak napvilágot. Egyes szerzők pozitív korrelációt írtak le a CD4+ és a CD8+ limfociták intratumorális denzitása és a túlélés között (40, 41), mások fordított korrelációt írtak le a CD3+ sejtek intratumorális infiltrációjával (42), megint mások nem találtak összefüggést a túlélés és a CD8+ T-limfociták intra- és peritumorális sűrűsége között (43). Intézeti kutatócsoportunk 52 tumormintán végzett vizsgálata során szintén nem talált összefüggést a túlélés és a CD8+ valamint a CD3+ T-sejtek peritumorális sűrűsége között (44).

Az ellentmondásos eredmények háttérében az a probléma feltételezhető, hogy ezekben a vizsgálatokban nem vették figyelembe a T-sejtek potenciálisan csökkent funkcionális aktivitását. Intézeti kutatócsoportunk összefüggést talált a sejtosztódás szabályozásában fontos szerepet játszó CD25 aktivációs markert, illetve a CD134 kostimulációs receptort hordozó sejtek magas peritumorális

denzitása, valamint a kedvező prognózis között, utóbbi marker a túlélés független prediktorának bizonyult (45, 46).

A melanomás betegek tumormintáit infiltráló regulátor T-sejtek (melyek jelölésére leggyakrabban a FOXP3 faktor elleni antitesteket használják) jelenlétének prognosztikai jelentőségét vizsgáló kutatások szintén ellentmondásos eredményeket adtak (42, 47), kutatócsoportunk 97 beteg tumormintáin végzett vizsgálata nem tudta összefüggésbe hozni denzitásukat a betegség kimenetelével (48).

2.2.2.2. B-limfociták

Az antitest-közvetített immunválasz fő szereplői, a B-limfociták a többi szolid tumorhoz hasonlóan melanomában is viszonylag kis mennyiségben fordulnak elő, az összes limfocita 15-20 százalékát alkotják (42, 45). Jellemzőjük, hogy a membránjukon jelen levő B-sejt-receptor (BCR) komplex oldott vagy részecske-antigénekkkel is képes reagálni, APC-k közvetítése nélkül. Az antigéningerre vagy limfokinek hatására aktiválódó B-limfociták plazmasejtté, vagyis ellenanyag-termelésre specializálódott effektor sejtté alakulva a humorális immunválasz alapvető résztvevői. Szerepük a tumorprogresszióban szintén ellentmondásos; a termelt antitestek révén a tumor növekedését is elősegíthetik, ugyanakkor hatékony antigénprezentáló sejt-ként a daganatellenes immunválaszt is potenciórozhatják (49, 50). Kutatócsoportunk a CD20 marker elleni antitesttel jelölt B-limfociták jelenlétét a tumorban pozitív prognosztikus faktornak találta, az aktivált T-sejtek egyidejű jelenlétét jelző CD20+/CD134+ kombináció pedig a túlélés független prediktorának bizonyult (51).

2.2.2.3. NK-sejtek

Az NK-sejtek alkotják a T- és a B-sejtek mellett a harmadik fő limfoid sejtpopulációt. A veleszületett immunrendszer elemei, antigénkötő receptor nélkül is képesek különbséget tenni a szervezet egészséges sejtjei és az MHC-I molekulákat nem megfelelő mennyiségben expresszáló tumorsejtek között és azonnal elpusztítják azokat.

Az NK-sejtek effektor működését az MHC-I-specifikus gátló receptorok (KIR) és az aktiváló receptorok (KAR) egyensúlya határozza meg. A "hiányzó saját" hipotézis alapján, ha a gátló KIR a saját, nem kóros sejtek membránján levő MHC-I molekulához kapcsolódik, a sejtpusztítás nem indul el, ha viszont a célsejten az MHC-I-expresszió csökken és a KIR kötőhelye szabad marad, nem gátlódik a KAR működése, ami az NK-sejt aktiválásához és a célsejt elpusztításához vezet. A szolid daganatokban általában kis mennyiségben fordulnak elő, elsősorban a hematogén áttétek kialakulásának megelőzésében játszhatnak szerepet. Melanomában a szerepüket még nem vizsgálták, de több

tumortípus esetén jelenlétük a betegség kedvező kimenetelével járt együtt (52, 53). Legspecifikusabbnak tartott jelölő markerük az NKp46 marker.

2.2.2.4. Dendritikus sejtek

A dendritikus sejtek (DC-k) intenzív antigénfelvevő, -átalakító és -bemutató képességük révén a specifikus immunválasz beindításának nélkülözhetetlen elemei. Három fő típusuk ismert, a bőrben és a nyálkahártyákon előforduló Langerhans-sejtek, az intersticiális DC-k és a plazmocitoid DC-k. Jellemzőjük, hogy antigénfelvételt követően, illetve citokinek hatására gyors aktivációra és érésre képesek, az érett DC-k jellemző sejtfelszíni markerei a CD83 és a DC-LAMP. Míg a plazmocitoid DC-k és az éretlen DC-k inkább immunszuppresszív hatásúak és negatív prognosztikus faktornak bizonyultak (43, 54), addig az érett dendritikus sejtek magas denzitása, különösen aktivált T-sejtek egyidejű jelenléte esetén a betegség kedvező kimenetelét jelezte elő. Ennek megfelelően a DC-LAMP+/CD134+ kombináció a túlélés független prediktív faktorának bizonyult (55).

2.2.2.5. Makrofágok

A keringő monocitákból származó makrofágok különböző funkcionális sajátosságokkal rendelkezhetnek. A klasszikus módon (IFN-alfa és mikrobaantigének útján) aktivált M1 makrofágok a helper T-sejteket aktiválva és jó antigénprezentáló képességük révén fontosak a tumor elleni immunvédekezésben. Az alternatív úton aktivált (IL-4, IL-10, IL-13 vagy immunkomplexek által) M2 makrofágok inkább a károsodott szövetek újraépítésében vesznek részt. Növekedési faktorokat termelve az angiogenezist és a tumornövekedést stimulálhatják és gátolják a tumorelles immunválasz kialakulását. Ebbe a csoportba tartoznak feltételezhetően a tumorasszociált makrofágok is (56–58).

2.2.2.6. Granulociták és hízósejtek

A neutrofil granulociták, amelyek a szervezet külvilággal szembeni első védelmi vonalát jelentik, aktivált állapotban szintén képesek a malignus sejtek elpusztítására, az általuk termelt citokinek és mátrixbontó proteázok azonban inkább a daganat progresszióját és invázióját serkentik, jelenlétük általában a daganatokban és melanomában is a rossz prognózis jele (43, 52).

Az eozinofil sejtek jelenléte a legtöbb vizsgált tumorban a kedvező prognózis jele, melanomában előfordulásuk ritka, prognosztikai jelentőségüket még nem vizsgálták (52).

A szöveti hízósejtek a vérben keringő bazofil sejtek megfelelőinek tekinthetők. Prognosztikai jelentőségük kérdéses, ellentmondásos vizsgálati eredmények születtek, a közlemények többsége jelenlétüket inkább a betegség kedvezőtlen kimenetelével hozta összefüggésbe (52, 59–61).

2.2.3. A daganat elleni immunválasz

A daganatsejtek a bennük végbement genetikai változások következtében immunológiai szempontból általában megkülönböztethetők az egészséges sejtektől, így optimális esetben az immunrendszer képes őket megtalálni és elpusztítani mind a veleszületett, mind pedig az adaptív immunrendszer aktiválódása révén.

A daganatsejteken megjelenő antigének egyik csoportja a tumorspecifikus antigének, melyek kizárólag daganatsejteken fordulnak elő, melanómában ilyen pl. a ciklinfüggő kináz4 (CDK4), másik csoportjuk pedig a lényegesen gyakoribb tumorasszociált antigének, amelyek abnormalis időben, szövetben vagy mennyiségben megjelenő fehérjék, mint pl. a melanoma-antigén-1 (MAGE-1), illetve a melanin bioszintéziséhez szükséges tirozináz, amely csak melanocitákban és melanomasejtekben található.

A daganatsejtek antigénjeit megjelenítő dendritikus sejtek a legközelebbi nyirokcsomóba vándorolva CD4+ és CD8+ T-sejteket valamint B-sejteket aktiválnak, ellenanyagok és tumorspecifikus limfociták képződését generálva, melyek a keringésbe jutva találják meg a daganatsejteket.

A tumor elleni immunválaszban elsődleges sejtközvetített immunválasz kialakulásának feltétele egyrészt az antigénprezentáló sejtek MHC-molekuláin bemutatott antigénpeptid T-sejt-receptorral (TCR) történő összekapcsolódása, másrészt a kostimulációs szignál, amelyet a szintén az APC-k felszínén található kostimulációs molekuláknak a T-sejtek felszínén levő receptorhoz történő kapcsolódása hoz létre.

A kostimulációs molekulák közül kiemelkedő jelentőségű a B7-1 (CD80) és a B7-2 (CD86), melyek az aktivált APC-k felszínén jelentős mennyiségben fejeződnek ki és a naiv T-limfocitákon található CD28 receptorhoz kötődve a T-sejtek aktivációjához szükséges kostimulációs szignált biztosítják. A fenti immunellenőrzési pont gátló receptora a CTLA-4 (citotoxikus T-limfocita-asszociált antigén-4), amely a T-sejteken általános sejt felszíni expressziót mutató CD28-cal ellentétben nyugvó állapotban intracelluláris lokalizációjú, csak aktiváció hatására jelenik meg a sejtek felszínén. Kivételt képeznek a regulátor T-sejtek (Treg), melyeken a CTLA-4 konstitutív sejt felszíni expressziót mutat és fontos szerepet játszik immunszuppresszív hatásuk kifejtésében (62).

A B7-1, illetve B7-2 molekulák CTLA-4-hez való kapcsolódása – amely a CD28-hoz történő kötődésüknél 10-40-szer nagyobb affinitású – egy negatív visszacsatolós folyamat, amelynek fontos szerepe van az immunválasz korai fázisában a T-sejt-aktiváció mértékének szabályozásában. Jelentőségét mutatja, hogy a CTLA-4-hiányos egerek születésük után 3-4 héten belül elpusztulnak

több szervet érintő súlyos autoimmun limfoproliferatív betegség következtében (63, 64), emberben pedig a CTLA-4 gén polimorfizmusai fokozzák különböző autoimmun betegségek kockázatát (65).

A B7 molekulacsalád további fontos tagjai a B7-H1 (más néven PD-L1, programozott sejthalál ligandum-1) és a B7-DC (PD-L2), melyek kifejeződése fokozódik az APC-ken gyulladáscitokinek hatására (66–68). Receptoruk, a PD-1, a CTLA-4-hez hasonlóan szintén aktiváció hatására jelenik meg a T-limfocitákon (kivéve a konstitutív expressziót mutató Treg-sejteket). A PD-1 ligandumával történő kölcsönhatása gátolja a T- és a B-limfociták aktivációját, és fiziológiai körülmények között szintén az immunválasz szabályozásában van fontos szerepe. Daganatos szervezetben azonban a többféle tumorsejt-típuson expresszálandó PD-L1 és a tumorinfiltráló limfocitákon megjelenő PD-1 receptor kapcsolódása ugyancsak szerepet játszik a tumor elleni védekezés hatástalanságában (69, 70).

A másik PD-1-ligandum, a PD-L2 ritkábban expresszálandó daganatsejteken és az antitumorális immunitás szabályozásában játszott szerepe kevésbé tisztázott (67, 71). A T-sejtek aktivációját szabályozó fontosabb receptor-ligandum kölcsönhatások még a LAG3 és CD3-TCR komplex, a BTLA-HVEM kapcsolódás és a TIM3 és galektin-9 kapcsolódás, melyek szintén negatív szabályozó funkciót töltenek be (66, 72).

2.2.4. Az immunválasz elkerülése

Bár bizonyított tény, hogy az immunrendszer megpróbálja felvenni a harcot a daganatok ellen, ez az esetek egy részében ineffektív, ezt tanúsítja minden makroszkóposan kimutatható, diagnosztizált daganat.

A perifériás vérben és a tumorszövetben is jelen levő, a daganatsejtek elpusztítására potenciálisan képes specifikus CD8+ és CD4+ T-sejtek ellenére az emberi szervezet általában nem képes hatékony immunválasz létrehozására.

Mint ahogy a daganatsejtek a szervezet saját sejtjeiből keletkeznek, immunogenitásuk általában csekély, illetve aktívan is elnyomhatják és modulálhatják az immunrendszert. A daganatok által termelt immunszuppresszív hatású citokinek, mint pl. a TGF- β , VEGF, IL-6, az effektor vagy az antigénprezentáló sejteket gátolják és a regulátor T-sejtek kialakulásának kedveznek. A daganatos hipoxiában pedig a daganatsejtekben termelődő VEGF-A és adenzin gátolja a T-sejtek működését. Az immunrezisztencia hátterében a tumorantigének és MHC-molekulák nem megfelelő mértékű expressziója, valamint a sejtközvetített immunválasz kialakulásához szükséges antigénprezentáció hibái és a kostimulációs molekulák hiánya egyaránt feltételezhetők (73).

A daganatsejt genomja a fokozott szaporodás és az elégtelen javítási funkciók következtében instabil, melynek következtében különböző sejtvonalak jönnek létre, melyek aztán ellenálló képességük alapján szelektálódnak olyan módon, hogy az immunválaszt passzívan elkerülő vagy aktívan moduláló sejtek szaporodnak tovább. A daganattal szemben kialakuló immunológiai tolerancia kialakulásához az is hozzájárul, hogy a szervezetben folyamatosan és nagy mennyiségben jelen levő tumorantigének anergiát válthatnak ki, illetve a kiterjedt disszemináció a szervezetet legyengítve szintén az effektív immunvédekezés ellen hat (37).

2.3. A melanoma terápiája

2.3.1. Sebészi kezelés

A primer melanoma ellátása a megfelelő biztonsági zónával végrehajtott sebészi excízió, amely in situ melanoma esetén 5 mm-es sebészi szélt, 2 mm-nél vékonyabb invazív melanoma esetén 1 cm-es, 2 mm-nél vastagabb melanoma esetén 2 cm-es biztonsági zónát jelent (74). Ha a klinikai diagnózis bizonytalan, különösen, ha a műtét csonkolással vagy súlyos deformitással járna, próbaexcízió is megengedhető.

Intermedier tumorvastagság esetén, amikor a limfogén terjedés esélye már nem elhanyagolható, de a hematogén áttétképződés esélye még csekély, őrszem- (sentinel) nyirokcsomó vizsgálat végzése javasolt. Az SLN-vizsgálat egyrészt a pontos stádiumbesoroláshoz szükséges, másrészt korábbi vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy az áttétes őrszemnyirokcsomó esetén végzett komplettáló blokkdisszekció pozitív hatással van a túlélésre (75, 76), bár újabban ez utóbbit vitatják (77).

Klinikailag igazolt makroszkópos nyirokcsomóáttét esetén regionális blokkdisszekció a követendő eljárás.

Távoli áttét esetén műtéti megoldást ritkán alkalmazunk, leginkább szoliter metasztázis és egyebekben stabil betegség fennállásakor, illetve központi idegrendszeri áttét esetén jön szóba.

2.3.2. Sugárkezelés

Primer sugárterápia csak nagy kiterjedésű in situ melanoma esetén javasolható. Adjuváns irradiációt mind a primer tumor, mind a nyirokrégió sebészi ellátását követően alkalmazunk, amennyiben a megfelelő lokális kontroll műtéti úton nem biztosítható.

Panaszokat okozó metasztázisok esetén palliatív céllal, tumortömeg-csökkentés céljából is indikálható irradiáció. Cerebrális áttétek esetén, szintén palliatív céllal sugársebészeti (sztereotaxiás)

és teljes agyi besugárzást alkalmazunk, amennyiben a beteg általános állapota és várható élettartama ezt lehetővé teszi (74).

2.3.3. Gyógyszeres kezelés

2011 előtt nem állt a rendelkezésünkre olyan terápia az előrehaladott melanoma kezelésére, amely bizonyítottan javította volna a teljes túlélést, kontrollált, randomizált vizsgálatokban a teljes túlélés 8–11 hónap között volt (78, 79).

2.3.3.1. Kemoterápia

Citosztatikus terápiát metasztatikus melanomában ma már csak többedvonalban, maximálisan palliatív céllal alkalmazunk. A dakarbazint az FDA 1975-ben törzskönyvezte előrehaladott melanoma kezelésére, és bár a mai napig nem áll rendelkezésre olyan randomizált fázis III-as vizsgálat, amely a túlélésre gyakorolt pozitív hatását alátámasztaná, évtizedeken keresztül a szisztémás kezelés aranystandardjának számított. Cerebrális disszemináció esetén, illetve többedvonalban karboplatin, fotemusztin, paklitaxel és kemoterápiás kombinációk is alkalmazhatók, leggyakrabban dakarbazin-ciszplatin, PBD (ciszplatin, BiCNU, dakarbazin), BOLD séma (dakarbazin, vinkrisztin, BiCNU, bleomicin), de a válaszadási arány mind a monoterápiák, mind a kombinációk esetén kevesebb mint 15% és a túlélés nem éri el az 1 évet (78, 79).

2.3.3.2. Célzott terápia

Az onkogén BRAF-kináz első szelektív gátlóját, a vemurafenibet (Zelboraf) 2011-ben az FDA, majd az EMA is törzskönyvezte előrehaladott melanomában funkciónyerő BRAF V600 mutáció kimutatása esetén. A gyógyszer egy fázis III-as vizsgálatban kilencszeresre növelte az objektív válaszadási arányt a dakarbazinhoz képest (80).

A mutáns BRAF egy másik viszonylag szelektív gátlója, a dabrafenib az objektív válaszadási arányt 7%-ról 50%-ra emelte dakarbazinnal összehasonlítva, hasonlóan a vemurafenibhez (81). Ugyanakkor BRAF-inhibitor monoterápia mellett az átlagosan 6-7 hónap alatt kialakuló rezisztencia miatt igen hamar bekövetkezik a progresszió (82).

A trametinib a MEK jelátviteli útvonal gátlója, BRAF-mutáns betegekben monoterápiában kisebb hatékonyságot mutatott a BRAF-gátlókhöz képest (83).

Kombinációban alkalmazva azonban a dabrafenib-trametinib terápiát szignifikánsan hosszabb progressziómentes túlélés érhető el, egy fázis III-as vizsgálat alapján 11,4 hónap a vemurafenib-monoterápia 6,7 hónapjához képest (84). Hasonló eredményeket adtak a vemurafenib-kobimetinib kombinációval végzett vizsgálatok is (85).

CKIT-mutáns melanómában, fázis II-es vizsgálatokban 16–23%-os válaszadási arányt értek el (86, 87).

2.3.3.3. Immunterápia

A melanoma immunológiai vonatkozásai régóta ismertek. A spontán regresszió jelensége, amely mind a primer tumorban, mind a metasztázisokban előfordul, azt sugallja, hogy a megfelelően aktivált immunrendszer a daganatsejteket képes elpusztítani.

Az immuntolerancia legyőzésére számos stratégiát teszteltek, melyek két nagy csoportra, az aktív és a passzív immunterápiákra oszthatók.

2.3.3.1. Passzív immunterápiák

Adoptív sejterápia

Az adoptív sejterápia (ACT) személyre szabott terápiás stratégia, melynek során az antigénspecifikus T-sejteket izolálják a perifériás vérből vagy a reszekált tumorból, amelyeket ex vivo szaporítanak, majd visszaadják őket a betegnek. Több módzata ismert, egyes esetekben természetesen előforduló, aktivált tumorellenes T-sejteket használnak, más esetben olyanokat, amelyeket genetikailag módosítanak tumorellenes T-sejt-receptorral (TCR) vagy kiméra antigénreceptorral (CAR). Utóbbi esetben géntechnológiai úton manipulált, a tumorsejteket könnyebben felismerő, ezáltal a daganatellenes védekezésben hatékonyabb T-sejteket használnak.

Az autológ TIL-eket alkalmazó adoptív sejterápia az egyik leghatékonyabb megközelítésnek tűnik metasztatikus melanomás betegekben tartós teljes remisszió elérésére. A 80-as években igazolták először a saját TIL-t alkalmazó ACT hatását, majd 2002-ben számoltak be arról, hogy a kezelés előtt alkalmazott kemoterápiával végzett limfodeplecióval a válaszadási arány és a válasz tartóssága lényegesen emelhető. Az első, 43 betegen végzett vizsgálatban 49%-ban észleltek objektív választ és 12%-ban komplett remissziót, és hasonló hatékonyságról számoltak be más amerikai és izraeli centrumok is (88, 89).

Még jobb eredményeket sikerült elérni, amikor a prekondicionáló kemoterápiát követően a bevitt T-sejtek in vivo proliferációjának és túlélésének támogatására a kezelést IL-2 adásával egészítették ki, a hármas kombináció 40%-os objektív válasz mellett 10-20%-os komplett remissziót eredményezett (90).

A terápia széles körben való elterjedésének egyrészt technikai korlátai vannak, mert a megfelelő sejtenyészti rendszereknek a betegágy közelében kell rendelkezésre állni, másrészt standard terápiaként történő elfogadását a magas dózisú IL-2-injekció okozta súlyos toxikus mellékhatások is korlátozzák. A sejtenyészti technikák javítása a későbbiekben lehetővé teheti egy nagy betegszámon elvégzett, III-as fázisú vizsgálat lebonyolítását.

2.3.3.2. Aktív immunterápiák

2.3.3.2.1. Nem specifikus aktív immunterápiák

BCG-terápia

Az első próbálkozások bakteriális eredetű immunstimulánsok voltak, melyek közül a BCG használata terjedt el széles körben, elsősorban adjuváns indikációban. Metasztatikus melanomában a dermális metasztázisok intralézionális injektálásával az esetek 90%-ában sikerült objektív választ elérni, 17%-ban a nem kezelt dermális metasztázisokban is regressziót észleltek. Szubkután és vizcerális metasztázisok esetén azonban mindössze 31%-ban tapasztaltak átmeneti regressziót (91). Ma már melanomában nem alkalmazzák.

Interferon-alfa

Hatásmechanizmusa nem teljesen ismert, az immunrendszer különböző komponenseinek stimulálása mellett közvetlen tumorellenes és anti-angiogén hatása ismert. Metasztatikus melanomában 15%-os válaszadási arányt eredményezett (92). Jelenleg Európában és az USA-ban is adjuváns indikációban törzskönyvezett, magas, intermedier és alacsony dózisban. A teljes túlélésre gyakorolt kedvező hatás megfelelő bizonyossággal csak magas dózis esetén igazolódott, utóbbi azonban jelentős toxicitása miatt széles körben nem alkalmazható (93).

TNF-alfa

In-tranzit áttétek kezelésére alkalmazták izolált végtagperfúzióban melfalannal együtt, azonban vitatott, hogy a TNF-alfa mennyiben járult hozzá a klinikai hatáshoz (94).

Interleukin-2

A celluláris immunválaszban fontos szerepet játszó citokin, legfontosabb ismert hatása a T-sejtek proliferációjának elősegítése, de stimulálja a makrofágokat, az NK-sejteket és a B-sejteket is. Hatásmechanizmusa melanomában szintén nem teljesen tisztázott, hatását egy vizsgálat alapján valószínűleg az APC-k aktiválásán és a T-sejtek migrációjának elősegítésén keresztül fejt ki (95).

Egy metaanalízis alapján, amely 8 klinikai vizsgálat és összesen 270 interleukin-2-monoterápiában részesített, metastatikus melanomában szenvedő beteg kórlefolását dolgozta fel, a kezelés 16%-os válaszadási arány mellett 6%-os komplett remissziót eredményezett, amely jelentős számú esetben (28%) tartós tumorentességet jelentett. Ugyanakkor grade 3-4-es mellékhatások csaknem minden betegnél jelentkeztek, a kezeléssel összefüggő halálozás 2% volt, minden esetben szepszis következményeként (96).

2.3.3.2.2. Specifikus immunterápiák

Tumorsejtvakcinák

Az első kísérletekben DNP hapténnel módosított saját daganatsejtekkel történő immunizálással próbálkoztak, amely mérsékelt válaszadási arány mellett súlyos kései hiperszenzitivitási bőrreakciókat eredményezett (97, 98).

Történtek próbálkozások GM-CSF-termelő saját tumorsejtekkel történő vakcinációval is, melyeket az immunstimuláns citokinek génjeivel történő transzdukciónak útján hoztak létre, szintén mérsékelt eredménnyel (99), valamint különböző lizátum alapú preparátumokkal, amelyek azonban a kezdeti biztató eredmények ellenére fázis III-as vizsgálatban nem mutattak statisztikailag szignifikáns hatást (100, 101).

Nagy reményeket fűztek kezdetben a melanoma-asszociált antigéneket (MAA) imitáló peptidvakcinák alkalmazásához, melyek a melanomás betegek mintegy felénél specifikus sejtes immunreakciót váltottak ki, azonban a klinikai hatás korlátozott volt és gyakran nem korrelált az immunológiai hatással (102, 103).

Ígéretes megközelítésnek tűnt a tumorelles immunválasz fokozására a leghatékonyabb antigénprezentáló sejtek, a dendritikus sejtek alkalmazása. A daganatos betegekből kinyert DC-eket MAA-peptidekkel vagy tumorsejtlizátumokkal előkezelve alkalmazták a vakcinációt, azonban objektív klinikai választ csak néhány esetben detektáltak, a sikertelenség oka több esetben antigén-negatív klónok kisselektálódása volt (104).

2.3.3.2.3. Onkolitikus vírus terápia

A talimogene laherparepvec (T-VEC) egy genetikailag módosított herpeszvírus, amely a daganatba intralézionálisan injektálva, a daganatsejtben replikálódva képes elpusztítani azt, másrészt az elpusztult tumorsejtekből kiszabaduló antigének következtében immunstimuláló hatású. A törzskönyvezés alapjául szolgáló fázis III-as vizsgálatban 26%-os válaszadási ráta mellett 11%-os komplett választ eredményezett, a teljes túlélés szignifikáns meghosszabbítása nélkül (105).

2.3.3.2.4. Az immun-ellenőrzési pontok gátlása

A T-sejtek aktivitását fékező molekuláris szabályozó rendszer a daganatok környezetében hozzájárulhat a tumorelles immunvédekezés hatástalanságához. Az alábbi terápia célja, hogy e molekulák működésének blokkolásával felszabadítsa az immunrendszert a gátló hatás alól, így serkentve a daganat elleni immunválasz kialakulását.

CTLA-4-inhibitorok

Az immunmodulátor ellenanyagok első célpontja a CTLA-4 receptor volt. Az állatkísérletes vizsgálatok a 90-es években kezdődtek (106, 107), majd a sikeres preklinikai kísérleteket nem sokkal később követték a korai fázisú klinikai vizsgálatok két humán anti-CTLA-4 ellenanyag, az ipilimumab és a tremelimumab alkalmazásával (108–110).

Az ipilimumabbal és a tremelimumabbal végzett, hasonló hatásosságot mutató korai fázisú klinikai kísérletek ellenére a két antitest első fázis III-as vizsgálatai különböző eredménnyel zárultak. A tremelimumab esetében 655, nem operálható IIIc vagy IV-es stádiumú melanomás betegen a kísérleti gyógyszer hatását a standard kemoterápiás szerekével (dakarbazin vagy temozolamid) hasonlították össze, és mivel az interim analízis során nem találtak szignifikáns túlélési különbséget, a vizsgálatot a tervezett befejezés előtt leállították. A végső elemzésnél ugyanakkor kiderült, hogy bár a két karon az objektív válaszadási arány hasonló volt (10,7% a tremelimumab és 9,8% a kemoterápia esetén) és a túlélésben sem találtak szignifikáns különbséget (medián: 12,6 hónap vs. 10,7 hónap, $p=0,127$), a válasz időtartama hosszabb volt a tremelimumab esetében (35,8 hónap vs. 13,7 hónap, $p=0,0011$) (111).

Az ipilimumab ugyanakkor már az első, mérföldkőnek számító fázis III-as vizsgálatban szignifikáns túlélési előnyt eredményezett (112). A 676, nem operálható III-as, illetve IV-es stádiumú melanomás beteg bevonásával végzett randomizált vizsgálatban az egyedüli szerként, illetve gp100 peptidvakcinával kombinációban adott ipilimumabot (3 hetente 3 mg/ttkg dózisban adagolva) az önmagában adott gp100-vakcinával hasonlították össze. A válaszadási ráta az egyedül ipilimumabot kapott betegek között volt a legmagasabb, 10,9% vs. 5,7% az ipilimumab+gp100 karon és 1,5% a gp100-karon. A teljes túlélésben nem tapasztaltak szignifikáns különbséget a két ipilimumabot kapó kar között (medián: 10,1 és 10,0 hónap) és mindkettő meghaladta a gp100-kar medián értékét (6,4 hónap; $p=0,003$). A két ipilimumabos karon 10-15% volt a súlyos (grade 3-4), a megnövekedett immunaktivitással összefüggő mellékhatás (irAE) aránya és 2,1%-ban regisztráltak a kezeléssel összefüggő halálesetet, melynek a fele volt immunológiai eredetű. A súlyos immunasszociált mellékhatások leggyakrabban a gasztrointesztinális traktust érintették (colitis).

Egy másik placebokontrollált, randomizált fázis III-as vizsgálatban 502, kezeletlen áttétes (stage III, illetve IV) melanomás beteg részesült ipilimumabbal kombinált (10 mg/ttkg 3 hetente) dakarbazin-, illetve dakarbazin+placebo kezelésben (113). A kezelésre adott válasz aránya (CR+PR) 15,2% vs. 10,3% volt az ipilimumabot, illetve csak dakarbazint kapók között ($p=0,09$) és szignifikáns különbséget találtak a két csoport túlélésében (11,2 hónap vs. 9,1 hónap). Súlyos immunasszociált mellékhatások

az ipilimumabkaron 38,1%-ban fordultak elő és – eltérően a fent említett vizsgálatról – leggyakrabban a májat érintették (hepatitis).

A vizsgálat 4 éves túlélési adatai alapján az ipilimumab-dakarbazin kar betegeinek túlélése közel 10%-kal meghaladta a placebo-dakarbazin kar betegeinek túlélését, 19% vs. 9,6% (114). Egy másik, három különböző fázis II-es vizsgálat összesen 487 betegének követése alapján készült túlélési elemzés az öt éves túlélést 12–38%-nak mérte az előkezelt betegekben, míg 38–50%-nak azoknál a betegeknél, akik korábbi kezelésben nem részesültek (115).

PD-1-inhibitorok

A PD-1-et (programozott sejthalál receptor 1), illetve ligandumát, a PD-L1-et gátló antitestek tartós választ eredményeztek több különböző előrehaladott daganat esetén. A PD-1 aktivált T-sejteken, NK- és B-sejteken fejeződik ki. Ligandumai, PD-L1 és a PD-L2 elsősorban makrofágokon és dendritikus sejteken expresszálódnak. A PD-L1 azonban a PD-1-en kívül a CD80-hoz is kötődik, amely egy aktivációs T-sejt-marker, az anti-PD-1 és anti-PD-L1 terápia hatékonysága és a mellékhatásokban észlelt különbség valószínűleg elsősorban ezen interakció következménye.

A B7/CTLA-4 kölcsönhatással szemben, amely a sejt közvetített immunválasz kezdeti fázisának legfontosabb szabályozó mechanizmusa, a PD-1 fiziológiásan főként a T-sejt-aktiváció későbbi, végrehajtási fázisában játszik szerepet, a perifériás szövetekben a lokális gyulladásos reakciók kontrollálásában és a saját szövetekkel kapcsolatos tolerancia fenntartásában.

Több, a PD-1-útvonalat megszakító ágens fejlesztése indult meg párhuzamosan, melyek közül melanomában a PD-1-gátló nivolumab és pembrolizumab hatékonyságát sikerült klinikai vizsgálatok során alátámasztani.

A nivolumab 73%-os egyéves túlélést eredményezett terápianív, előrehaladott melanomában szenvedő betegeknél szemben a dakarbazinterápiában részesülő kontrollcsoport 42%-os túlélésével (116). Egy másik vizsgálatban korábban ipilimumabbal kezelt, előrehaladott melanomás betegeken vetették össze a nivolumab hatását a kemoterápiáéval; a válaszarány 32% vs. 11% volt (117).

A másik, melanomában hatásosnak bizonyult PD-1-gátló, a pembrolizumab 2 mg/ttkg dózisban fél év után 34%-os, 9 hónap után 24%-os progressziómentes túlélést biztosított a citosztatikus kar 16, illetve 8 százalékaival szemben (118). A Keynote-006 vizsgálatban (119) a pembrolizumab és az ipilimumab hatását hasonlították össze; a medián tumormentes túlélést szignifikánsan hosszabbnak mérték az első esetben (5,5 hónap vs. 2,8 hónap), a súlyos nemkívánatos események azonban az ipilimumabkaron voltak gyakoribbak (13,3% vs. 19,9%).

A PD-1-gátlók általában jobban tolerálhatók, súlyos autoimmun mellékhatás a CTLA-4-blokádhoz képest jelentősen ritkábban fordul elő.

Kombinált immunterápiák

A CTLA-4-inhibitorok és a PD-1-gátlók, mivel az immunválasz különböző fázisában hatnak, komplementer aktivitást mutatnak metasztatikus melanomában. Egy 945 beteg bevonásával készült, háromkarú fázis III-as vizsgálatban az ipilimumab, a nivolumab és az ipilimumab-nivolumab kombináció hatékonyságát és biztonságosságát hasonlították össze. A progressziómentes túlélést 2,9, 6,9 és 11,5 hónapnak mérték, a fenti sorrendben. A magasabb hatékonyságot azonban jelentősen fokozott mellékhatások árán lehetett elérni: a grade 3-4-es mellékhatások gyakorisága 16,3% volt a nivolumabkaron, 27,3% az ipilimumabkaron és 55% a kombináció esetén (120). Azt is megállapították, hogy a PD-L1-pozitív tumorban szenvedő betegek PFS-e ugyanannyi, 14 hónap volt mind nivolumab-monoterápia esetén, mind pedig a kombináció alkalmazásakor, amely megkérdőjelezi a kombinált terápia létjogosultságát ebben a betegcsoportban, különös tekintettel a várható súlyos mellékhatásokra.

2.3.3.3.3. Az immunterápiára adott válasz jellemzői

Már az ipilimumabbal végzett első vizsgálatok alapján világossá vált, hogy az immunterápiára adott válasz kinetikája alapvetően különbözik a konvencionális citosztatikus, illetve a molekulárisan célzott terápiás modalitásokétól. Míg azok esetében a kezelés eredménye sokszor már néhány héten belül megmutatkozik, az immunellenőrző pontok blokkolására, illetve az egyéb immunterápiákra adott válasz általában jóval később jelentkezik, tipikusan több hónap múlva, a hatásos tumorelles immunválasz kialakulása időigényességének megfelelően (121).

A klinikai válasz kialakulását megelőzően esetenként még az áttétek méretnövekedése is megfigyelhető képalkotó vizsgálatokkal, ami feltehetően a megnövekedett immunsejt-infiltrációval hozható összefüggésbe. A terápiás válasz többféle formában megjelenhet, és mindegyik válaszmintázat kedvező túléléssel jár együtt: a meglévő léziók zsugorodása újak megjelenése nélkül; tartós stabil betegség, esetenként a teljes tumortömeg lassú csökkenésével; kezdeti tumortömegnövekedést követő klinikai válasz; klinikai válasz új léziók megjelenése mellett (122). A különböző hatáskinetika miatt a citotoxikus szerek hatásának értékelésére kifejlesztett szempontrendszerek, mint a WHO- vagy RECIST-kritériumok alkalmazásával nem minden esetben lehet megfelelően lemérni a daganatellenes immunválasz befolyásolását célzó terápia hatékonyságát. Új szempontrendszereket fejlesztettek ezért ki az immunterápiás protokollok értékelésére, amelyek figyelembe veszik a különböző lehetséges választípusokat (121, 122). Az irRC (immune-related

response criteria, immunfüggő válaszkritériumok) lényege a teljes tumorterhelés (indexlézió térfogatának és az új léziók térfogatának összege) mérése. Ha például a tumorterhelés legalább 50%-kal csökken, akkor új léziók megjelenése esetén is a terápiás válasz parciális regresszióknak tekinthető. Az immunterápiákra adott válasz jellemző kinetikája azt is eredményezi, hogy a kezelés hosszú távú eredményességének értékelése jobb objektív válaszarányt eredményezhet, mint a vizsgálat befejezése idején meghatározott mutatók. A stabil betegség például idővel részleges válasszá (PR), míg ez utóbbi komplett válasszá (CR) alakulhat (123, 124).

Fontos jellemzője még az immunterápiák klinikai hatásának, hogy bár a válaszadási arány alacsonyabb, mint a célzott terápiák esetén, a responderek jelentős hányadánál tartós remisszió érhető el (109, 112, 124, 125). A hosszú távú hatás hátterében valószínűsíthető az immunológiai memória kialakulása és védő hatása, ami magyarázhatja a korábban más immunterápiás modalitások esetében megfigyelt hasonló eredményeket is, pl. a nagy dóziszú IL-2-re vagy az adoptív sejttranszferre reagáló előrehaladott melanomás betegeknél (96, 103, 126).

2.3.3.3.4. Az immunterápiák prediktív biomarkerei

Az immunrendszer stimulálását célzó kezelésmódoknál tapasztalt alacsonyabb válaszráta részben annak tulajdonítható, hogy – szemben a célzott terápiákkal, melyeknél a kezelés feltétele a megfelelő mutáció jelenléte, amely viszonylag stabil – ezek nem közvetlenül a daganatsejtekre hatnak, és így nehezebb megfelelő prediktív faktort találni, amely segítene a kezelésre jól reagáló betegek kiválasztásában. A potenciális markerek ráadásul nem stabilak, minthogy a beteg immunológiai státuszának, illetve a daganat környezetének változásával ezek expressziója is változhat.

A kutatások elsősorban immunológiai paraméterek vizsgálatára irányultak, egyrészt szisztémásan, másrészt lokálisan, a tumor területén. Nehezíti a megítélést ugyanakkor, hogy a vizsgált tényezők egy része, így a tumort infiltráló immunsejtek denzitása, vagy egyes fehérvérsejttípusok mennyisége és aránya a perifériás vérben prognosztikus markerként is ismeretesek, azaz a terápiától függetlenül is előre jelezhetik a betegség kimenetelét (127).

Ipilimumab esetén az egyik legtöbbet vizsgált szisztémás marker az abszolút limfocitaszám (ALC), amelynek legtöbbször a kezelés hatására bekövetkező emelkedése korrelált a terápiás válasszal és a túléléssel (128–130). Megfigyelték még az alacsony limfocita/neutrofil arány (131), a Treg-sejtszám csökkenése (132), a keringő mieloid eredetű szuppressorsejtek (MDSC) alacsony száma (133), a keringő CD4+, ICOS-t expresszáló T-sejtek emelkedett száma (128), a Ki67-expresszáló, illetve NY-ESO-1 antigénre specifikus CD8+ T-limfociták jelenlétének (130, 134) összefüggését a betegség

kimenetelével. A szérumfaktorok közül az emelkedett LDH, VEGF és CRP a betegség rosszabb kimenetelét jelezte számos vizsgálatban ipilimumabterápiával kezelt betegeknél (130, 135, 136).

A lokális tényezők közül a tumorban a kezelés előtt nagyszámú FOXP3+ sejt jelenlétét, az indolamin-2,3-deoxigenáz (IDO) immunszuppresszív enzim expresszióját, illetve a kezelést követően a tumorinfiltráló limfociták számának emelkedését (138), és számos immunasszociált gén (T-sejtmarkerek, citokinek, kemokinek, MHC-molekulák, immunglobulinok) magasabb kiindulási expressziós szintjét, valamint a kezelés hatására az immunválasz kialakulásával kapcsolatba hozható gének kifejeződésének emelkedését és a sejtosztódással kapcsolatos gének kifejeződésének csökkenését hozták összefüggésbe a kedvező terápiás válasszal (137, 138).

A PD-1-gátló hatóanyagokkal végzett vizsgálatok többségében a tumor PD-L1-expressziója korrelált a terápia hatásosságával. Ugyanakkor a PD-L1-expresszió nem kellően szenzitív, mert PD-L1-negatív tumorban szenvedő betegek jelentős részénél (15-20%) is effektív a terápia (139, 140). Másrészt a marker specifitását rontja, hogy olyan daganatoknál, ahol a tumorsejtek PD-L1-expressziója ugyan magas, de a tumorinfiltráló immunsejtek hiányoznak, effektor sejtek hiányában a PD-1-gátló terápia hatástalan lehet.

3. CÉLKITŰZÉSEK

1. A terápia effektivitását mutató faktorok, a válaszadási arány, a legjobb terápiás válasz, a betegségkontroll-ráta, a progressziómentes és a teljes túlélés vizsgálata a klinikai gyakorlatban ipilimumabbal kezelt metasztatikus melanomás betegekben.
2. Az ipilimumab toxicitásának vizsgálata, az autoimmun mellékhatások és a potenciális prediktív markerek, illetve a terápia effektivitása közötti összefüggés elemzése.
3. A klinikai gyakorlatban könnyen elérhető prediktív marker keresése, amelynek segítségével a terápiás döntés meghozatala előtt megjósolható az ipilimumab várható hatékonysága.
4. A betegek nyirokcsomóáttéteit, illetve a kután/szubkután áttéteit infiltráló egyes immunsejttípusok denzitása és a terápia effektivitása közötti összefüggés vizsgálata.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Az ipilimumabterápia klinikai effektivitásának vizsgálata

4.1.1. A betegbevonás kritériumai és a terápia kivitelezése

A vizsgálathoz 47 előrehaladott melanómában szenvedő, 2010 és 2015 között az Országos Onkológiai Intézetben ipilimumabterápiában részesített beteg kórlefolását elemeztük. A retrospektív vizsgálatba minden olyan beteget bevontunk az adott időszakban, akik szövettanilag igazolt irreszekábilis, III. vagy IV. stádiumú (metasztatikus) bőr-, nyálkahrtya-, vagy okuláris melanoma miatt az Országos Onkológiai Intézetben ipilimumabkezelésben részesültek. A terápiát 13 beteg az Országos Egészségbiztosítási Pénztár (OEP) egyedi méltányossági engedélye alapján, 34 beteg a Bristol-Myers Squibb kiterjesztett hozzáférési programja keretei között kapta. A betegek az ipilimumabkezelésben másod- vagy többedvonalban részesültek.

A kiterjesztett hozzáférési program bevonási kritériuma volt a 2-es vagy annál jobb (0-1) ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) státusz. Az ipilimumabterápiát legalább 28 nappal a megelőző kezelések (sebészi, sugár- vagy kemoterápia) befejezését követően kezdtük. Ki kellett zárunk a kezelésből az autoimmun betegségben, egyéb malignus betegségben, HIV- vagy hepatitis B, C fertőzésben és tünetekkel járó agyi metasztázisban szenvedő, illetve gravid betegeket.

Az ipilimumabterápiát a betegek intravénás infúzió formájában, 3 hetente, 3 mg/ttkg dózisban, összesen maximum 4 alkalommal kapták (indukciós fázis). Dózismódosításra nem volt lehetőség, szükség esetén azonban egy ciklus kihagyása vagy a terápia felfüggesztése megengedett volt. A reindukciót objektív válasz és legalább 6 hónapos progressziómentes túlélést követően, azonos terápia séma szerint alkalmaztuk.

A vizsgálatot a Helsinki Nyilatkozat irányelveinek megfelelően, a Tudományos és Kutatásügyi Bizottság engedélyének birtokában (engedélyszám: 4758-2/2017/EKU) végeztük.

4.1.2. A vizsgálatok kivitelezése és értékelése

Az immunterápia megkezdése előtt 10 napon belül rögzítettük a betegek fizikális és radiológiai státuszát valamint laboratóriumi paramétereit, amely tartalmazta a minőségi vérkép és az ionok mellett a máj-, vese- és pajzsmirigyfunkcióra vonatkozó adatokat.

Minden kezelés előtt fizikális vizsgálatot és standard laboratóriumi vizsgálatokat végeztünk.

A radiológiai utánkövetés koponya-, nyak-, mellkas-, has- és kismedencei CT-vel, szükség esetén kiegészítő MRI-vizsgálattal történt az első ipilimumabkezelést követő 12., 16. és 24. héten. A betegség stádiumát az American Joint Committee on Cancer (AJCC) irányelvei alapján határoztuk meg (22).

A terápias választ az Immune-related Response Criteria (irRC) irányelvei alapján komplett (irCR) vagy parciális (irPR) válaszként, progresszív betegségként (irPD), illetve stabil betegségként (irSD) értékeltük (122). A klinikai előnyt a legjobb terápias válasz ráta (irBORR) vizsgálatával mértük, összegezve a parciális és komplett remissziót elérő betegek százalékos arányát; a betegségkontroll-ráta meghatározásához az előbbiekhez hozzáadtuk a stabil betegséget (irSD) mutató betegek százalékos arányát is.

4.1.3. Statisztikai elemzés

A beteganyag-jellemzők, valamint a terápias válasz értékeit leíró statisztikával (százalék, medián, terjedelem) adtuk meg. A túlélési vizsgálatokban a progressziómentes túlélési időt (PFS) a terápia kezdete és az első progresszió között eltelt időtartamként, a teljes túlélési időt (OS) a terápia kezdete és a halál időpontja között eltelt időtartamként határoztuk meg. Azokban az esetekben, ahol a progresszió jelentkezése és/vagy a halál dátumáról nem állt rendelkezésre pontos információ, az utolsó vizit időpontjával számoltunk. A progressziómentes és a teljes túlélést Kaplan–Meier-módszerrel, a medián követési időt fordított Kaplan–Meier-tesztel vizsgáltuk. A statisztikai elemzést a Statistica 12.5 (Statsoft, Tulsa, OK) programmal végeztük.

4.2. Az ipilimumab toxicitásának vizsgálata

Minden kezelés előtt mellékhatás-monitorozást végeztünk, fizikális és laboratóriumi vizsgálattal, szükség esetén képalkotóval (ultrahang, CT, MRI) kiegészítve. A nemkívánatos eseményeket a National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events 4.0. verziója alapján értékeltük. A beteganyag-jellemzők, a laborparaméterek és az autoimmun mellékhatások megjelenése közötti összefüggést Mann–Whitney U-teszt és Fisher-egzakt teszt segítségével vizsgáltuk.

4.3. A klinikai markerek vizsgálata

4.3.1. A vizsgálatok kivitelezése és értékelése

A klinikai gyakorlatban elérhető prediktív biomarkerek vizsgálatához szükséges adatokat – a betegek kora, neme, ECOG-státusza, a primer melanoma kiindulási helye, az áttétes szervek száma és a betegség stádiuma a terápia megkezdésekor, BRAF- és NRAS-mutációs státusz, megelőző kezelések, laboratóriumi paraméterek, képalkotó vizsgálatok eredményei, nemkívánatos események, progressziómentes és teljes túlélés – intézeti adatbázisunk alapján elemeztük.

A minőségi vérkép vizsgálata automatikus sejtszámlálóval történt, az abszolút neutrofil leukocitaszámot (ANC) 1,9–7 G/L között, az abszolút limfocitaszámot (ALC) 4–11 G/L, az abszolút eozinofilszámot (AEC) 0,04–0,4 G/L, az LDH-értéket 226–451 U/L, a vérsüllyedés értékét (ESR) 2–20 mm/h között értékeltük normáltartománynak. Meghatároztuk a kiindulási neutrofil/limfocita arányt (NLR) és az eozinofil/limfocita arányt (ELR) is. A túlélési modellekben vizsgált kiindulási leukocitaszám és szérummarker-értékek esetén a következő küszöbértékeket határoztuk meg: 0,1 G/L (AEC), 1 G/L (ALC), 4 G/L (ANC), 0,1 (ELR), 4 (NLR), 20 mm/h (ESR), 675 U/L (LDH).

A primer tumort infiltráló limfociták (TIL) jelenlétének értékelése szemikvantitatív módszerrel, hematoxilín-eozinnal festett metszetek vizsgálatával történt, az Amerikai Patológusok Kollégiumának 2015-ös ajánlása alapján (AJCC/UICC TNM, 7th edition). "Hiányzó"-ként értékeltük a TIL jelenlétét, ha nem volt limfocitás infiltráció, vagy ha a limfociták nem infiltrálták a tumor vertikálisan növekvő részét.

A mutációanalízist polimeráz láncreakcióval (PCR) végeztük a BRAF 15. exonja (600. kodon), az NRAS 3. exonja (61. kodon) és az NRAS 2. exonja (12., 13. kodon) irányába, lehetőség szerint a metasztázisokból. Amennyiben metasztázisból szövetminta nem állt rendelkezésre, a vizsgálatot a primer tumorból végeztük.

4.3.2. Statisztikai elemzés

A betegek és a primer tumorok főbb klinikai jellemzőit leíró statisztikával tüntettük fel.

A beteganyag-jellemzők, a laborparaméterek és a terápiás válasz közötti összefüggést Mann-Whitney U-teszt és Fisher-egzakt teszt segítségével vizsgáltuk. A leukocita- és szérummarkerek értékeinek a progressziómentes valamint a teljes túléléssel való összefüggését vizsgálva küszöbértékeket használtunk, melyek értékét ROC-analízissel határoztuk meg. A beteganyag-jellemzők és a laborparaméterek összefüggését a PFS-sel és OS-sel egyváltozós vizsgálatban log-rank-teszttel vizsgáltuk. Az egyváltozós vizsgálatban szignifikánsnak bizonyult változók kapcsolatát Cox-féle

regressziós analízissel vizsgáltuk, az eredményeket esélyhányados (hazard ratio, HR) formájában prezentáltuk, 95%-os konfidenciaintervallummal számolva.

Azokat a betegeket, akiknek az adatai hiányoztak egy adott modellben, kizártuk a vizsgálatból. A szignifikancia határának a 0,05-ös p-értéket tekintettük. A statisztikai elemzést Statistica 12.5 (Statsoft, Tulsa, OK) programmal végeztük.

4.4. A tumorinfiltráló immunsejtek vizsgálata

4.4.1. A betegbevonás kritériumai és a terápia kivitelezése

Az áttéteket infiltráló immunsejtek vizsgálatához 2010 és 2014 között négy magyar centrumban metasztatikus melanoma miatt ipilimumabterápiában részesített 30 beteg archivált, paraffinba ágyazott szövetmintái (1–25 minta/beteg) álltak rendelkezésre. Összesen 86 mintát vizsgáltunk, 52 nyirokcsomóáttétet és 34 kután/szubkután metasztázist. A vizsgált szövetminták mindegyike az immunterápia megkezdése előtti 12 hónapban lett eltávolítva. Az immunterápiát 18 beteg a Bristol-Myers Squibb kiterjesztett hozzáférési program keretében, 3 beteg a társadalombiztosítás terhére, 9 beteg pedig a CA-184-169 vizsgálat keretei között kapta.

A betegek ECOG-státusza 2-es vagy annál jobb (0-1) volt, az ipilimumabterápiát legalább 28 nappal a megelőző kezelések (sebészi, sugár- vagy kemoterápia) befejezését követően kezdtük. Az ipilimumabterápiát a betegek intravénás infúzió formájában kapták 3 hetente, 3 mg/ttkg dózisban, a CA-184-169 vizsgálatban részt vevő 9 beteg pedig 3 mg/ttkg, illetve 10 mg/ttkg dózisban, összesen maximum 4 alkalommal.

A terápiás választ az Immune-related Response Criteria (irRC) irányelvei alapján értékeltük (122). Vizsgálatunkban "responder"-nek véleményeztük azokat a betegeket, akiknél legjobb terápiás válaszként komplett vagy parciális remissziót, illetve legalább 6 hónapig tartó stabil betegséget sikerült elérni (n=13).

A vizsgálatot a Helsinki Nyilatkozat irányelveinek megfelelően, a Tudományos és Kutatásetikai Bizottság engedélyének birtokában (engedélyszám: 2506-3/2017/EKU) végeztük.

4.4.2. A vizsgálatok kivitelezése és értékelése

Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz formalinban fixált, paraffinba ágyazott, 3 mikrométer vastag metszeteket használtunk. A deparaffinált metszeteken mikrohullámos antigénfeltárást követően az

endogén peroxidáz-aktivitást metanolban hígított 3%-os hidrogén-peroxiddal blokkoltuk. A nem specifikus kötőhelyek gátlását 3%-os borjúsérummal végeztük.

A vizsgálatoknál a következő monoklonális antitesteket használtuk: CD8, CD20cy, CD45RO, CD68 (Dako, Glostrup, Dánia), CD16, CD137 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), CD134 (BD Biosciences Eastern Europe, Heidelberg, Németország), FOXP3 (236A/E7; eBioscience, San Diego, CA), NKp46 (R&D Systems, Abingdon, Egyesült Királyság), CD4 és PD-1 (Cell Marque, Rocklin, CA).

Az antitestek kötődését SSTM One-Step Polymer-HRP IHC Detection System (BioGenex, Fremont, CA) alkalmazását követően 3-amino-9-etilkarbazollal (AEC; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) tettük láthatóvá, majd hematoxilinnel háttérfestést végeztünk.

A melanomaáttétek metszeteinek vizsgálatát 10×10-es négyzetháló segítségével végeztük, 400×-os nagyítás mellett, ahol a négyzetháló területe 0,0625 mm² volt. A számolást 2 kutató egymástól függetlenül végezte, a klinikai adatok ismerete nélkül. A két kutató által mért értékek között nem volt szignifikáns különbség, a korrelációs koefficiens az egyes immunsejttípusokra vonatkoztatva 0,6814 és 0,9156 között volt. Az analízishez a mért adatok középértékét használtuk fel. A festődő sejteket minden metszet esetében legalább 10, véletlenszerűen kiválasztott látómezőben számoltuk, a nekrotikus területek kihagyásával. Kisebb metasztázisok esetén a tumor egész területét megvizsgáltuk. Azoknál a pácienseknél, akiknek több szövettani mintája is rendelkezésre állt, a festődő sejtek átlagos sűrűségét is meghatároztuk az egyes immunsejttípusokra vonatkoztatva.

Minden markerre meghatároztunk küszöbértéket a teljes minta vizsgálata alapján kalkulált mediánértékek alapján (néhány esetben kisebb kiigazítást alkalmazva a diszkriminációs erő fokozása céljából) és kiszámítottuk azoknak a betegeknek az arányát, akiknél a küszöbérték feletti átlagos immunsejtsűrűséget mértünk. A nyirokcsomó-metasztázisok esetén a következő küszöbértékeket alkalmaztuk, sejt/mm²-ben megadva: 46 (CD4), 215 (CD8), 430 (CD45RO), 8 (CD134), 10 (CD137), 70 (FOXP3), 83 (PD-1), 53 (CD20), 5 (NKp46), 450 (CD16), 450 (CD68). A kután/szubkután metasztázisoknál használt küszöbértékek a következők voltak: 18 (CD4), 21 (CD8), 220 (CD45RO), 4 (CD134), 3 (CD137), 20 (FOXP3), 5 (PD-1), 4 (CD20), 4 (NKp46), 370 (CD16), 500 (CD68). A nyirokcsomó- és a kután/szubkután metasztázisokat együtt vizsgálva a következő küszöbértékekkel számoltunk: 24 (CD4), 155 (CD8), 440 (CD45RO), 8 (CD134), 7 (CD137), 60 (FOXP3), 28 (PD-1), 34 (CD20), 4 (NKp46), 440 (CD16), 440 (CD68).

4.4.3. Statisztikai elemzés

Az egyes immunsejttípusok sejtdenzitás-értékeinek a két betegcsoport közötti összehasonlítására Mann–Whitney U-tesztet, a magas sejtdenzitást mutató esetek részarányának összehasonlítására khí-négyzet-próbát használtunk. Az összefüggést a különböző sejttípusok és a sejtsűrűség-értékek között Pearson-féle korrelációval vizsgáltuk. A túlélés értékelésére Kaplan–Meier-tesztet és Mantel–Cox-tesztet alkalmaztunk, továbbá egy- és kétváltozós Cox-féle regressziós analízist is végeztünk az átlagos immunsejtsűrűség, valamint a főbb beteganyag-jellemzők (életkor, nem, AJCC-stádium, ECOG-státusz, metasztatikus szervek száma, LDH-érték, előző terápiaik száma) és a túlélés közötti kapcsolat vizsgálata céljából.

Azokat a betegeket, akiknek az adatai hiányoztak egy adott modellben, kizártuk a vizsgálatból. A szignifikancia határának a 0,05-ös p-értéket tekintettük. A statisztikai elemzést a BMDP Statistical Software Pack programmal végeztük.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Az ipilimumabterápia klinikai effektivitásának vizsgálata

5.1.1. Beteganyag-jellemzők

Az Országos Onkológiai Intézetben 2010. december és 2015. július között metasztatikus melanoma miatt ipilimumabterápiában részesített 47 beteg főbb klinikai jellemzőit az 1. táblázat tartalmazza.

Disszeminált betegeink több mint fele (25 beteg, 53%) vastag melanomával (T3-T4) került első ellátásra, és túlnyomó többségük (44 beteg, 94%) után melanomában szenvedett. Tumorinfiltráló limfociták a primer melanomákban közel azonos arányban hiányoztak (18, 38%), illetve voltak jelen (19, 40%). A daganatok 38%-ában találtunk BRAF-mutációt, 17%-ban NRAS-mutációt, 13 daganatban pedig (28%) egyik mutáció sem volt jelen.

A betegek átlagéletkora 57 év volt (tartomány: 26–83), valamivel több mint felük (57%) férfi. A betegek 75 százalékánál jó általános állapotban (ECOG 0) kezdtük a terápiát, 25 százalékuknak voltak enyhe panaszai (ECOG 1), rossz általános állapotú, ágyhoz kötött beteg nem részesült ipilimumabterápiában centrumunkban.

A terápia megkezdésekor a betegek 53%-a (25 beteg) M1c stádiumban, 21% (10 beteg) M1b stádiumban, 13% (6 beteg) M1a stádiumban és ugyanennyi (6 beteg) irreszekábilis III. stádiumban volt, a metasztatikus szervek száma az esetek 28%-ában három vagy annál több volt és 13%-uk agyi metasztázisban is szenvedett. A kiindulási LDH-érték a páciensek túlnyomó többségénél (35 beteg, 75%) a normáltartomány felső határának másfélszerese alatt volt, a betegek 60%-a az ipilimumab előtt legalább 2 különböző típusú terápiában részesült.

A betegek háromnegyede mind a négy ciklus terápiát megkapta, két beteg (4%) kezelése grade 4 mellékhatás miatt szakadt félbe, 10 beteg (21%) esetében pedig a betegség gravis progressziója miatt kellett felfüggeszteni az immunterápiát. Az ipilimumabkezelést követően, a daganat progressziója miatt 23 beteg (49%) egyéb szisztémás kezelésben is részesült: 6 beteg (13%) BRAF-inhibitor-terápiát, 6 beteg (13%) PD-1-gátló terápiát és 18 beteg (38%) citotoxikus kezelést kapott. Reindukciót három esetben alkalmaztunk.

5.1.2. A terápiás válasz

A terápiás válasz értékelését 42 betegen tudtuk elvégezni, 5 esetben az alapbetegség gyors progressziója és a beteg 12 héten belül bekövetkezett halála miatt a terápiás válasz nem volt értékelhető (2. táblázat).

A legjobb terápiás válasz rátát (irBORR) 17%-nak találtuk, komplett választ 5 esetben (12%), parciális választ 2 esetben (5%) detektáltunk. Tíz beteg (24%) esetében legjobb terápiás válaszként stabil betegséget észleltünk, a többi 25 beteg (60%) pedig progressziót. A betegségkontroll-rátát (DCR) a terápia megkezdésétől számított 24. héten 40%-ban állapítottuk meg.

A reindukcióban részesült 3 beteg mindegyikénél progressziót észleltünk a 12., illetve a 16. heti kontroll CT-vizsgálaton.

5.1.3. A progressziómentes és a teljes túlélés

A medián progressziómentes túlélést (PFS) a 10 hónapos (tartomány: 1–61) medián követési idő során 2,7 hónapnak találtuk (95% CI: 0,1–5,4).

A medián teljes túlélés, amelyet az immunterápia kezdésének napjától számítottunk, 9,8 hónap (95% CI: 4,7–14,9), az egy-, illetve két éves túlélési ráta 40%, illetve 28% volt (2. táblázat). A követési idő során 47 betegünk közül 40 meghalt (85%), 39 beteg a daganat progressziójának következtében, egy beteg halálát grade 5 gyógyszer mellékhatás okozta.

5.2. Az ipilimumab toxicitásának vizsgálata

A klinikai markerek vizsgálatába bevont 47 beteg közül 19-nél (40%) jelentkezett autoimmun mellékhatás, amelyek közül 6 (13%) eset súlyos, grade 3–5 fokozatú volt.

Leggyakoribb mellékhatásként enyhe és közepesen súlyos dermatológiai eltéréseket (erythema, maculo-papulosus exanthema, bőrkütés) észleltünk 17 betegnél (36%), valamint gasztroenterológiai nemkívánatos eseményeket 6 betegnél (13%), melyek közül két eset grade 3, illetve egy eset grade 5 fokozatú volt (letális kimenetelű colitis).

Két beteg szenvedett el súlyos, grade 3–4 nephritist, egy esetben pedig grade 3 orbitális inflammációt észleltünk. Szintén két betegnél észleltünk mellékvesekéreg-elégtelenséget MRI-n is detektálható hypophysitisszel. Két esetben kényszerültünk súlyos immunmediált mellékhatás kialakulása miatt a terápia végleges felfüggesztésére (3. táblázat).

Sem a betegek klinikai paraméterei, sem a vizsgált laboratóriumi markerek nem mutattak összefüggést az autoimmun mellékhatások megjelenésével. Nem mutatott korrelációt az autoimmun toxicitás jelentkezése a terápia hatékonyságával sem.

5.3. A klinikai markerek vizsgálata

5.3.1. Az LDH-értékekkel összefüggést mutató klinikai paraméterek

Szignifikáns összefüggést találtunk a metasztatikus szervek száma és az LDH-érték között. A kettőnél több szervet érintő áttétben szenvedő betegek medián LDH-értékét 799 U/L-nek mértük, szemben a kettő vagy annál kevesebb szervi metasztázisban szenvedő betegeknél mért 455 U/L mediánértékkel ($p=0,0221$). A kettőnél több szervi áttéttel érintett 12 beteg (1 esetben n.a.) felénél ($n=6$, 50%) mértünk a normálérték felső határának másfélszeresét meghaladó LDH-értéket, míg a kevesebb metasztázissal érintett 34 beteg mindössze 15 százalékánál, 5 betegnél ($p=0,0223$).

Az LDH-értékek szignifikáns különbséget mutattak az NRAS-mutáns és vad típusú betegeknél is: míg a 8 beteget tartalmazó NRAS-mutáns csoportban a betegek felénél mértünk a normálérték másfélszeresét meghaladó LDH-értéket ($n=4$, 50%), addig a 31 vad típusú beteg mindössze 13%-ánál, 4 betegnél ($p=0,0401$).

5.3.2. A terápiás válasz és a klinikai markerek kapcsolatának vizsgálata

A vizsgált klinikopatológiai, vérsajt- és szérumparaméterek közül a kiindulási abszolút eozinofil sejtszámot és az eozinofil/limfocita arány értékét szignifikánsan magasabbnak találtuk a progrediáló betegeknél a terápia megkezdését követő 12. és 16. héten valamint a 24. héten is, bár utóbbi esetben nem tudtunk szignifikáns különbséget igazolni. A terápia megkezdésekor mért vérsüllyedésérték alapján is minden vizsgált időpontban különbséget észleltünk a progrediáló és a nem progrediáló betegcsoport között – a progrediáló betegcsoportban a medián ESR magasabb volt –, a különbség a 24. hétre szignifikánssá vált (4. táblázat).

Nem volt összefüggés vizsgálatunkban a terápiára adott válasz és a betegparaméterek, illetve a primer tumor jellemzői, így a BRAF- és NRAS-mutációs státusz között sem. Vizsgálatunkban a kiindulási abszolút limfocita- és neutrofilszám és a limfocita/neutrofil arány szintén nem befolyásolta a terápiás választ. Bár az LDH-érték a terápia kezdetekor és a 12., 16., 24. héten is magasabb volt a progrediáló betegek csoportjában, szignifikáns különbség nem igazolódott.

5.3.3. A progressziómentes túlélés és a klinikai markerek kapcsolatának vizsgálata

Egyváltozós analízissel vizsgálva a potenciális prediktív faktorokat, a normáltartomány felső határának másfélszeresét meghaladó kiindulási LDH-érték (HR: 2,297, 95% CI: 1,105–4,777, $p=0,0323$), a normáltartomány felső határát meghaladó kiindulási ESR (HR: 1,756, 95% CI: 0,926–3,329, $p=0,0340$)

és a 0,1 G/L kiindulási értéket meghaladó AEC (HR: 1,909, 95% CI: 1,01–3,609, $p=0,023$) szignifikáns összefüggést mutatott a rövidebb progressziómentes túléléssel. A többi vizsgált paraméter esetében nem találtunk összefüggést. Multivariációs analízis során azonban a három paraméter egyike sem bizonyult független prediktív faktornak a progressziómentes túlélés vonatkozásában.

5.3.4. A teljes túlélés és a klinikai markerek kapcsolatának vizsgálata

Egyváltozós analízisben szignifikáns összefüggést mutatott a rövidebb teljes túléléssel az emelkedett kiindulási LDH-érték, a magas vérsüllyedés, a 4 vagy annál nagyobb neutrofil/limfocita arány, a 0,1 G/L kiindulási értéket meghaladó abszolút eozinofilszám, a 0,1 értéket meghaladó eozinofil/limfocita arány, az 1-es vagy annál rosszabb ECOG-státusz és a metasztatikusan érintett szervek száma, amennyiben az 3 vagy annál több (1. ábra, 5. táblázat). A többi vizsgált klinikopatológiai faktor (a beteg kora, neme, a primer tumor T-stádiuma, a tumorinfiltráló limfociták jelenléte, BRAF- és NRAS-mutációs státusz, előző terápiák száma, immunmediált mellékhatás jelentkezése) valamint az abszolút neutrofil- és limfocitaszám esetén nem mutattunk ki összefüggést a teljes túléléssel. Az AJCC-stádium esetén határérték-szignifikanciát ($p=0,078$) mértünk.

Multivariációs vizsgálattal egyedül a normáltartomány felső határának másfélszeresét meghaladó kiindulási LDH-érték bizonyult a rövidebb teljes túlélés független prediktorának (6. táblázat). A medián teljes túlélés 17 hónap volt az alacsonyabb LDH-értékű ($\leq 1,5 \times \text{ULN}$) csoportban, míg mindössze 4 hónap az emelkedett LDH-értékű ($> 1,5 \times \text{ULN}$) betegcsoportban. Magasabb LDH-érték esetén három és félszer nagyobb volt a halál rizikója a követési idő során, mint az alacsonyabb LDH-értékkel rendelkező betegeké. Az egy- és két éves túlélés 54%, illetve 42% volt az alacsonyabb LDH-értékű csoportban, míg a normáltartomány másfélszeresét meghaladó LDH esetén 0%.

5.4. A tumorinfiltráló immunsejtek vizsgálata

5.4.1. Beteganyag-jellemzők

Az áttéteket infiltráló immunsejtek vizsgálatába bevont 30 beteg fele (50%) M1c stádiumban volt a terápia megkezdésekor, kétharmaduknak (67%) ugyanakkor semmilyen tünete vagy panasza nem volt az ipilimumabkezelés megkezdésekor, emelkedett LDH-értéket is csak 12 betegnél (40%) találtunk. A melanoma ebben a betegcsoportban is csaknem minden esetben a bőrből indult ki (28 beteg, 93%), 2 esetben ismeretlen volt a primer tumor.

A betegek túlnyomó többsége (26 beteg) a terápiát másod- vagy többedvonalban kapta, kemoterápiát követően, 8 beteg ezen kívül sugárterápiát, 2 beteg elektrokemoterápiát, 1 beteg BRAF-inhibitor-terápiát is kapott az ipilimumabkezelést megelőzően. A betegek többségénél (26 beteg) komplettáltuk a 4 kezelést, 4 beteg progresszió vagy súlyos mellékhatás megjelenése miatt csak 3 dózist kapott (7. táblázat).

5.4.2. Az immunsejtek denzitásának meghatározása a betegek kezelés előtt eltávolított nyirokcsomó- és kután/szubkután áttéteinek mintáiban

Meghatároztuk 52 nyirokcsomó- és 34 kután, illetve szubkután metasztázis mintában az alábbi markereket expresszáló immunsejtek intratumorális denzitását: CD4, CD8, CD45RO, CD20, CD134, CD137, FOXP3, PD-1, NKp46, CD16, CD68 (2. ábra).

A nyirokcsomó-metasztázisokban CD45RO+ T-limfocitákat, CD16+ sejteket és CD68+ makrofágokat detektáltunk legnagyobb számban, ezt követték a CD8+ T-limfociták, majd a FOXP3+ sejtek, CD20+ B-limfociták, CD4+ és PD-1+ sejtek, ugyanakkor CD134+ és CD137+ sejteket valamint NKp46+ NK-sejteket az előbbieknél jóval kisebb mennyiségben sikerült kimutatni (3. ábra).

Szignifikáns különbséget észleltünk a nyirokcsomó- és a kután-szubkután metasztázisok között minden immunsejttípus mennyiségében (a CD68+ makrofágok és a NKp46+ NK-sejtek kivételével), ezért az immunsejtdenzitások prognosztikus és prediktív vonatkozásait a két lokalizáció esetében külön is vizsgáltuk.

5.4.3. A terápiás válasz és a tumorinfiltráló immunsejtek kapcsolatának vizsgálata

A jelölt sejtek intratumorális denzitásértékeit vizsgáltuk a terápiás válasz vonatkozásában. Minden immunsejtmarker esetén – a teljes minta mediánértékeire alapozott küszöbértékek alapján – meghatároztuk azon betegek arányát, akik mintáiban a medián sejtdenzitásérték a küszöbérték felett volt, valamint vizsgáltuk a betegcsoportban a terápiára adott választ (responder/nonresponder).

A responder csoport nyirokcsomó-metasztázisaiban a CD4+, CD8+, FOXP3+, CD134+ limfociták, CD20+ B-sejtek és NKp46+ NK-sejtek denzitásértékeit szignifikánsan magasabbnak mértük a nonresponderek átlagértékeihez képest (4. ábra). Amennyiben az összehasonlítást úgy végeztük el, hogy a küszöbértéknél magasabb, illetve alacsonyabb átlagos sejtdenzitású tumorral rendelkező betegek arányát vizsgáltuk a kezelésre reagálók és nem reagálók csoportjában, a fenti markerekkel jelölt sejteken kívül még a CD137+ sejtek esetén is szignifikáns különbséget kaptunk (8. táblázat).

A kután-szubkután metasztázisok vizsgálatakor szignifikáns különbséget a responderek és a nonresponderek között csak a CD68+ makrofágokat és CD16+ sejteket a küszöbérték feletti, illetve alatti mértékben tartalmazó tumorban szenvedő betegek arányában találtunk (8. táblázat).

Az összes minta együttes vizsgálatakor csak az NK-sejtek denzitása mutatott korrelációt a terápiás válasszal ($p=0,0182$), valamint azon betegek aránya, akiknek daganata a küszöbérték feletti mennyiségben tartalmazott CD68+ makrofágokat, FOXP3+ regulátor T-sejteket, illetve NKp46+ NK-sejteket (8. táblázat).

Megállapítottuk, hogy a vizsgált immunsejttípusok denzitásértékei szorosan korreláltak egymással és nagy gyakorisággal mutattak együttes megjelenést; a 7 responder közül 6 beteg (86%) nyirokcsomó-metasztázisaiban a vizsgált 11 marker közül legalább 7 mutatott magas expressziót, míg ugyanez csak 3 betegnél (25%) fordult elő a 12 nonresponder csoportjában ($p=0,0106$).

5.4.4. A teljes túlélés és a tumorinfiltráló immunsejtek kapcsolatának vizsgálata

5.4.4.1. A nyirokcsomóáttétek vizsgálata

A teljes túlélést Kaplan–Meier-tesztel vizsgálva az immunsejtek átlagos denzitásának függvényében, a nyirokcsomóminták esetén a vizsgált 11 sejttípusból 7 sejttípusnál találtunk szignifikáns összefüggést a mediánértéknél nagyobb sejtsűrűség és a hosszabb túlélés között (5.a ábra).

Cox-regressziós vizsgálattal is elemeztük az összefüggést az immunsejtsűrűség mint folyamatos változó, az AJCC-stádium, a betegek kora, neme, ECOG-státusza, az érintett szervek száma, a terápia megkezdésekor mért szérum-LDH-érték, a megelőző terápiák száma és a teljes túlélés között. Egyváltozós vizsgálattal a CD4+, CD8+, CD45RO+, FOXP3+ és CD16+ sejtek denzitása ($p=0,0290$, $p=0,0093$, $p=0,0180$, $p=0,0083$, $p=0,0047$, azonos sorrendben), valamint az ECOG-státusz ($p=0,0009$) és az LDH-érték ($p=0,0227$) mutatott szignifikáns összefüggést a túléléssel. Multivariációs analízissel vizsgálva ugyanezen paramétereket az ECOG-státusz ($p=0,001$) és a FOXP3+ immunsejtek denzitása ($p=0,004$) bizonyult a teljes túlélés független prediktorának.

5.4.4.2. A szubkután/kután áttétek vizsgálata

A szubkután/kután minták vizsgálatakor a Kaplan–Meier-teszt a CD16+ és a CD68+ immunsejtek átlagos sűrűsége és a hosszabb teljes túlélés között mutatott szignifikáns kapcsolatot (5.b ábra), és hasonló eredményt kaptunk egyváltozós Cox-regressziós vizsgálattal is ($p=0,0197$, $p=0,0175$). Multivariációs analízissel ebben a csoportban csak a kiindulási LDH-érték bizonyult a túlélés független prediktorának ($p=0,002$).

5.4.4.3. Az összes minta együttes vizsgálata

Együtt vizsgálva az összes mintát, Cox-regressziós analízissel a jobb ECOG-státusz ($p=0,0026$) és a normális kiindulási LDH-érték ($p=0,0006$) mellett a CD4+, CD8+, CD45RO+, FOXP3+, CD16+, CD68+ és CD20+ immunsejtek küszöbérték feletti denzitása mutatott szignifikáns összefüggést a teljes túléléssel ($p=0,0348$, $p=0,0136$, $p=0,0113$, $p=0,0121$, $p=0,0055$, $p=0,0168$, $p=0,0372$, azonos sorrendben). A multivariációs analízis során a kiindulási LDH-érték ($p=0,001$) és a FOXP3+ immunsejtek magas denzitása ($p=0,016$) bizonyult a túlélés független prediktorának.

A betegek korát, nemét, a betegség stádiumát, az érintett szervek és a megelőző terápiák számát sem az egyváltozós, sem a többváltozós analízisek során sem tudtuk összefüggésbe hozni a túléléssel.

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. A biomarkerek jelentősége a melanoma immunterápiájában

Az ipilimumab, mint az új típusú immunterápiák első képviselőjének bevezetése forradalmasította a malignus melanoma kezelését és megnyitotta az utat más hatásmechanizmusú immunválaszmódosító antitestek, a PD-1- és PD-L1-inhibitor terápiák kifejlesztésének irányába, kiterjesztve ezzel az immunterápia lehetőségeit más tumorsejttargetek ellen is.

Ugyanakkor, még az újabb immunterápiás modalitások esetében is fennáll az a probléma, hogy míg a betegek kevesebb mint fele profitál az immunterápia előnyös hatásaiból, a súlyos és nem elhanyagolható arányban életveszélyes mellékhatások veszélyének viszont minden beteg ki van téve. Különös tekintettel az egyéb effektív terápiás lehetőségek térnyerésére, nagy szükség lenne olyan prediktív markerek felkutatására, amelyek segítségével az immunterápia hatékonysága megjósolható és a terápiából potenciálisan profitáló betegek köre meghatározható.

Eddig nem sikerült az új immunterápiás modalitások esetében alkalmazható, bizonyítottan hatékony biomarkert találni, ezért – tekintettel a viszonylag alacsony válaszarányra és a súlyos mellékhatások előfordulására – továbbra is a kutatások egyik fókusza ilyen markerek keresése.

Az ipilimumabterápia kapcsán korábban felmerült biomarkerek egy része esetén nem a kiindulási érték, hanem a változás mértéke mutatott összefüggést a terápia hatékonyságával, ezek azonban inkább farmakodinámiás, helyettesítő végpontként használható (surrogate) markerek, a terápiás döntés meghozatalában nem segítenek.

Másrészt, a terápia hatásosságával összefüggésbe hozott markerek többsége a túléléssel, nem pedig a terápiás válasszal mutatott korrelációt, illetve a nem kezelt betegeknél is összefüggött a betegség kimenetelével, azaz inkább prognosztikus, mint prediktív markernek tekinthetők.

Az eddigi eredmények ugyanakkor arra utalnak, hogy a betegek immunaktivitási szintje – mind szisztémásan, mind lokálisan, a tumor területén – összefüggésbe hozható az anti-CTLA-4 ellenanyagok klinikai hatásosságával.

6.2. Az ipilimumabterápia klinikai hatékonyságának vizsgálata

Az intézetünkben kezelt 47 beteg esetén, akik többedvonalban kapták az ipilimumabkezelést, a 17%-os válaszadási arány (RR) korrelál a korábbi vizsgálatokban közölt 8,5–26% közötti eredményekkel (9. táblázat, 112, 128, 132,141–147). Hasonló eredményt tapasztaltunk a betegségkontroll-ráta (DCR)

tekintetében is, amelyet fél évvel a terápia megkezdése után 40%-nak mértünk, ugyancsak illeszkedve a korábbi vizsgálatokban közölt 27,5% és 55% közötti eredményekhez (9. táblázat).

Két esetben észleltünk diszkrepanciát a terápiás válasz vonatkozásában az eredményeket RECIST 1.1, illetve irRC szerint elemezve; mindkét esetben az első értékeléskor (12. hét) észlelt progresszív betegség iránya a megerősítő értékeléskor (16. hét) megváltozott és legjobb terápiás válaszként a betegek parciális, illetve komplett remissziót értek el.

A reindukció kritériumainak megfelelő és ismételt terápiában részesített 3 betegünk közül egyiknél sem sikerült objektív választ vagy legalább stabil betegséget elérni, noha a törzskönyvezési vizsgálat 31, reindukcióban részesült betege esetén 37,5%-os objektív válasz mellett a betegségkontroll-ráta 75% volt (148).

Betegeink jelentős része (72%) többedvonalban, a kiterjesztett hozzáférési program keretei között kapta a terápiát, ahol a beválasztási kritériumok sokkal kevésbé voltak szigorúak, mint a randomizált klinikai vizsgálatban, ennek megfelelően betegeink 6 százaléka a rosszabb prognosztikus csoportba tartozó extrakután melanómában szenvedett, 28 százaléuk esetén kiterjedt disszemináció (3 vagy több szerv érintettsége) mellett indítottuk a terápiát és a betegek 13 százaléka agyi áttétben is szenvedett. Ennek ellenére a túlélési mutatók nem tértek el jelentősen a törzskönyvezési vizsgálat (112) és a korábban közölt vizsgálatok eredményeitől, melyekben többszörösen előkezelt, előrehaladott melanomás betegeket részesítettek ipilimumabterápiában (9. táblázat); a 2,7 hónapos medián PFS és a 9,8 hónapos medián OS is korrelál a korábbi vizsgálatokban jelentetett 2,6–3,7 hónapos progressziómentes és az 5–10,1 hónapos teljes túlélési eredményekkel.

Ugyanígy, az általunk észlelt 40%-os 1 éves és 28%-os 2 éves túlélési ráta megfelel a fenti vizsgálatok 34,8–46,6%-os és 20–28,8%-os túlélési eredményeinek (9. táblázat).

A teljes túlélési görbénken a 2,7 évnél kialakult platót szintén megfigyelték több korábbi vizsgálatban (149); minden esetben 3 év körül alakul ki és akár 10 évig követhető, ami arra utal, hogy a betegeknek annál a kis hányadánál, akik jól reagálnak az ipilimumabterápiára, általában hosszú távú túlélésre számíthatunk.

6.3. Az ipilimumab toxicitásának vizsgálata

A megfigyelt, immunrendszer-túlműködéshez köthető nemkívánatos események a betegek többségénél enyhék és jól kezelhetőek voltak, leggyakrabban dermatitist tapasztaltunk. Ugyanakkor, kis százalékban ugyan, de megjelentek súlyos, grade 3-4 fokozatú mellékhatások is, két páciensnél maradandó hypopituitarismus alakult ki izolált adrenokortikális elégtelenséggel, két beteg grade 3-as

nephritist szenvedett el, egy betegnél grade 3-as orbitális inflammációt észleltünk, egy betegünk pedig életét veszítette fulmináns gravis colitis következtében kialakult vékonybél-perforáció miatt. A kialakult súlyos, grade 3-4 mellékhatások százalékos aránya ugyancsak korrelál az irodalomban korábban közölt eredményekkel (9. táblázat).

Bár egyes közlések pozitív összefüggést feltételeztek az ipilimumab hatékonysága és a kialakult mellékhatások között (128, 150), ezt más vizsgálatok nem erősítették meg (142, 145, 147, 151), és az általunk kezelt betegeknél sem találtunk összefüggést a terápia hatékonysága és a kialakult autoimmun mellékhatások között.

6.4. A klinikai markerek vizsgálata

Vizsgálatunk legfőbb céljaként olyan potenciális biomarkereket kerestünk, melyek összefüggésbe hozhatók a terápia várható hatékonyságával. Elsősorban olyan paramétereket vettünk számításba, amelyek a napi klinikai gyakorlatban könnyen elérhetők, és amelyek alapján behatárolható azoknak a betegeknek a köre, akik várhatóan profitálnak az ipilimumabterápiából.

Első lépésként a betegek és a primer tumor klinikai jellemzőit vizsgáltuk meg. Egy 2015-ben megjelent tanulmány az ECOG-státuszt és az áttéttel érintett szervek számát független prognosztikus faktornak találta a teljes túlélés vonatkozásában (152). A betegjellemzők közül az ECOG-státusz és a metasztatikusan érintett szervek száma egyváltozós vizsgálatunkban negatívan befolyásolta a túlélést, ugyanakkor egyik tényező esetében sem találtunk összefüggést a terápiás válasszal. A metasztatikusan érintett szervek száma és az LDH-érték közötti korreláció a nagyobb tumorterheléssel és az LDH-érték ismert prognosztikai szerepével magyarázható.

Az AJCC-stádium vonatkozásában, bár más vizsgálatokban erős korrelációt mutatott a túléléssel (153, 154), a jelen vizsgálatban csak határérték-szignifikanciát tudtunk kimutatni egyváltozós analízissel.

Meglepő módon az agyi áttét jelenléte sem mutatott szignifikáns összefüggést a túléléssel. Ezt egyrészt azzal magyarázzuk, hogy a cerebrális metasztázisban szenvedő betegek közül kevesen voltak alkalmasak immunterápiára (6 beteg), másrészt a teljes kezelt betegcsoport háromnegyede kiterjedten disszeminált (53% M1c, 21% M1b) volt a terápia megkezdésekor.

Vizsgálatunkban a primer tumor jellegzetességei (T-stádium, lokalizáció, a tumorinfiltráló limfociták jelenléte) nem mutattak összefüggést a terápia hatékonyságával. Bár mind a BRAF-, mind az NRAS-mutáció jelenléte negatív prognosztikus faktornak bizonyult melanomában (26, 27), vizsgálatunkban a mutációs státusz nem befolyásolta az ipilimumabterápiában részesülő betegek túlélését, hasonlóan más vizsgálatok eredményeihez (132, 143). Az NRAS-mutáns betegeknél mért szignifikánsan

magasabb LDH-szint lehetséges, hogy a mutáció negatív prognosztikus értékével függ össze, bár hasonló megállapítást nem találtunk a szakirodalomban.

Az elmúlt évtizedben világossá vált, hogy a tumor körüli inflammáció egyes daganattípusok esetén hatással lehet a túlélésre (155–157). A vérsüllyedés (ESR, erythrocyte sedimentation rate) értéke az inflammáció fontos markere. Kelderman 166, ipilimumabbal kezelt beteg esetében az emelkedett LDH mellett az emelkedett vérsüllyedést találta a túlélés negatív prediktorának. Vizsgálatunkban az emelkedett ESR negatívan befolyásolta mind a tumormentes, mind a teljes túlélést egyváltozós analízisben. Különbséget találtunk a terápiás válasz vonatkozásában is: a 24 hónapos kontrollvizsgálat időpontjában a progrediáló betegek ESR-értékeit szignifikánsan magasabbnak mértük a stabil állapotú vagy regressziót mutató betegek értékeihez képest.

A szisztémás gyulladás a szolubilis faktorok mellett az immunsejtek számának és funkciójának megváltozását is maga után vonja. Azt feltételezik, hogy a tumor mikrokozonyára, amely meghatározó szerepet játszik az immunterápiára adott válasz minőségében, jelentős befolyást gyakorolnak a neutrofil limfociták. A magas neutrofilszám szisztémás inflammációt von maga után, amely elősegítheti a tumor növekedését (158, 159). Több kutatásban a magas kiindulási neutrofilszámot független negatív prognosztikus faktornak találták a túlélés vonatkozásában (146, 160); a jelen vizsgálatban ezt nem tudtuk megerősíteni.

Az emelkedett kiindulási limfocitaszám és a túlélés között is pozitív összefüggést írtak le néhány vizsgálatban ipilimumabbal kezelt melanomás betegeknél (132, 161), valamint a terápia megkezdését követő hatodik-nyolcadik héten mért limfocitaszám-emelkedés is több vizsgálatban korrelált a hosszabb túléléssel (128, 129, 132, 141, 144). A kiindulási abszolút limfocitaszám és neutrofilszám hányadosaként létrehozott NLR magas értéke számos daganattípus esetén rosszabb életkilátásokkal korrelál (156, 157).

Vizsgálatunkban a magas NLR-érték (>4) szignifikánsan összefüggött a rövidebb túléléssel egyváltozós vizsgálatban, a korrelációt azonban multivariációs analízisben nem tudtuk megerősíteni, ellentétben több korábbi közleménnyel, melyek erős kapcsolatot állapítottak meg az NLR és a túlélés között (146, 147, 151, 162).

Az utóbbi években felmerült az eozinofil granulociták mint effektor sejtek szerepe is a tumorrejekció folyamatában. Több vizsgálatban leírták az eozinofilek számának ipilimumabterápia indukálta növekedését, mint a hosszabb túlélés indikátorát (145, 163), egy 2016-os vizsgálat pedig a kiindulási magas eozinofilszámot is kapcsolatba tudta hozni a megnövekedett túlélési idővel (164). A fentiekkel ellentétben, a jelen vizsgálatban negatív korrelációt észleltünk a kiindulási AEC- és ELR-érték nagysága

és a korai terápiás válasz között, egyváltozós analízisben pedig az emelkedett AEC és ELR a túlélés negatív prediktorának bizonyult.

A keringésbe kerülő LDH enzim legfontosabb forrásai a nagy glükóz-anyagcseréjű szövetek, így az izom, a máj, az idegszövet és a vörösvértestek mellett a tumorszövet is. A nagy tumortömeg és a felgyorsult sejtlebomlás a szérum LDH-szintjének emelkedését eredményezi, amely a IV-es stádiumú melanoma jól ismert negatív prognosztikus faktora (22).

Bár a két III-as fázisú vizsgálat, amelynek alapján mind az FDA, mind az EMA törzskönyvezte az ipilimumabot (112, 113) nem talált a terápia eredményessége és a kiindulási LDH-érték között korrelációt, utóbb több vizsgálatban szignifikáns összefüggés igazolódott mind a terápiás válasz (132, 147), mind a rövidebb túlélés és az emelkedett kiindulási LDH-érték között ipilimumabterápiával kezelt melanomás betegeknél (142, 144, 145, 147, 152).

Vizsgálatunkban a terápiás válasz tekintetében, bár az LDH-érték a kiinduláskor és később is minden időpontban magasabb volt a progrediáló betegek csoportjában, szignifikáns különbség nem igazolódott. Ugyanakkor a normálérték másfélszeresét meghaladó LDH volt az egyetlen biomarker, amely mind egyváltozós, mind multivariációs analízisben a túlélés független és erős negatív prediktorának bizonyult, három és félszeresre növelve a halál rizikóját. Az a tény, hogy az egy- és kétéves túlélés az alacsonyabb LDH-értéket mutató betegeknél 54%, illetve 42% volt, míg a felső határ másfélszeresét meghaladó csoportban már az egyéves túlélés is 0%, azt bizonyítja, hogy a nagy tumortömeggel és jelentősen emelkedett LDH-val bíró betegek hosszú távon egyáltalán nem profitálnak a terápiából.

6.5. A tumorinfiltráló immunsejtek vizsgálata

A daganatokat infiltráló gazdaszervezeti sejtek specifikus markerekkel való feltérképezése során kiderült, hogy ezek igen vegyes összetételűek, B- és T-sejtek különböző alpopulációi mellett makrofágokat és egyéb antigénprezentáló sejteket tartalmaznak. A daganat növekedésének, inváziójának és áttétképzésének kedvező feltételeket biztosító, tumorhoz társult gyulladásban szerepet játszó tumorasszociált makrofágok, hízósejtek és neutrofil granulociták esetében a daganatprogressziót serkentő hatások dominálnak, másrészt viszont a hatékony adaptív immunválaszban kulcsszerepet játszó T-limfocita-alcsoportok és antigénprezentáló dendritikus sejtek infiltrációja általában kedvező prognózissal jár együtt. Saját kutatócsoportunk vizsgálatai alapján primer melanomában a CD25 és CD134 aktivációs markereket expresszáló T-limfociták magas

peritumorális denzitása kedvező prognózissal járt együtt, csakúgy, mint a B-limfociták, illetve a dendritikus sejtek fokozott infiltrációja (45, 51, 55).

Jelen vizsgálatunkban a CD4+, CD8+ és CD45RO+ T-sejtek, a CD20+ B-sejtek, CD134, CD137 vagy PD-1 aktivációs markert expresszáló limfociták, FOXP3+ regulátor T-sejtek, NKp46+ NK-sejtek, CD68+ makrofágok és CD16-ot (Fcγ receptor III) expresszáló sejtek denzitását mértük ipilimumabterápiában részesülő betegek kezelés előtti tumormintáiban. Összefüggést kerestünk az egyes sejtípusok denzitásértékei, valamint a mintavételt követő immunterápia eredményessége – a terápiára adott válasz és a teljes túlélés – között. Annak érdekében, hogy minimalizáljuk az immunológiai mikrokörnyezet megváltozásának esélyét a sebészi beavatkozás és az ipilimumabterápia között eltelt időben, kizárólag olyan betegek mintáit vizsgáltuk, akiknél a sebészi beavatkozás és az ipilimumabterápia megkezdése között nem telt el egy évnél hosszabb idő.

Mivel a tumorszövet bizonyos fokú heterogenitása egy páciens különböző tumormintái között, sőt egy tumormintán belül is előfordulhat, nem biopsziák anyagait, hanem sebészi úton eltávolított teljes szövetszövetmintákat vizsgáltunk, és amely esetekben erre lehetőség volt, egy betegtől több különböző áttét elemzését is elvégeztük.

Tudomásunk szerint ez az első olyan feldolgozás, amelyben klinikai vizsgálaton kívül, a mindennapi gyakorlatban ipilimumabterápiában részesített betegek tumormintáinak immunsejtdenzitását vizsgálták a terápiára adott klinikai válasz függvényében. Vizsgálatunk összefüggést igazolt számos infiltráló immunsejt intratumorális denzitása valamint a terápiára adott válasz és a túlélés között.

A nyirokcsomó-metasztázisokban a CD4+ és CD8+ T-limfociták, a FOXP3+ limfociták, a CD134 aktivációs markert hordozó sejtek, valamint a CD20+ B-sejtek és NKp46+ NK-sejtek mennyiségét szignifikánsan nagyobbak találtuk a kezelésre reagáló betegekben; a legnagyobb differenciát a FOXP3 marker esetén mértük. A CD45RO+, PD-1+, CD16+ és CD68+ immunsejtek intratumorális denzitása vizsgálatunkban csak a túléléssel mutatott szignifikáns összefüggést, a terápiára adott válasz vonatkozásában nem tudtunk összefüggést igazolni. A kután/szubkután metasztázisokat vizsgálva csak a CD16+ és CD68+ immunsejtek denzitásértékei mutattak a terápiás válasszal és a túléléssel szignifikáns összefüggést.

A vizsgált infiltráló immunsejtek közül egyesek, mint a CD8+ T-limfociták és a CD20+ B-limfociták sűrűsége korábbi vizsgálatokban prognosztikus értékűnek bizonyult melanomametasztázisok (többségében bőr- és nyirokcsomóáttétek) esetén, míg a FOXP3+ sejtek vonatkozásában korábban nem sikerült összefüggést kimutatni az infiltráció erőssége és a túlélés között (165).

Eredményeink alapján tehát összefüggés feltételezhető a tumorinfiltráló T-sejtek jelenléte és az ipilimumab immunterápia hatásossága között, megerősítve azt a hipotézist, hogy a különböző immunterápiás megközelítések vonatkozásában különbség lehet a T-sejtekkel sűrűn infiltrált és a nem infiltrált tumorok között abban a tekintetben, hogy az immunosuppresszió feloldása révén a T-sejtekben gazdag tumorral bíró betegek többet profitálhatnak a terápiából (166). Ezt az elméletet támasztja alá az a tény is, hogy korábban már számos más daganattípus esetén igazolták az összefüggést a betegség kedvező kimenetele és az immunaktivitással kapcsolatos gének fokozott expressziója között immunellenőrzőpont-gátló terápia során (138, 167, 168).

A CD8+ sejtek denzitása a betegek metasztázisainak a kezelést megelőző mintáiban összefüggést mutatott a terápiás válasszal pembrolizumabterápia során (169), ugyanakkor nem sikerült ugyanezt igazolni más PD-1/PD-L1 gátló ágensek, illetve CTLA-4-blokkoló antitestek esetén (137, 167, 170, 171). Felmerül a lehetőség, hogy a T-sejtek denzitása azért nem bizonyult prediktív tényezőnek egyes vizsgálatokban, mert különböző daganattípusok különböző lokalizációból származó mintáit együtt elemezték. Vizsgálatunkban szignifikáns különbséget találtunk a nyirokcsomóáttétek és a kután/szubkután metasztázisok immunsejtsűrűsége között, kettő kivételével (CD68+ makrofágok és NKp64+ NK-sejtek) minden immunsejttípus vonatkozásában, ami alátámasztja azt a feltételezést, hogy különböző lokalizációjú metasztázisok együttes vizsgálata valószínűleg nem optimális a kezelésre reagálók és nem reagálók közötti különbségek feltárására.

Vizsgálatunkban a nyirokcsomóáttéteket infiltráló FOXP3+ sejtek denzitása bizonyult a legerősebb prediktív faktornak a terápiára adott válasz vonatkozásában. Hasonló összefüggést egy korábbi vizsgálatban is leírtak; a FOXP3- ésIDO-expresszió korrelációt mutatott az ipilimumabterápia hatásosságával (137). Az immunosuppresszív mechanizmusok "upregulációja" a tumorban az immunológiai szempontból aktív mikrokörnyezet velejárója lehet, negatív visszacsatolási mechanizmusként szolgálva. Spranger és mtsai összefüggést állapítottak meg azIDO, FOXP3 és a PD-L1 expressziója között, valamint utóbbiak és a CD8+ T-limfociták mennyisége között melanomaáttétekben, és egérmodellen bizonyították, hogy a gátló mechanizmusok irányítása a CD8+ sejtekhez köthető (172). A FOXP3+ sejtek, a CD8+ és CD45RO+ T-limfociták denzitásértékei vizsgálatunkban is szignifikáns korrelációt mutattak egymással. Feltételezhető, hogy a T-sejtben gazdag tumorokban szimultán jelen levő suppresszív mechanizmusok tehető felelőssé a T-sejtek antitumorális hatásának gátlásáért, így azok a terápiás stratégiák, mint a checkpoint inhibitorok, melyek a blokkoló mechanizmusok feloldására irányulnak, hatásosak lehetnek ezekben az esetekben.

A közelmúltban napvilágot látott kutatások eredményei felvetették a lehetőséget, hogy a CTLA-4-inhibitor terápia hatásmechanizmusa az intratumorális regulátor T-sejtek ADCC (antitestfüggő sejtes citotoxicitás) általi depléciója az Fcy-receptorokat expresszáló monociták/makrofágok segítségével (173–176). Ezt támasztja alá az a megállapítás is, hogy az ipilimumabterápiában részesülő melanomás betegek metasztázisainak kezelés előtti mintáiban a CD16+ és CD68+ sejtek denzitását magasabbnak mérték a responderek mintáiban, mint a nonresponderekében (176). Eredményeink részben alátámasztják a fenti vizsgálatok megállapításait, bár szignifikáns összefüggést a CD16+ és CD68+ sejtek denzitása és a terápiás válasz között csak a kután/szubkután áttétek esetében sikerült igazolni, míg a nyirokcsomóáttéteknél nem elsősorban a klinikai válasz, hanem a túlélés vonatkozásában találtunk szignifikáns korrelációt. A FOXP3+ sejtek denzitása és a terápiás válasz között észlelt összefüggés (137 és a jelen vizsgálat) arra enged következtetni, hogy az ipilimumab hatásmechanizmusában szerepe lehet a regulátor T-sejtek CD16+ effektor sejtek által közvetített számcsökkenésének is. Ugyancsak megfigyeltük a másik ADCC-effektor immunsejttípust, az NK-sejtek magasabb számát is a responderek mintáiban, minthogy azonban ennek a sejttípusnak a denzitása összességében minden mintában igen alacsony volt, az NK-sejtek biológiai jelentőségének szerepe a hatásmechanizmusban bizonytalan.

6.6. A kutatás korlátai és értéke

Az immunsejtek vizsgálata során lehetőségeinket korlátozta az immunhisztokémiai vizsgálatra alkalmas, minden feltételnek megfelelő szövetminták korlátozott elérhetősége.

Klinikai marker vizsgálatunkban, bár a betegek csaknem fele a progressziót követően egyéb szisztémás kezelésekből is részesült, túlnyomó többségük még a BRAF-gátlók és a PD-1-inhibitorok bevezetését megelőzően részesült kezelésben, ezért a progressziót követően mindössze 26%-uk kapott olyan szisztémás kezelést, amely az evidenciák alapján befolyásolhatja a túlélést.

A vizsgálat értékét növeli, hogy tudomásunk szerint kutatócsoportunk a legnagyobb betegcsoport adatait dolgozta fel, akik Magyarországon klinikai vizsgálaton kívül ipilimumabterápiában részesültek. Kontrollcsoport hiányában és annak ismeretében, hogy bár a kiindulási magas LDH-érték szignifikánsan negatívan befolyásolta a túlélést, a terápiás válasz vonatkozásában csak azonos irányú nem szignifikáns trendet észleltünk, vizsgálatunk alapján nem lehet biztosan kijelenteni, hogy a kiindulási LDH-érték csak prognosztikus marker, vagy pedig a terápia prediktív markere-e is egyben. Az újabb terápiás modalitások előretörése és az ipilimumab többedvonalba szorulása miatt ugyanakkor nem valószínű, hogy a közeljövőben lehetőség lesz prospektív vizsgálatok végzésére,

noha a gyógyszer kombinációban első vonalban, monoterápiaként pedig másodvonalban, illetve az USA-ban adjuváns indikációban jelenleg is törzskönyvezett.

Eredményeink alapján a kiindulási LDH-érték vizsgálata segítséget nyújthat a terápiás döntés meghozásában, különös tekintettel arra, hogy az ipilimumabterápiának validált prediktív markere jelenleg még nem létezik, a metasztázist infiltráló immunsejtek összetételének vizsgálata pedig, összevetve a terápia eredményességével, közelebb hoz az immunterápia bonyolult patomechanizmusának megértéséhez.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

1. A terápia effektivitását mutató faktorok, a válaszadási arány, a legjobb terápiás válasz, a betegségkontroll-ráta, a progressziómentes és a teljes túlélés értékei a klinikai gyakorlatban korreláltak a klinikai vizsgálatok korábban közölt eredményeivel.
2. Az ipilimumabterápia által kiváltott mellékhatások százalékos aránya és súlyossága ugyancsak korrelált a klinikai vizsgálatokban közölt adatokkal. A kialakult autoimmun mellékhatások sem a vizsgált klinikai markerekkel, sem a terápia eredményességével nem mutattak összefüggést.
3. Az ECOG-státusz, az áttéttel érintett szervek száma, a vérsüllyedés, az abszolút eozinofilszám, az eozinofil/limfocita arány és a neutrofil/limfocita arány egyváltozós analízisben szignifikáns összefüggést mutatott a túléléssel. Az emelkedett kiindulási LDH-érték mindkét vizsgálatunkban többváltozós analízissel is a túlélés független prediktorának bizonyult.
4. A FOXP3+ sejtek, a CD4+, CD8+, CD134+ T-limfociták, a CD20+ B-sejtek és az NKp46+ NK-sejtek emelkedett száma az áttétes melanomában szenvedő betegek kezelés előtti nyirokcsomó-metasztázisaiban, csakúgy, mint a nagyszámú CD16+ sejt és CD68+ makrofág a kután/szubkután metasztázisokban szignifikáns összefüggést mutatott a terápia hatékonyságával.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Az immunellenőrző pontok monoklonális antitestekkel történő blokkolása a metasztatikus melanoma terápiájának egyik legfontosabb stratégiájává vált az elmúlt években. Az ipilimumab az első olyan terápia, amely statisztikailag igazolhatóan meghosszabbította az előrehaladott melanomában szenvedő betegek életét. Monoterápiaként ma már csak másodvonalban ajánlott, kombinációban első vonalban alkalmazva viszont hosszabb túlélést biztosít a betegeknek a monoterápiáknál, megnövekedett toxicitás árán. Az ipilimumab alkalmazásának legfőbb korlátja jelenleg az, hogy míg a terápiából csak a betegek egy relatíve kis hányada profitál, a súlyos, gyakran életveszélyes mellékhatásoknak minden beteg ki van téve.

Vizsgálataink célja az ipilimumab biztonságosságának és hatásosságának elemzése volt a klinikai gyakorlatban, valamint olyan prediktív markerek keresése, amelyekkel előre meghatározható a betegeknek az a csoportja, akiknél a terápia várhatóan hatásos lehet.

Az első vizsgálatban a centrumunkban 2010 és 2015 között ipilimumabterápiában részesült 47 beteg kórlefolyását elemezve elsősorban olyan markereket kerestünk, amelyek a napi klinikai gyakorlatban könnyen elérhetőek. Összefüggést kerestünk a betegek klinikai paramétereit, a primer tumor jellegzetességeit, a szérum-LDH, a vérsüllyedés, az abszolút eozinofil-, limfocita- és neutrofilejtszám, a neutrofil/limfocita és az eozinofil/limfocita arány, a toxicitás és a terápia hatásossága (válaszadási arány, progressziómentes és teljes túlélés) között univariációs és multivariációs analízisek segítségével. Objektív választ az immunterápiára a betegek 17%-ánál tapasztaltunk, a betegségkontroll-ráta a kezelés megkezdését követő 24. héten 40% volt. A medián progressziómentes túlélést 2,7 hónapnak, a teljes túlélést 9,8 hónapnak mértük 10 hónapos medián követési idő mellett, az 1 éves túlélési ráta 40%, a 2 éves 28% volt.

Egyváltozós analízist használva korrelációt észleltünk a betegek ECOG-státusza, az érintett szervek száma, a vérsüllyedés, az eozinofilszám, az eozinofil/limfocita arány, a neutrofil/limfocita arány és a túlélés között, az egyetlen olyan markernek azonban, amely mind univariációs, mind multivariációs vizsgálatban erős összefüggést mutatott a betegség kimenetelével, az emelkedett kiindulási szérum-LDH-értéket találtuk. A gyógyszer okozta toxicitás előfordulása sem a terápia hatásosságával, sem a vizsgált egyéb paraméterekkel nem mutatott összefüggést.

Második vizsgálatunkban 30, metasztatikus melanomában szenvedő, ipilimumabterápiában részesülő beteg összesen 86 kezelés előtti szövettani mintáját elemeztük, 52 nyirokcsomó- és 34 kután/szubkután metasztázist. Tizenegy antitestet tartalmazó immunpanel segítségével vizsgáltuk a különböző immunsejttípusok intratumorális denzitását és ennek összefüggését a terápiás válasszal, illetve a túléléssel. Mivel csaknem minden marker esetén közel kétszeres medián sejtsűrűséget mértünk a nyirokcsomó-metasztázisokban a kután/szubkután áttétekhez képest, a két csoportot külön is vizsgáltuk. A responderek nyirokcsomó-metasztázisaiban a vizsgált immunsejtek magasabb prevalenciáját észleltük, különösen a FOXP3+ és CD8+ limfociták esetében. A kután/szubkután metasztázisoknál szignifikáns különbséget csak a CD16+ és a CD68+ sejtek esetén tapasztaltunk a terápiára adott válasz vonatkozásában. A túléléssel való összefüggést vizsgálva hasonló különbséget találtunk a legtöbb vizsgált immunsejttípus esetén a nyirokcsomó-metasztázisokban, míg a bőráttek mintáiban csak a CD16+ és a CD68+ sejtek magasabb denzitása korrelált a hosszabb túléléssel.

Eredményeink alapján feltételezhető, hogy az immunológiailag aktív mikrokörnyezet szignifikánsan befolyásolja mind a tumor elleni immunterápiára adott választ, mind pedig a túlélést. A terápiára adott válasz legfontosabb klinikai prediktív markerének a terápia megkezdése előtt mért szérum-LDH-értéket találtuk.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Schwart RA (2008). *Skin Cancer: Recognition and Management*, 2nd Edition, Willey-Blackwell
- [2] Kosary CL, Altekruse SF, Ruhl J, Lee R, Dickie L (2014). Clinical and prognostic factors for melanoma of the skin using SEER registries: Collaborative stage data collection sytem, version 1 and version 2. *Cancer* 120 Suppl 23:3807-14
- [3] Guy GP Jr., Thomas CC, Thompson T, Watson MN, Massetti GM, Richardson LC 2015. Vital signs: Melanoma incidence and mortality trends and projections-United states, 1982-2030. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 64(21): 591-6
- [4] Liskay G 2012. A melanoma malignum terápiája, *Háziorvosi Továbbképző Szemle* 17: 119-22
- [5] Elwood JM, Jopson J, 1997. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int J Cancer.* 73:198–203.
- [6] Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, 2005. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer* 41:45–60
- [7] Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER). Program Cancer Statistics Review, 1975–2013, National Cancer Institute [Internet], 2015
- [8] Ballantine KR, Watson H, Macfarlane S, Winstanley M, Corbett RP, Spearing R, et al, 2017. Small numbers, big challenges: Adolescent and young adult cancer incidence and survival in New Zealand. *J Adolesc Young Adult Oncol.* 6(2):277–85.
- [9] Watson M, Geller AC, Tucker MA, Guy GP Jr., Weinstock MA, 2016. Melanoma burden and recent trends among non-Hispanic whites aged 15–49 years, United States. *Prev Med.* 91:294–8.
- [10] Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends, 2009. *Clin Dermatol.* 27(1):3–9
- [11] Weir HK, Marrett LD, Cokkinides V, Barnholtz-Sloan J, Patel P, Tai E, et al, 2011. Melanoma in adolescents and young adults (ages 15–39 years): United States, 1999–2006. *J Am Acad Dermatol.* 65(5) Suppl 1:S38–49.
- [12] Linos E, Swetter SM, Cockburn MG, Colditz GA, Clarke CA, 2009. Increasing burden of melanoma in the United States. *J Investig Dermatol.* 129(7):1666–74.
- [13] GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet] 2013
- [14] Whiteman DC, Green AC, Olsen CM, 2016. The growing burden of invasive melanoma: Projections of incidence rates and numbers of new cases in six susceptible populations through 2031. *J Investig Dermatol.* 136(6):1161–71.
- [15] de Vries E, Bray FI, Coebergh JW, Parkin DM, 2003. Changing epidemiology of malignant cutaneous melanoma in Europe 1953–1997: Rising trends in incidence and mortality but recent stabilizations in western Europe and decreases in Scandinavia. *Int J Cancer.* 107(1):119–26
- [16] Nikolaou V, Stratigos AJ, 2014. Emerging trends in the epidemiology of melanoma. *Br J Dermatol.* 170(1):11–19.

- [17] Narayanan DL, Saladi RN, Fox JL, 2010. Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int J Dermatol* 49(9):978-86
- [18] Seebode C, Lehmann J, Emmert S, 2016. Photocarcinogenesis and skin cancer prevention strategies. *Anticancer Res.* 36(3):1371–8.
- [19] Moan J, Grigalavicius M, Baturaite Z, Dahlback A, Juzeniene A, 2015. The relationship between UV exposure and incidence of skin cancer. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 31(1):26–35.
- [20] Wu S, Han J, Laden F, Qureshi AA, 2014. Long-term ultraviolet flux, other potential risk factors, and skin cancer risk: A cohort study. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 23(6):1080–9.
- [21] Soura E, Eliades P, Shannon K, Stratigos A, Tsao H, 2016. Hereditary Melanoma: Update on Syndromes and Management - Genetics of familial atypical multiple mole melanoma syndrome. *J Am Acad Dermatol.* 74(3): 395-407
- [22] Melanoma-Diagnosis, Subtypes and AJCC Stages, Springer International Publishing AG, 2016
- [23] KeraliyaA, Krajewski K, Braschi Amirfarzan M, Tirumani SH, Shinagare AB et al., 2015. Extracutaneous melanomas: a primer for the radiologist. *Insights Imaging* 6(6):707-717
- [24] Platz A, Egyhazi S, Ringborg U, Hansson J. 2008. Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. *Mol Oncol.* 1(4):395-405.
- [25] Ellerhorst JA, Greene VR, Ekmekcioglu S, Warneke CL, Johnson MM et al., 2011 Clinical correlates of NRAS and BRAF mutations in primary human melanoma. *Clin Cancer Res.* 2011 Jan 15; 17(2):229-35.
- [26] Muñoz-Couselo E, Adelantado EZ, Ortiz C, García JS, Garcia H et al. 2017. *NRAS*-mutant melanoma: current challenges and future prospect. *Onco Targets Ther.*10: 3941–3947
- [27] Ny L, Nyakas M, Hernberg M, Koivunen J, Oddershede L et al, 2018. BRAF mutation as a prognostic marker for survival in malignant melanoma: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Oncology* 36, no. 15suppl.
- [28] Curtin J.A., Busam K., Pinkel D., Bastian BC et al. 2006. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol.* 24:4340–4346
- [29] Beadling C, Jacobson-Dunlop E, Hodi FS, Le C, Warrick A, 2008. KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clin Cancer Res.* 14(21):6821-8
- [30] Ma X, Wu Y, Zhang T, Song H, Jv H et al, 2017. The clinical significance of c-Kit mutations in metastatic oral mucosal melanoma in China. *Oncotarget.* 2017 Jul 31;8(47):82661-82673
- [31] Koopmans AE, Vaarwater J, Paridaens D, Naus NC, Kilic E, de Klein A, 2013. Patient survival in uveal melanoma is not affected by oncogenic mutations in GNAQ and GNA11 *Br J Cancer.* 2013 Jul 23; 109(2):493–496
- [32] Shoushtari AN, Carvajal RD, 2014. GNAQ and GNA11 mutations in uveal melanoma. *Melanoma Res.* 24(6):525-34
- [33] Perez D, Henle AM, Amsterdam A, Hagen HR, Lees JA, 2018. Uveal melanoma driver mutations in GNAQ/11 yield numerous changes in melanocyte biology. *Pigment Cell Melanoma Res.* 31(5):604-613

- [34] Thörn M, Pontén F, Bergström R, Sparén P, Adami HO, 1994- Clinical and histopathologic predictors of survival in patients with malignant melanoma: a population-based study in Sweden. *J Natl Cancer Inst.* 18; 86(10):761-9.
- [35] Austin PF, Cruse CW, Lyman G, Schroer K, Glass F et al., 1994. Age as a prognostic factor in the malignant melanoma population, *Ann Surg. Oncol.* 1(6):487-94.
- [36] Gershenwald JE, Scolyer LA, Hess KR, Sondak VK, Ross MI, 2017. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 67(6):472-492.
- [37] Erdei A, 2012. *Immunológia. Medicina Könyvkiadó Zrt.*
- [38] Zhao X, Xu Z, Li H, 2017. NSAIDs Use and Reduced Metastasis in Cancer Patients: results from a meta-analysis. *Sci Rep* 7: 1875
- [39] Zarif JC, Taichman RS, Pienta KJ, 2014. TAM macrophages promote growth and metastasis within the cancer ecosystem. *Oncoimmunology.* 3(7)
- [40] Piras F, Colombari R, Minerba L, et al. 2005. The predictive value of CD8, CD4, CD68 and human leukocyte antigen-D-related cells in the prognosis of cutaneous malignant melanoma with vertical growth phase. *Cancer* 104:1246–1254
- [41] van Houdt IS, Sluijter BJR, Moesbergen LM, et al. 2008. Favorable outcome in clinically stage II melanoma patients is associated with the presence of activated tumor infiltrating T-lymphocytes and preserved MHC class I antigen expression. *Int J Cancer* 123:609–615
- [42] Hillen F, Baeten CIM, van de Winkel A, et al. 2008. Leukocyte infiltration and tumor cell plasticity are parameters of aggressiveness in primary cutaneous melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 57:97–106
- [43] Jensen TO, Schmidt H, Møller HJ, et al. 2012. Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma. *Cancer* 118:2476–2485
- [44] Kiss J, Tímár J, Somlai B, et al. 2007. Association of microvessel density with infiltrating cells in human cutaneous malignant melanoma. *Pathol Oncol Res* 13:21-31
- [45] Ladányi A. Emberi daganatokat infiltráló immunsejtek funkcionális és prognosztikai jelentősége. 2004. *Magy Onkol* 48:49–56
- [46] Ladányi A, Somlai B, Gilde K, et al. T-cell activation marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma. 2004. *Clin Cancer Res* 10:521-530
- [47] Miracco C, Mourmouras V, Biagioli M, et al. 2007. Utility of tumour-infiltrating CD25+FOXP3+regulatory T cell evaluation in predicting local recurrence in vertical growth phase cutaneous melanoma. *Oncol Rep* 18:1115-1122
- [48] Ladányi A, Mohos A, Somlai B, et al., 2010. FOXP3+ cell density in primary tumor has no prognostic impact in patients with cutaneous malignant melanoma. *Pathol Oncol Res* 16:303–309
- [49] de Visser, Korets LV, Coussens LM. 2005. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell* 7:411–423
- [50] Di Lillo DJ, Yanaba K, Tedder TF. 2010. B cells are required for optimal CD4+ and CD8+ T cell tumor immunity: therapeutic B cell depletion enhances B16 melanoma growth in mice. *J Immunol* 184:4006–4016
- [51] Ladányi A, Kiss J, Mohos A, et al. 2011. Prognostic impact of B-cell density in cutaneous melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 60:1729–1738

- [52] Senovilla L, Vacchelli E, Galon J, et al. 2012. Prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer. *Oncol Immunology* 1:1323–1343
- [53] Fregni G, Perier A, Avril MF, Caignard A. 2012. NK cells sense tumors, course of disease and treatments. Consequences for NK-based therapies. *Oncol Immunology* 1:38–47
- [54] Enk AH, Jonuleit H, Saloga J, Knop J. 1997. Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 73:309–316
- [55] Ladányi A, Kiss J, Somlai B, et al. 2007. Density of DC-LAMP+ mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor. *Cancer Immunol Immunother* 56:1459–1469
- [56] Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. 2006. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 42:717–727
- [57] Allavena P, Sica A, Solinas G, et al. 2008. The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol* 66:1–9
- [58] Coffelt SB, Hughes R, Lewis CE. 2009. Tumor-associated macrophages: Effectors of angiogenesis and tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 1796:11–18
- [59] Khazaie K, Blatner NR, Khan MW, et al. 2011. The significant role of mast cells in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 30:45–60
- [60] Ribatti D, Crivellato E. Mast cells, angiogenesis, and tumour growth, 2012. *Biochim Biophys Acta* 1822:28
- [61] Tóth T, Tóth-Jakatics R, Jimi S, et al. 2000. Cutaneous malignant melanoma: Correlation between neovascularization and peritumor accumulation of mast cells overexpressing vascular endothelial growth factor. *Hum Pathol* 31:955–960
- [62] Salama AKS, Hodi S, 2011. Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4. *Clin Cancer Res* 17:4622–4628
- [63] Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, et al. 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3:541–547
- [64] Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, et al. 1995 Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4. *Science* 270:985–88
- [65] Gough SC, Walker LS, Sansom DM, 2005. CTLA4 gene polymorphism and autoimmunity. *Immunol Rev* 204:102–115
- [66] Pardoll DM, 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12:252–264
- [67] Seliger B, Marincola FM, Ferrone S, Abken H. 2008. The complex role of B7 molecules in tumor immunology. *Trends Mol Med* 14:550–559
- [68] Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM, 2012. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 24:207–212
- [69] Zou W, Chen L, 2008. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 8:467–477
- [70] Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, et al, 2009. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 114:1537–1544
- [71] Sznol M, Chen L, 2013. Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer. *Clin Cancer Res* 19:1021–1034

- [72] Mocellin S, Benna C, Pilati P, 2013. Coinhibitory molecules in cancer biology and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 24:147–161
- [73] Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S, 2000. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 74:181-273
- [74] NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Melanoma. Version 1. 2019
- [75] Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N et al. 2006. Sentinel-Node Biopsy or Nodal Observation in Melanoma. *N Engl J Med* 355:1307-1317
- [76] Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N, 2014. Final Trial Report of Sentinel-Node Biopsy versus Nodal Observation in Melanoma. *N Engl J Med* 370:599-609
- [77] Ferrara G, Partenzi A, Filosa A, 2018 Sentinel Node Biopsy in Melanoma: A Short Update *Dermatopathology* 5:21–25
- [78] Atkins MB, Hsu J, Lee S, Cohen GI, Flaherty LE et al. 2008. Phase III trial comparing concurrent biochemotherapy with cisplatin, vinblastine, dacarbazine, interleukin-2, and interferon alfa-2b with cisplatin, vinblastine, and dacarbazine alone in patients with metastatic malignant melanoma (E3695): a trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin. Oncol* 26(35):5748-54
- [79] Flaherty KT, Lee SJ, Schuchter LM, Flaherty LE, Wright J et al. 2010. Final results of E2603: A double-blind, randomized phase III trial comparing carboplatin (C)/paclitaxel (P) with or without sorafenib (S) in metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 28: 15(suppl)abstr. 8511.
- [80] Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen CB, Ascierto P et al. 2011. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation *N Engl J Med* 2011; 364:2507-2516
- [81] Hauschild A, Grob J, Demidov LV, Jouray T, Gutzmer R et al. 2012. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 28;380(9839):358-65
- [82] Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzals R, Pavlick AC et al. 2012. Survival in BRAF V600–Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib. *N Engl J Med* 366:707-714
- [83] Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C et al. 2012. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med* 367(2):107-14
- [84] Robert C, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A et al. 2015. Improved Overall Survival in Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib. *N Engl J Med* 2015; 372:30-39
- [85] Larkin J, Ascierto P, Dréno B, Atkinson V, Liskay G et al. 2014. Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med* 371:1867-1876
- [86] Guo J, Si L, Kong Y, Flaherty KT, Xu X et al. 2011. Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. *J Clin Oncol* 29(21):2904-9.
- [87] Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD, Chapman PB, Roman RA et al. 2011. KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA* 8;305(22):2327-34.
- [88] Muul LM, Spiess PJ, Director EP, Rosenberg SA, 1987. "Identification of specific cytolytic immune responses against autologous tumor in humans bearing malignant melanoma," *Journal of Immunology*, vol. 138, pp. 989–995
- [89] Rosenberg SA, Restifo NP, 2015. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*. 348:62-68

- [90] Andersen R, Donia M, Ellebaek E, Borch TH, Kongsted P et al. 2016. Long-lasting complete responses in patients with metastatic melanoma after adoptive cell therapy with tumor-infiltrating lymphocytes and an attenuated IL-2 regimen. *Clin Cancer Res* 1;22(15):3734-45
- [91] Morton DL, Eilber FR, Holmes EC, Hunt JS, Ketcham AS, 1974. BCG Immunotherapy of Malignant Melanoma: Summary of a Seven-year Experience. *Ann Surg* 180(4): 635–641.
- [92] Legha SS, 1997. The role of interferon alfa in the treatment of metastatic melanoma. *Semin Oncol* 24(Suppl 4): S24-S31
- [93] Kirkwood JM, Ibrahim JG, Sondak VK, et al. High- and low-dose interferon alfa-2b in high-risk melanoma: first analysis of intergroup trial E1690/S9111/C9190. *J Clin Oncol* 12:2444-2458, 2000
- [94] Lienard D, Eggermont AM, Schraffordt Koops H, et al, 1994. Isolated perfusion of the limb with high-dose tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interferon-gamma (IFN-gamma) and melphalan for melanoma stage III. Results of a multi-centre pilot study. *Melanoma Res* 4(Suppl 1): 21-26,
- [95] Panelli MC, Wang E, Phan G, et al., 2002. Gene-expression profiling of the response of peripheral blood mononuclear cells and melanoma metastases to systemic IL-2 administration. *Genome Biol* 3: research0035.1-0035.17
- [96] Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G et al. 1999. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol* 17(7):2105-16
- [97] Berd D, 2001. Autologous, hapten-modified vaccine as a treatment for human cancers. *Vaccine* 19: 2565-2570
- [98] Safa MM, Foon KA, 2001. Adjuvant immunotherapy for melanoma and colorectal cancers. *Semin Oncol* 28: 68-92
- [99] Soiffer R, Lynch T, Mihm M, et al., 1998. Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13141- 13146
- [100] Chan AD, Morton DL, 1998. Active immunotherapy with allogeneic tumor cell vaccines: present status. *Semin Oncol* 25: 611-622
- [101] Wallack MK, Sivanandham M, Balch CM, et al, 1998. Surgical adjuvant active specific immunotherapy for patients with stage III melanoma: the final analysis of data from a phase III, randomized, double-blind, multicenter vaccinia melanoma oncolysate trial. *J Am Coll Surg* 187: 69-77
- [102] Marchand M, van Baren N, Weynants P, et al, 1999. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer* 80: 219-230
- [103] Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, et al, 1998. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 4: 321-327
- [104] Thurner B, Haendle I, Röder C, et al, 1999. Vaccination with Mage3A1 peptide-pulsed mature monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* 190: 1669-1678

- [105] Andtbacka RHS, Collichio FA, Amatruda T, Senzer N, Chesney J et al., 2017. OPTiM: A randomized phase III trial of talimogene laherparepvec (T-VEC) versus subcutaneous (SC) granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) for the treatment (tx) of unresected stage IIIB/C and IV melanoma. *J Clin Oncol* 31, no 18 suppl.
- [106] Leach DR, Krummel MF, Allison JP, 1996. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271:1734–1736
- [107] van Elsas A, Hurwitz AA, Allison JP, 1999. Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (Ctla-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (Gm-Csf)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J Exp Med* 190:355–366
- [108] Hodi FS, Mihm MC, Soiffer RJ, et al, 2003. Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4712–4717
- [109] Ribas A, Camacho LH, Lopez-Berestein G, et al, 2005 Antitumor activity in melanoma and anti-self responses in a phase I trial with the anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody CP-675,206. *J Clin Oncol* 23:8968–8977
- [110] Wolchok J, Neyns B, Linette G, et al., 2010. Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomized, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. *Lancet Oncol* 11:155–164
- [111] Ribas A, Kefford R, Marshall MA, et al., 2013. Phase III randomized clinical trial comparing tremelimumab with standard-of-care chemotherapy in patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol* 31:616–622
- [112] Hodi FS, O’Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363:711–723, 2010
- [113] Robert C, Thomas L, Bondarenko I, Robert C, et al., 2011. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated melanoma. *N Engl J Med* 364:2517–2526
- [114] Maio M, Bondarenko I, et al., 2012. Four-year survival update for metastatic melanoma (MM) patients (pts) treated with ipilimumab (IPI)+dacarbazine (DTIC) on phase 3 study CA184-024. *Ann Oncol* 23(Suppl 9):367
- [115] Lebbé C, Weber JS, Maio M, et al., 2012. Five-year survival rates for patients (pts) with metastatic melanoma (MM) treated with ipilimumab (IPI) in phase II trials. *Ann Oncol* 23(Suppl 9):363–364, 2012
- [116] Robert C, Long G, Brady B, Dutriaux C, Maio M et al., 2015 Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without *BRAF* Mutation. *N Engl J Med* 372:320-330
- [117] Weber JS, D’Angelo SP, Minor D, et al, 2015. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomized, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 16(4):375–384
- [118] Ribas A, Puzanov I, Dummer R, Shadendorf D, Hamid O et al, 2015. Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEYNOTE-002): a randomised, controlled, phase 2 trial *Lancet Oncol* 16: 908–18
- [119] Robert C, Schachter J, Long G, Arance A, Grob J et al. 2015. Pembrolizumab versus ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 2015; 372:2521-2532

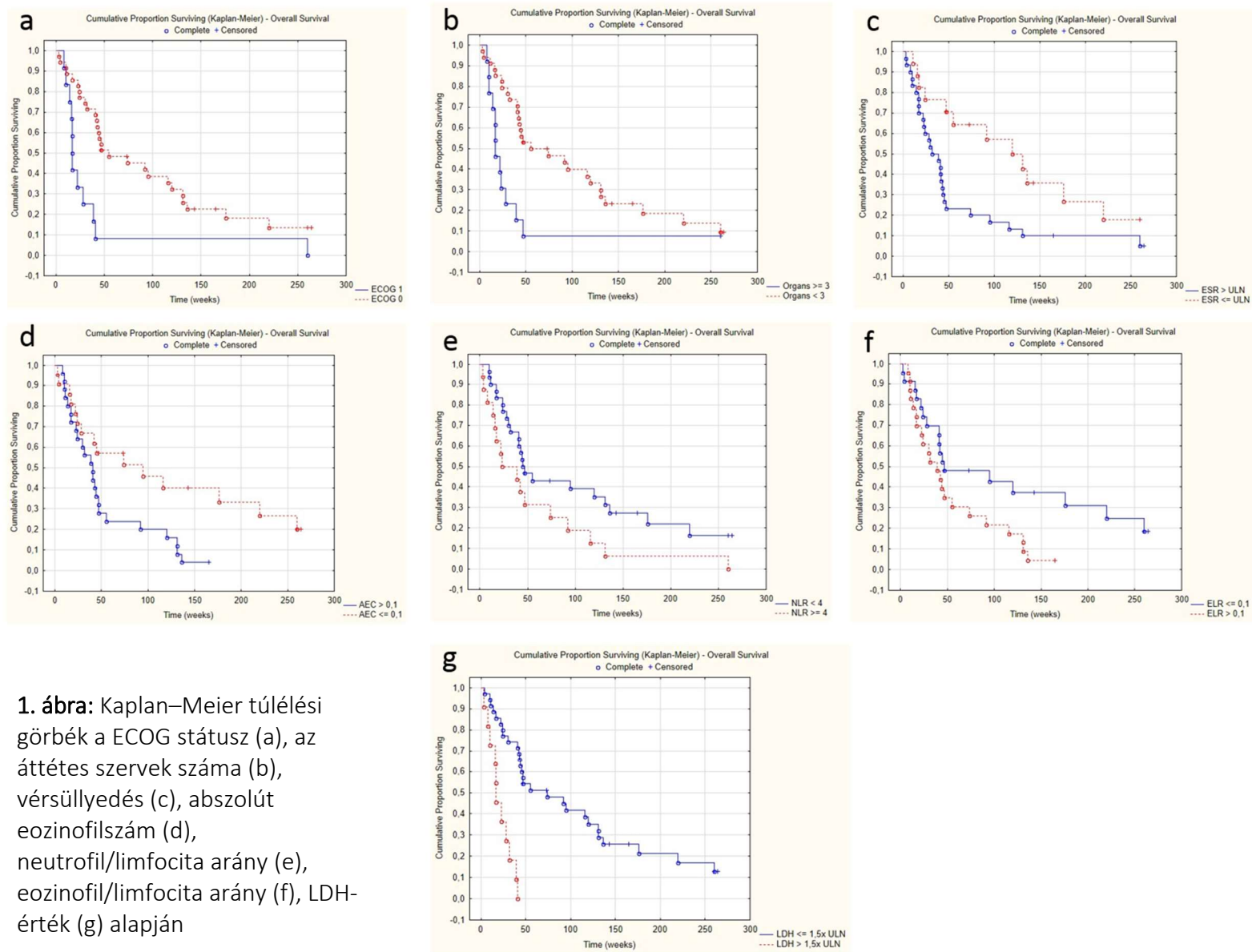
- [120] Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob J, Cowey CL, Lao CD et al, 2015. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med* 2015; 373:23-34
- [121] Hoos A, Eggermont AMM, Janetzki S, et al, 2010. Improved endpoints for cancer immunotherapy trials. *J Natl Cancer Inst* 102:1388–1397
- [122] Wolchok JD, Hoos A, O’Day S, et al, 2009. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clin Cancer Res* 15:7412–7420
- [123] Prieto PA, Yang JC, Sherry RM, et al, 2012. CTLA-4 blockade with ipilimumab: long-term follow-up of 177 patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 18:2039–2047
- [124] Lipson EJ, Sharfman WH, Drake CG, et al, 2013. Durable cancer regression off-treatment and effective reinduction therapy with an anti-PD-1 antibody. *Clin Cancer Res* 19:462–468
- [125] Callahan MK, Postow MA, Wolchok JD, 2013. Immunomodulatory therapy for melanoma: Ipilimumab and beyond. *Clin Dermatol* 31:191–199
- [126] Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, et al, 2011. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 17:4550–4557
- [127] Mahoney KM, Atkins MB, 2014. Prognostic and predictive markers for the new immunotherapies. *Oncology (Williston Park)*. Suppl 3:39-48
- [128] Ku GY, Yuan J, Page DB, et al, 2010. Single-institution experience with ipilimumab in advanced melanoma patients in the compassionate use setting. *Cancer* 116:1767–1775
- [129] Delyon J, Mateus C, Lefeuvre D, et al, 2013. Experience in daily practice with ipilimumab for the treatment of patients with metastatic melanoma: an early increase in lymphocyte and eosinophil counts is associated with improved survival. *Ann Oncol* 24:1697-1703
- [130] Ascierto PA, Kalos M, Schaer DA, et al, 2013. Biomarkers for immunostimulatory monoclonal antibodies in combination strategies for melanoma and other tumor types. *Clin Cancer Res* 19:1009–1020
- [131] Di Giacomo AM, Calabrò L, Danielli R, et al, 2013. Long-term survival and immunological parameters in metastatic melanoma patients who responded to ipilimumab 10 mg/kg within an expanded access programme. *Cancer Immunol Immunother* 62:1021-1028
- [132] Simeone E, Gentilcore G, Giannarelli D, Grimaldi AM, Caracò C (2014) Immunological and biological changes during ipilimumab treatment and their potential correlation with clinical response and survival in patients with advanced melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 63:675–683
- [133] Kitano S, Postow MA, Cortez C, Rasalan T, Gallardo HF, Panageas K, et al, 2012. Myeloid-derived suppressor cell quantity prior to treatment with ipilimumab at 10 mg/kg to predict for overall survival in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 30 (suppl; abstr2518)
- [134] Weide B, Di Giacomo AM, Fonsatti E, Zitvogel L, 2015. Immunologic correlates in the course of treatment with immunomodulating antibodies. *Semin Oncol* 42:448–458
- [135] Blank CU, Enk A, 2014. Therapeutic use of anti-CTLA-4 antibodies. *Int Immunol* 27:3–10
- [136] Koguchi Y, Hoen HM, Bambina SA et al, 2015. Serum immunoregulatory proteins as predictors of overall survival of metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. *Cancer Res* 75:5084–5092

- [137] Hamid O, Schmidt H, Nissan A, et al, 2011. A prospective phase II trial exploring the association between tumor microenvironment biomarkers and clinical activity of ipilimumab in advanced melanoma. *J Transl Med* 9:204
- [138] Ji RR, Chasalow SD, Wang L, et al, 2012. An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab. *Cancer Immunol Immunother* 61:1019–1031
- [139] Sunshine J, Taube JM. PD-1/PD-L1 inhibitors, 2015. *Curr Opin Pharmacol* 23:32–38
- [140] Carbognin L, Pilotto S, Milella M, et al, 2015. Differential activity of nivolumab, pembrolizumab and MPDL3280A according to the tumor expression of programmed death-ligand-1 (PD-L1): sensitivity analysis of trials in melanoma, lung and genito-urinary cancers. *PLoS One* 10:e0130142
- [141] Wilgenhof S, Du Four S, Vandenbroucke F, Everaert H, Salmon I, Liénard D, Marmol VD, Neyns B (2013) Single-center experience with ipilimumab in an expanded access program for patients with pre-treated advanced melanoma. *J Immunother* 36:215–222
- [142] Kelderman S, Heemskerk B, van Tinteren H, van den Brom R et al. (2014) Lactate dehydrogenase as a selection criterion for ipilimumab treatment in metastatic melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 63:449–458
- [143] Ascierto PA, Simeone E, Sileni VC et al. 2014. Clinical experience with ipilimumab 3 mg/kg: real-world efficacy and safety data from an expanded access programme cohort. *J Transl Med.*;12:116. doi: 10.1186/1479-5876-12-116
- [144] Di Giacomo AM, Danielli R, Calabro L, Bertocci E, Nannicini C, Giannarelli D et al (2010) Ipilimumab experience in heavily pre-treated patients with melanoma in an expanded access program at the University Hospital of Siena (Italy). *Cancer Immunol Immunother* 60:467–477
- [145] Delyon J, Mateus C, Lefeuvre D, Lanoy E, Zitvogel L, Chaput N, Roy S, Eggermont AM, Routier E, Robert C (2013) Experience in daily practice with ipilimumab for the treatment of patients with metastatic melanoma: an early increase in lymphocyte and eosinophil counts is associated with improved survival. *Ann Oncol* 24:1697–1703
- [146] Ferrucci PF, Gandini S, Battaglia A, Alfieri S, di Giacomo AM, Giannarelli D, Cappellini GCA, de Galitiis F, Marchetti P, Amato G, Lazzeri A, Pala L, Cocorocchio E, Martinoli C (2015) Baseline neutrophil-to-lymphocyte ratio is associated with outcome of ipilimumab-treated metastatic melanoma patients. *Br J Cancer* 112:1904–1910
- [147] Khoja L, Atenafu EG, Templeton A, Qye Y, Chappell MA, Saibil S, Hogg D, Butler MO, Joshua AM (2016) The full blood count as a biomarker of outcome and toxicity in ipilimumab-treated cutaneous metastatic melanoma. *Cancer Med* 5:2792–2799
- [148] Robert C, Schadendorf D, Messina M, Hodi FS, O'Day S, 2013. Efficacy and safety of retreatment with ipilimumab in patients with pretreated advanced melanoma who progressed after initially achieving disease control. *Clin Cancer Res.* 19(8):2232-9
- [149] Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, Weber JS, Margolin K, Hamid O, Patt D, Chen TT, Berman DM, Wolchok JD (2015) Pooled analysis of long-term survival data from phase II and phase III trials of ipilimumab in unresectable or metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 33:1889–1894
- [150] Attia P, Phan GQ, Maker AV, Robinson MR, Quezado MM, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Kammula US, Royal RE, Restifo NP, Haworth LR, Levy C, Mavroukakis SA, Nichol G, Yellin MJ, Rosenberg SA (2005) Autoimmunity correlates with tumor regression in

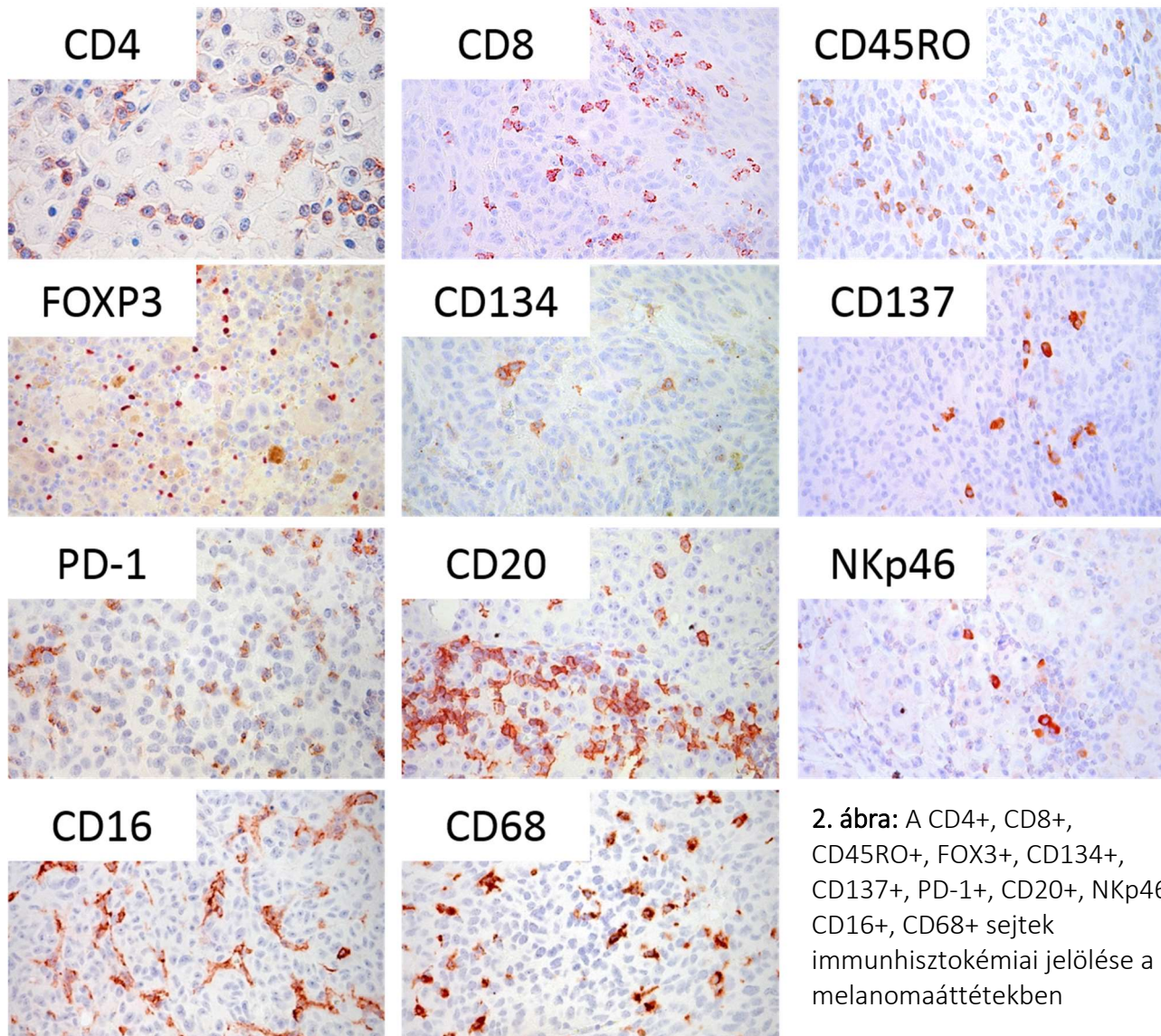
- patients with metastatic melanoma treated with anticytotoxic T-lymphocyte antigen-4. *J Clin Oncol* 23:6043–6053
- [151] Di Giacomo AM, Grimaldi AM, Ascierto PA, Queirolo P, Del Vecchio M, 2013. Correlation between efficacy and toxicity in pts with pretreated advanced melanoma treated within the Italian cohort of the ipilimumab expanded access programme (EAP). *J Clin Oncol* 31.15. suppl 9065
- [152] Diem S, Kasenda B, Martin-Liberal J, Lee A, Chauhan D, Gore M, Larkin J (2015) Prognostic score for patients with advanced melanoma treated with ipilimumab. *Eur J Cancer* 51:2785–2791
- [153] Margolin K, Ernstoff MS, Hamid O, Lawrence D, McDermott D, Puzanov I, Wolchok JD, Clark JI, Sznol M, Logan TF, Richards J, Michener T, Balogh A, Heller KN, Hodi FS (2012) Ipilimumab in patients with melanoma and brain metastases: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 13:459–465
- [154] Queirolo P, Spagnolo F, Ascierto PA, Simeone E, Marchetti P, Scoppola A, del Vecchio M, di Guardo L, Maio M, di Giacomo AM, Antonuzzo A, Cognetti F, Ferraresi V, Ridolfi L, Guidoboni M, Guida M, Pigozzo J, Chiarion Sileni V (2014) Efficacy and safety of ipilimumab in patients with advanced melanoma and brain metastases. *J Neuro-Oncol* 118:109–116
- [155] Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646–674
- [156] Guthrie GJ, Charles KA, Roxburgh CS, Horgan PG, McMillan DC, Clarke SJ (2013) The systemic inflammation-based neutrophil-lymphocyte ratio: experience in patients with cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 88:218–230
- [157] Templeton AJ, McNamara MG, Šeruga B et al (2014) Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 106:dju124
- [158] Petruccio CA, Kim-Schulze S, Kaufman HL (2006) The tumor microenvironment and implications for cancer immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther* 6:671–684
- [159] Vasievich EA, Huang L (2011) The suppressive tumor microenvironment: a challenge in cancer immunotherapy. *Mol Pharm* 8:635–641
- [160] Vapione S, Martinoli C, Fava P et al. 2015. Personalised medicine: Development and external validation of a prognostic model for metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. *Eur J Cancer*. 2015 Sep;51(14):2086-94. doi: 10.1016/j.ejca.2015.06.130. Epub 2015 Jul 2
- [161] Felix J, Lambert J, Roelens M, Maubec E, Guermouche H, 2016 Ipilimumab reshapes T cell memory subsets in melanoma patients with clinical response. *Oncoimmunology*. 2016 Feb 18;5(7):1136045
- [162] Zaragoza J, Caille A, Beneton N, Bens G, Christiann F, Maillard H, Machet L (2016) High neutrophil to lymphocyte ratio measured before starting ipilimumab treatment is associated with reduced overall survival in patients with melanoma. *Br J Dermatol* 174: 146–151
- [163] Gebhardt C, Sevko A, Jiang H, Lichtenberger R, Reith M, Tarnanidis K, Holland-Letz T, Umansky L, Beckhove P, Sucker A, Schadendorf D, Utikal J, Umansky V (2015) Myeloid cells and related chronic inflammatory factors as novel predictive markers in melanoma treatment with ipilimumab. *Clin Cancer Res* 21:5453–5459

- [164] Martens A, Wistuba-Hamprecht K, Geukes Foppen M et al (2016) Baseline peripheral blood biomarkers associated with clinical outcome of advanced melanoma patients treated with ipilimumab. *Clin Cancer Res* 22:2908–2918
- [165] Erdag G, Schaefer JT, Smolkin ME, Deacon DH, Shea SM, Dengel LT, Patterson JW, Slingluff CL Jr (2012) Immunotype and immunohistologic characteristics of tumor-infiltrating immune cells are associated with clinical outcome in metastatic melanoma. *Cancer Res* 72:1070–1080
- [166] Gajewski TF, Woo SR, Zha Y, Spaapen R, Zheng Y, Corrales L, Spranger S (2013) Cancer immunotherapy strategies based on overcoming barriers within the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol* 25:268–276
- [167] Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, Sosman JA, McDermott DF, Powderly JD, Gettinger SN et al (2014) Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 515:563–567
- [168] Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, Vansteenkiste J, Mazieres J, Park K, Smith D, Artal-Cortes A, Lewanski C, Braiteh F, Waterkamp D, He P, Zou W, Chen DS, Yi J, Sandler A, Rittmeyer A, for the POPLAR Study Group (2016) Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicenter, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet* 387:1837–1846
- [169] Tumei PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, Chmielowski B, Spasic M, Henry G, Ciobanu V et al (2014) PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 515:568–571
- [170] Yuan J, Adamow M, Ginsberg BA, et al, 2011 Integrated NY-ESO-1 antibody and CD8+ T-cell responses correlate with clinical benefit in advanced melanoma patients treated with ipilimumab. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:16723–16728
- [171] Taube JM, Klein A, Brahmer JB, Xu H, Pan X, Kim JH, Chen L, Pardoll DM, Topalian SL, Anders RA (2014) Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res* 20:5064–5074
- [172] Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, Williams J, Meng Y, Ha TT, Gajewski TF (2013) Up-regulation of PD-L1, IDO, and Tregs in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8+ T cells. *Sci Transl Med* 5:200ra116
- [173] Bulliard Y, Jolicoeur R, Windman M, Rue SM, Ettenberg S, Knee DA, Wilson NS, Dranoff G, Brogdon JL (2013) Activating Fc γ receptors contribute to the antitumor activities of immunoregulatory receptor-targeting antibodies. *J Exp Med* 210:1685–1693
- [174] Selby MJ, Engelhardt JJ, Quigley M, Henning KA, Chen T, Srinivasan M, Korman AJ (2013) Anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumoral regulatory T cells. *Cancer Immunol Res* 1:32–42
- [175] Simpson TR, Li F, Montalvo-Ortiz W, Sepulveda MA, Bergerhoff K, Arce F, Roddie C, Henry JY, Yagita H, Wolchok JD, Peggs KS, Ravetch JV, Allison JP, Quezada SA (2013) Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med* 210:1695–1710
- [176] Romano E, Kusio-Kobialka M, Foukas PG, Baumgaertner P, Meyer C, Ballabeni P, Michielin O, Weide B, Romero P, Speiser DE (2015) Ipilimumab-dependent cell-mediated cytotoxicity of regulatory T cells ex vivo by nonclassical monocytes in melanoma patients. *Proc Natl Acad Sci* 112:6140–6145

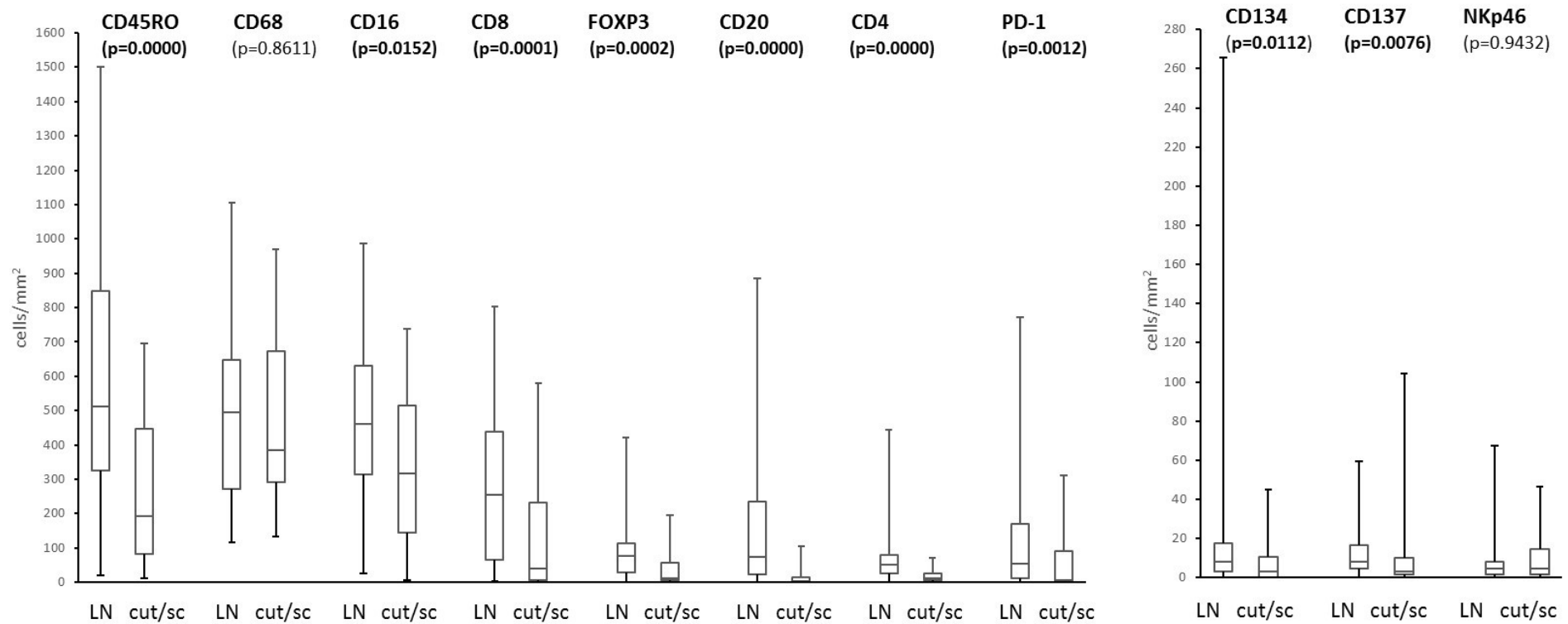
10. TÁBLÁZATOK ÉS ÁBRÁK



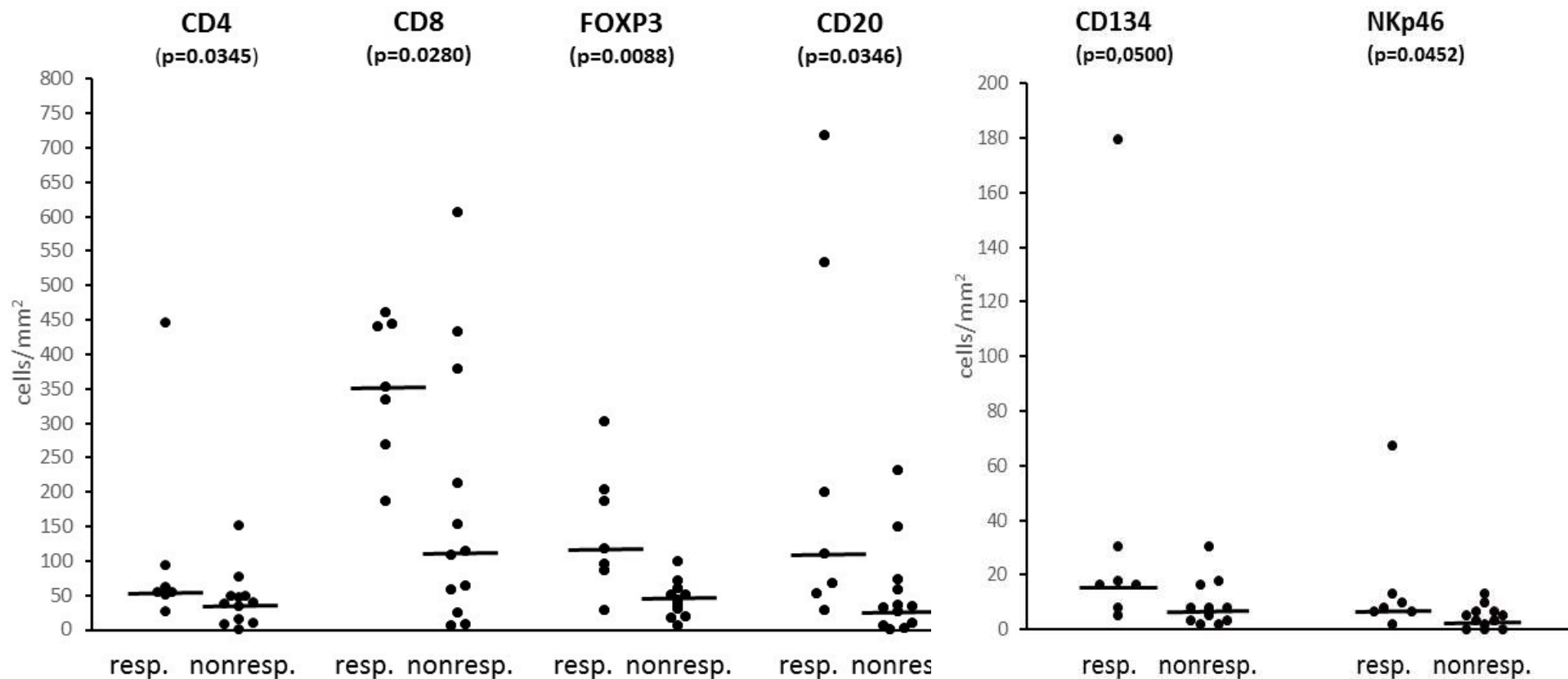
1. ábra: Kaplan–Meier túlélési görbék a ECOG státusz (a), az áttétes szervek száma (b), vérsüllyedés (c), abszolút eozinofilszám (d), neutrofil/limfocita arány (e), eozinofil/limfocita arány (f), LDH-érték (g) alapján



2. ábra: A CD4+, CD8+, CD45RO+, FOXP3+, CD134+, CD137+, PD-1+, CD20+, NKp46+, CD16+, CD68+ sejtek immunhisztokémiai jelölése a melanomaáttétekben

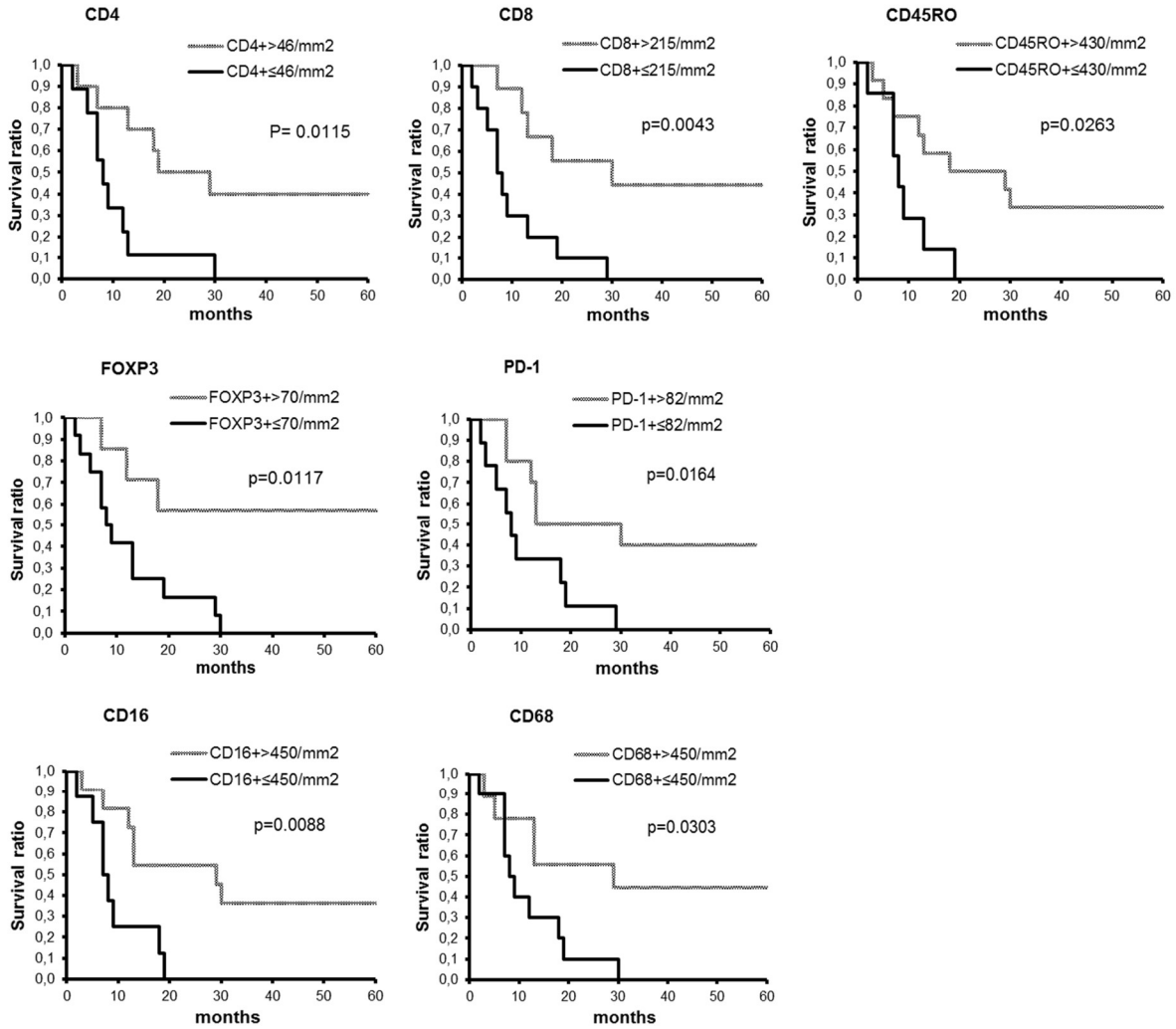


3. ábra: Az immunsejtek sűrűsége az ipilimumabterápiában részesült betegek kezelés előtti nyirokcsomó- és kután/szubkután metasztázisiban (boxplot diagramm). A dobozok alsó és felső élei a 25-ös és 75-ös percentiliseket, a horizontális vonalak a mediánértéket, a pálcikák alsó és felső pontjai a maximum- és a minimumértékeket mutatják

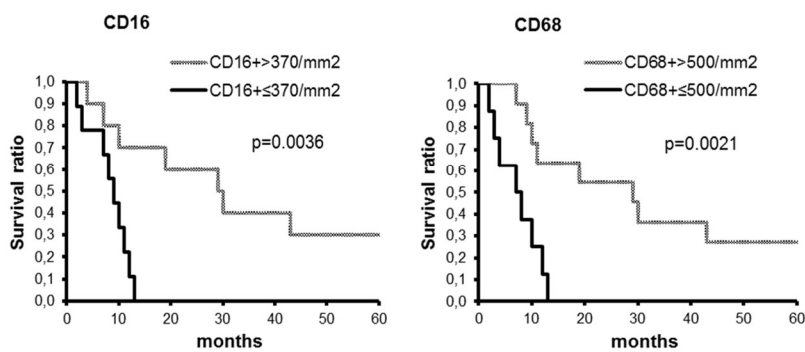


4. ábra: Az egyes immunsejttípusok sűrűsége az ipilimumabterápiában részesült páciensek kezelés előtti nyirokcsomó-mintáiban: responderek (n=7) és non-responderek (n=12). A pontdiagramm egyes értékei az egyes betegek átlagos denzitásértékeit, a horizontális vonalak a mediánértéket jelölik

a



b



5. ábra: Az ipilimumabterápiában részesülő betegek Kaplan–Meier-görbéi az immunsejtek átlagos sűrűségének vonatkozásában nyirokcsomóáttétek (a) és kután/szubkután áttétek esetén (b)

1. táblázat. A betegek főbb klinikai jellemzői

Klinikai paraméter	Érték
Kezelt betegek száma	47
Életkor, év – medián (tartomány)	57 (26–83)
Nem, n (%)	
Férfi	27 (57)
Nő	20 (43)
Primer tumor stádiuma, n (%)	
T1-T2	15 (32)
T3-T4	25 (53)
Ismeretlen	7 (15)
Tumor kiindulási helye, n (%)	
Bőr	44 (94)
Uveális	2 (4)
Nyálkahártya	1 (2)
TIL jelenléte a primer tumorban, n (%)	
Jelen van	19 (41)
Hiányzik	18 (38)
Ismeretlen	10 (21)
Mutációs státusz, n (%)	
BRAF+NRAS-	18 (38)
BRAF-NRAS+	8 (17)
BRAF-NRAS-	13 (28)
Ismeretlen	8 (17)
ECOG-státusz, n (%)	
0	35 (75)
1	12 (25)
2	0
AJCC-stádium, n (%)	
III (irreszekábilis)	6 (13)
IV M1a	6 (13)
IV M1b	10 (21)
IV M1c	25 (53)
Agyi áttét, n (%)	
Jelen van	6 (13)
Nincs	41 (87)
Előző terápiaik száma, n (%)	
1	19 (40)
≥2	28 (60)

Kiindulási LDH-érték, n (%)	
≤1,5× normál felső határa	35 (75)
>1,5× normál felső határa	11 (23)
Ismeretlen	1 (2)
Metasztatikus szervek száma, n (%)	
<3	034 (72)
≥3	13 (28)
Ipilimumabciklusok száma, n (%)	
1	4 (8)
2	2 (4)
3	6 (13)
4	35 (75)
Ipilimumabterápiát követő kezelés	
BRAF-inhibitor	6 (13)
PD-1-inhibitor	6 (13)
ipilimumab-reindukció	3 (6)
citotoxikus	18 (38)
nem történt további kezelés	24 (51)

2. táblázat. Terápiás válasz és túlélés ipilimabterápiát követően

Legjobb terápiás válasz (42 beteg)	
Komplett válasz	5 (12%)
Parciális válasz	2 (5%)
Stabil betegség	10 (24%)
Progresszió	25 (60%)
Legjobb terápiás válasz ráta	17%
Betegségkontroll-ráta	40%
PFS, hónap – medián (95% CI)	2,7 (0,1–5,4)
OS, hónap – medián (95% CI)	9,8 (4,7–14,9)
6 hónapos OS	70%
12 hónapos OS	40%
24 hónapos OS	28%

3. táblázat. Autoimmun mellékhatások

Mellékhatás	Összes, n (%)	Grade 3-5, n (%)
Összes	19 (40)	6 (13)
Bőrgyógyászati		
Viszketés	1 (2)	0
Bőrkiütés	15 (32)	0
Vitiligo	1 (2)	0
Gasztrointesztinális		
Diarrhoea	4 (9)	0
Colitis	2 (4)	2 (4)
Endokrin		
Hypophysitis	2 (4)	2 (4)
Hepaticus	6 (13)	0
Egyéb		
Nephritis	2 (4)	2 (4)
Uveitis	1 (2)	1 (2)

4. táblázat. A folyamatos változók értékeinek összehasonlítása progrediáló (PD) és nem progrediáló (DC) betegeknél

	12. hét			16. hét			24. hét		
	DC	PD	p-érték	DC	PD	p-érték	DC	PD	p-érték
LDH (U/L)	479	514	0,8831	463	535	0,4203	354	530	0,1677
ESR (mm/h)	30	45	0,1079	29	45	0,0532	18	46	0,0059
ANC (G/L)	4,2	4,6	0,6981	4,3	4,4	1,0000	3,7	4,7	0,2455
AEC (G/L)	0,08	0,16	0,0042	0,09	0,16	0,0299	0,08	0,12	0,1180
ALC (G/L)	1,2	1,16	0,9042	1,18	1,16	0,9214	1,17	1,25	0,5574
NLR	2,7	3,3	0,7789	2,8	4,0	0,6213	3,0	5,8	0,5105
ELR	0,08	0,18	0,0066	0,09	0,19	0,0257	0,09	0,15	0,1677

5. táblázat. A klinikai paraméterek kiindulási értékeinek összefüggése a túléléssel, egyváltozós analízis (log-rank teszt)

	Hazard ratio	95% CI	p-érték
ECOG-státusz >0	2,898	1,427–5,886	0,0153
Áttétes szervek száma ≥ 3	2,555	1,265–5,159	0,0300
ESR >1 \times ULN	2,367	1,884–4,716	0,0084
AEC >0,1 G/L	2,304	1,142–4,648	0,0193
NLR ≥ 4	1,970	1,035–3,750	0,0475
ELR >0,1	6,105	1,302–25,628	0,0401
LDH >1,5 \times ULN	6,565	2,695–15,996	0,0029

6. táblázat. A klinikai paraméterek kiindulási értékeinek összefüggése a túléléssel, többváltozós analízis (Cox-regesszió)

Klinikai paraméterek	Hazard ratio	95% CI	p-érték
ECOG-státusz	1,653	0,644–4,240	0,2954
LDH	3,554	1,225–10,306	0,0190
AEC	1,507	0,578–3,924	0,4000
ESR	1,544	0,609–3,912	0,3590

7. táblázat. A betegek és a minták klinikai paramétereit

	Responderek (n=13) ^a	Non-responderek (n=17) ^a	p-érték
Életkor – év, medián (tartomány)	67 (51–78)	53 (30–66)	0,0000 ^b
Nem – n (%)			
nő	5 (38)	8 (47)	NS ^c
férfi	8 (62)	9 (63)	
Betegségstádium – n (%)			NS ^c
III N3	1 (8)	0 (0)	
IV M1a	4 (31)	2 (12)	
IV M1b	3 (23)	5 (29)	
IV M1c	5 (38)	10 (59)	
Metasztatikus szervek száma			NS ^c
1-2	8 (62)	14 (82)	
>2	5 (38)	3 (18)	
ECOG-státusz			NS ^c
0	10 (77)	10 (59)	
1	3 (23)	5 (29)	
2	0 (0)	2 (12)	
LDH			NS ^c
Normál	10 (77)	8 (47)	
>Normál felső határa	3 (23)	9 (53)	
BRAF V600 mutáció			NS ^c
Jelen van	5 (38)	3 (18)	
Hiányzik	4 (31)	6 (35)	
Ismeretlen	4 (31)	8 (47)	
Progressziómenets túlélés – hónap, medián (tartomány)	9 (6–57)	2 (1–5)	0,0000 ^b
Teljes túlélés – hónap, medián (tartomány)	30 (10–61)	7 (2–30)	0,0000 ^b
Összes vizsgált minta	34	52	NS ^c
nyirokcsomó-metasztázis	20	32	
kután/sc. metasztázis	14	20	

^aRespondernek értékeltük azokat a betegeket, akiknél a legjobb terápiás válasz komplett vagy parciális remisszió vagy legalább 6 hónapig tartó stabil betegség volt. ^bMann–Whitney-teszt, ^c χ^2 -teszt

8. táblázat. A terápiás válasz és a metasztázisokat infiltráló immunsejtek sűrűségének kapcsolata^a

Immunsejtmarker	Nyirokcsomó-metasztázis (betegszám: 19)			Kután/sc. metasztázis (betegszám: 19)			Összes metasztázis (betegszám: 30)		
	Resp. n=7	Non- resp. n=12	p-érték	Resp. n=9	Non- resp. n=10	p-érték	Resp. n=13	Non- resp. n=17	p-érték
CD4	6 (86)	4 (33)	0,0274	5 (56)	5 (50)	0,8087	8 (62)	9 (53)	0,6377
CD8	6 (86)	3 (25)	0,0106	4 (44)	5 (50)	0,8087	8 (62)	5 (29)	0,0785
CD45RO	6 (86)	6 (50)	0,1195	6 (67)	4 (40)	0,2451	7 (54)	5 (29)	0,1758
CD20	6 (86)	4 (33)	0,0274	3 (33)	5 (50)	0,4625	6 (46)	4 (24)	0,1927
CD134	5 (71)	3 (25)	0,0480	5 (56)	4 (40)	0,4977	8 (62)	5 (29)	0,0785
CD137	5 (71)	2 (17)	0,0170	4 (44)	5 (50)	0,8087	7 (54)	7 (41)	0,4906
FOXP3	6 (86)	1 (8)	0,0009	5 (56)	5 (50)	0,8087	7 (54)	3 (18)	0,0371
PD-1	5 (71)	5 (42)	0,2101	3 (33)	6 (60)	0,1775	6 (46)	8 (47)	0,9607
CD16	5 (71)	6 (50)	0,3615	7 (78)	3 (30)	0,0373	8 (62)	6 (35)	0,1533
CD68	4 (57)	5 (42)	0,5146	8 (89)	3 (30)	0,0094	11 (85)	8 (47)	0,0344
NKp46 ^b	6 (86)	4 (33)	0,0274	4 (50)	3 (30)	0,1353	10 (83)	7 (41)	0,0232

^aA szignifikánsan magas immunsejtsűrűséget mutató metasztázissal bíró betegek számát adtuk meg (%). ^bEgy nyirokcsomó-metasztázis nem volt vizsgálható. Resp.: responder, Non- resp.: non-responder

9. táblázat. Ipilimumab immunterápiával kapcsolatos klinikai vizsgálatok effektivitási és biztonságossági paraméterei

Vizsgálat	Betegszám (n)	ORR (%)	DCR (%)	PFS (hó)	OS (hó)	1 éves túlélés (%)	2 éves túlélés (%)	Gr 3-4 autoimmun mellékhatás (%)
Hodi (112)	131	10,9	28,5	2,8	10,1	45,6	23,5	11,5
Ku (128)	53	12	41	2,6	7,2	n.a.	n.a.	29
Wilgenhof (141)	50	10,4	55	n.a.	7	45,2	28,8	18
Kelderman (142)	230	17	35	2,9	7,5	37,8	22,9	16
Simeone (132)	26	26	38	n.a.	9,6	46	22	n.a.
Ascierto (143)	833	13	34	3,7	7,2	35	20	12
DiGiacomo (144)	27	11	29,6	n.a.	9	34,8	23,5	18
Ferrucci (146)	187	8,5	27,5	3,1	5	n.a.	n.a.	11
Khoja (147)	183	8	31	2,8	9,6	n.a.	n.a.	n.a.
OOI	47	17	40	2,7	9,8	40	28	13

(n.a.= hiányzó adat)

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Liszkay Gabriella Professzor Asszonynak és Dr. Ladányi Andrea Tanárnőnek, akik támogatták felvételemet a Doktori Iskolába, szakmai tanácsaikkal, tapasztalataikkal és ötleteikkel sok segítséget nyújtottak, hozzájárulva ezzel kutatási munkám sikeres befejezéséhez.

Hálával tartozom az Országos Onkológiai Intézet vezetőségének, Prof. Dr. Kásler Miklós és Prof. Dr. Polgár Csaba Főigazgató Úrnak, valamint a Pécsi Tudományegyetem vezetésének, kiemelve Mangel László Professzor Urat a munkámhoz nyújtott támogatásért.

Szeretném kifejezni hálás köszönetemet Dr. Fröhlich Georginának és Gaudi Istvánnak a kutatási eredmények statisztikai feldolgozásához nyújtott hatalmas segítségért.

Köszönettel tartozom Dr. Tóth Erika Tanárnőnek és a molekuláris patológiai vizsgálatok kivitelezéséért, valamint Dr. Plótár Vandának a szövettani vizsgálatok értékelésében nyújtott segítségért, valamint Parragné Derecskei Katalin szakasszisztensnek az immunhisztokémiai reakciók kivitelezéséért.

Köszönöm kollégáimnak, Dr. Pánczél Gittának, Dr. Czirbesz Katának, Dr. Imrédi Eleonóranak, Dr. Kotlán Beatrixnek és Dr. Kovács Péternek, valamint Horváth Anikó titkárnőnek, Faragó Dániel informatikus könyvtárosnak, Miklós Zoltánné vezető asszisztensnek és helyettesének, Sárköziné Kunyoczky Katalinnak, Kárpáti Ilona főnővérnek és Gurgolné Marcsa Krisztina helyettes főnővérnek a támogatását PhD-munkám végzése során.

Köszönöm szüleimnek, akik lelkiileg támogattak és rengeteg biztatást kaptam tőlük, valamint köszönöm férjemnek, Dr. Bárczi Györgynek, hogy klinikusként és kutatóként hasznos tanácsokkal látott el és segített a kutatás kezdeti fázisaitól a PhD-munkám befejezéséig.