

# IMUNSKA GENSKA TERAPIJA IN MOŽNOST KOMBINIRANJA Z RADIOTERAPIJO

Maja Čemažar<sup>1,2</sup> in Gregor Serša<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> *Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija*

<sup>2</sup> *Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola, Slovenija*

<sup>3</sup> *Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, Slovenija*

Elektronski naslov: mcemazar@onko-i.si; gserša@onko-i.si

---

## Izvleček

V prispevku bomo predstavili gensko imunoterapijo z interlevkinom 12 (IL-12), od predkliničnih študij do klinične študije faze I, ki se trenutno izvaja na Onkološkem inštitutu Ljubljana in Kliniki za otorinolaringologijo in maksilofacialno kirurgijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Poleg tega bomo predstavili osnove za kombinacijo imunskih terapij z lokalnimi ablativnimi terapijami, kot je radioterapija.

**Ključne besede:** bazalno celični karcinom, interlevkin 12, elektroporacija, genski elektroprenos, klinična študija faze I

---

## Uvod

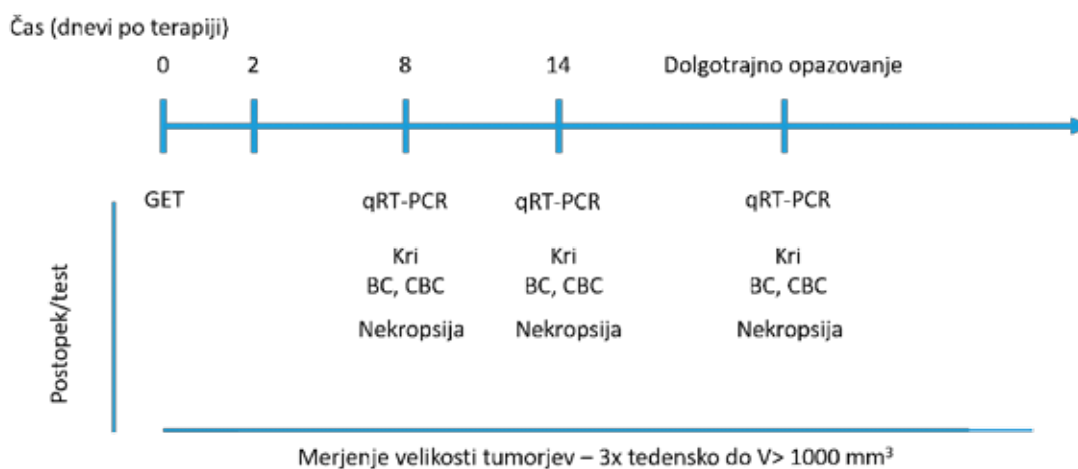
Kombinacija imunskih terapij z radioterapijo predstavlja velik izziv za raziskovalce, predvsem v iskanju pravih doz, vrstnega reda terapij in trajanja zdravljenja. Največ raziskav na področju radioterapije poteka z zaviralci imunskih kontrolnih točk. Poleg zaviralcev imunskih kontrolnih točk, pa se lahko uporabljajo tudi druge imunske molekule, kot so citokini. V naših raziskavah uporabljamo citokin interlevkin-12 (IL-12), ki ga vnesemo v celice v obliki zapisa na plazmidni DNA molekuli, kjer se potem prevede v terapevtski protein. Na osnovi dolgoletnih predkliničnih raziskav na različnih vrstah tumorjev, smo zastavili klinično preizkušanje faze I z genskim elektroprenosom plazmida z zapisom za IL-12. Za pridobitev dovoljenja za izvajanje kliničnega preizkušanja smo izvedli tudi ne-klinično testiranje zdravila. Namen faze I kliničnega preskušanja je preučiti varnost in sprejemljivost zdravila za gensko terapijo, plazmida pIL12, pri zdravljenju bazalnoceličnih karcinomov v predelu glave in vratu. Študija je zasnovana kot študija s povečevanjem odmerka z namenom ugotavljanja varnosti in sprejemljivosti zdravljenja. Poleg tega želimo ugotoviti kateri odmerek plazmida pIL12 je varen in hkrati izzove biološko aktivnost interlevkina 12 (IL-12). Rezultati te študije bodo osnova za nadaljnje klinične študije, kjer bi gensko terapijo kombinirali s standardnimi lokalnimi terapijami, kot je radioterapija.

## Genska imunoterapija z interleukinom 12

Terapije raka s spodbujanjem imunskega sistema se na najrazličnejše načine uporabljajo že vrsto let. V zadnjem času se intenzivno razvijajo terapije v obliki genske imunoterapije,

ki temelji na tem, da v organizem vnesemo gen za citokin, ki se potem v celicah izraža v nizkih količinah, ter dalj časa. To ne vodi v povišane serumske koncentracije in s tem povezano toksičnostjo in neželene učinke. Med najbolj raziskanimi citokini za zdravljenje raka je IL-12, ki nima direktnega citotoksičnega učinka na tumorske celice, ampak je ta učinek posredovan preko različnih mehanizmov. IL-12 sodeluje pri diferenciaciji naivnih celic T v celice Th1, poleg tega spodbuja rast in delovanje celic T. Spodbuja nastajanje in izločanje interferona gama (IFN- $\gamma$ ) in tumorskega nekroznega faktorja alfa (TNF- $\alpha$ ) iz celic T in naravnih celic ubijalk (NK). IL-12 ima tudi antiangiogeno delovanje, kar pomeni, da lahko blokira nastajanje novih krvnih žil. To stori preko posredovanja IFN- $\gamma$ , ki poveča proizvodnjo kemokina, imenovanega inducibilni protein-10 (IP-10 ali CXCL10).

Vnos genov v tarčne celice lahko izvedemo na več načinov, z virusnimi vektorji ali nevirusnimi vektorji, kamor spada tudi vnos plazmidne DNA z elektroporacijo – genski elektroprenos (GET). Genska imunoterapija z IL-12, ki je bila posredovana z GET, se je v mnogih predkliničnih študijah izkazala za uspešno na različnih tumorskih modelih. V neklinični študiji smo zaradi biološke neaktivnosti humanega IL-12 v miših uporabili plazmid z mišjim genom za IL-12 (plazmid pmIL12). Študijo smo izvedli na obeh spolih miši, kar je v skladu s najnovejšimi smernicami Evropske agencije za zdravila.



Slika 1. Potek poskusov na *in vivo* nivoju ne-kliničnega testiranja z izbranimi točkami testiranja. GET – genski elektroprenos, qRT-PCR – kvantitativni real time PCR, BC – biokemija, CBC – kompletna krvna slika, IgG/IgM – določevanje količine protiteles IgG in IgM v serumu.

V ne-klinični študijo smo v različnih časovnih točkah določevali biološko aktivnost, farmakodinamiko, farmakokinetiko, toksičnost in imunogenost plazmida pmIL12 (slika 1). Rezultati neklinične študije so pokazali, da v celicah nastaja biološko aktiven protein, ki ima protitumorsko učinkovitost, saj statistično značilno poveča tako zaostanek v rasti tumorjev kot preživetje miši in sicer pri vseh treh testiranih dozah. Dva dni po genskem elektroprenosu s pmIL12 v tumorje CT26, smo zaznali prisotnost pmIL12 v vseh analiziranih organih/tkivih, razen v očesu ter pljučih, štirinajst dni po genskem elektroprenosu pa je prisoten samo še v koži nad in okoli tumorja. Dokazali smo, da nastaja biološko aktiven protein mIL-12, ki poveča infiltracijo imunskih celic v tumor

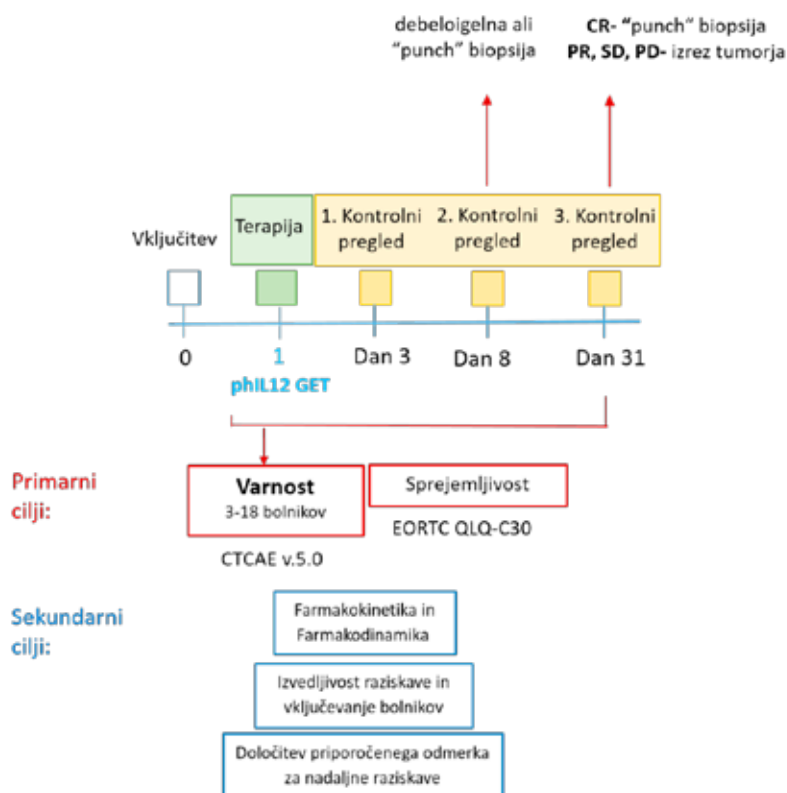
ter kožo nad in okoli tumorja in da na sistemskem nivoju ne povzroča nobenih zaznavnih toksičnih sprememb v primerjavi z naivnimi in kontrolnimi mišmi. Na osnovi teh rezultatov, smo pripravili dokumentacijo za prijavo klinične faze I pri bolnikih z bazalno celičnim karcinomom.

### Klinična študija faze I pri bazalno celičnem karcinomu

V fazi I klinične študije so vključeni bolniki z bazalno celičnim karcinomom, ki ima največje mutacijsko breme v primerjavi z drugimi kožnimi raki, in je zato primeren tip tumorja za testiranje imunskih terapij. Klinično študijo smo zasnovali kot nerandomizirano študijo faze 1 za testiranje varnosti in sprejemljivosti naraščajočega odmerka plazmidne DNA phIL12 pri zdravljenju operabilnih bazalno celičnih karcinomov v področju glave in vratu.

Primarna cilja študije sta oceniti varnost in sprejemljivost genske imuno terapije. Sekundarni cilji pa so določiti farmakokinetiko, farmakodinamiko, izvedljivost raziskave in predvsem določiti odmerek plazmida, ki vodi v produkcijo proteina IL-12, ki je biološko aktiven, povzroči infiltracijo imunskih celic v tumor in ni toksičen, kar bo osnova za nadaljnje klinične raziskave.

Študijo sta odobrili Komisija Medicinske etike Republike Slovenije (RS) (0120-524/2020-12) in Javna agencija za zdravila in medicinske pripomočke RS. Študijo smo registrirali v podatkovni bazi ISRCTN (ISRCTN15479959) in Clinical Trials (NCT05077033), kjer so navedeni tudi vsi vključitveni in izključitveni kriteriji. Shema zdravljenja in kontrolni pregledi so predstavljeni na sliki 1.



Slika 2: Shema poteka klinične raziskave.

V študiji bomo testirali 3 odmerke pHIL12 (0,5 mg/mL, 1 mg/mL and 2 mg/mL). Odmerke plazmidne DNA, protokol elektroporacije in število ponovitev terapije smo določili v ne-kliničnem delu študije, ki smo jo izvedli z mišjim ortologom pHIL12 (pmIL12). Zdravljenje bomo izvedli v splošni anesteziji ali sedaciji, odvisno od presoje anesteziologa. Plazmidna DNA bo injicirana intratumorsko in 5 minut za tem bomo na tumor dovedli električne pulze, ki se uporabljajo za elektrokemoterapijo, z generatorjem električnih pulzov Cliniporator. Po koncu terapije bo rana oskrbljena s standardnimi postopki. Ko se bodo bolniki prebudili iz anestezije, bo ocenjena toksičnost in morebitni neželeni učinki ter bolečina po zdravljenju (VAS lestvica). O času odpusta in potrebi po analgeziji se odloči glavni raziskovalec. Kontrolni pregledi so predvideni 3, 8, in 31 dan, kjer bomo bolnikom jemali brise iz mesta aplikacije plazmida, kri in bioptični vzorec za določitev farmakodinamike (koncentracija IL-12 in interferona  $\gamma$  v tumorju, število kopij plazmida v tumorju) in farmakokinetike (koncentracija IL-12 v serumu). Varnost terapije se bo ocenila po kriterijih CTCAEv5.0. Sprejemljivost terapije se bo spremljala z vprašalnikom o kakovosti življenja EORTC QLQ-C30. Če 31. dan po terapiji ne bo dosežen popolni odgovor tumorja, bo le-ta kirurško odstranjen. Odgovor tumorja se bo določal po RECISTv1.1 kriteriju.

Do sedaj smo v študijo vključili 4 bolnike; trije so bili zdravljeni z najnižjim odmerkom plazmida (0,5 mg/mL), eden pa s srednjim odmerkom 1 mg/mL). Pri vseh smo ugotovili, da je terapija varna, sprejemljiva, izvedljiva in da neželenih učinkov ni bilo. Pri vseh bolnikih je bila izvedena tudi kirurška odstranitev tumorja po 31. dnevu, ker sama genska imunska terapija z IL-12 pri uporabljenih odmerkih pHIL12 ni vodila v popolni odgovor tumorja.

### **Kombinacija z radioterapijo**

Genska imunska terapija z IL-12 v kombinaciji z radioterapijo, vključno z stereotaktičnim obsevanje je bila testirana v predkliničnih študijah na različnih tumorskih modelih, vključno z tumorji pankreasa. Dokazano je bilo, da dosežemo boljši protitumorski učinek kot z samo radioterapijo in da se razvije tudi imunski spomin. Kot vektorje za lokalni vnos IL-12 so bili uporabljene, mikrosfere za rekombinanten IL-12, ter adenovirusni vektorji, in tudi genski elektroprenos plazmidne DNA. Radioterapija se uporablja v kombinaciji z imunskimi terapijami kot in situ vakcinacija, ki povzroči sproščanje tumorskih antigenov, ki sprožijo z IL-12 povezan protitumorski imunski odziv. Kombinacija genskih imunskih terapij in radioterapije ima sposobnost, da močno okrepi sistemski imunski odziv in s tem širi uporabnost na napredovale bolezni. Izzivi, ki obstajajo za nadaljnje študije pa so predvsem v iskanju prave doze in frakcioniranega režima obsevanja, doze in načina aplikacije plazmidne DNA, optimalne sestave plazmidne DNA, parametrov genskega elektroprenosa, časovnega zaporedja terapij, ter seveda v iskanju prediktivnih biomarkerjev za selekcijo tumorjev/bolnikov, ki so primerni za tako zdravljenje.

### **Literatura**

1. Bhatia S, Longino NV, Miller NJ, Kulikauskas R, Iyer JG, Ibrani D, et al. Intratumoral delivery of plasmid IL12 via electroporation leads to regression of injected and noninjected tumors in Merkel cell carcinoma. Clin Cancer Res. 2020;26:598-607. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-0972

2. Cemazar M, Jarm T, Sersa G. Cancer Electrogene Therapy with Interleukin-12. *Curr Gene Ther.* 2010;10:300-11. doi: 10.2174/156652310791823425
3. Daud AI, DeConti RC, Andrews S, Urbas P, Riker AI, Sondak VK, et al. Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 2008;26:5896-903. doi: 10.1200/JCO.2007.15.6794
4. Kos S, Bosnjak M, Jesenko T, Markelc B, Kamensek U, Znidar K, et al. Non-clinical *in vitro* evaluation of antibiotic resistance gene-free plasmids encoding human or murine IL-12 intended for first-in-human clinical study. *Pharmaceutics.* 2021;13:1739. doi: 10.3390/PHARMACEUTICS13101739
5. Groselj A, Bosnjak M, Jesenko T, Cemazar M, Markelc B, Strojan P, Sersa G. Treatment of skin tumors with intratumoral interleukin 12 gene electrotransfer in the head and neck region: a first-in-human clinical trial protocol. *Radiol Oncol.* 2022; in press. doi:10.2478/raon-2022-0021
6. Čemažar M, Jesenko T, Bošnjak M, Markelc B, Kamenšek U, Kranjc Brezar S, et al. Genska terapija v onkologiji, prvi razvojni koraki v Sloveniji / Gene therapy in oncology, first steps of development in Slovenia. *Onkologija* 2022;16:12-21. doi:10.25670/oi2022-002on
7. Telli ML, Nagata H, Wapnir I, Acharya CR, Zablotsky K, Fox BA, et al. Intratumoral plasmid IL12 expands CD8 + T cells and induces a CXCR3 gene signature in triple-negative breast tumors that sensitizes patients to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res.* 2021;27:2481-93. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-3944
8. Yu CF, Chang CH, Wang CC, Hong JH, Chiang CS, Chen FH. Local interleukin-12 treatment enhances the efficacy of radiation therapy by overcoming radiation-induced immune suppression. *Int J Mol Sci.* 2021;22(18):10053. doi: 10.3390/ijms221810053.
9. Mills BN, Connolly KA, Ye J, Murphy JD, Uccello TP, Han BJ, et al. Stereotactic Body radiation and interleukin-12 combination therapy eradicates pancreatic tumors by repolarizing the immune microenvironment. *Cell Rep.* 2019;8;29(2):406-21.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.08.095.

