

FIZIKALNI MODELI IMUNOTERAPIJE IN RADIOTERAPIJE

Damijan Valentinuzzi¹, Martina Vrankar², Katja Uršič Valentinuzzi^{2,3}, Mojca Unk², Olga Gordeeva⁴, Alen Hadžić⁴, Gregor Serša^{2,5}, Maja Čemažar^{2,6}, Robert Jeraj^{1,7}

¹ *Fakulteta za matematiko in fiziko, Univerza v Ljubljani, Jadranska ulica 19, 1000 Ljubljana, Slovenija*

² *Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija*

³ *Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva ulica 101, 1000 Ljubljana, Slovenija*

⁴ *Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija*

⁵ *Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, Slovenija*

⁶ *Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola, Slovenija*

⁷ *Department of Medical Physics, University of Wisconsin-Madison, 1111 Highland Ave, Madison, WI 53705-2275, ZDA*

Elektronski naslov: damijan.valentinuzzi@fmf.uni-lj.si

Izvleček

V prispevku bomo predstavili rezultate fizikalnih modelov imunoterapije, ki smo jih razvili v programski skupini Medicinska fizika na Fakulteti za matematiko in fiziko Univerze v Ljubljani. Glavni cilj raziskav je bila prepoznavna bioloških značilnosti tumorjev, od katerih je odvisen odziv na zdravljenje s protitelesi receptorja programirane celične smrti 1 (angl. anti-programmed-death-1 (anti-PD-1)). Posebno pozornost smo namenili meritvam modelskih parametrov ter preverbi rezultatov modeliranja, kar je eden izmed predpogojev za uspešno translacijo modeliranja v rutinsko predklinično in klinično prakso. Predstavili bomo tudi načrte za prihodnost, tj. modeliranje kombinacije anti-PD-1 in radioterapije.

Uvod

Imunoterapija z zaviralci imunskih kontrolnih točk je v zadnjem desetletju spremenila način zdravljenja mnogih vrst raka (1). Kljub izjemnim rezultatom – možne so celo popolne ozdravitve nekaterih napredovalih vrst raka, kot sta npr. metastatski melanom in nedrobnocelični rak pljuč – ostaja odprtih še veliko vprašanj. Medtem ko je imunoterapija z anti-PD-1 pri nekaterih vrstah raka izjemno uspešna, so rezultati pri drugih vrstah še vedno slabi (2). Hkrati pa so tudi pri tistih vrstah raka, pri katerih imunoterapija velja za uspešno, bolniki, ki odgovorijo na zdravljenje, še vedno v manjšini. Posledično bi bilo bistvenega pomena odkriti najpomembnejše biološke značilnosti tumorjev, od katerih je odvisen odziv na imunoterapijo, definirati optimalna kombinirana zdravljenja in razviti nove generacije in načine imunoterapij. Vse skupaj pa bo težko uresničljivo z zanašanjem izključno na klinične študije, ki so navadno dizajnirane po principu “poskusov in napak” (angl. trial-and-error) in so večinoma drage ter zamudne. Število različnih imunoterapij (brez upoštevanja vseh možnih kombinacij in načinov doziranja) se je namreč v zadnjih letih izjemno povečalo (3).

Cilji naših raziskav so bili: (1) razviti mehanistični model po načelu od spodaj navzgor (ang. bottom-up) za simulacijo odziva tumorjev na imunoterapijo anti-PD-1, (2) preveriti model na podatkih iz literature, (3) preveriti model z lastnimi eksperimentalnimi podatki in (4) raziskovati, katere biološke značilnosti tumorjev bistveno vplivajo na odziv na imunoterapijo.

Mehanistični model imunoterapije anti-PD-1 po načelu od spodaj navzgor

Osnovni mehanistični model, ki smo ga najprej razvili, je prikazan z enačbami En.1 – En.4 (4).

$$\frac{dC}{dt} = k \cdot C \cdot \ln\left(\frac{C_{max}}{C + C_{dead}}\right) - a \cdot SNV \cdot MHCI \cdot \left(1 - PDL1 \cdot PD1 \cdot \left(1 - PD1_{occup}(D, t)\right)\right) \cdot TIL \cdot C \quad \text{En. 1}$$

$$\frac{dTIL}{dt} = b \cdot SNV \cdot (C + C_{dead})^{\frac{2}{3}} - a \cdot SNV \cdot MHCI \cdot PDL1 \cdot PD1 \cdot \left(1 - PD1_{occup}(D, t)\right) \cdot TIL \cdot C - d \cdot TIL \quad \text{En. 2}$$

$$\frac{dC_{dead}}{dt} = a \cdot SNV \cdot MHCI \cdot \left(1 - PDL1 \cdot PD1 \cdot \left(1 - PD1_{occup}(D, t)\right)\right) \cdot TIL \cdot C - l \cdot C_{dead} \quad \text{En. 3}$$

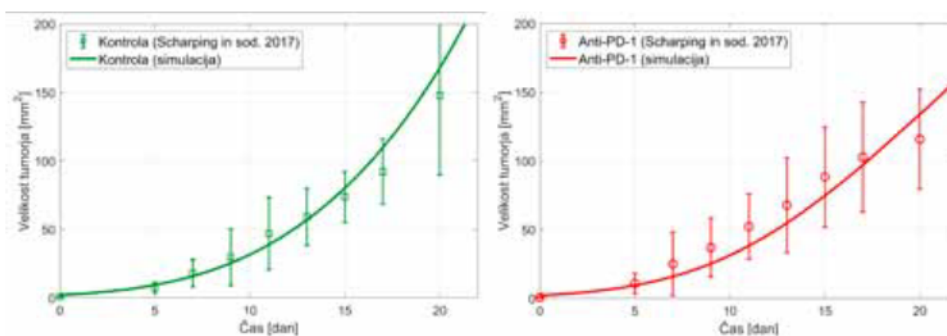
$$V(t) = \frac{4}{3} \pi r_c^3 \cdot (C(t) + C_{dead}(t)) + \frac{4}{3} \pi r_{TIL}^3 \cdot TIL(t) \quad \text{En. 4}$$

Biologija v modelu je poenostavljena. Model namenoma vsebuje le tiste spremenljivke in parametre, ki so bistveniza simulacijo imunoterapije anti-PD-1, saj smo želeli, da model omogoča eksperimentalno preverbo. Opisuje interakcije med dvema bistvenima tipoma celic: tumorskimi celicami (C) in tumor infiltrirajočimi limfociti T (TIL). Poleg tega vsebuje tudi tiste biološke parametre, za katere je znano, da so vpleteni v imunoterapijo anti-PD-1, kot npr. tumorsko mutacijsko breme, ki navadno dobro korelira s številom enojnih nukleotidnih variacij (angl. single nucleotide variations (SNV)), izraženost poglobitnega kompleksa tkivne skladnosti (angl. major histocompatibility complex (MHC)) razreda I na tumorskih celicah ter interakcije med receptorji PD-1 na limfocitih T in njihovimi ligandi na tumorskih celicah (PD-L1), s katerimi tumorske celice lahko omejijo imunski odziv. Večina parametrov v modelu je fiksnih in povzetih iz literature – le štirje parametri so prosti in pridobljeni s prilagajanjem modela eksperimentalnim podatkom iz literature. Zainteresirani bralec lahko njihove definicije, vrednosti in reference najde v (4).

Opis členov v modelskih enačbah:

- En. 1, prvi člen: Gompertzova funkcija – intrinzična rast tumorja v odsotnosti imunskega sistema.
- En. 1, drugi člen: odmiranje tumorskih celic zaradi interakcij z imunskim sistemom.
- En. 2, prvi člen: infiltracija TIL v tumor.
- En. 2, drugi člen: odmiranje TIL zaradi interakcij s tumorskimi celicami.
- En. 2, tretji člen: odmiranje TIL zaradi naravne smrti.
- En. 3, prvi člen: nastajanje mrtvih tumorskih celic (glej En. 1).
- En. 3, drugi člen: odstranjevanje mrtvih tumorskih celic iz tumorja.
- En. 4, prvi člen: celokupen volumen tumorskih celic.
- En. 4, drugi člen: celokupen volumen TIL.

Modelske napovedi smo ovrednotili na dveh neodvisnih predkliničnih študijah z melanomom B16, v katerih so avtorji uporabili drugačno število nasajenih celic, drugačno dozo ali urnik doziranja v primerjavi s študijo, na katero smo prilagajali proste parametre (5,6). Rezultati ujemanja modelskih napovedi z eksperimenti študije, ki so jo izvedli Scharping in sodelavci (6), so predstavljeni na Sliki 1.

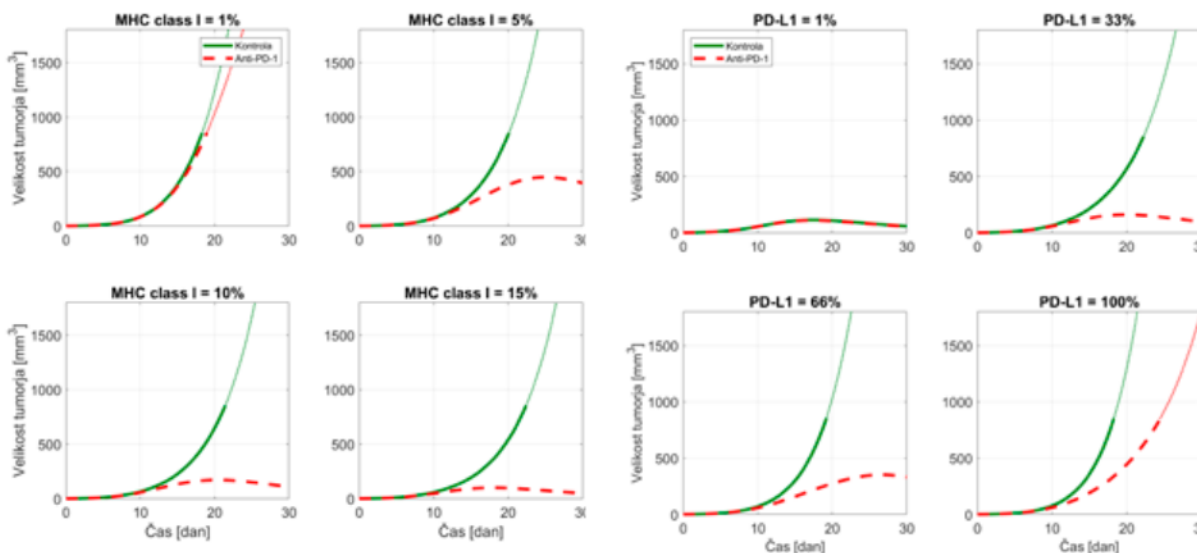


Slika 1. Primerjava modelskih napovedi z eksperimentalnimi podatki (6).

Vidimo lahko, da se simulacije zelo dobro ujemajo s predkliničnimi podatki, saj so povsod znotraj eksperimentalnih napak.

Da bi ugotovili, katere so najpomembnejše biološke značilnosti tumorjev, od katerih je odvisen odziv na imunoterapijo anti-PD-1, smo nato naredili več senzitivnostnih analiz, pri katerih smo po korakih spreminjali vrednosti ključnih bioloških parametrov in opazovali posledične spremembe v simuliranih rezultatih. Rezultati senzitivnostnih analiz so pokazali predvsem dvoje:

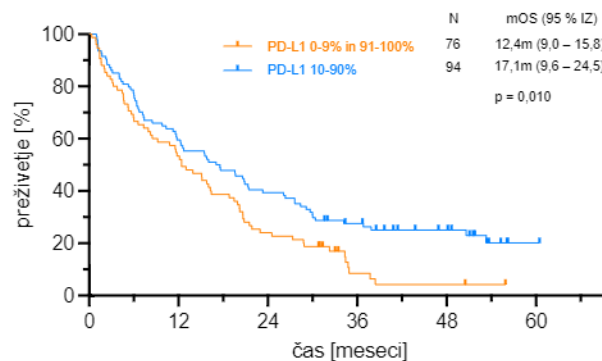
- 1.) Izraženost MHC razreda I na tumorskih celicah se je izkazal kot edini parameter, čigar vrednost nedvoumno definira odziv na zdravljenje (Slika 2, levo).
- 2.) Ob pogoju dovolj velike izraženosti MHC razreda I je model napovedal najboljši odziv na imunoterapijo anti-PD-1 pri tumorjih z zmerno izraženostjo PD-L1 (Slika 2, desno).



Slika 2. Levo: Senzitivnostna analiza izraženosti MHC razreda I, desno: Senzitivnostna analiza PD-L1.

Drugo napoved modela smo preverili tudi na kliničnih podatkih. V retrospektivni študiji smo analizirali podatke 209 bolnikov z razsejanim nedrobnoceličnim rakom pljuč, ki so bili zdravljeni z imunoterapijo anti-PD-1 na Onkološkem inštitutu Ljubljana

v obdobju od 2014 – 2019. Med demografskimi podatki, ki smo jih analizirali, sta bila tudi izraženost PD-L1 na tumorskih celicah ter celokupno preživetje bolnikov. Analiza preživetja s Kaplan-Meier-jevim diagramom (Slika 3) je pokazala, da so imeli bolniki z zmerno izraženostjo PD-L1 (10 % – 90 %) daljše srednje celokupno preživetje kot bolniki s skrajnimi vrednostmi (<10 % ali > 90 %) (17,1 mesec (95 % IZ 9,6 – 24,5) proti 12,4 meseca (95 % IZ 9,0 – 15,8), $p = 0,010$). Znanstveni članek je v pripravi in bo objavljen v kratkem.



Slika 3. Vpliv izraženosti PD-L1 na preživetje bolnikov, zdravljenih z imunoterapijo anti-PD-1.

Razširjeni mehanistični model imunoterapije anti-PD-1 po načelu od spodaj navzgor, podprt z lastnimi eksperimenti

Ker smo hoteli fizikalni model še bolj podpreti in preveriti z lastnimi eksperimenti, smo v sodelovanju z Oddelkom za eksperimentalno onkologijo na Onkološkem inštitutu Ljubljana naredili serijo predkliničnih eksperimentov. Na podlagi predhodnih rezultatov, ki so kazali na pomembno vlogo izraženosti MHC razreda I in PD-L1 na tumorskih celicah, smo se odločili za meritev njune izraženosti s pretočno citometrijo. S tem smo želeli pridobiti oceno o heterogenosti populacije tumorskih celic pred nasaditvijo na miši. Posledično smo razširili prvotni model, da se je bolje skladal s tako pridobljenimi vhodnimi podatki. Razširjeni model je prikazan z En. 5–En. 11.

$$\frac{dC_1}{dt} = k \cdot C_1 \cdot \ln\left(\frac{C_{max}}{\sum_{i=1}^4 C_i}\right) - a \cdot SNV \cdot \left(1 - PD1 \cdot \left(1 - PD1_{occup}(D, t)\right)\right) \cdot TIL \cdot C_1 \quad \text{En. 5}$$

$$\frac{dC_2}{dt} = k \cdot C_2 \cdot \ln\left(\frac{C_{max}}{\sum_{i=1}^4 C_i}\right) - a \cdot SNV \cdot TIL \cdot C_2 \quad \text{En. 6}$$

$$\frac{dC_3}{dt} = k \cdot C_3 \cdot \ln\left(\frac{C_{max}}{\sum_{i=1}^4 C_i}\right) \quad \text{En. 7}$$

$$\frac{dC_4}{dt} = k \cdot C_4 \cdot \ln\left(\frac{C_{max}}{\sum_{i=1}^4 C_i}\right) \quad \text{En. 8}$$

$$\frac{dTIL}{dt} = b \cdot SNV \cdot \left(\sum_{i=1}^4 C_i + C_{dead}\right)^{\frac{2}{3}} - a \cdot SNV \cdot PD1 \cdot \left(1 - PD1_{occup}(D, t)\right) \cdot TIL \cdot (C_1 + C_2) - d \cdot TIL \quad \text{En. 9}$$

$$\frac{dC_{dead}}{dt} = a \cdot SNV \cdot \left(1 - PD1 \cdot \left(1 - PD1_{occup}(D, t)\right)\right) \cdot TIL \cdot C_1 + a \cdot SNV \cdot TIL \cdot C_2 - l \cdot C_{dead} \quad \text{En. 10}$$

$$V(t) = \frac{4}{3}\pi r_c^3 \cdot \left(\sum_{i=1}^4 C_i(t) + C_{dead}(t)\right) + \frac{4}{3}\pi r_{TIL}^3 \cdot TIL(t) \quad \text{En. 11}$$

Zainteresirani bralec lahko definicije, vrednosti in reference modelskih spremenljivk in parametrov najde v (7).

Bistvena razlika v primerjavi z osnovnim modelom so štiri različne podskupine tumorskih celic glede na izražanje MHC razreda I (MHC-I) in PD-L1, in sicer:

- C1 (En. 5): tumorske celice, ki so MHC-I⁺PD-L1⁺
- C2 (En. 6): tumorske celice, ki so MHC-I⁺PD-L1⁻
- C3 (En. 7): tumorske celice, ki so MHC-I⁻PD-L1⁺
- C4 (En. 8): tumorske celice, ki so MHC-I⁻PD-L1⁻

Meritve izraženosti smo izvedli na dveh predkliničnih celičnih linijah, in sicer:

- Mamarni karcinom 4T1 (iz literature poznan kot neodziven na imunoterapijo anti-PD-1)
- Kolorektalni karcinom CT26 (iz literature poznan kot odziven na imunoterapijo anti-PD-1).

Rezultate meritev s pretočno citometrijo, s katerimi smo ocenili začetne pogoje spremenljivk C1-4, prikazuje Tabela 1. Zanimivo je, da smo tumorske celice brez izražanja MHC razreda I (C3, C4), za katere predpostavljamo, da so odporne na zdravljenje z imunoterapijo, ker ne predstavljajo antigenov, zaznali le ob eni meritvi pri CT26, medtem ko so bile pri liniji 4T1 bolj pogoste.

V nadaljevanju smo na mišjih modelih naredili tri serije eksperimentov, s katerimi smo razklopili posamezne biološke procese, ki jih opisuje fizikalni model:

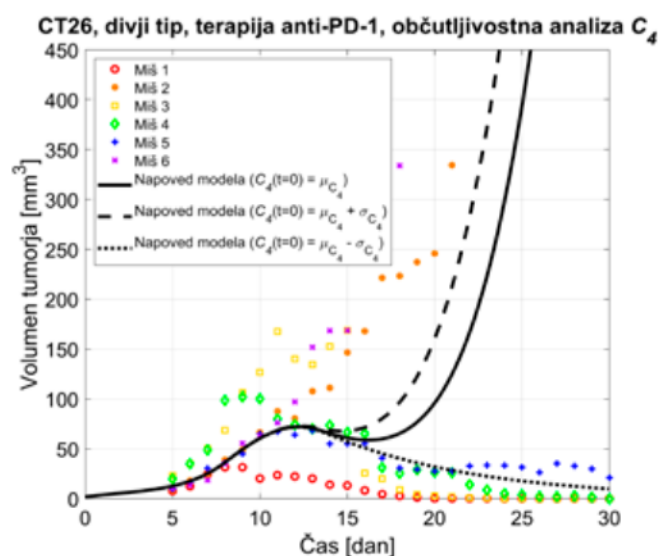
- 1.) Tumorske celice obeh celičnih linij smo nasadili na gole miši brez priželjca, torej brez limfocitov T. Na tak način smo lahko ocenili parametre intrinzične rasti tumorja k in C_{max} .
- 2.) Tumorske celice smo nasadili na miši divjega tipa s funkcionalnim imunskim sistemom. Ob fiksiranih k in C_{max} (iz točke 1) smo lahko določili še modelska parametra a (stopnja interakcije med tumorskimi celicami in TIL) in b (stopnja infiltriranja TIL v tumor).
- 3.) Tumorske celice smo nasadili na miši divjega tipa, ki smo jih zdravili z imunoterapijo anti-PD-1. Podatke, ki smo jih tako pridobili, smo uporabili za ovrednotenje napovedi modela.

Podobno kot pri osnovnem modelu, smo tudi tokrat naredili serijo senzitivnostnih analiz, da bi ovrednotili, kateri modelski parameter igra največjo vlogo pri odzivu tumorjev na imunoterapijo antiPD-1. Tokrat smo izmerjene povprečne vrednosti modelskih parametrov spreminjali za \pm izmerjeno standardno deviacijo (SD).

Tabela 1: Rezultati meritev izraženosti MHC razreda I in PD-L1 s pretočno citometrijo.

4T1				
Meritev	MHC-I ⁺ PD-L1 ⁺ [%]	MHC-I ⁺ PD-L1 ⁻ [%]	MHC-I ⁻ PD-L1 ⁺ [%]	MHC-I ⁻ PD-L1 ⁻ [%]
1	11,5	86,9	0,4	1,2
2	3,4	96,5	0,1	0,0
3	6,6	93,4	0,0	0,0
4	22,9	77,1	0,0	0,0
5	8,5	90,9	0,3	0,3
povprečje ± standardna deviacija (SD)	10,6 ± 7,5	89,0 ± 7,5	0,2 ± 0,2	0,3 ± 0,5
CT26				
Meritev	MHC-I ⁺ PD-L1 ⁺ [%]	MHC-I ⁺ PD-L1 ⁻ [%]	MHC-I ⁻ PD-L1 ⁺ [%]	MHC-I ⁻ PD-L1 ⁻ [%]
1	29,3	70,5	0,0	0,2
2	15,4	84,6	0,0	0,0
3	5,6	94,4	0,0	0,0
4	9,7	90,3	0,0	0,0
5	26,7	73,3	0,0	0,0
povprečje ± standardna deviacija (SD)	17,3 ± 10,4	82,6 ± 10,4	0,0 ± 0,0	0,04 ± 0,09

Modelske simulacije so dobro napovedale neodzivnost celične linije 4T1 (rezultati niso prikazani). Modulacija modelskih parametrov za \pm SD pa ni prinesla bistvenih sprememb rezultatov – celična linija 4T1 je, tako kot v realnosti, ostala neodzivna na zdravljenje z imunoterapijo anti-PD-1. Rezultate za kolorektalni karcinom CT26 pa prikazuje Slika 4.



Slika 4. Eksperimentalni podatki tumorjev celične linije CT26, ki so bili zdravljeni z imunoterapijo anti-PD-1 ter senzitivnostna analiza parametra C_4 .

Že pogled na eksperimentalne podatke je zelo zanimiv. V treh primerih je tumor po zdravljenju popolnoma izginil, v enem primeru smo dosegli dolgotrajen nadzor nad boleznijo, v dveh primerih pa se tumorja na zdravljenje nista odzvala. Modelske simulacije so po drugi strani napovedale zastoj v rasti tumorja s kasnejšo ponovno rastjo, kar se eksperimentalno ni pokazalo.

Najbolj zanimiva pa je bila senzitivnostna analiza parametra C4 (tumorske celice MHC-I PD-L1). Pokazala je, da je mogoče popoln odziv na zdravljenje doseči le v primeru homogenih tumorjev, pri katerih popolnoma vse tumorske celice izražajo MHC razreda I. Z zmanjšanjem C4 za eno standardno deviacijo v simulacijah ob nasaditvi tumorjev namreč ni bilo več celic brez izražanja MHC razreda I. Glede na eksperimentalne rezultate pretočne citometrije v Tabeli 1, se pri CT26 tak scenarij najverjetneje pogosto zgodi. Po drugi strani pa simulacije tudi pokažejo, da že majhen delež MHC-I celic povzroči, da take celice tekom zdravljenja prevladajo, kar vodi v neuspeh zdravljenja z anti-PD-1. Ti rezultati še dodatno potrjujejo in nadgrajujejo ugotovitve osnovnega modela, in sicer o pomembni vlogi izraženosti MHC razreda I na tumorskih celicah pri odzivu na imunoterapijo anti-PD-1, kar bi bilo zanimivo preveriti tudi v klinični praksi.

Načrt za prihodnost: Mehanistični model imunoterapije anti-PD-1 v kombinaciji z radioterapijo

V zadnjih letih je postalo jasno, da radioterapija pri zdravljenju raka ni koristna samo zaradi že dolgo znanega direktnega citotoksičnega efekta, ampak ima tudi imunogeni učinek. Študije kažejo, da radioterapija (med drugim) v tumorju povzroča imunogeno celično smrt (8), poveča tumorsko mutacijsko breme in poveča izražanje MHC razreda I (9). Vsi navedeni efekti pozitivno vplivajo na stimulacijo imunskega sistema, zato se poglobljeno raziskujejo kombinacije imunoterapije in radioterapije v upanju, da bi s tem povečali delež bolnikov, ki bi odgovorili na zdravljenje. Ker pa je večina zgoraj navedenih učinkov radioterapije dozno in časovno odvisnih, verjetno ni potrebno posebej poudarjati, da se pri takšni kombinirani terapiji pojavi še veliko več prostostnih stopenj in odprtih vprašanj kot pri imunoterapiji kot monoterapiji. Pomoč podobnih fizikalnih modelov, kot smo jih predstavili v prispevku, bi v takih primerih zagotovo prišla še bolj do izraza. Njihov razvoj je prav gotovo eden izmed ciljev naše skupine v bližnji prihodnosti.

Literatura

1. Wolchok J. Putting the immunologic brakes on cancer. *Cell*. 2018 Nov 29;175(6):1452–1454.
2. Kabacaoglu D, Ciecieski KJ, Ruess DA, Algül H. Immune Checkpoint Inhibition for pancreatic ductal adenocarcinoma: current limitations and future options. *Front Immunol*. 2018;9:1878.
3. Tang J, Shalabi A, Hubbard-Lucey VM. Comprehensive analysis of the clinical immunooncology landscape. *Ann Oncol*. 2018;29(1):84–91.
4. Valentinuzzi D, Simončič U, Uršič K, et al. Predicting tumour response to anti-PD-1 immunotherapy with computational modelling. *Phys Med Biol*. 2019 ;64(2):025017.
5. Sanchez-Paulete AR, Cueto FJ, Martinez-Lopez M, et al. Cancer immunotherapy with

immunomodulatory Anti-CD137 and Anti-PD-1 monoclonal antibodies requires BATF3-dependent dendritic cells. *Cancer Discov.* 2016;6(1):71–79.

6. Scharping NE, Menk A V, Whetstone RD, et al. Efficacy of PD-1 blockade is potentiated by metformin-induced reduction of tumor hypoxia. *Cancer Immunol Res.* 2017;5(1):9–16.
7. Valentinuzzi D, Uršič K, Maruna M, et al. Computational modeling and experimental investigations to enhance the successful response of anti-PD-1 cancer immunotherapies. *Phys Cancer, Res Adv.* 2020;145–64.
8. Golden EB, Frances D, Pellicciotta I, et al. Radiation fosters dose-dependent and chemotherapy-induced immunogenic cell death. *Oncoimmunology.* 2014;3(4).
9. Reits EA, Hodge JW, Herberts CA, et al. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J Exp Med.* 2006;203(5):1259–71.

