Molekularne podstawy radiobiologii,

efekt abskopalny,

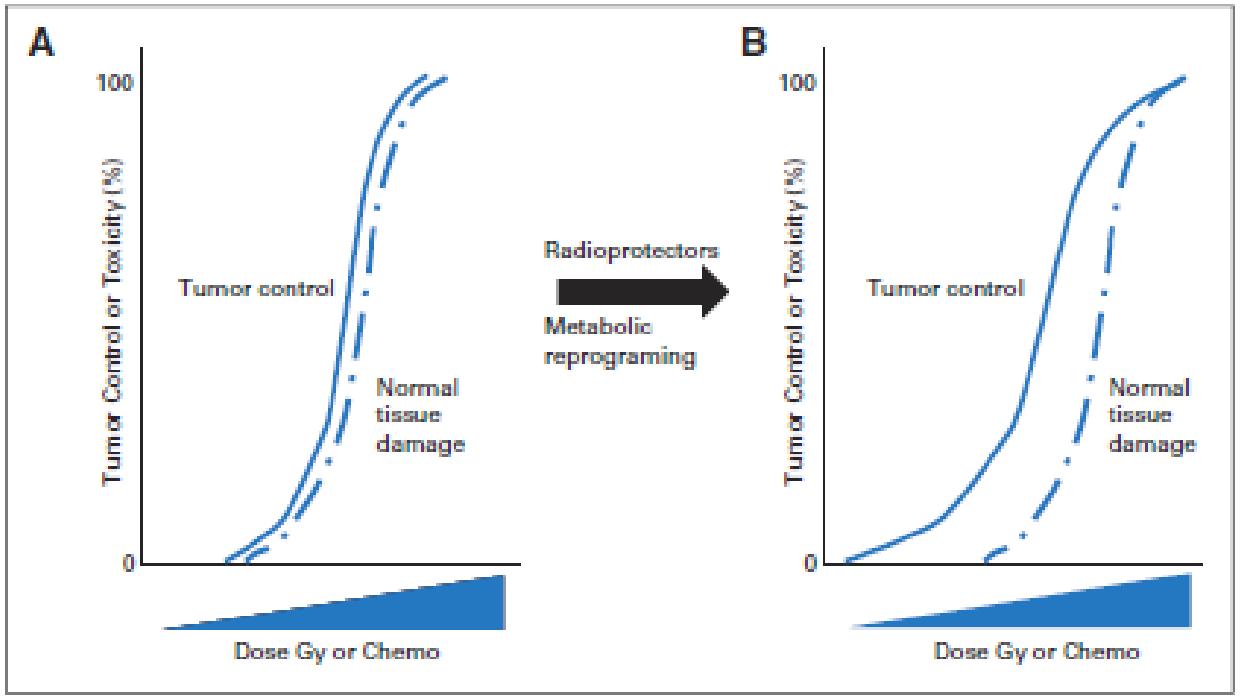
interakcja radioterapii i immunoterapii

Ewa Sierko

Klinika Onkologii
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Zakład Radioterapii
Białostockie Centrum Onkologii

Indeks terapeutyczny

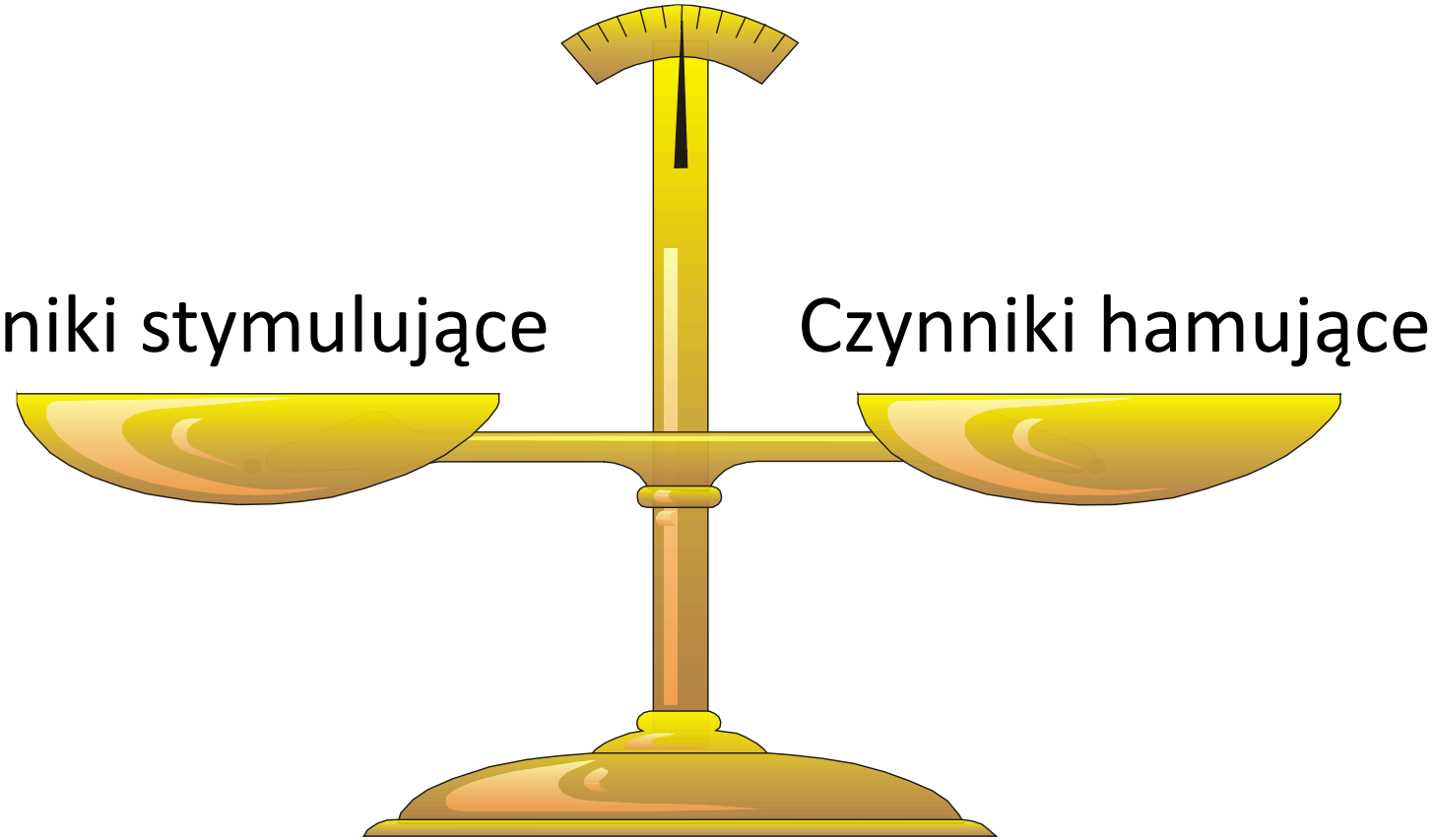


J Clin Oncol 32:2871-2878.

5R

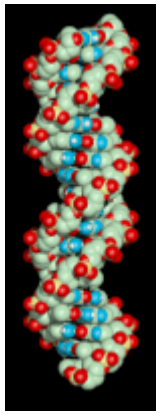
- Reoksygenacja
- Repopulacja
- Naprawa uszkodzeń popromiennych
- Redystrybucja w cyklu komórkowym
- Radiowrażliwość komórek

Homeostaza ustroju

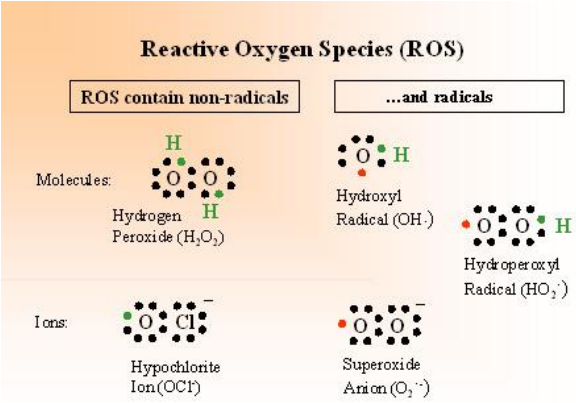


Radioterapia

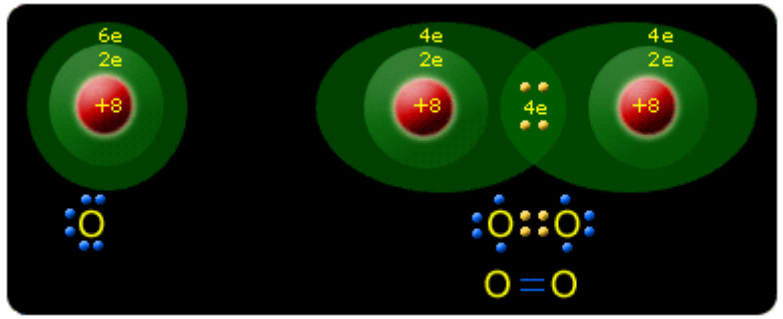
Śmierć komórki po zastosowaniu RT jest wynikiem uszkodzenia DNA lub pobudzenia innych, niezależnych od DNA mechanizmów, prowadzących do apoptozy i/lub martwicy komórek



rodniki



Tlen



Tlen jest uznanym czynnikiem promieniouczulającym

Połączenie tlenu z rodnikami powstałymi wskutek napromieniania nasila uszkodzenia DNA

W badaniach eksperymentalnych –
KN napromieniane w warunkach niedotlenienia są 3-krotnie mniej wrażliwe na RT

W warunkach klinicznych:

Rak szyjki macicy

Raki okolicy głowy i szyi

Mięsaki

Cel promieniowania

promieniowrażliwość KN klonogennych jest najważniejszym czynnikiem determinującym odpowiedź guza na RT

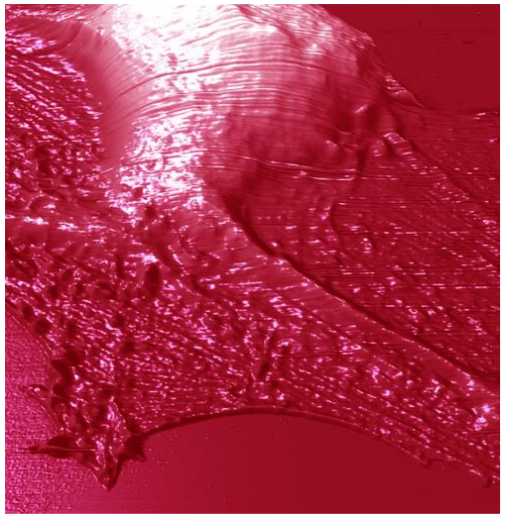
- Puck i wsp, J Exp Med. 1956; 103: 653
- Rofstad E i wsp, IJROBP 1986; 12: 975
- Stuschke M i wsp, IJROBP 1992; 29: 57
- Gerweck LE i wsp, IJROBP 1994; 29: 57
- Suit HD & Willers H, Science 2003; 302: 1894c
- Brown i wsp, , Science 2003; 302: 1894d
- Gerweck LE i wsp, Cancer Res 2006; 66: 8352
- Ogawa k i wsp, Cancer Res 2007; 67: 4016

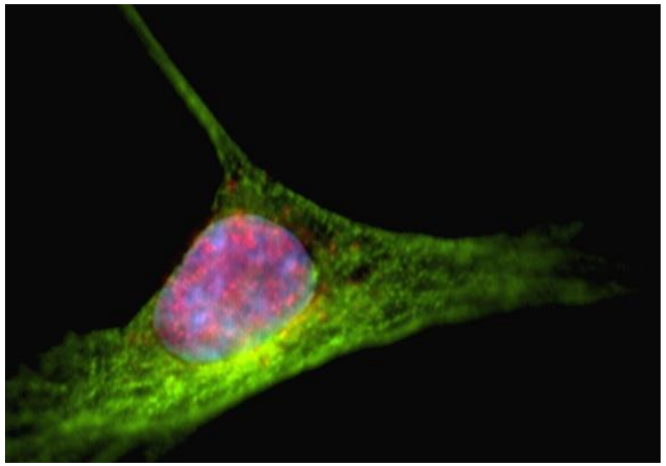
Czynniki zewnętrzne modyfikujące odpowiedź guza na RT

- Mikrośrodowisko nowotworu
- Odpowiedź immunologiczna ustroju

ECs w obrębie nowotworów

dzielą się 40-krotnie częściej niż w tkankach prawidłowych





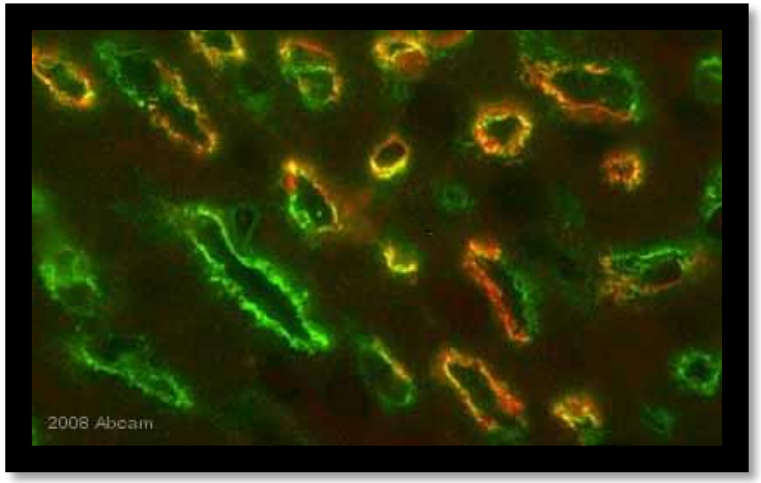
ECs w obrębie nowotworów

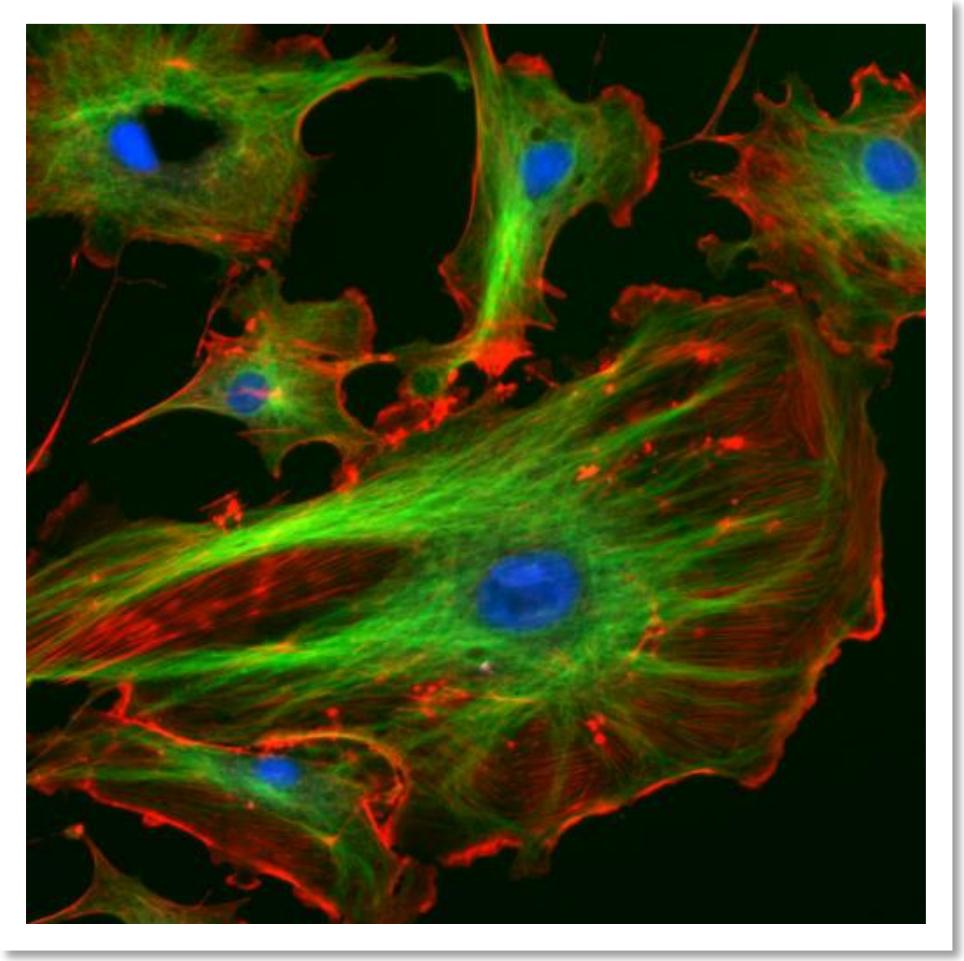
Obecność:

cząsteczek adhezyjnych

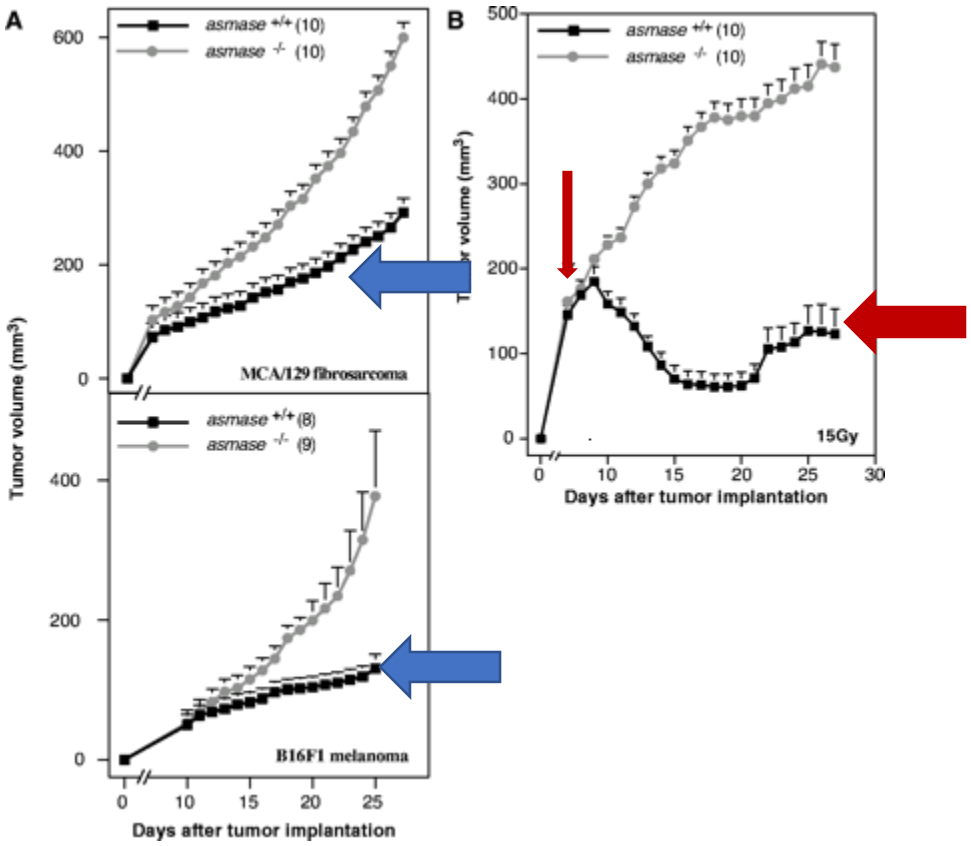
receptorów czynników wzrostu

co sprzyja ich proliferacji, adhezji i migracji





Cel promieniowania



Krzywe wzrostu

Uszkodzenie ECs wpływa na odpowiedź nowotworu na RT
Zwiększenie promieniowrażliwości ECs - zwiększa stopień regresji guza po RT

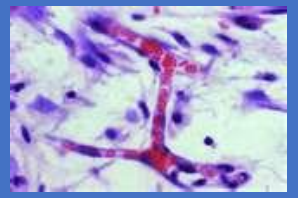
Garcia-Barros M i wsp, Science 2003; 300: 1155

Wpływ RT na ECs

Opóźnienie odrostu guza (TGD)

a nie trwała kontrola nowotworu (LC)

Suit HD & Willers H, Science 2003; 302: 1894c
Brown i wsp, , Science 2003; 302: 1894d
Gerweck LE i wsp, Cancer Res 2006; 66: 8352
Ogawa k i wsp, Cancer Res 2007; 67: 4016



Unaczynienie nowotworu

Warunki środowiska w nowotworze, np.

Utlenowanie KN

Ciśnienie parcjalne

pH przestrzeni zewnątrzkomórkowej

Skuteczność

RT

CT

IT

...

Radioterapia

RT zmienia aktywność wielu czynników transkrypcyjnych, chemokin, cytokin i czynników wzrostu

Wpływ na odpowiedź tkanek na RT, w tym obrzęk, włóknienie, zapalenie, apoptozę

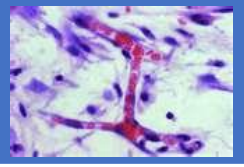
Zmiany w aktywności w/w czynników, które zmieniają wrażliwość komórek podścieliska, mogą wpływać na opóźnienie odrostu guza po RT

Radioterapia

RT

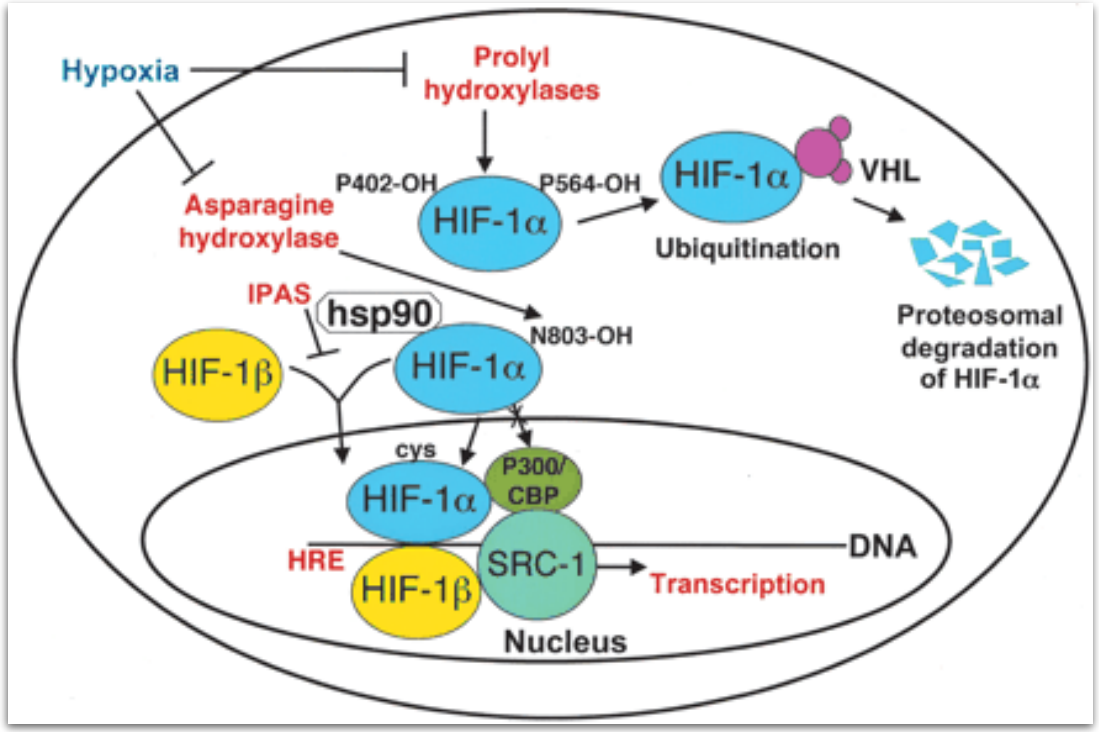
KN uwalniają cytokiny, m.in. HIF-1α *(hipoxia inducible factor* -1α)

HIF-1 hamuje apoptozę ECs



RADIOOPORNOŚCI

Moeller BJ i wsp, Cancer Cell 2005; 8: 99

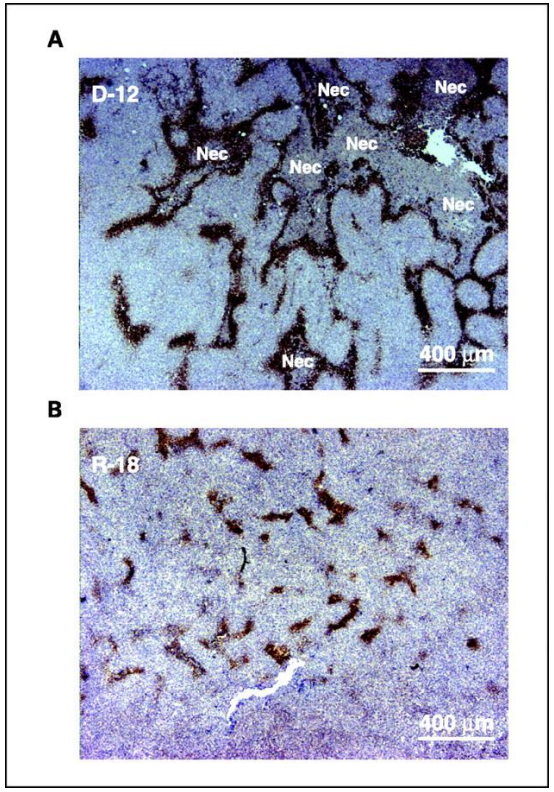


VEGF

- Pobudzenie angiogenezy
- Czynnik przetrwania dla Ecs

Glikoliza

Przerzutowanie



KN przewlekle niedotlenione

(niedostateczna dyfuzja tlenu)

KN w stanie ostrego lub przejściowego niedotlenienia

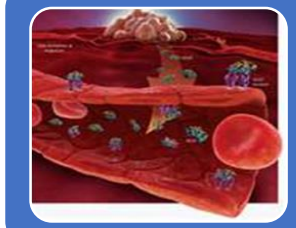
(zmienne warunki w przepływie krwi)

20% kn

GUZ

Rofstad EK i wsp. Clin Cancer Res 2007;13:1971

Angiogeneza



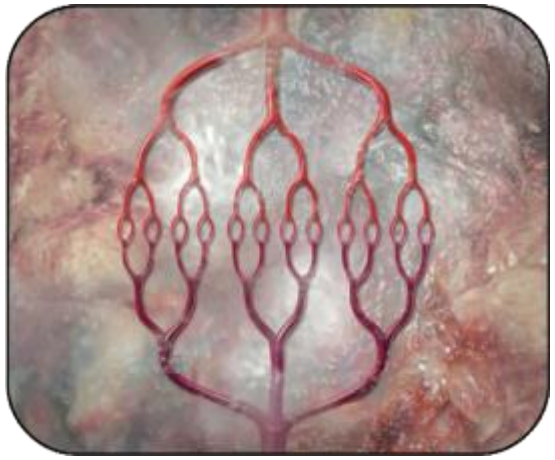
Tlen i składniki odżywcze nie mogą przedostawać się z naczyń do KN, które położone są dalej niż 2-3mm od ściany naczynia krwionośnego

Wzrost nowotworu > 2-3 mm3 uzależniony jest od sieci nowych naczyń krwionośnych z naczyń gospodarz

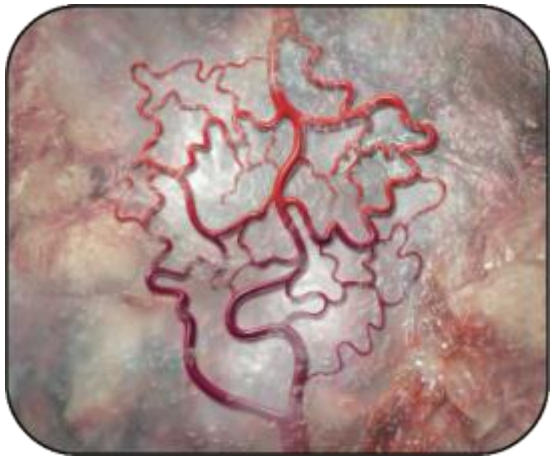
Sieć nieregularna, budowa ścian – nieprawidłowa
zwiększona przepuszczalność ścian
przepływ krwi chaotyczny i turbulentny

Dezorganizacja sieci naczyń może mieć miejsce po zastosowaniu SBRT (wysoki dawki –efekt waskulotoksyczny
Naczynia – budowa szeregowa – nawet niewielkie uszkodzenie – może wpływać na zaburzenia ukrwienia dużych objętości tkanek

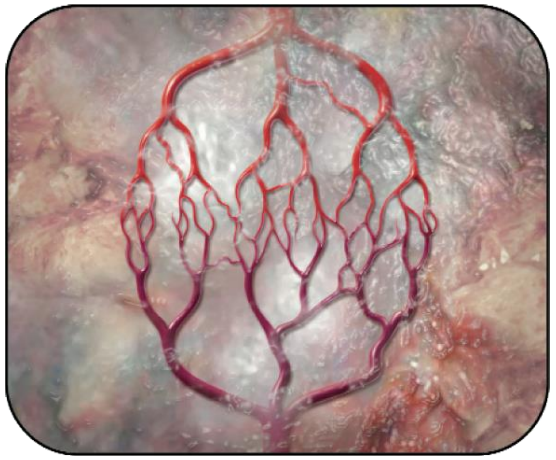
Terapia anty-VEGF NORMALIZUJE unaczynienie guza



Prawidłowe unaczynienie



Nieprawidłowe unaczynienie



‘Normalizacja’ unaczynienia guza

Winkler F i wsp, Cancer Cell 2004; 6: 553

„*Normalization window*"

Okres czasu, podczas którego skojarzenie terapii anty VEGFR-2 i RT daje najlepsze wyniki leczenia

Winkler F i wsp, Cancer Cell 2004; 6: 553

Drobiazgi składają się na doskonałość,
ale doskonałość nie jest drobiazgiem

Leonardo da Vinci

Rozbieżność sposobów napromieniania w badaniach eksperymentalnych

- Jedna dawka vs frakcjonowana RT
- Różne dawki pojedyncze
- Różne dawki frakcyjne i całkowite
- Różna ilość frakcji
- Różny odstęp czasu pomiędzy frakcjami
- Różny całkowity czas RT

BRAK, jak dotąd, WYDŁUŻENIA OS (RT + anty-angio) – np. AVAGLIO

Toksyczność leczenia – RT + anty-angio u chorych na raka odbytnicy

Interferowanie z niedotlenieniem guza….

- Tirapazamina – aktywowana w warunkach hipoksji (badanie negatywne w H&NC)

Inne koncepcje:

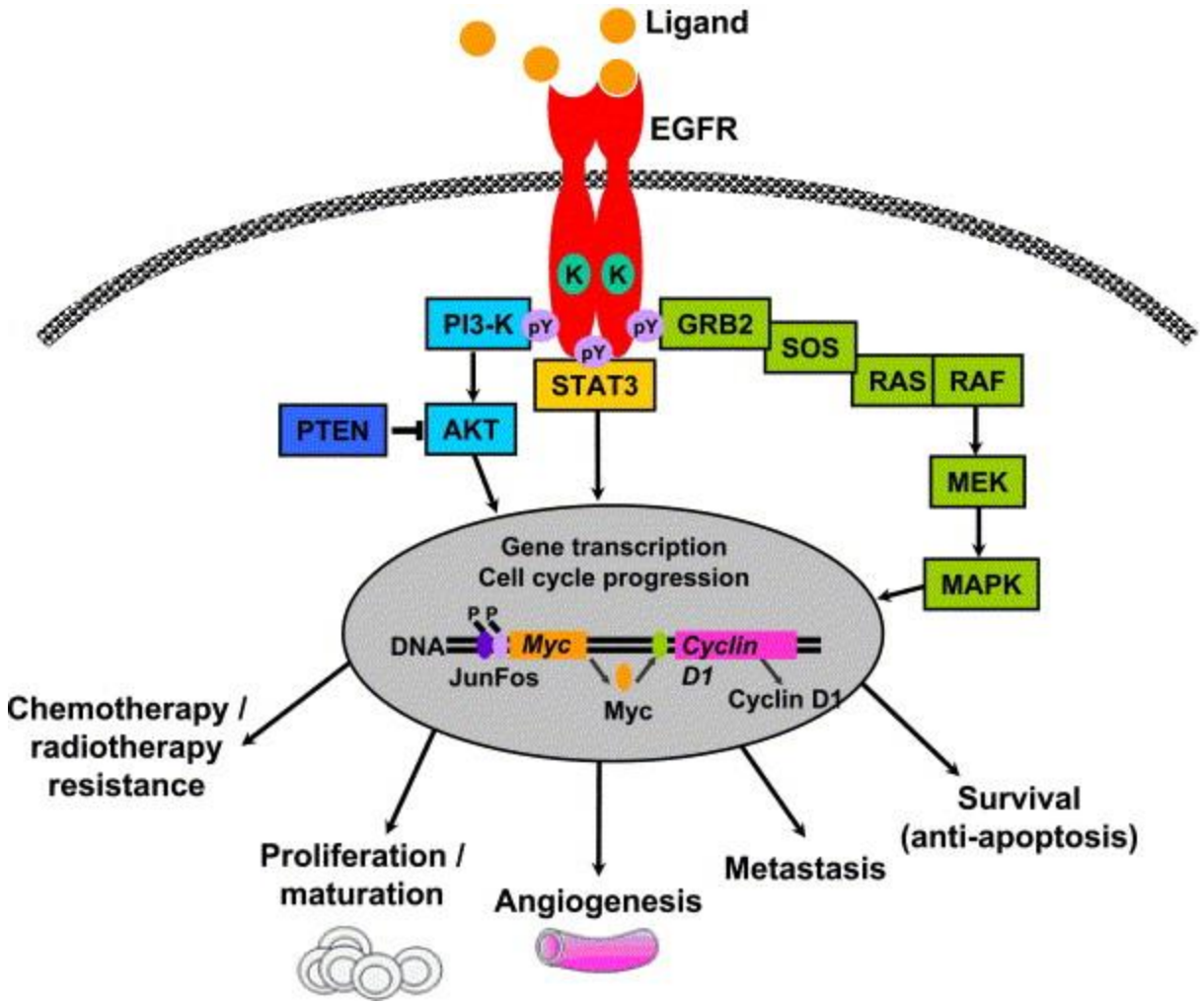
- Interferowanie z sygnałowymi szlakami wewnątrzkomórkowymi zależnymi od hipoksji
- Reprogramowanie funkcji mitochondriów celem obniżeni konsumpcji tlenu przez kn

  wysokie dawki glukozy

  metformina

  2-deoksyglukoza

SZLAK PRZEKAŹNICTWA EGFR

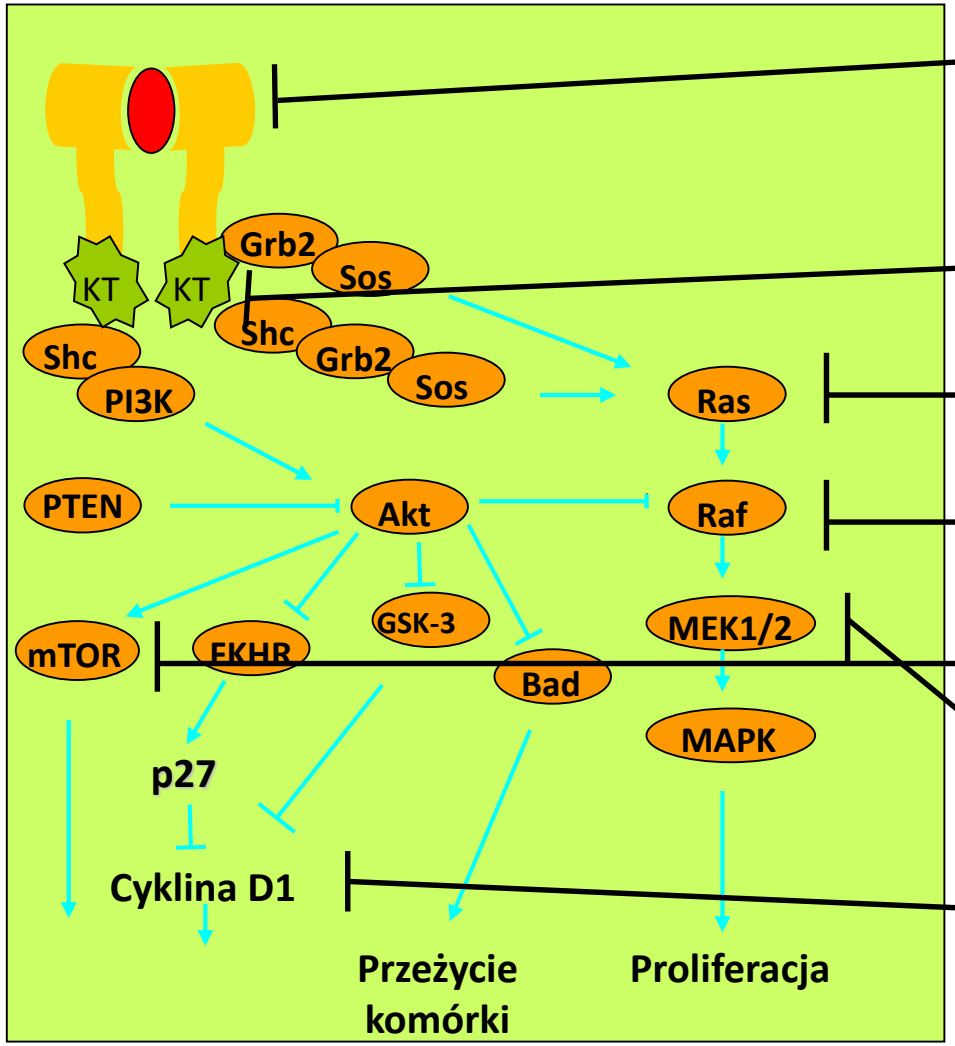


Bonner study

	Radiotherapy alone (%) (n = 213)	Radiotherapy + cetuximab (%) (n = 211)	p
Anti-tumour efficacy			
3-year loco-regional control	34	47	<0.01
3-year progression-free survival	31	42	0.04
3-year overall survival	45	55	0.05
Adverse effects (grades 3–5)			
Mucositis	52	56	0.44
Dysphagia	30	26	0.45
Radiation dermatitis	18	23	0.27
Acneiform rash	1	17	<0.001

Data from Bonner *et al.* (2006).

Terapia celowana ukierunkowana na EGFR



P/ciała Anty-EGFR
(Cetuksymab, panitumumab, EMD 72000, h-R3, MDX-447)

TKIs Anty-HER1, HER2, HER4
(Gefitynibu, Erlotynibu ZD1839, OSI-774, EKB-569, PKI-166 GW-572016, CI-1033)

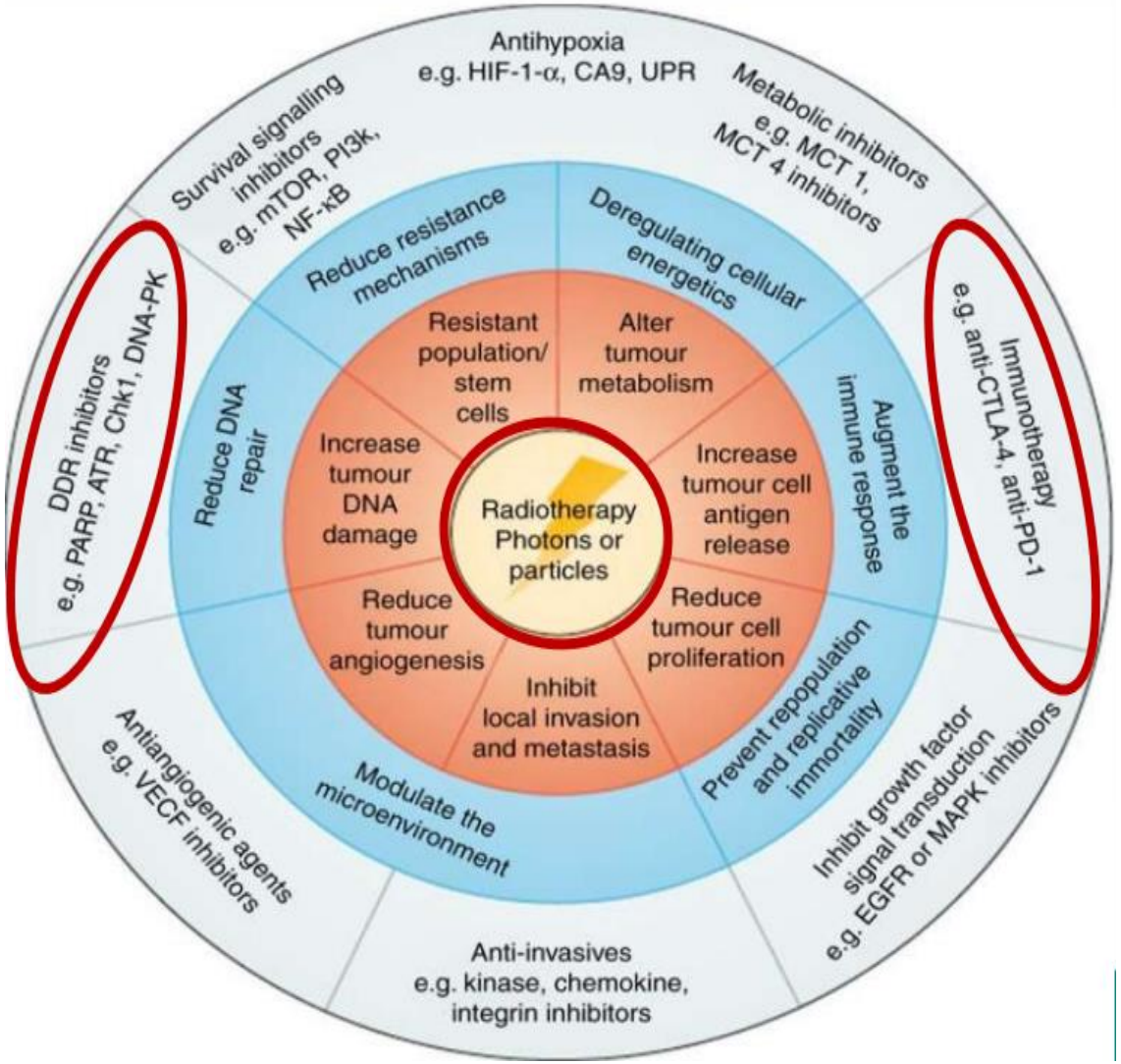
Inhibitory transferazy farnezylowej
(BMS214662, R115777, SCH66336)

Inhibitory RAF
(BAY 43-9006, L-779450)

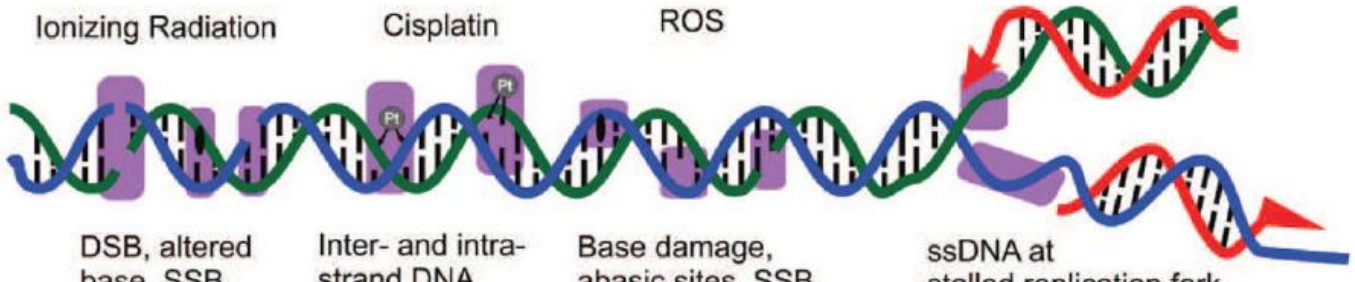
Inhibitory mTOR
(temsirolimus, everolimus)

Inhibitory MEK
(CI-1040, U-0126)

Inhibitory cykliny
(E7070, Flavopiridol, HMR 1275)


Antihypoxia
e.g. HIF-1-α, CA9, UPR
Metabolic inhibitors
e.g. MCT 1,
MCT 4 inhibitors
Survival signalling
inhibitors
e.g. mTOR, PI3k,
NF-κB
DDR inhibitors
e.g. PARP, ATR, Chk1, DNA-PK
Immunotherapy
e.g. anti-CTLA-4, anti-PD-1
Antiangiogenic agents
e.g. VECF inhibitors
Anti-invasives
e.g. kinase, chemokine,
integrin inhibitors
Inhibit growth factor
signal transduction
e.g. EGFR or MAPK inhibitors
Reduce resistance
mechanisms
Deregulating cellular
energetics
Reduce DNA
repair
Augment the
immune response
Modulate the
microenvironment
Prevent repopulation
and replicative
immortality
Resistant
population/
stem
cells
Alter
tumour
metabolism
Increase
tumour
DNA
damage
Increase
tumour cell
antigen
release
Reduce
tumour
angiogenesis
Reduce
tumour cell
proliferation
Inhibit
local invasion
and metastasis
Radiotherapy
Photons or
particles

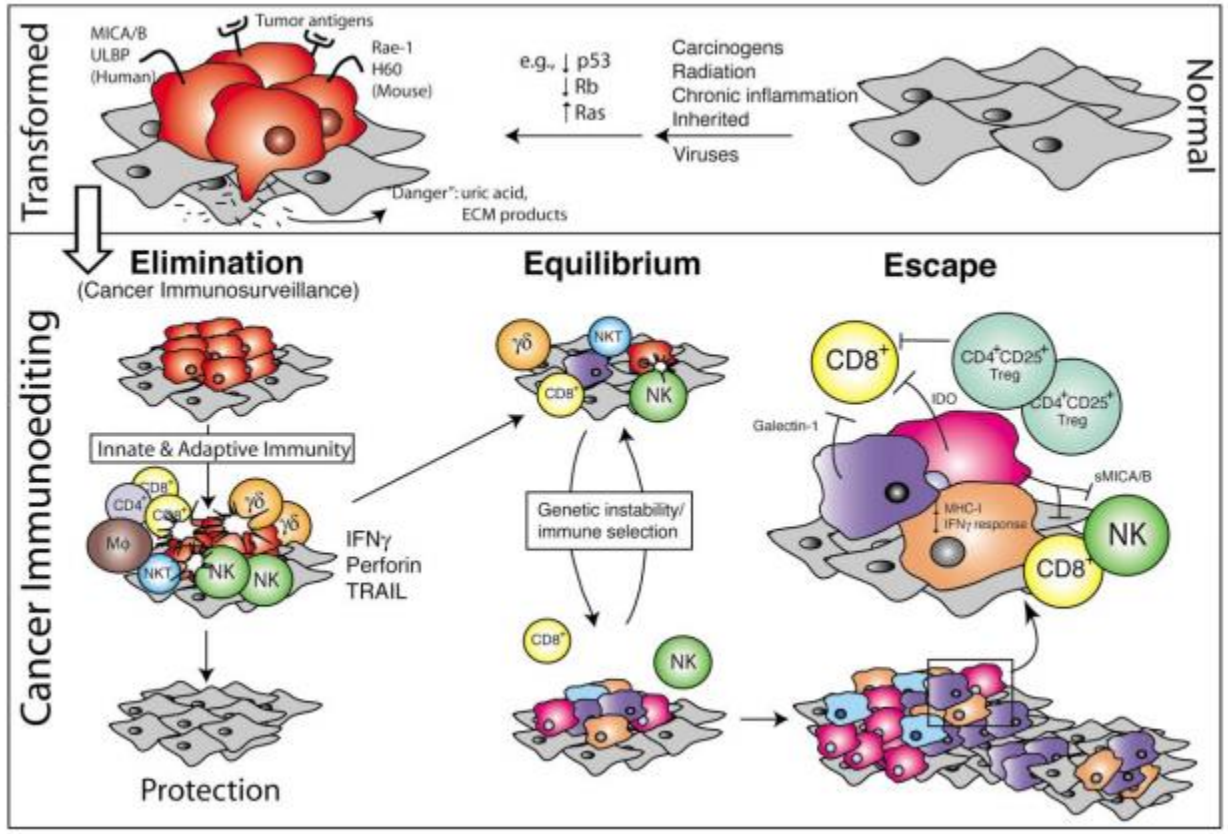
Naprawa uszkodzeń DNA



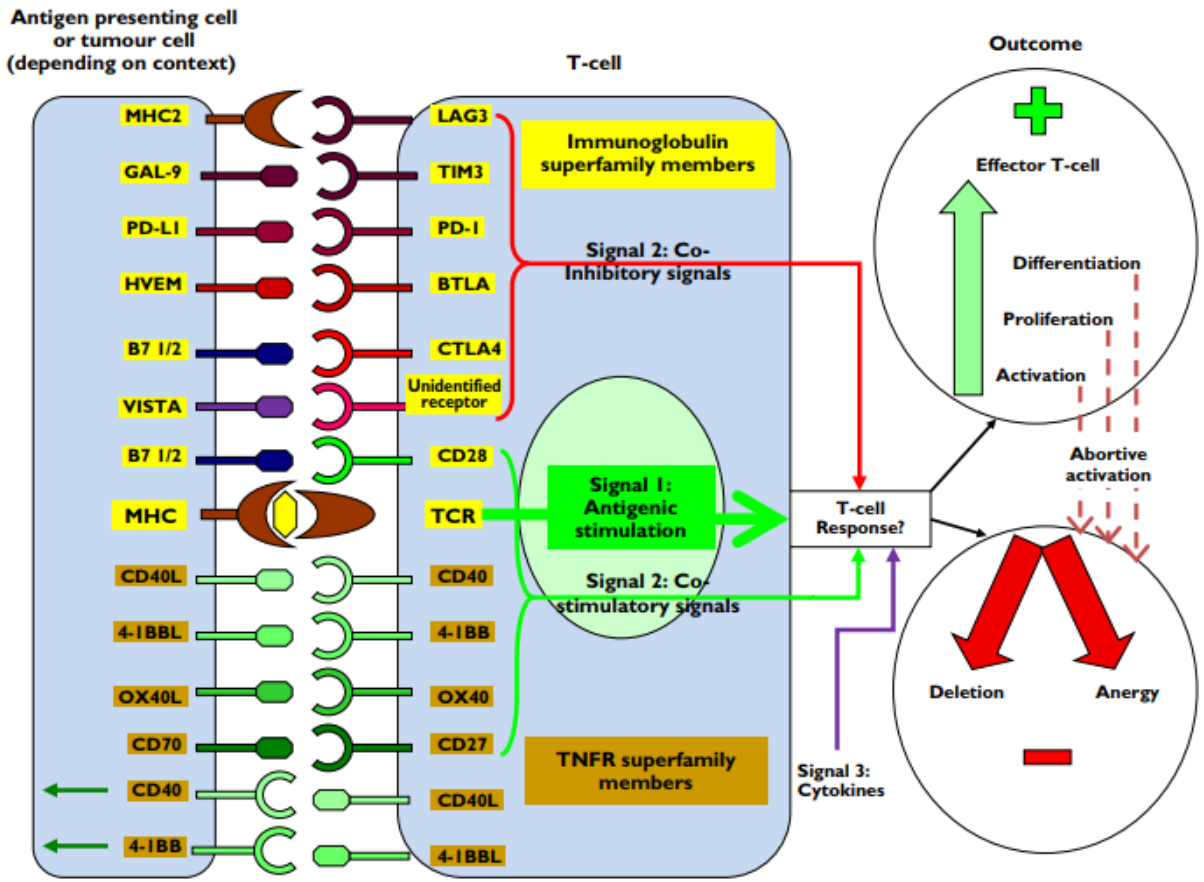
Insult	Ionizing Radiation	Cisplatin	ROS	
Damage	DSB, altered base, SSB	Inter- and intra-strand DNA crosslinks	Base damage, abasic sites, SSB	ssDNA at stalled replication fork
Pathways	NHEJ HDR BER PARP DDR	FA HDR NER DDR	BER PARP	HDR FA DDR
Targets	DNA-PK DNA-ligase IV Rad51 MRE11 ATM Chk1 PARP1	XPA RPA ATR Chk2	APE1 DNA pol β PARP1	Rad51 RPA ATR Chk2

Pharmacol Ther. 2016 April ; 160: 65–83. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.02.003.

3E Teoria redagowania immunologicznego nowotworu *Immunoediting*

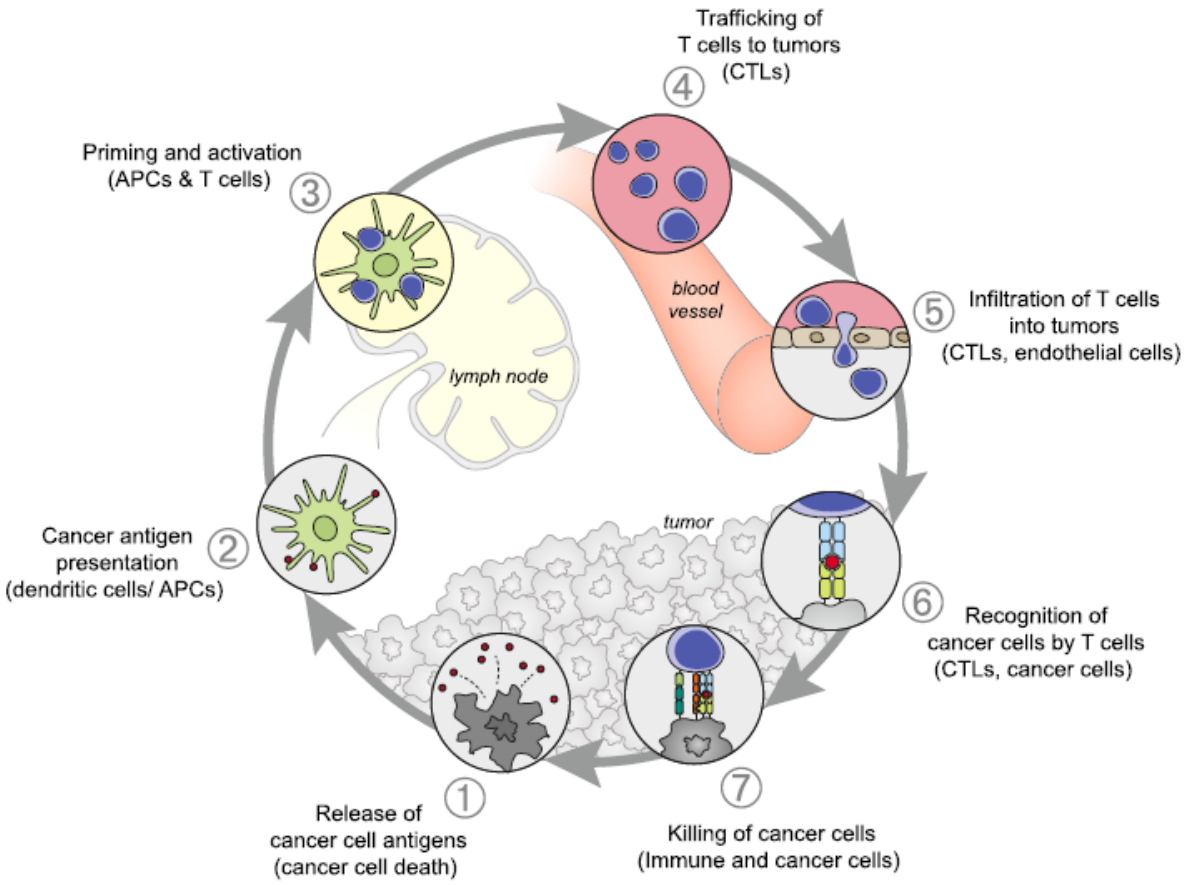


Synapsa immunologiczna



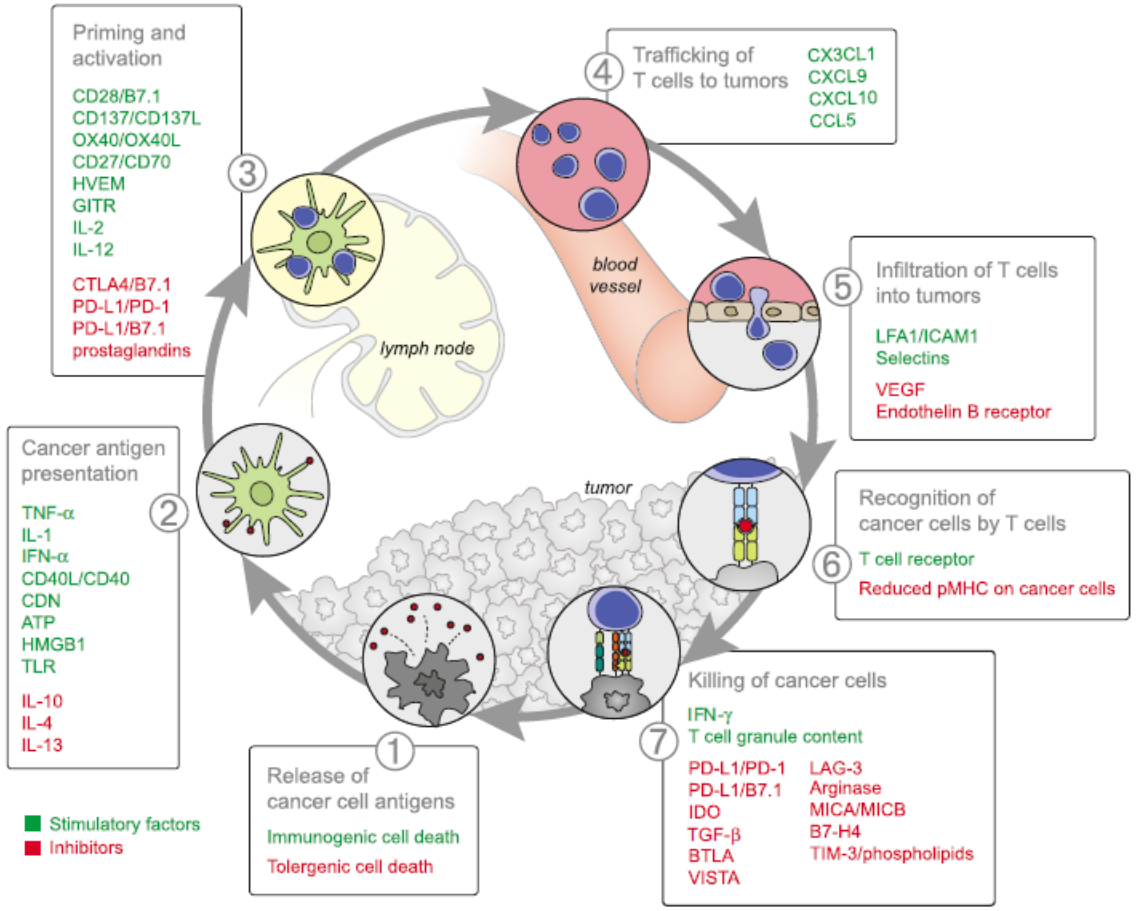
Br J Clin Pharmacol / 76:2 / 233–247 / 233

Cykl: nowotwór-immunogenność



Immunity *39*, July 25, 2013 ©

Cykl: nowotwór-immunogenność



Immunity 39, July 25, 2013 ©

Faza ucieczki nowotworu spod nadzoru układu immunologicznego

- Zmienność kn
  - Nieefektywność prezentacji Ag przez kn (białko z proteasomu nie przedostaje się do ER)
  - Dysfunkcja proteasomu
  - Mutacja beta2-mikroglogluliny, będącej fragmentem MHC klasy I
  - Dysfunkcja łańcuchów ciężkich MHC klasy I
  - Utrata klasycznych cząsteczek MHC klasy I
  - Złuszczanie nieklasycznych cząsteczek MHC klasy I
  - Obecność PD-L1 na powierzchni kn
- Immunosupresyjne działanie TME
  - Komórki podścieliska (fibroblasty, kom. naczyń krwionośnych, kom. naciekające)
  - Pozakomórkowe składniki (białka podporowe, białka macierzy, rozpuszczalne czynniki-mediatory)
- Komórki promujące fazę ucieczki
  - MDSC – mieloidalne kom. supresorowe
  - Makrofagi M2
  - Limfocyty T reg
  - fibroblasty
- Supresyjne czynniki rozpuszczalne w TME
  - Adenozyna akumulująca się pozakomórkowo wskutek niedotlenienie-hamuje limf. T
  - TGF beta
  - VEGF- hamuje prezentację Ag na k.d, promuje akumulację w guzie MDSC i limf. T reg
  - inne

RT

- Śmierć kn po RT podczas podziałów komórkowych- wskutek uszkodzenia DNA – apoptoza, uśpienie, autofagia – główny mechanizm działania RT

- Śmierć limfocytów w interfazie

- RT – działanie immunosupresyjne
  - Duże pola RT – śmierć limfocytów
  - Limfopenia po RT – rak piersi, płuca, HNC
  - TBI – przed przeszczepem szpiku

EFEKT ABSKOPALNY

Odpowiedź systemowa guzów nienapromienianych po miejscowej RT innego obszaru

Whole Body Irradiation—Radiobiology or Medicine?

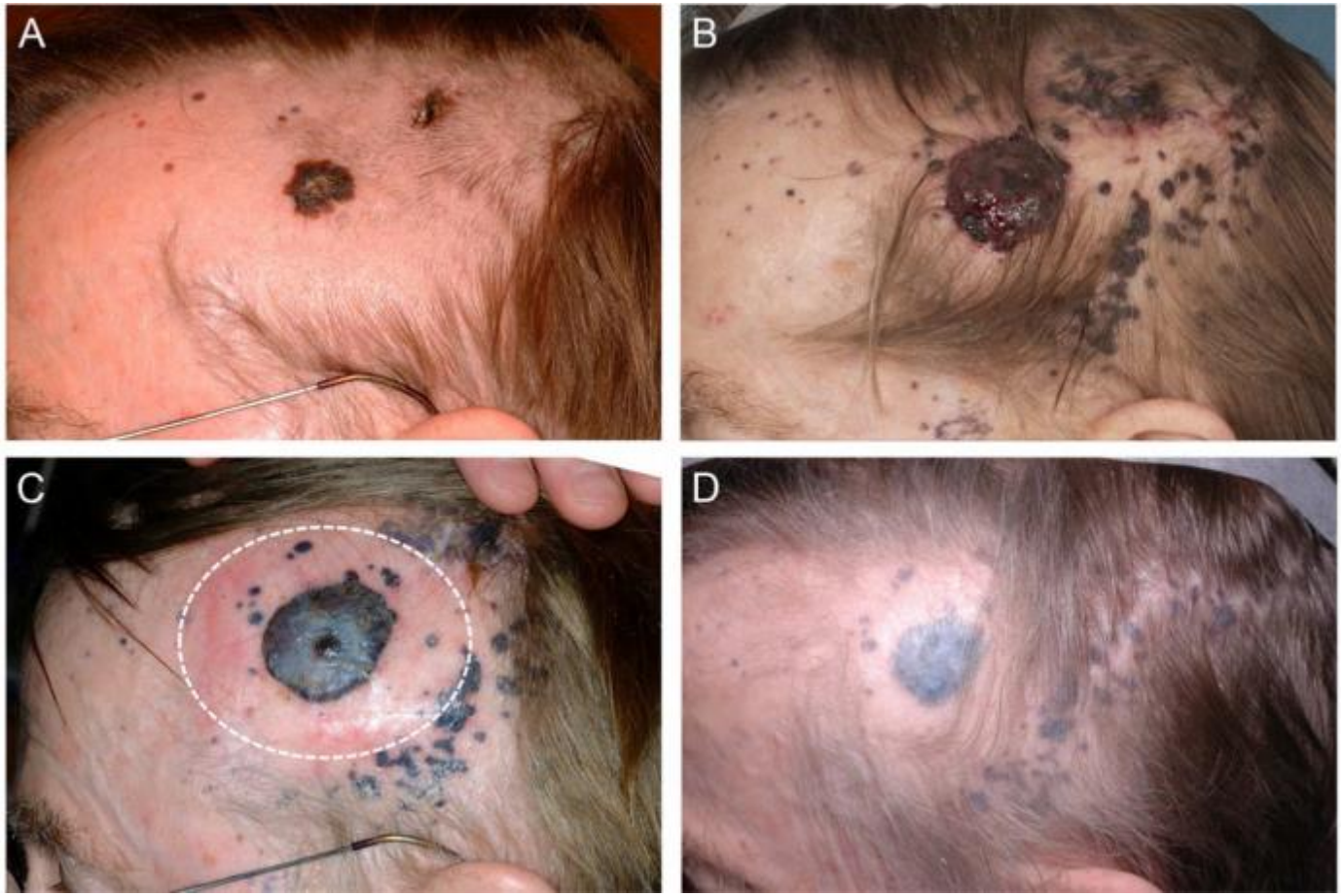
R. H. Mole, M.A., B.M., B.Ch., M.R.C.P.

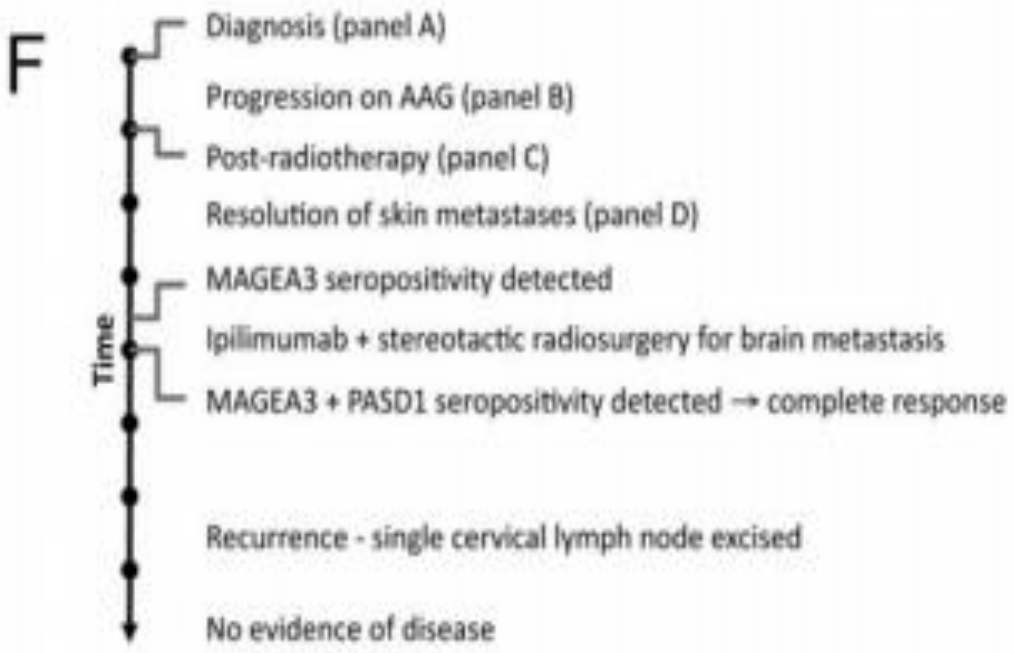
1953 r.

from 'ab scopus', that is, away from the target

Br J Radiol. 1953 May;26(305):234-41.

EFEKT ABSKOPALNY - czerniak

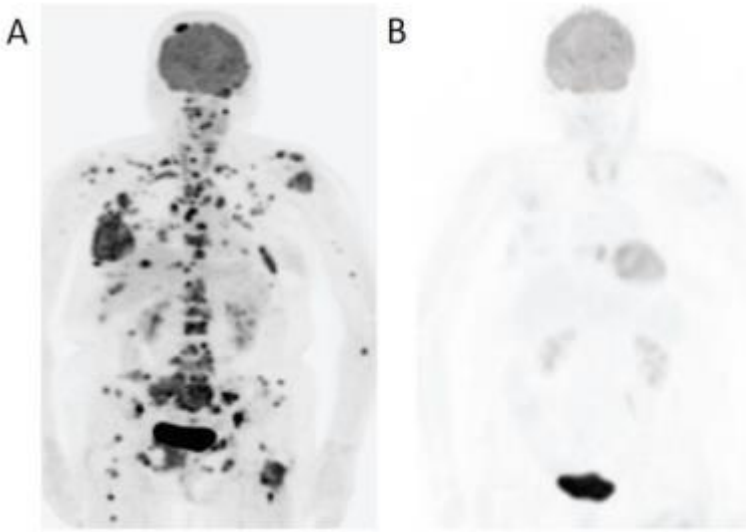




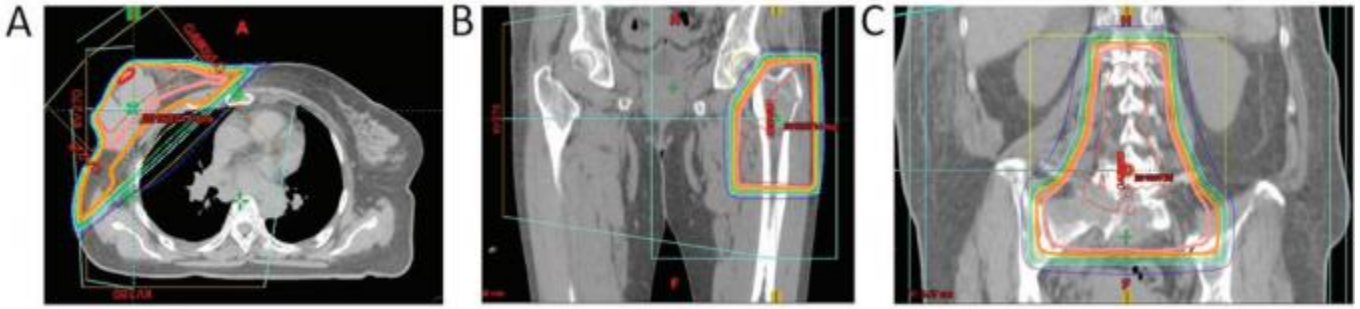
Po 8 m-cach

Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2013 February 1; 85(2): 293–295.

EFEKT ABSKOPALNY – rak piersi



Po 10 m-cach



60Gy/2Gy 28GY/2Gy 40GY/2Gy

MOLECULAR AND CLINICAL ONCOLOGY 9: 283-286, 2018

EFEKT ABSKOPALNY- HCC, przerzuty do śródpiersia i płuca prawego

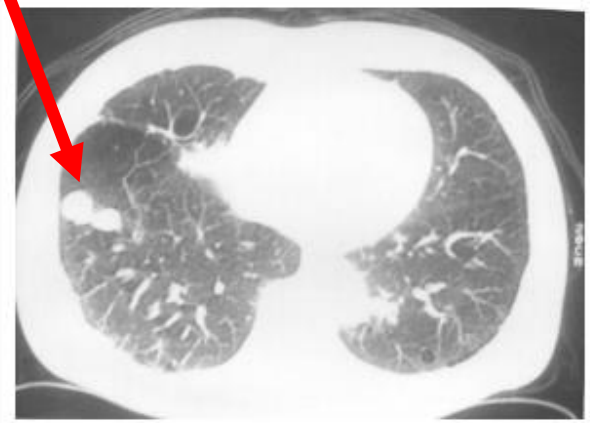


Figure 2 Two lung metastases.

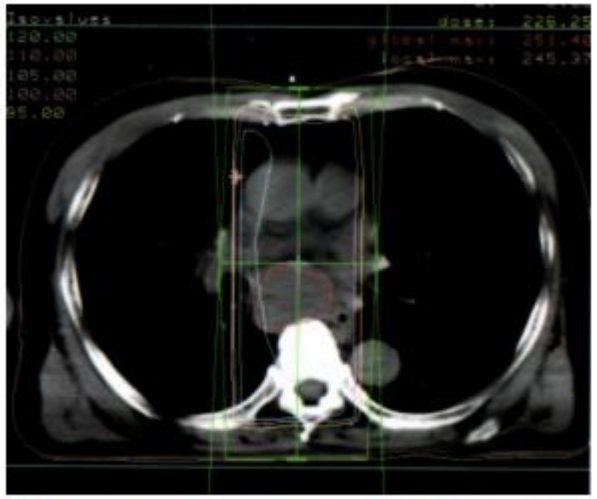


Figure 3 Chest CT image showing radiation dose distribution: axial view.

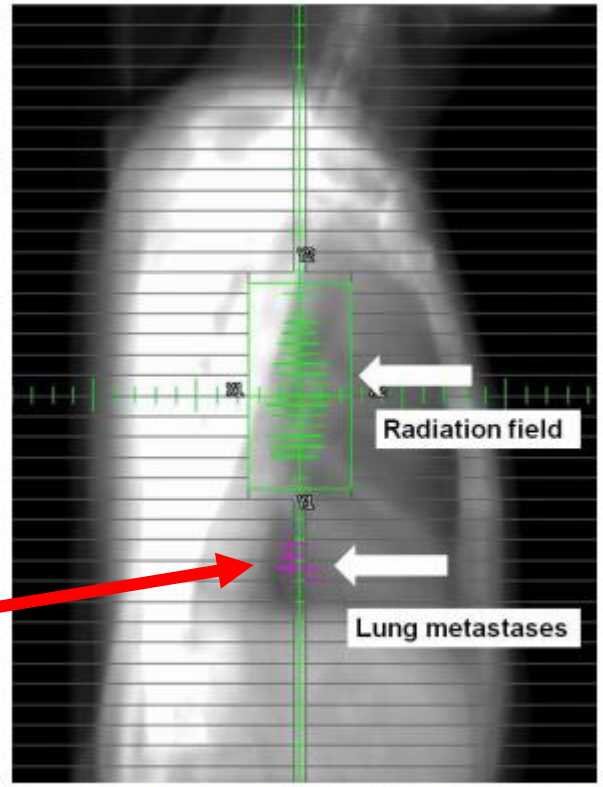
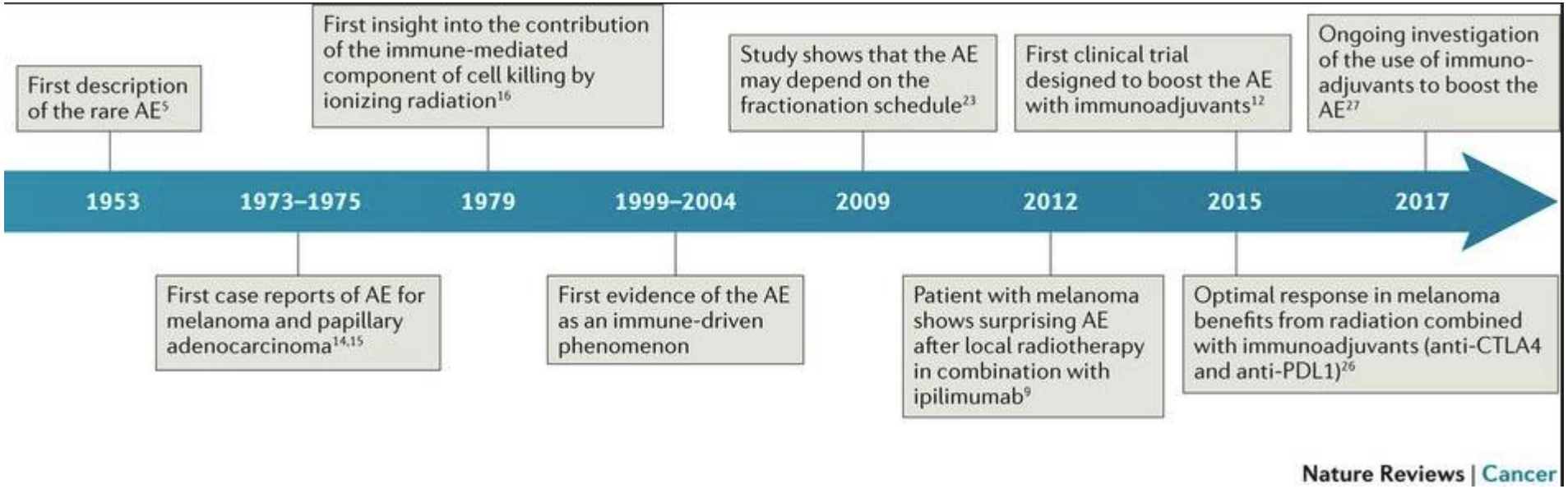


Figure 6 Beam's eye view of the lateral beam of the radiation therapy. This shows the metastatic lung tumor is outside the target area.

Figure 8 CT scan showing the absence of both lung metastases, which regressed after radiation therapy.

60,75Gy/2,25Gy

Okuma et al. Journal of Medical Case Reports 2011, 5:111



Nature Reviews Cancer **18**, 313–322 (2018)

EFEKT ABSKOPALNY

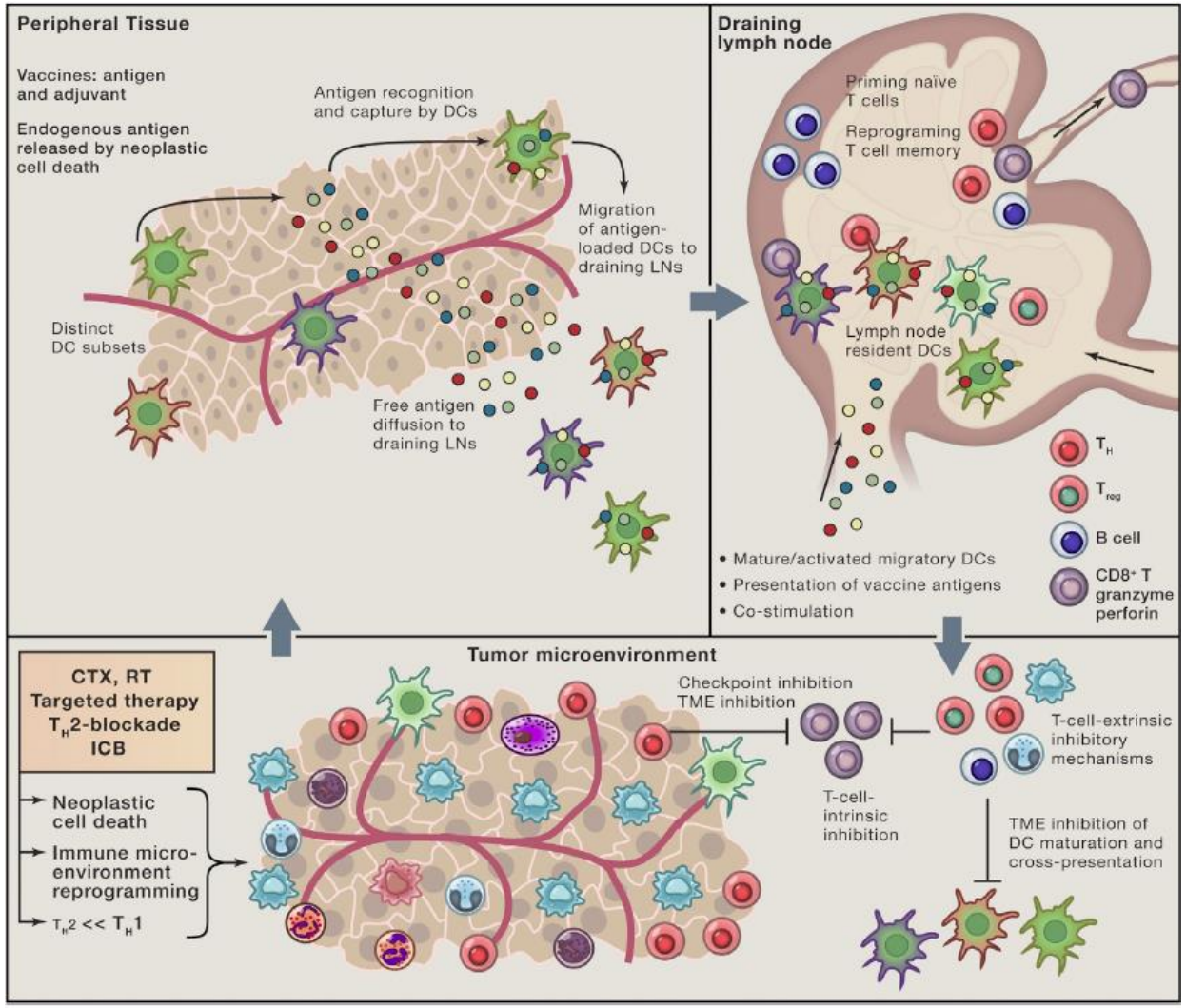
- Po RT występuje rzadko

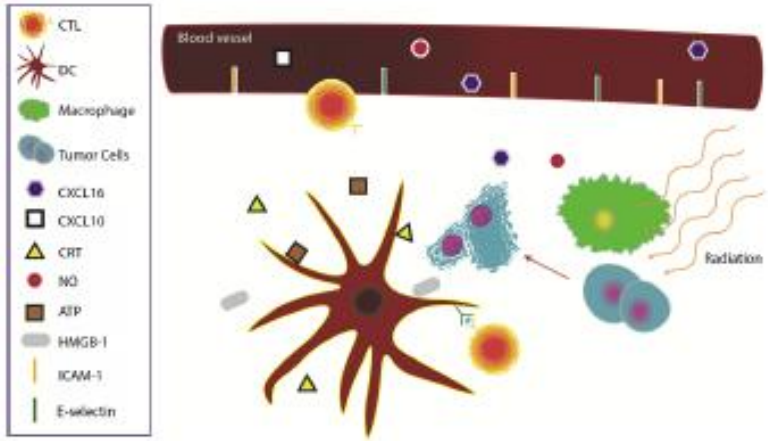
- W trakcie RT ustalona przewaga mechanizmów tolerancji immunologicznej może znosić pojawienie się odpowiednio silnej odpowiedzi abskopalnej

Po RT

- Uwolnienie TAA z guza
- Uwolnienie DAMPs z guza
- Delecja anergicznych i regulatorowych limfocytów T
- Pobudzenie machiny procesowania Ag i zwiększenie ekspresji receptorów śmierci
- Indukcja cytokin i chemokin
- Pobudzenie krążenia komórek układu immuno

RT - promowanie immunogenności guza

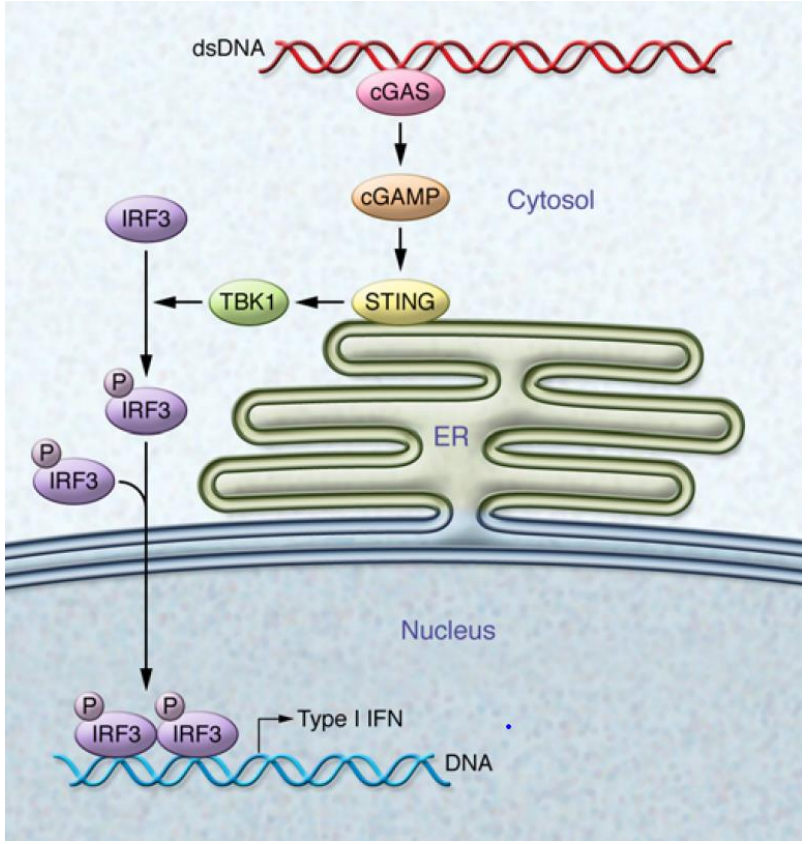




Curr Breast Cancer Rep (2017) 9:45–51

Cell *164*, March 10, 2016

Komórki dendrytyczne
Szlak STING
stimulator of interferon genes pathways



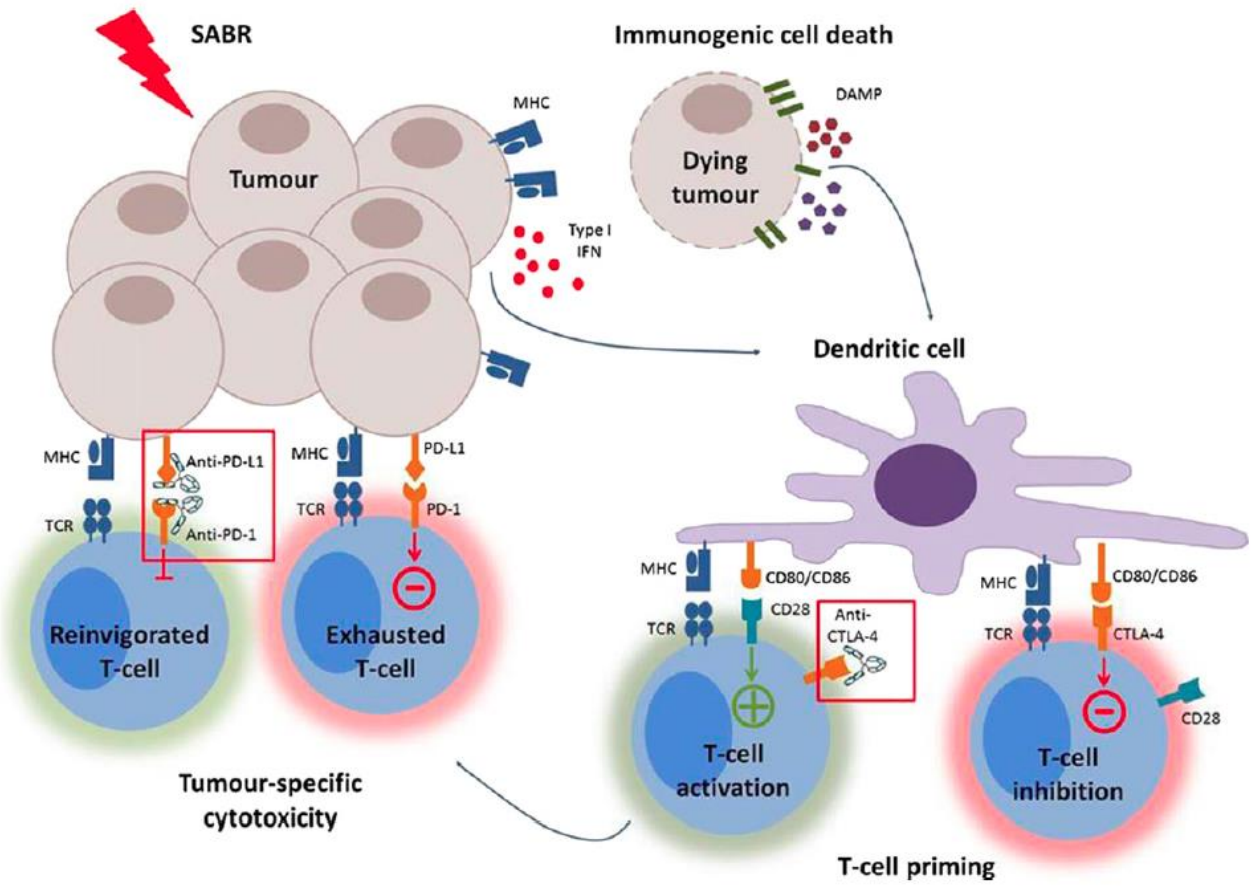
: *J Clin Invest.* 2016;126(7):2404–2411. doi:10.1172/JCI86892.

Aktualne koncepcje

- RT jako szczepionka – zwiększenie/pobudzenie efektu abskopalnego – nieszczenie napromienianego guza i innych guzów przerzutowych - choroba przerzutowa

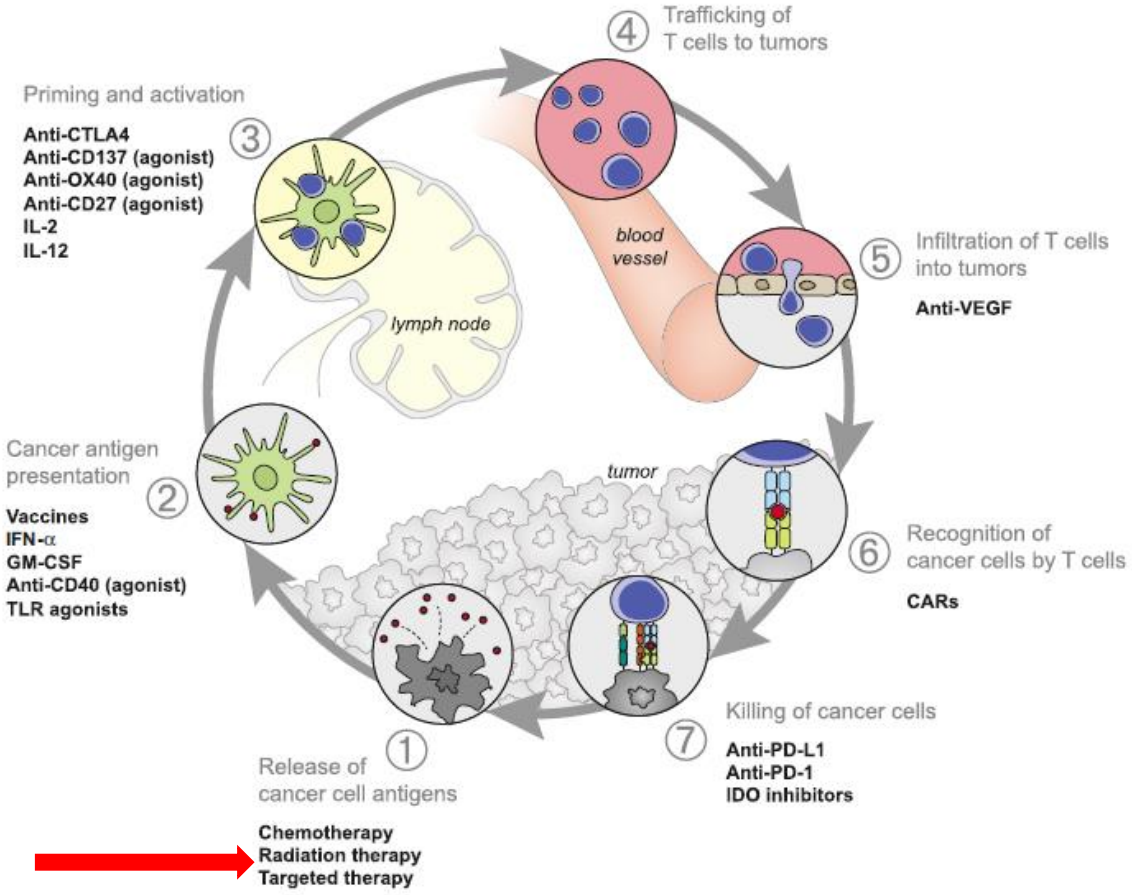
- RT – modulacja immunologiczna – leczenie radykalne

Stereotactic ablative radiotherapy and immunotherapy combinations: turning the future into systemic therapy?



Br J Radiol 2016; **89**: 20160472.

Cykl: nowotwór-immunogenność



Immunity *39*, July 25, 2013

Czerniak – RT + ipilimumab - OS

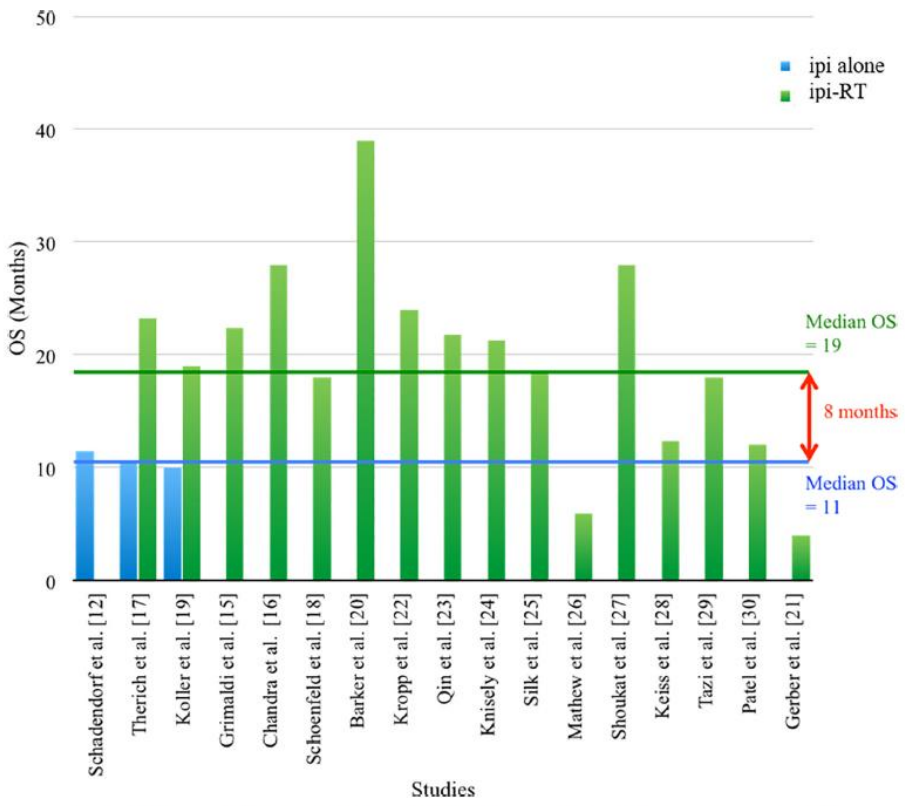
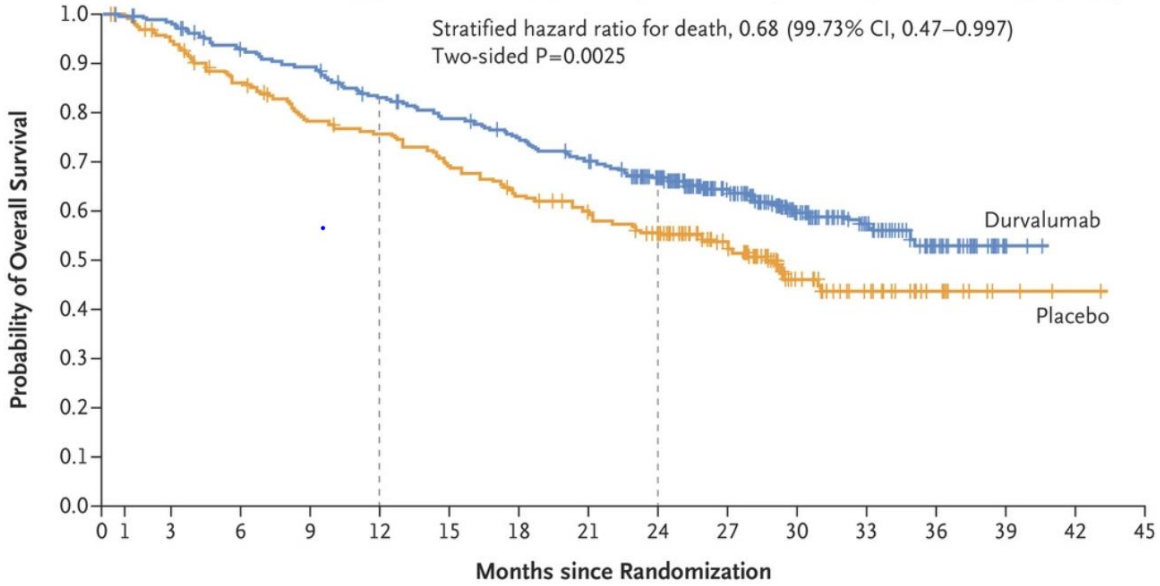


Fig. 3. Overall survival outcomes reported in prospective and retrospective studies using ipi-RT versus ipi alone.

R. Chicas-Sett et al. / Clinical and Translational Radiation Oncology 9 (2018) 5–11

NDRP - PACIFIC study – OS durwalumab

	No. of Events/ Total No. of Patients	Median Overall Survival (95% CI)	12-Mo Overall Survival Rate (95% CI)	24-Mo Overall Survival Rate (95% CI)
		mo	%	%
Durvalumab	183/476	NR (34.7–NR)	83.1 (79.4–86.2)	66.3 (61.7–70.4)
Placebo	116/237	28.7 (22.9–NR)	75.3 (69.2–80.4)	55.6 (48.9–61.8)



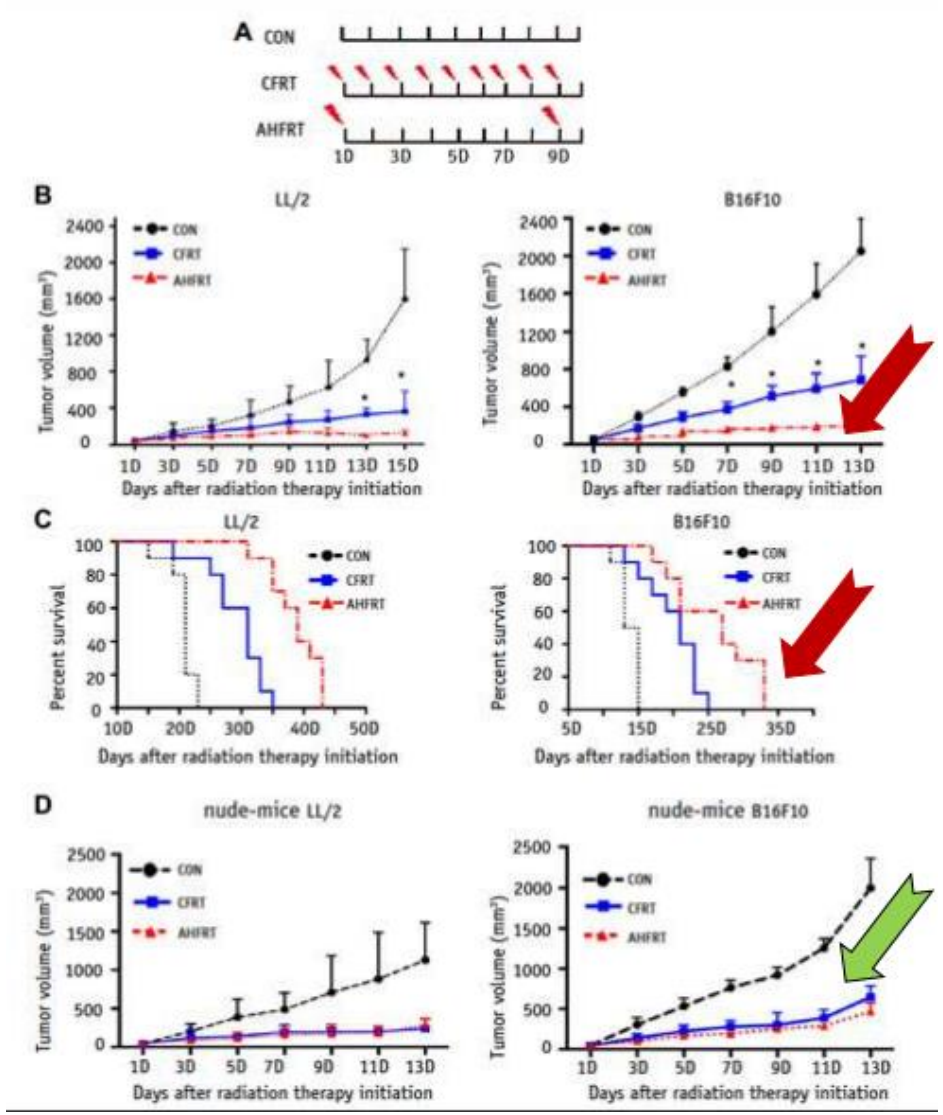
No. at Risk																
Durvalumab	476	464	431	415	385	364	343	319	274	210	115	57	23	2	0	0
Placebo	237	220	198	178	170	155	141	130	117	78	42	21	9	3	1	0

N Engl J Med. 2018 Sep 25. doi: 10.1056/NEJMoa1809697.

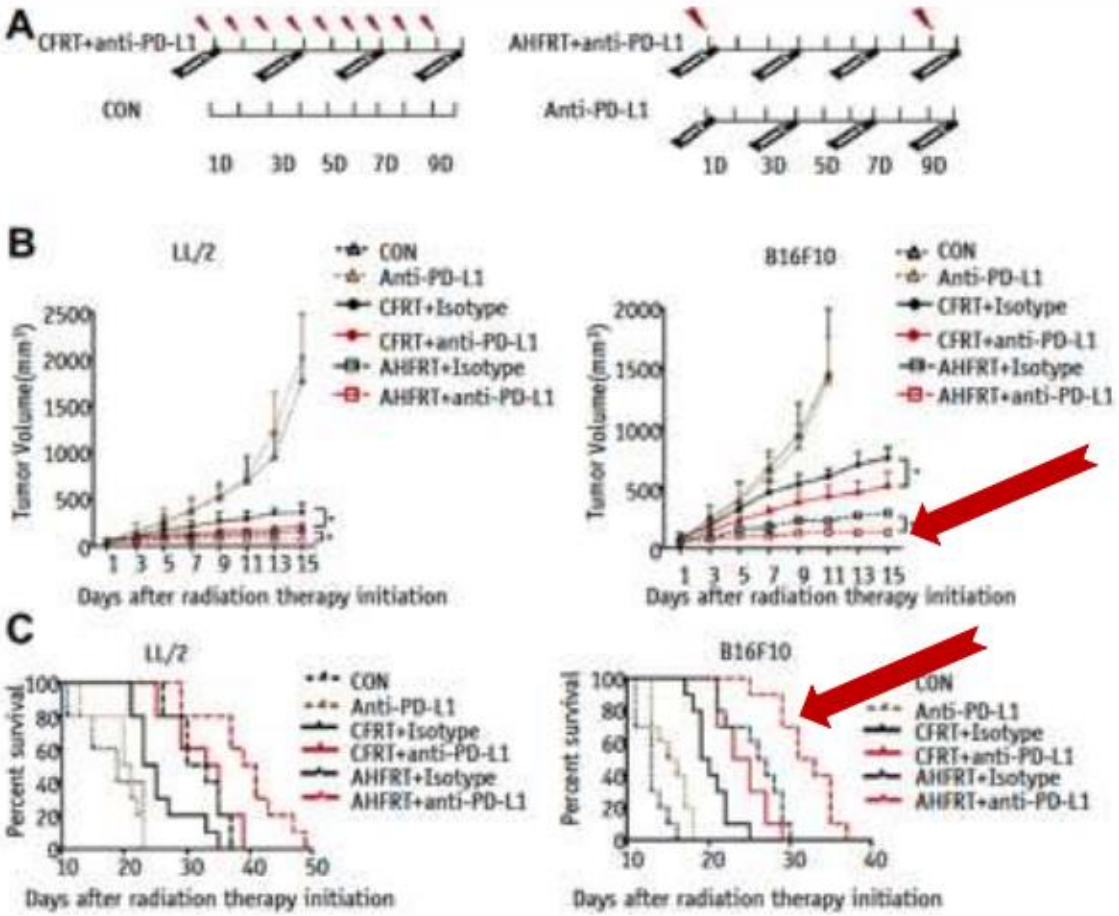
Radioterapia hipofrakcjonowana –efekt najlepszy przy sprawnie działającym układzie immunologicznym

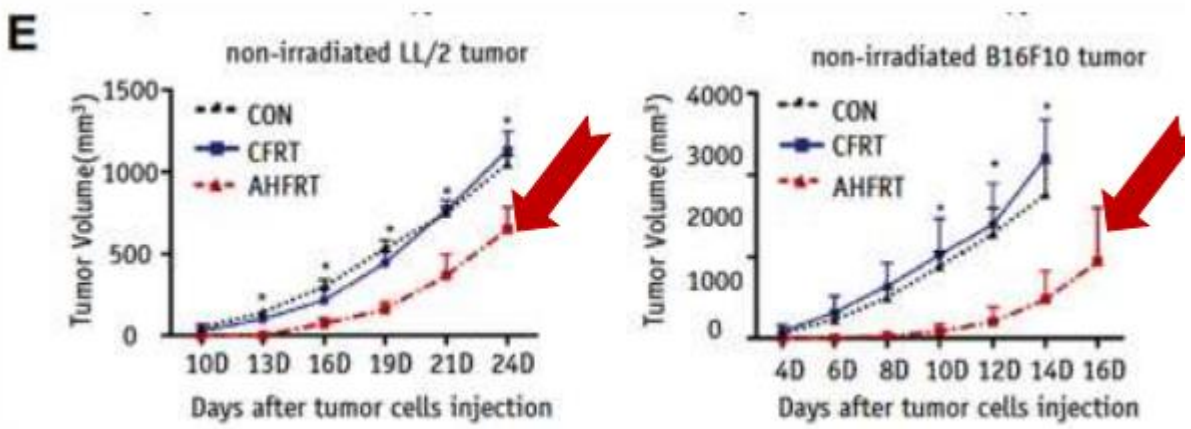
Targeting Myeloid-derived Suppressor Cells and Programmed Death Ligand 1 Confers Therapeutic Advantage of Ablative Hypofractionated Radiation Therapy Compared With Conventional Fractionated Radiation Therapy

Jie Lan, PhD,* Rui Li, MS,* Li-Mei Yin, MD,* Lei Deng, MD,* Jun Gui, PhD,† Bao-Qing Chen, MD,* Lin Zhou, MD,* Mao-Bin Meng, PhD,‡ Qiao-Rong Huang, MS,§ Xian-Ming Mo, PhD,§ Yu-Quan Wei, MD,* Bo Lu, MD,‖ Adam Dicker, MD,‖ Jian-Xin Xue, MD,* and You Lu, MD*



AHRT + anty PD-L1 – lepiej działa niż CFRT + anty PDL-1

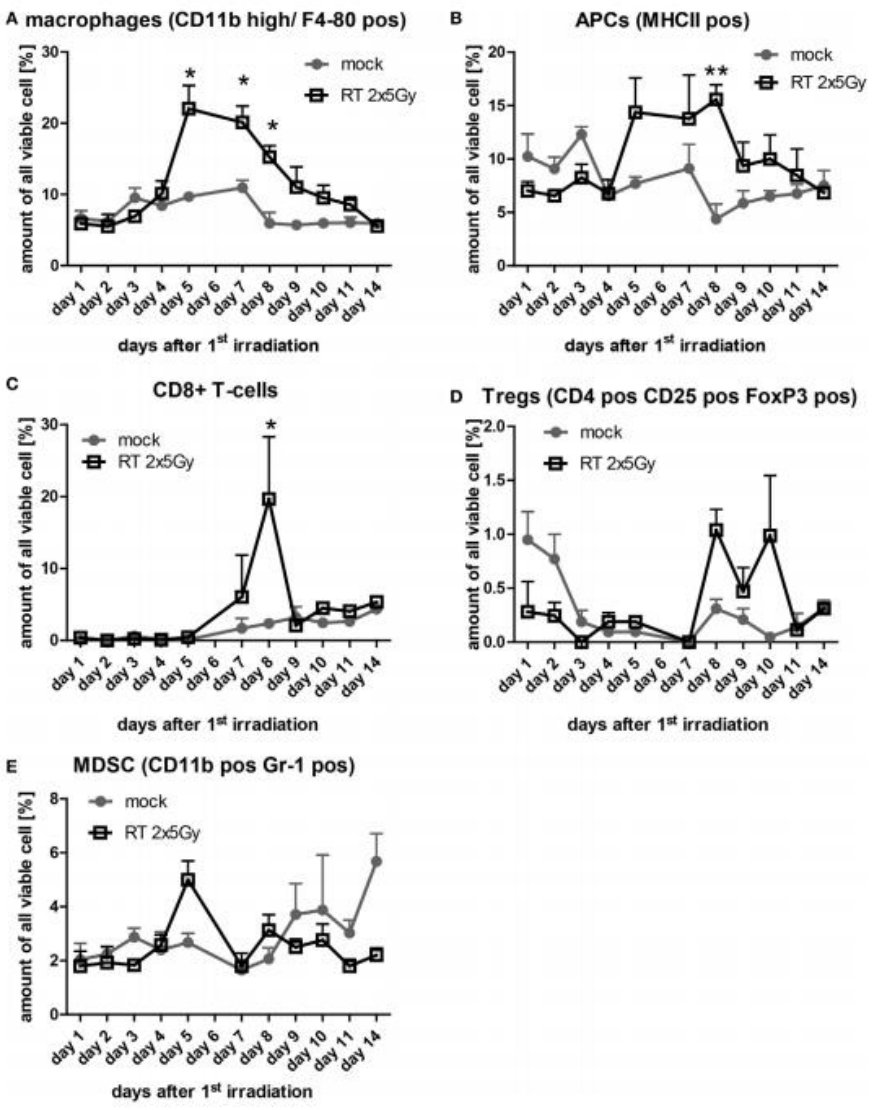




Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2018 May 1;101(1):74-87.

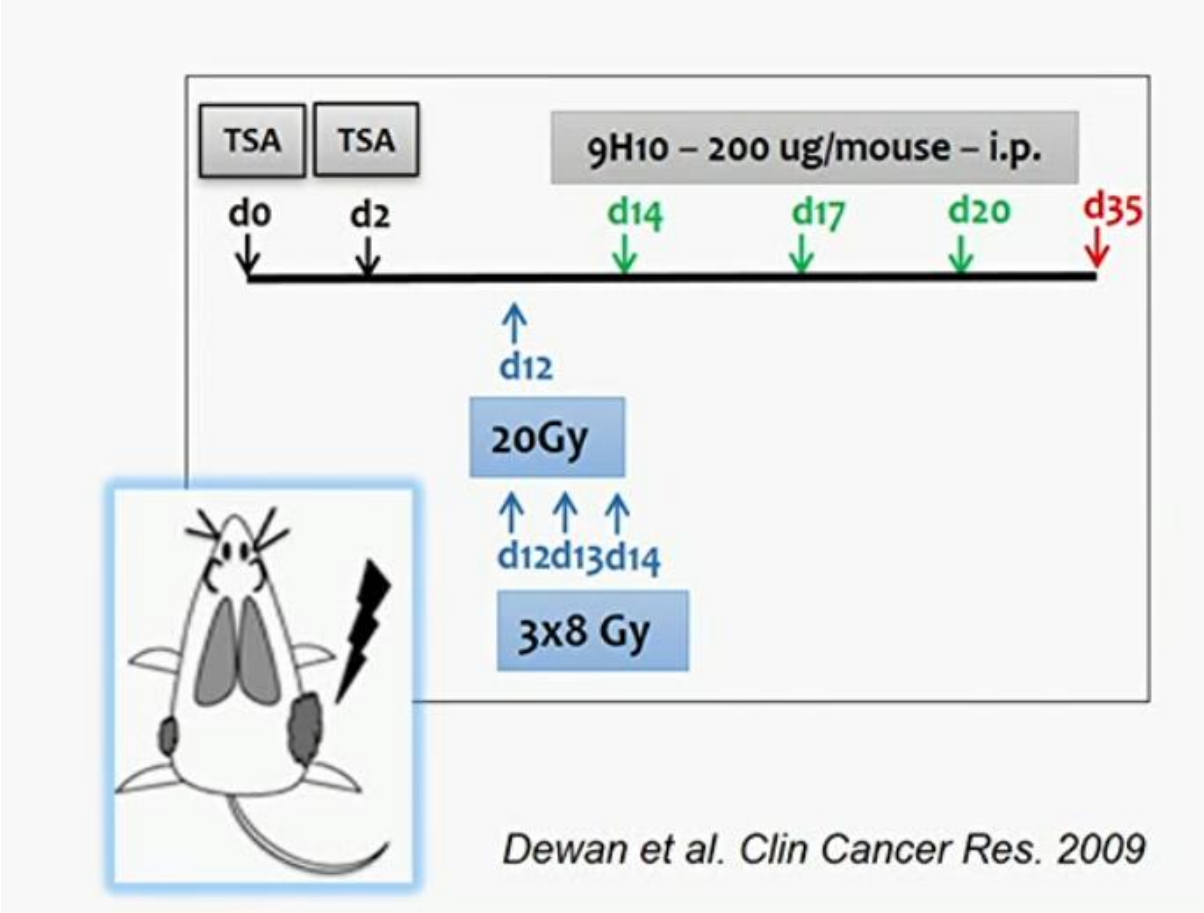
Hypofractionated Irradiation Has Immune Stimulatory Potential and Induces a Timely Restricted Infiltration of Immune Cells in Colon Cancer Tumors

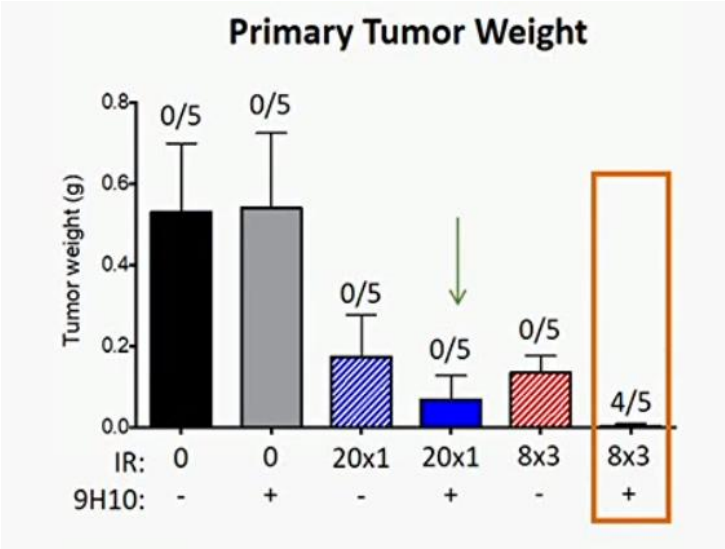
*Benjamin Frey[1], Michael Rückert[1], Julia Weber[1], Xaver Mayr[1], Anja Derer[1], Michael Lotter[1], Christoph Bert[1], Franz Rödel[2], Rainer Fietkau[1] and Udo S. Gaipl[1]**

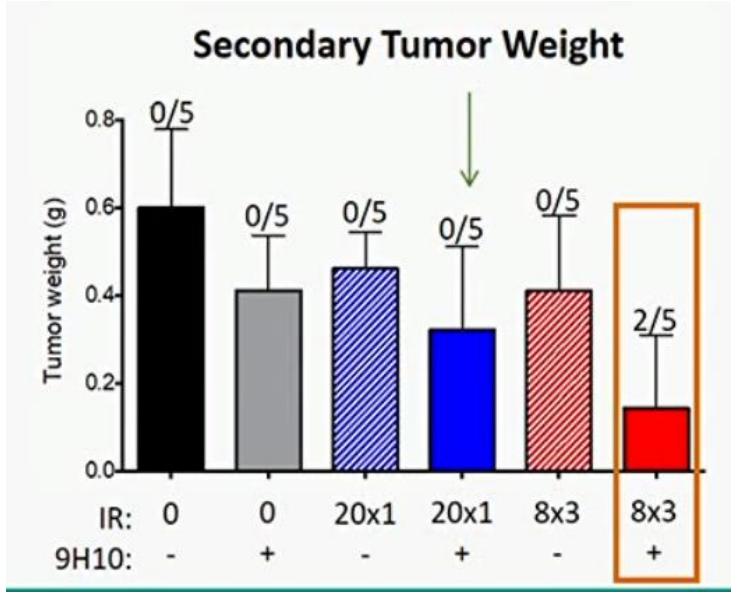


Front. Immunol. 8:231.
doi: 10.3389/fimmu.2017.00231

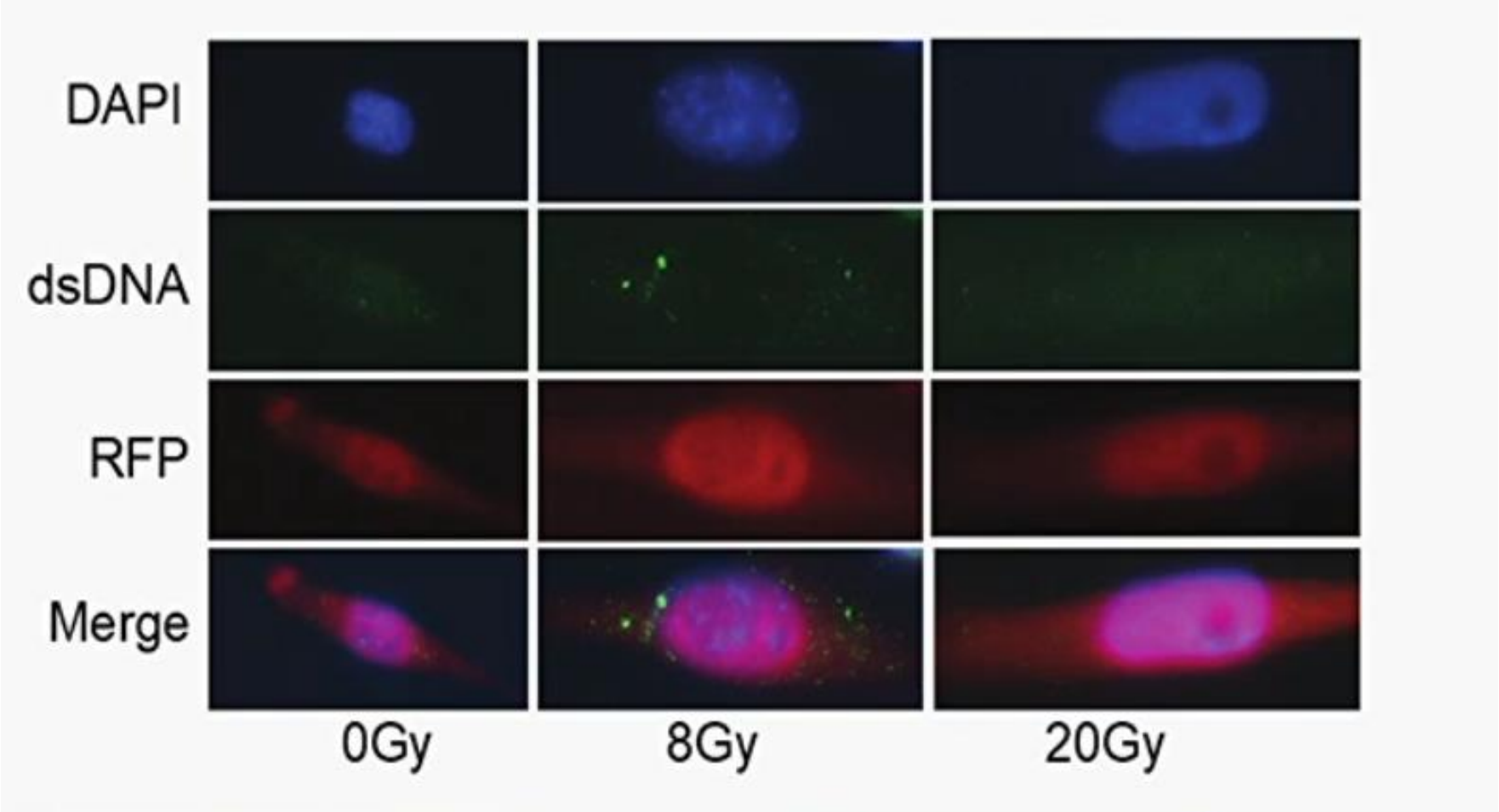
RT frakcjonowana
a nie pojedyncza dawka







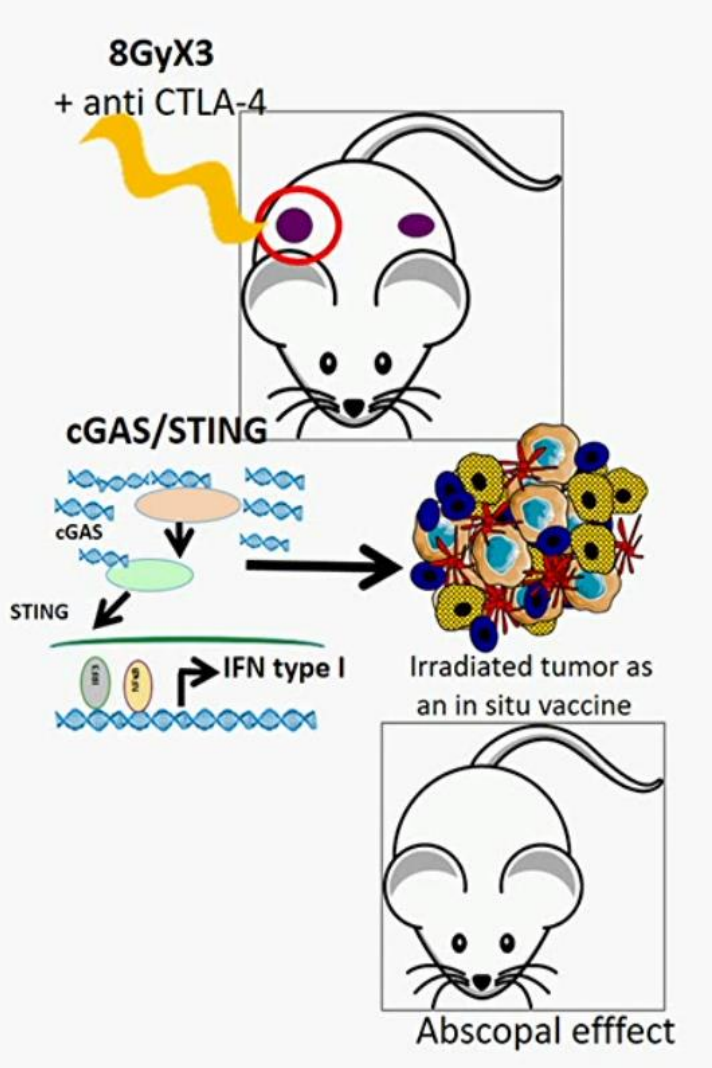
Fragmenty DNA pochodzenia nowotworowego w cytoplazmie

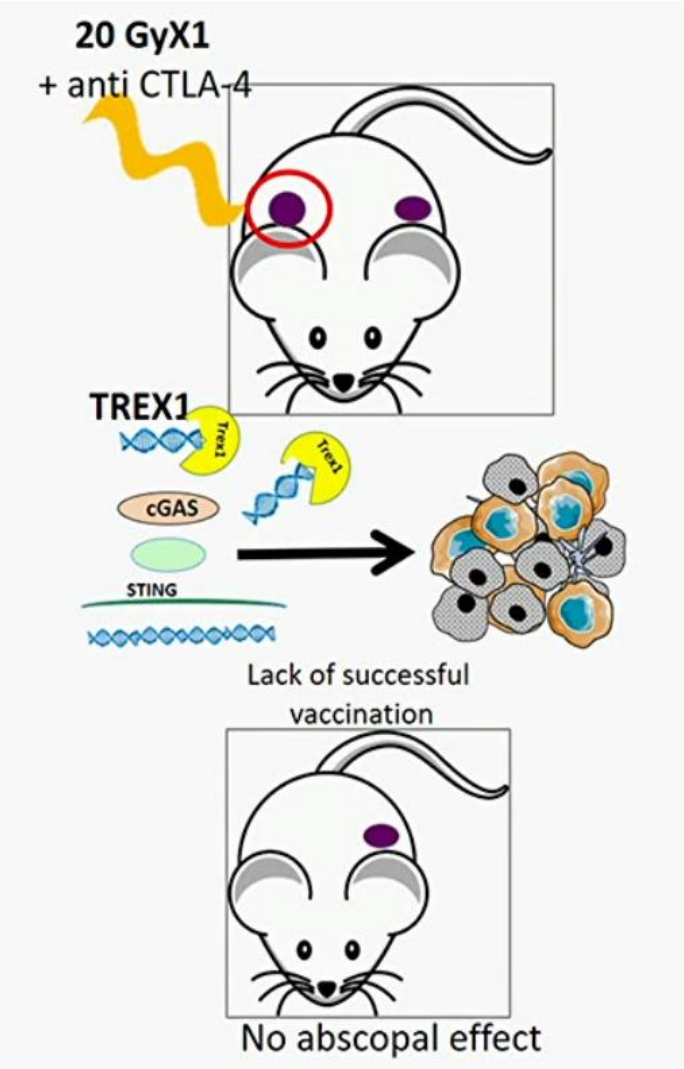


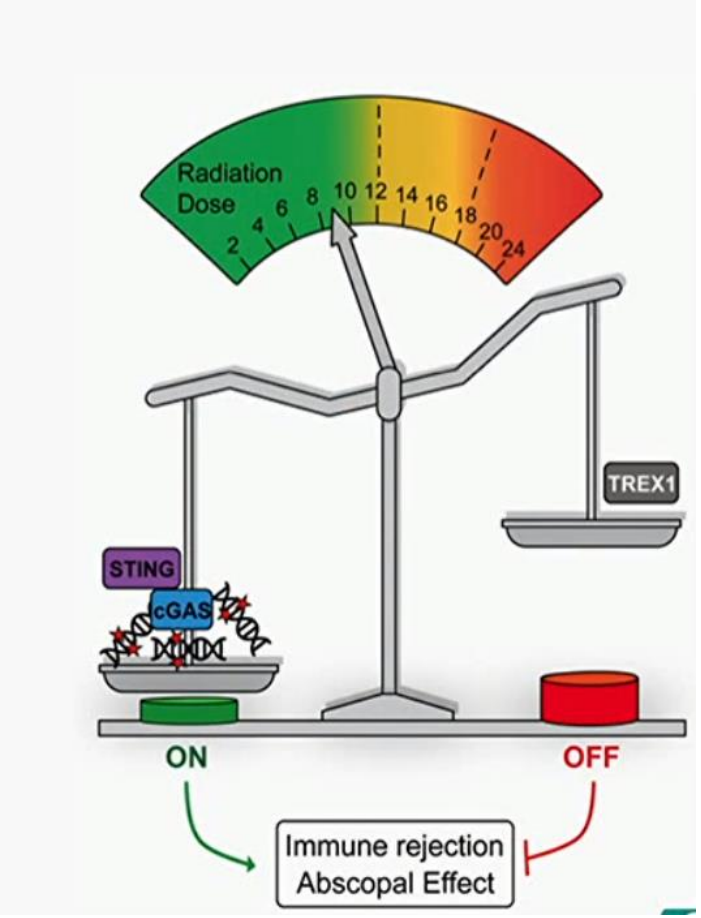
Vanpouille-Box et al., Nature Communications, 2017

Immunogenna śmierć kn: większa dawka frakcyjna ale nie za duża!

Pojedyncza duża dawka indukuje ekspresję Trex1



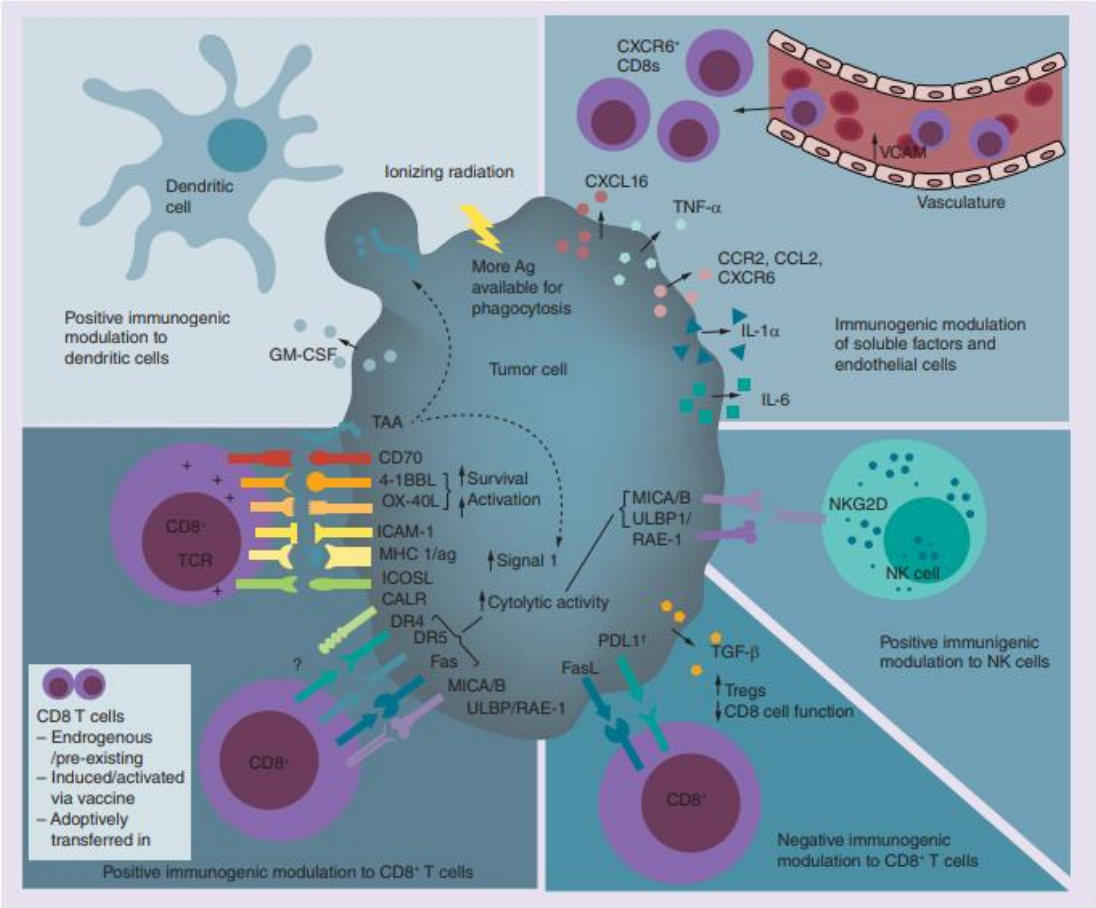




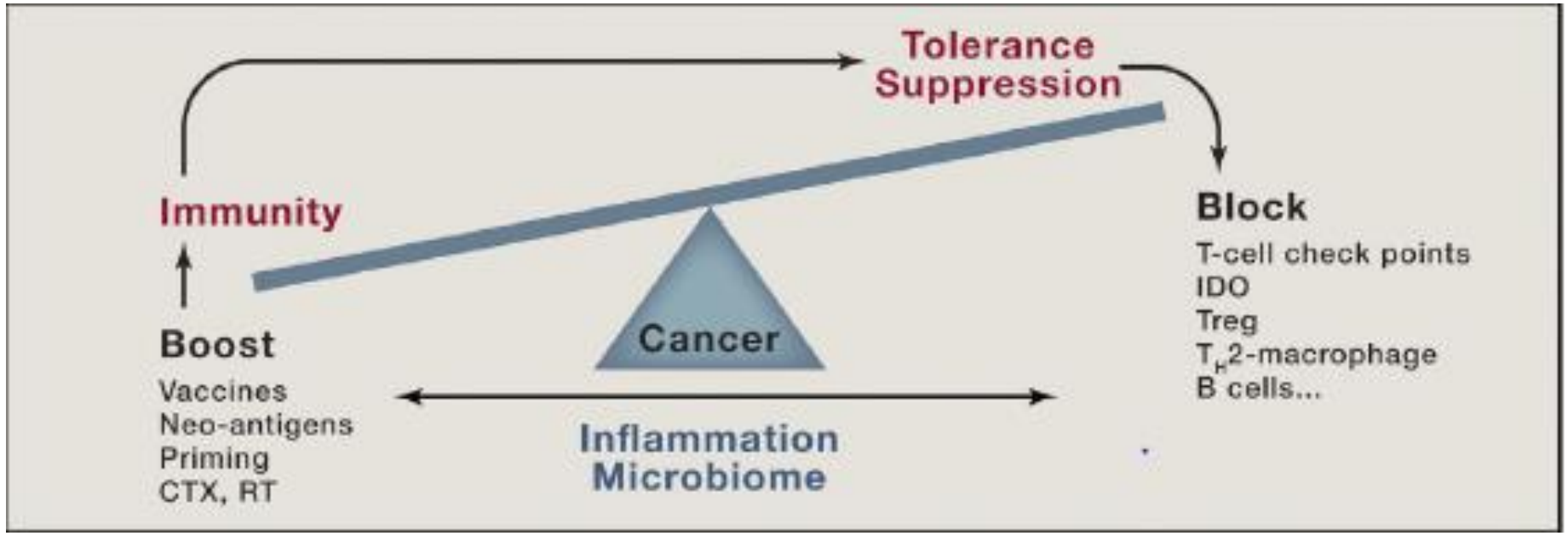
IJROBP, 2018

Synergia z anty-CTLA-4 i anty-PD-L1, anty-PD-1

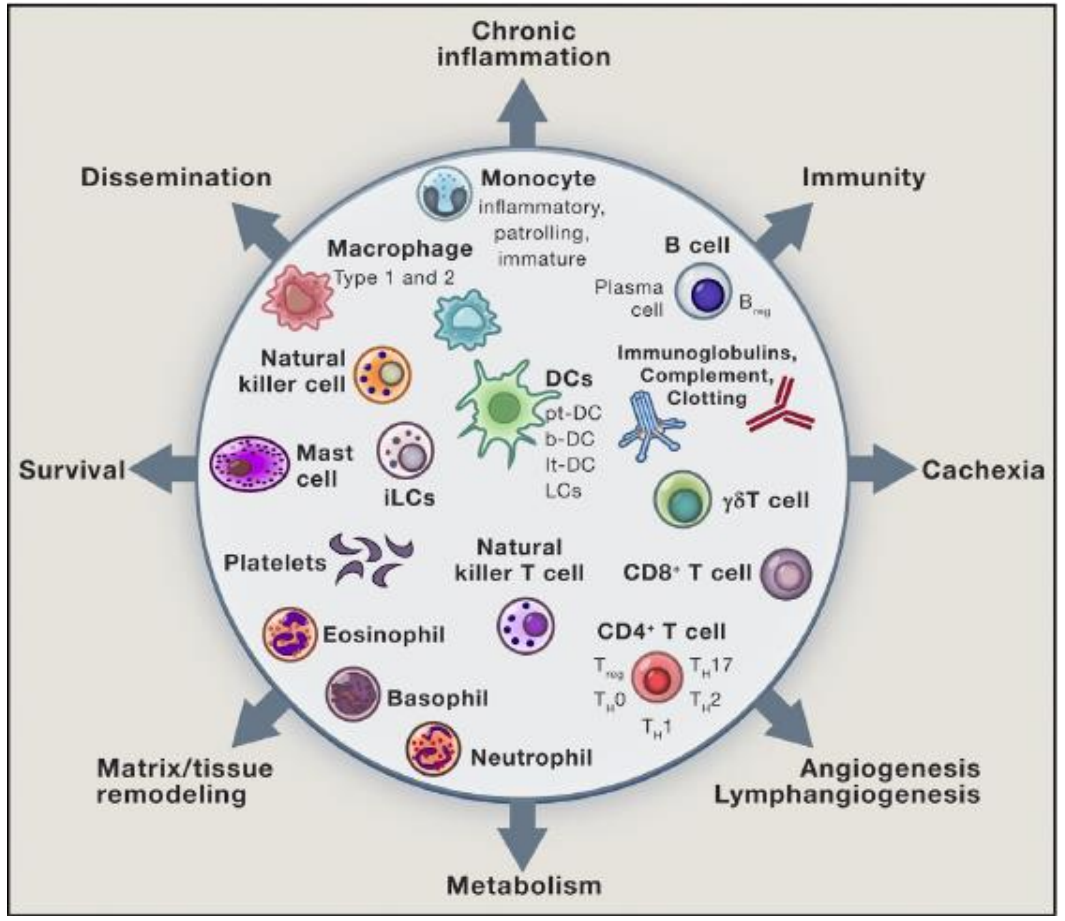
Immunologiczna modulacja KN po RT



Future Oncol. (2016) 12(2), 239–256

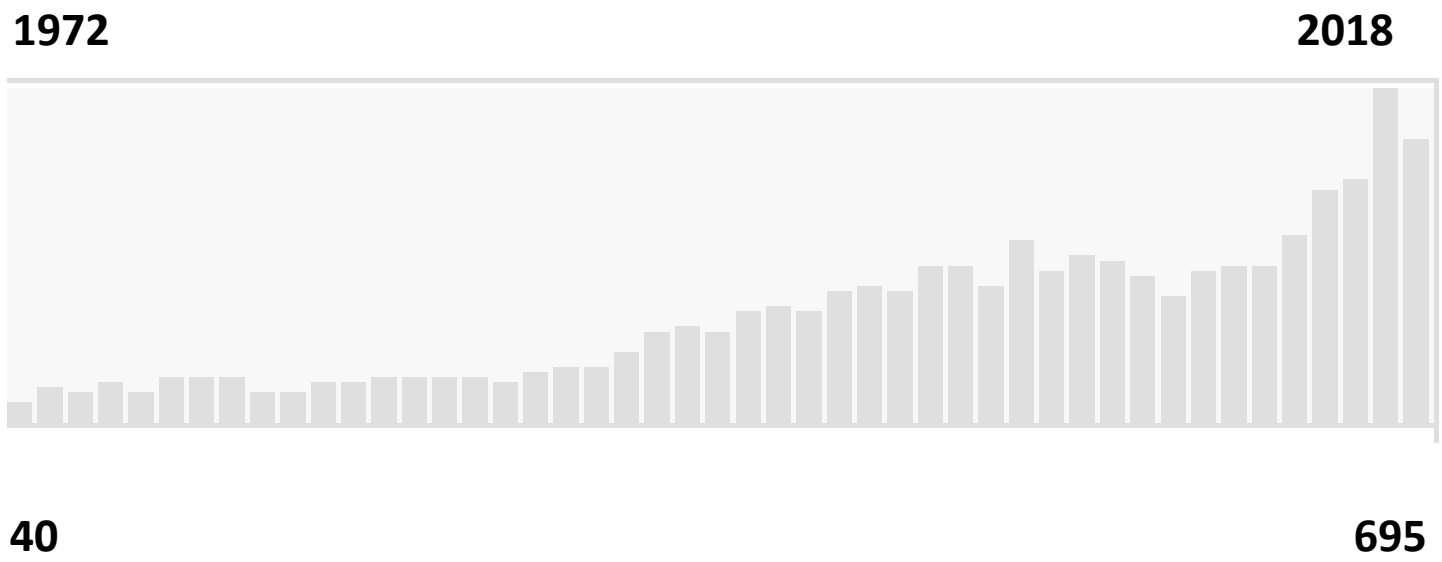


Cell *164*, March 10, 2016



Cell *164*, March 10, 2016

Pubmed:
Immunology AND radiation therapy



U.S. National Library of Medicine

ClinicalTrials.gov

2538 Studies found for: **radiation therapy immunology**

Nature is a key to perfection...

Antoni Gaudi

Konieczna identyfikacja wielu składowych leczenia

- Translacja wyników z badań przedklinicznych, na ile wiarygodna?
- Guz pierwotny /choroba przerzutowa
- Lokalizacja napromienianego guza (kość, płuca – TME)
- HP
- Markery biochemiczne, molekularne, zaburzenia genetyczne
- Odpowiednia sekwencja leczenia skojarzonego (timing)
- Dawka frakcyjna / całkowita RT / czas leczenia / częstość RT- 5x w tyg., 1 x na tydzień
- Frakcjonowanie dawki
- RT tylko jednego przerzutu czy kilku /wszystkich przerzutów
- RT całego guza czy części?
- Właściwy dobór leczenia immunologicznego, czas jego trwania
- Działania niepożądane

Konieczna identyfikacja czynników predykcyjnych

- Gęstość mutacji (TMB)
- Całkowita liczba limfocytów
- L /N, L / płytki krwi
- Stan p53
- Ekspresja kalretikuliny
- Poziom Trex1
- Aktywność STING
- ….