

Immunotherapy of Glioblastoma Multiforme Tumors: From Basic to Clinical Trial Studies

Leila Alizadeh^{1†}, Ali Gorizan^{1†}, Maryam Akbari Dana², Amir Ghaemi^{3*}¹Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Alanbia Hospital, Tehran, Iran²School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran³Infectious Diseases Research Center, Department of Microbiology, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

†These authors contributed equally to this work.

Article Info:

Received: 22 Mar 2015

Accepted: 22 May 2015

ABSTRACT

Introduction: Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and deadliest of malignant primary brain tumors in adults and is one of a group of tumors referred to as gliomas. The National Cancer Institute estimates that 23,000 adults were diagnosed with GBM every year in USA, and less than 5% survive 5 years post-diagnosis. Thus, novel therapeutic strategies to target and kill GBM cells are desperately needed to increase the efficiency of therapy. Immunotherapy has the potential of inducing the immunity to remove GBM cells that might have spread throughout the central nervous system. **Conclusion:** In current review, the latest developments in preclinical immunotherapy for glioma will be discussed, which involve the local delivery of pro-inflammatory cytokines, such as Flt3L, Type I IFNs, IL-2, IL-4, and IL-12 using gene therapy carriers and neural stem cells, or the blockade of immune-suppressive mediators, such as TGF beta, FasL and phosphorylated STAT3. New immunotherapeutic strategies have also been evaluated in clinical trials applied in GBM patients, which makes it a promising tool in the future treatments for GBM.

Key words:

1. Glioblastoma
2. Cytokines
3. Immunity

* **Corresponding Author:** Amir Ghaemi

E-mail: ghaem_amir@yahoo.com

ایمونوتراپی تومورهای گلیوبلاستوم چند شکلی: از مطالعات پایه تا کارآزمایی‌های بالینی

لیلا علیزاده^۱، علی گریزان^۱، مریم اکبری دانا^۲، امیر قائمی^{۳*}^۱مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم الانبیا، تهران، ایران^۲دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران^۳مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران⁺ این نویسندگان به نسبت مساوی در این مقاله مشارکت داشته‌اند.

اطلاعات مقاله:

تاریخ پذیرش: ۱ خرداد ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: ۲ فروردین ۱۳۹۴

چکیده

مقدمه: گلیوبلاستوم چند شکلی یکی از رایج‌ترین و مهلک‌ترین تومورهای مغزی اولیه بدخیم در بزرگسالان است و یکی از گروه تومورهایی است که به‌عنوان گلیوما ارجاع داده می‌شود. انیستیتو ملی سرطان تخمین زده است که هر ساله ۲۳۰۰۰ بزرگسال با گلیوبلاستوم چند شکلی در آمریکا تشخیص داده می‌شوند و کمتر از ۵٪ آن‌ها ۵ سال پس از تشخیص زنده باقی می‌مانند. بنابراین راهبردهای درمانی نوین برای هدف قرار دادن و کشتن سلول‌های گلیوبلاستوم چند شکلی به‌شدت نیاز به افزایش کارایی درمان دارد. ایمونوتراپی دارای پتانسیل القای مصونیت به‌منظور حذف سلول‌های گلیوبلاستوم چند شکلی است که ممکن است دارای توانایی انتشار در سرتاسر سیستم عصبی مرکزی باشند. **نتیجه‌گیری:** در مقاله مروری حاضر آخرین تحولات در خصوص ایمونوتراپی پیش بالینی برای گلیوما مورد بحث قرار خواهد گرفت که شامل آزادسازی موضعی سایتوکاین‌های پیش التهابی مانند؛ Flt3L، اینترفرون‌های نوع ۱، اینترلوکین ۲، اینترلوکین ۴ و اینترلوکین ۱۲ با بهره‌گیری از حاملین ژن درمانی و سلول‌های بنیادی مغزی یا مهار واسطه‌های سرکوب‌کننده ایمنی مانند TGF beta، FasL و STAT3 فسفوریله، می‌باشند. راهبردهای نوین ایمونوتراپی نیز در کارآزمایی‌های بالینی مورد استفاده در بیماران گلیوبلاستوم چند شکلی مورد بررسی قرار گرفته‌اند که آن را یک ابزار نوید بخشی در درمان‌های آینده برای گلیوبلاستوم چند شکلی می‌سازد.

کلید واژه‌ها:

۱. گلیوبلاستوم
۲. سایتوکاین‌ها
۳. ایمنی

* نویسنده مسئول: امیر قائمی

آدرس الکترونیکی: ghaem_amir@yahoo.com

مقدمه

شده است. تشخیص GBM در بین مردان بیشتر از زنان با نسبت ۱:۱/۵ و در سفیدپوستان بیشتر از سیاهپوستان با نسبت ۱:۲ گزارش شده است. نتیجه بررسی‌ها بر روی سن بیماران مبتلا به این تومور گویای این مطلب است که با افزایش طول عمر احتمال بروز این نوع تومور افزایش می‌یابد. شیوع این تومور در گروه‌های سنی ۸۴-۷۵ سال بیشتر می‌باشد و میانگین سن مبتلایان به این تومور ۶۴ سالگی گزارش شده است. قرار گرفتن در معرض اشعه‌های یونیزان، عاملی برای پیشرفت تومور گلیومای بدخیم شناخته شده است. پیش‌آگهی بیماری GBM ضعیف می‌باشد، از این رو احتمال بهبود پایین و احتمال مرگ این بیماران بالاست (۲). از سال ۱۹۹۵ تا ۲۰۰۸ میزان بقای یک‌ساله بیماران مبتلا به GBM ۳۵٪، در حالی که میزان بقای پنج‌ساله آن‌ها تنها ۵٪ گزارش شده است (۲).

شانس زنده ماندن بیماران با تومور آستروسایتومای آناپلاستیک کمی بیشتر است و میزان بقای یک‌ساله آن‌ها ۶۱٪ و میزان بقای پنج‌ساله آن‌ها ۲۷٪ گزارش شده است. در حال حاضر میانگین بقاء بیماران با تشخیص GBM، ۱۲ تا ۱۵ ماه می‌باشد در حالی که میانگین بقاء برای آستروسایتومای آناپلاستیک بین ۳۶ تا ۶۰ ماه است. به‌طور معمول این بیماران با علائم عمومی مانند سردرد، اختلالات اعصاب مرکزی، تغییر وضعیت ذهنی، تغییرات شخصیتی، تشنج، سردردهای همراه با تهوع و استفراغ و افزایش فشار داخل جمجمه به پزشک مراجعه می‌کنند.

در زمان تشخیص فاکتورهای سن بالا، وضعیت پایین عملکردی کارنوفسکی^{۱۲}، غیرقابل برداشت بودن تومور، ویژگی‌های بافت‌شناسی مطابق با GBM حاکی از پیش‌آگهی ضعیف‌تری هستند. درمان رایج برای بیماران مشکوک به GBM، برداشت تومور توسط جراح و به دنبال آن رادیوتراپی کانونی و شیمی‌درمانی همزمان می‌باشد. جهت کاهش ادم حاصل از تومور، از دوز بالای کورتیکواستروئیدها (اغلب دگزامتازون) استفاده می‌گردد. این نوع درمان علائم عصبی را بهبود می‌بخشد. علاوه بر آن درمان ضد تشنجی همزمان با علائم اولیه حملات تشنجی مورد نیاز است. به‌علاوه زمانی که تشنج جزء علائم اولیه باشد، باید درمان ضد صرعی نیز انجام گردد.

اولین قدم در درمان بیماران با تومور GBM، برداشت تومور توسط جراح است. یکی از محدودیت‌های معمول در برداشت تومور توسط جراحی، موقعیت مکانی تومور در ناحیه کنترل تکلم در مغز است. به‌تازگی نشان داده شده است که برداشت حداقل ۷۸٪ تومور باعث افزایش طول عمر بیماران می‌گردد و موفقیت در جراحی به سن بیمار، وضعیت عملکرد کارنوفسکی، حجم تومور و میزان برداشت تومور پس از جراحی بستگی دارد (۳).

میزان وسعت برداشت تومور و حجم تومور پس از جراحی

میانگین زندگی بیماران بعد از جراحی و برداشت ۷۸٪ حجم تومور، ۱۲/۵ ماه است؛ در مقابل این زمان بعد از شیمی‌درمانی با تموزولومید به ۱۶ ماه می‌رسد. از سال ۲۰۰۵، تموزولومید

علی‌رغم تحقیقات کلینیکی و پاراکلینیکی وسیع جهت افزایش طول عمر بیماران مبتلا به تومور گلیوبلاستوم چند شکلی (GBM)^۱، این بیماری پیش‌آگهی نامعلومی داشته و به‌صورت یک چالش درمانی برای نوروانکولوژیست‌ها و جراحان مغز و اعصاب باقی مانده است. استفاده از داروی شیمی‌درمانی تموزولومید^۲ علاوه بر درمان‌های رایج مانند جراحی و برداشت تومور و اشعه درمانی، طول عمر بیماران GBM را ارتقاء بخشیده ولی تنها ۵٪ از بیماران پس از تشخیص اولیه زنده می‌مانند. از دلایل پایین بودن موفقیت درمان‌های رایج این تومور می‌توان از مقاومت ذاتی تومور گلیوبلاستوم به شیمی‌درمانی و رادیوتراپی، عملی نبودن برداشت کامل تومور توسط جراحی به دلیل ماهیت تهاجمی تومور، وجود سد خونی-مغزی که دسترسی دارو را به محل تومور محدود می‌کند و سمیت عصبی عوامل درمانی که دوزهای مصرفی داروها را محدود می‌سازد، نام برد.

بنابراین روش‌های درمانی نوین، برای درمان این بیماران به‌شدت مورد نیاز است. درمان‌های ایمونوتراپی جهت تحریک سیستم ایمنی بدن برای شناسایی و از بین بردن سلول‌های توموری گلیوبلاستوم بدخیم باقی مانده پس از عمل جراحی می‌باشد. در دهه گذشته پژوهشگران تلاش‌های بسیاری با هدف بهبود کارایی روش‌های ایمونوتراپی در بیماران تومور گلیوبلاستوم بدخیم داشته‌اند. در این مقاله آخرین دستاوردهای بالینی و پاراکلینیکی ایمونوتراپی بر روی بیماران گلیوبلاستومای بدخیم ذکر و مورد بحث و بررسی قرار گرفته است.

روش‌های استاندارد درمان تومور گلیوبلاستومای بدخیم

سازمان بهداشت جهانی (WHO)^۳ گرید III و IV تومور آستروسیت^۴ و الیگواستروسیتوم^۵ (گرید III) و الیگودندروگلیوما^۶ (گرید III) را جزء کلاسی از تومورهای سیستم اعصاب مرکزی به نام گلیوم بدخیم دسته‌بندی کرد (۱). تشخیص آستروسیتوم بدخیم توسط آزمایش‌های هیستوپاتولوژیک صورت می‌گیرد. WHO استفاده از سیستم St. Anne-mayo جهت تشخیص و تأیید هیستوپاتولوژی تومورهای بدخیم آستروسیتوم (گرید III) و وجود دو فاکتور از چهار فاکتور ۱- تغییر هسته^۷ ۲- میتوز^۸ ۳- تکثیر اندوتلیالی^۹ ۴- نکروز^{۱۰} را جهت تأیید نهایی لازم و ضروری دانسته است (۲).

GBM (گرید IV) با داشتن حداقل سه خصوصیت از چهار ویژگی نامبرده مورد شناسایی قرار می‌گیرد. از آنجایی که خطر انتشار سیستمیک پایین است، طبقه‌بندی انجام شده صرفاً بر پایه یافته‌های پاتولوژیک استوار است. از مرکز ثبت تومورهای مغزی در ایالات متحده آمریکا (CBTRUS)^{۱۱} در سال‌های ۲۰۰۴ و ۲۰۰۸ تعداد ۹۸۶ و ۲۹۵ هزار تومور اولیه سیستم اعصاب مرکزی شناسایی و گزارش شده است. ۶/۳٪ آن‌ها گلیوبلاستومای چند شکلی بود، این تومور به‌عنوان شایع‌ترین نوع تومور سیستم اعصاب مرکزی شناسایی

¹ Glioblastoma multiforme (GBM)

² Temozolomide

³ World Health Organization

⁴ Astrocytic tumors

⁵ Oligoastrocytomas

⁶ Oligodendrogliomas

⁷ Nuclear atypia

⁸ Mitosis

⁹ Endothelial proliferation

¹⁰ Necrosis

¹¹ Central Brain Tumor Registry of the United States

¹² Karnofsky

بالینی GBM نمی‌گردد (۶).

القای یک پاسخ ایمنی مؤثر آنتی تومور نه تنها به یک محرک سیستم ایمنی نیاز دارد، بلکه به آزاد شدن آنتی ژن‌های توموری و پروتئین‌های التهابی داخل سلولی مشتق از سلول‌های توموری نیز نیازمند است. گزارش شده است که ترکیب Ad-Flt3L و عوامل سمیت سلولی به منظور القای یک پاسخ مؤثر آنتی توموری مورد نیاز است؛ این امر به کاهش تومور و بقای بیشتر بیماران منجر می‌گردد (۷).

به نظر می‌رسد که سلول‌های دندرتیک وارد شده در درون تومور مغز موش‌ها و موش‌های صحرایی تیمار شده با Ad-Flt3L به منظور شروع پاسخ ایمنی آنتی تومور نیاز به فعال‌سازی به وسیله^{۱۳} HMGB1 - یک آگونیست TLR2^{۱۴} آزاد شده به وسیله سلول‌های مرده توموری - دارند. عوامل پروآپتوتیک متعددی مانند تیمیدین کیناز (TK)^{۱۵}، آزادسازی HMGB1 را از سلول‌های GBM القاء می‌کنند. TK، سایتوتوکسینی است که در حضور پیش داروی گانسیکلوویر (GCV)^{۱۶} منجر به آپوپتوز سلول‌های تومور در حال تقسیم می‌شود (۸، ۶).

از میان این راهبردهای درمانی، Ad-TK+GCV باعث بیشترین میزان آزادسازی HMGB1 می‌گردد. گزارش شده است که ترکیب Ad-Flt3L با Ad-TK+GCV بیشترین اثر را در القای مهار تومور در موش‌ها و موش‌های صحرایی که GBM داخل جمجمه‌ای در آن‌ها ایجاد شده است، دارد. در موش‌های صحرایی دارای تومور داخل جمجمه‌ای CNS-1^{۱۷}، درمان با Ad-Flt3L+Ad-TK+GCV به بقا طولانی مدت در ۷۵٪ موارد منجر می‌گردد، در حالی که Ad-Flt3L+Ad-FasL در القاء مهار و کاهش تومور ناتوان می‌باشد (۷).

گزارش‌هایی از یافته‌های اولیه آزمایشگاهی نشان می‌دهد که در موش‌های دارای GL26 GBM یا GL261 GBM ملانوما متاستاتیک، ترکیب Ad-Flt3L+Ad-TK+GCV در ۵۰-۴۰٪ حیوانات منجر به کاهش تومور می‌گردد، در حالی که درمان داخل توموری با Ad-Flt3L ترکیب شده با تموزولومید سیستمیک میانگین بقا را بهبود می‌بخشد، اما باعث بقای طولانی مدت نمی‌گردد (۱۰، ۹).

یافته‌های اخیر نشان داده‌اند که استفاده از ترکیب Ad-TK+Ad-Flt3L در شرایط *in situ* گزینه مناسبی برای درمان کمکی به همراه واکسن‌های سیستمیک دندرتیک سلی می‌باشد. این نوع درمان کارایی ضد توموری را در بیماران GBM افزایش می‌دهد. افزایش اثربخشی درمان و ایمنی ضد توموری در راستای تغییر محیط تومور به وسیله تزریق داخل توموری Ad-TK+Ad-Flt3L در ترکیب با واکسیناسیون موضعی دندرتیک سلی در مقایسه با هر یک از آن‌ها به تنهایی در موش‌های صحرایی دارای تومورهای بزرگ CNS-1، گزارش شده است. ویژگی مهم ناقل‌های ژن درمانی تزریق شده به مغز، قابلیت ایمن و بی‌خطر نوروپاتولوژیک آن‌ها است. از آنجایی که این ناقل‌های طراحی شده برای درمان بیماران GBM پس از برداشت

به عنوان داروی درمانی GBM مورد استفاده قرار گرفته است. استاپ^{۱۸} و همکاران در سال ۲۰۰۵ درمان ترکیبی تموزولومید به همراه رادیوتراپی را بر روی بیماران مورد بررسی قرار دادند (۳). میانگین عمر بیمارانی که فقط تحت درمان با رادیوتراپی قرار گرفته بودند، ۱۲/۱ ماه گزارش شد. در مقابل عمر بیمارانی که درمان ترکیبی تموزولومید و رادیوتراپی را باهم داشتند، به ۱۴/۶ ماه افزایش یافته بود. قابل ذکر است که نرخ بقا دوساله در گروه مصرف‌کننده تموزولومید به همراه رادیوتراپی ۲۶/۵٪ و در بیمارانی که فقط رادیوتراپی شده بودند به ۱۰/۴٪ گزارش گردید. به علت اثبات افزایش بقا در گروه‌های درمانی با تموزولومید همزمان با رادیوتراپی، این درمان ترکیبی به عنوان یک درمان استاندارد شناخته شد (۳).

خاموشی پروموتور ژن متیل گوانین متیل ترانسفراز (MGMT)^{۱۹} در اثر عوامل اپی ژنتیک یک نشانگر^{۲۰} مولکولی است که اهمیت پیش آگهی آن اثبات شده است. ژن MGMT یک پروتئین بازسازی کننده DNA می‌باشد که مسئول برداشت گروه آلکیل از اکسیژن موقعیت ۶ گوانین می‌باشد. متیله شدن پروموتور این ژن، باعث خاموشی اپی ژنتیک و اختلال در بازسازی DNA می‌گردد (۴). بیمارانی که پروموتور ژن MGMT آن‌ها متیله شده بود تحت درمان با تموزولومید و رادیوتراپی قرار گرفتند، متوسط بقا این بیماران ۲۱/۷ ماه گزارش گردید. در مقابل متوسط بقا در بیماران بدون متیله شدن پروموتور ژن MGMT که همین درمان ترکیبی را دریافت کرده بودند، ۱۵/۳ ماه گزارش شد (۴).

راهبردهای^{۱۶} ایمونوتراپی برای گلیوما: اثربخشی بالینی

در طول دهه گذشته در جهت درمان GBM از ناقلین ژن درمانی استفاده شد. بسیاری از آن‌ها سبب عرضه موضعی سایتوکاین‌های پیش التهابی می‌شوند که باعث جذب سلول‌های التهابی به توده توموری می‌گردد (به عنوان مثال: Flt3L) یا سیستم ایمنی میزبان را تحریک می‌کند (به عنوان مثال: اینترلوکین-۱۲)^{۲۱} و یا اینکه به صورت مستقیم اثرات ضد توموری را اعمال می‌کنند (اینترفرون آلفا)^{۲۲}. همچنین مهار سایتوکاین‌های سرکوب‌کننده‌ای مانند TGF-β^{۲۳} و FasL^{۲۰} مورد بررسی قرار گرفته است. در اینجا اثربخشی و بی‌خطر بودن این رویکردهای ژن درمانی به واسطه ایمنی مورد بحث قرار خواهد گرفت (۵).

بیان موضعی سایتوکاین Flt3L

لیگاند تیروزین کیناز شبه FMS، فاکتور رشد برای پیش سازهای خونی می‌باشد که باعث گسترش و تمایز سلول‌های دندرتیک می‌شود. استفاده داخل جمجمه‌ای ناقل آدنوویروسی کد کننده این سایتوکاین (Ad-Flt3L) باعث گسترش و انتشار سلول‌های دندرتیک و ورود آن‌ها به پارانشیم مغز می‌گردد. تزریق داخل توموری Ad-Flt3L به طور قابل توجهی تعداد سلول‌های دندرتیک و دیگر سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن GBM را در مغز موش‌های صحرایی و موش‌ها افزایش می‌دهد. اگرچه کاربرد Ad-Flt3L به عنوان یک عامل درمانی باعث مهار تومور در مدل‌های پیش

¹³ Stupp

¹⁴ Methyl guanine methyl transferase

¹⁵ Marker

¹⁶ Strategies

¹⁷ Interleukin 12

¹⁸ Interferon alpha

¹⁹ Transforming growth factor beta

²⁰ Fas ligand

²¹ High-mobility group box 1

²² Toll-like receptor 2

²³ Thymidine kinase

²⁴ Ganciclovir

²⁵ Cyclophilin seven suppressor

افزایش می‌دهد که آن را یک هدف جذاب برای ایمونوتراپی GBM قرار می‌دهد. اگرچه استفاده سیستمیک از آن به علت سمیت این سایتوکاین محدود است، به کارگیری موضعی IL-2 به استفاده متوالی داخل مجسمه‌ای نیاز دارد (۱۳).

ناقل‌های ژن درمانی ابزارهای مناسبی برای عرضه طولانی مدت این سایتوکاین در مغز هستند. برای عرضه IL-2 حامل‌های ژن درمانی در ترکیب با راهبردهای پروآپتوتیک، به منظور تحریک و افزایش ایمنی ضد GBM مورد استفاده قرار گرفته‌اند. پلاسمیدها و ویروس‌های واکسینای کد کننده IL-2 و مولکول‌های پروآپتوتیک p53 و Bax به صورت درون توموری در گلیومای موش صحرایی C6 و موش‌های nude استفاده شدند. لازم به ذکر است که این درمان‌ها با عملکرد ضد توموری و بدون اثرات جانبی در مدل حیوانی فاقد هر گونه ایمنی مشاهده گردیدند (۱۴). یک حامل آدنو ویروسی کد کننده IL-2 در ترکیب با Ad-TK و Ad-Flt3L برای درمان GBM در موش صحرایی مدل RG2 مورد استفاده قرار گرفت (۱۵).

موش‌های صحرایی مبتلا به تومورهای RG2 داخل مجسمه‌ای یک مدل چالش برانگیز در درمان GBM بوده‌اند، چرا که این تومورها نشان دادند که به بیشتر رویکردهای درمانی از جمله رادیوتراپی، شیمی درمانی و ایمونوتراپی مقاوم‌اند. بیان بالای IL-2 درون ریز محیط تومور RG2، سلول‌های T فاکتور را تحریک می‌کند و مانع از نفوذ سلول‌های T تنظیمی شده و پاسخ‌های ایمنی ضد توموری به واسطه CTL را افزایش می‌دهد و هنگامی که با Ad-Flt3L+Ad-TK ترکیب می‌شود به طور موفقیت آمیزی میانگین بقای موش‌های صحرایی مبتلا به تومور RG2 را افزایش می‌دهد (۱۵).

سایر سایتوکاین‌ها

راهبرد دیگر برای عرضه ژن درمانی به تومورهای مغزی، استفاده از سلول‌های بنیادی عصبی (NSCs)^{۲۶} می‌باشد، این سلول‌ها شبیه به سلول‌های GBM فعالیت مهاجرتی درون پارانشیم مغز دارند (۱۶). به کارگیری NSCs برای عرضه سایتوکاین‌های پیش التهابی مانند IL-4 و IL-12 در گلیوماهای داخل مجسمه‌ای موش و موش صحرایی در محیط In vivo منجر به کاهش حجم تومور GBM گردید. سلول‌های بنیادی عصبی با ترشح کننده IL-2 در ارتباط هستند که این امر سبب افزایش نفوذ سلول‌های T به میکروستلایتهای تومور می‌گردد که در نهایت منجر به افزایش ایمنی ضد توموری می‌گردد. بنابراین فعالیت سلول‌های بنیادی عصبی جهت از بین بردن سلول‌های گلیومای منتشر شونده می‌تواند استفاده شود (۱۷). اگرچه از لحاظ سمیت عصبی نیاز به ارزیابی‌های بیشتر است ولی به کارگیری موضعی NSCs به عنوان یک ابزار مفید برای عرضه سایتوکاین‌های درمانی برای درمان GBM در حال بررسی است. ژن درمانی به واسطه بیان بالای سایتوکاین‌های پیش التهابی نیز می‌تواند به منظور افزایش اثربخشی واکسن‌های ضد گلیومایی مورد استفاده قرار گیرد (۱۸).

تومور به وسیله جراحی به محل تومور تزریق می‌گردد، ارزیابی‌های پاراکلینیکی و نوروپاتولوژی در پارانشیم مغز سالم در سنجش کارایی درمان‌های نهایی برای GBM ضروری و حیاتی می‌باشد.

تزریق داخل مجسمه‌ای Ad-Flt3L و Ad-TK به مغز موش‌های صحرایی و سگ‌های بدون تومور، پروفایل نورولوژیکی بسیار ایمنی را به همراه التهاب خفیف موضعی و بدون علائم سمیت عصبی نشان می‌دهد. با این وجود، استفاده از پروموتورهای قابل القاء مثل عنصر پاسخ‌گو به ترانسایکالین (TRE)^{۲۷}، به کنترل بیان ترانس ژن در شرایطی که اثرات جانبی ایجاد شوند، کمک می‌کند. در سلول‌های GBM انسان، سگ و موش بیان ژن Flt3L با استفاده از پروموتور TRE از طریق کنترل ترانس ژن به شدت قابل تنظیم است که امنیت و بی‌خطر بودن این نوع درمان را افزایش می‌دهد و به طور اختصاصی اثرات ضد توموری را القاء می‌کند (۹۰، ۹۱).

اینترفرون‌های نوع ۱

دریافت IFN- α به عنوان روشی برای درمان GBM ارزیابی شده است. IFN- α به عنوان یک هدف نوین برای درمان GBM از نظر اثرات آن روی ایمنی ضد تومور، عروق زایی و تکثیر سلول توموری مورد توجه است. IFN- α به عنوان فاکتور ضد خون سازی در مدل‌های GBM درون مجسمه‌ای پیش کلینیکی عمل می‌کند. IFN- α همچنین یک محرک قوی برای سیستم ایمنی است چرا که سلول دندریتیک را فعال می‌نماید و بیان II و MHC^{۲۸} را تنظیم و پاسخ‌های ایمنی را افزایش می‌دهد. اگرچه به کارگیری Ad-IFN- α به تنهایی اثر درمانی مفیدی در تومورهای CNS-1 ندارد اما اشتراک آن با Ad-TK منجر به کاهش تومور و زنده ماندن طولانی در حدود ۵۰٪ حیوانات می‌شود. همچنین به کارگیری IFN- β به عنوان راهبرد درمانی GBM مورد بررسی قرار گرفته است (۷).

اگرچه IFN- α سایتوکاینی است که برای درمان سرطان مورد آزمایش قرار گرفته است، لیکن سمیت قابل توجه آن باعث محدودیت استفاده از این سایتوکاین شده است. به کارگیری IFN- α در مغز سالم موش صحرایی به التهاب موضعی و از دست رفتن بافت مغز، نکروز، خونریزی و اثرات جانبی سیستمیک منجر شد (۶). استفاده از پروموتورهای اختصاصی سلولی و قابل القاء ممکن است قابلیت بی‌خطری این رویکرد را افزایش دهد، همان طور که باعث کنترل زمانی و توپوگرافی بیان ترانس ژن می‌شوند (۱۱). به تازگی یک پروموتور دوگانه اختصاصی گلیال و القاء شده با هایپوکسی مطرح شده است. در این ناقل ترانس ژن اختصاصی دوگانه، بیان ژن نستین^{۲۹} به وسیله پروموتور SV40^{۳۰} و تقویت کننده ایتروپویتینی برای سلول‌های گلیال و بیان ژن اختصاصی هایپوکسی کنترل می‌شود (۱۱). پروموتورهای قابل القاء با اشعه نیز ابزارهای مناسبی برای محدود کردن سمیت این روش‌ها هستند (۱۲).

اینترفرون‌های نوع ۲

IL-2 یک سایتوکاین اختصاصی Th1^{۳۱} است و از سلول‌های CD8+T آزاد شده و ایمنی ضد توموری را با واسطه CTL^{۳۲}

^{۲۶} Tetracycline response elements

^{۲۷} Major histocompatibility complex (MHC)

^{۲۸} Nestin

^{۲۹} Simian virus 40

^{۳۰} T-helper cell 1

^{۳۱} Cytotoxic T lymphocytes

^{۳۲} Neural stem cells

را کاهش می‌دهد و نفوذ موضعی سلول‌های T را در مدل‌های حیوانی GBM در محیط *In vivo* افزایش می‌دهد. روی هم رفته، این یافته‌ها نشان می‌دهند که عرضه ژن درمانی با واسطه decorin ممکن است یک عامل مکمل مفید برای درمان GBM را اثبات کند.

ایمونوتراپی‌های گلیوما: آزمایش‌های بالینی

در طول قرن گذشته حدس و گمان‌هایی وجود داشته‌است که سیستم ایمنی نقش مهمی در بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما بازی می‌کند. گزارش‌های موردی نشان می‌دهند که عفونت‌های پس از عمل جراحی به ارتقای بقاء بیماران گلیوبلاستوما منجر می‌گردد (۲۲).

De Bonis و همکاران در سال ۲۰۱۱ سابقه‌ای از ۱۹۷ بیمار منتشر کردند که تحت عمل کرایوتومی به دلیل گلیوبلاستوما قرار گرفته بودند (۲۳). عفونت‌های پس از جراحی در ۵٪ از بیماران مشاهده شد و مشخص گردید که این دسته از بیماران مزیت ۱۵ ماه بقاء را در مقایسه با کرایوتومی‌های گلیوبلاستوما غیر عفونی داشتند. امروزه مشخص شده است که بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما سیستم ایمنی کم و بیش سرکوب شده‌ای دارند و درجه سرکوب ارتباط معکوس با بقای این بیماران دارد (۲۳). با توجه به این مشاهدات و با هدف قرار دادن هر دو ایمنی فعال و تطابق، درمان‌های جدیدی برای بیماران گلیوبلاستوما ارائه شده است.

ایمونوتراپی علیه گلیوبلاستوما بدخیم

ایمونوتراپی بر اساس سلول (که به‌عنوان ایمنی تطابقی نیز شناخته می‌شود) شامل به‌کارگیری سلول‌های ایمنی فعال شده در محیط *Ex vivo*، در بدن فرد بیمار به‌طور داخل وریدی و یا از راه کاشتن و وارد کردن آن‌ها در حفره توموری می‌باشد. سلول‌های کشنده طبیعی فعال شده توسط لنفوسیت‌ها، اولین سلول‌هایی بودند که در آزمایش‌ها و بررسی‌های بالینی در بیماران گلیوبلاستوما استفاده شدند. این سلول‌ها از لنفوسیت‌های خون محیطی کشت داده شده با IL-2 جمع‌آوری می‌گردند. این فرایند منجر به تولید سلول‌های T سایتوتوکسیک و سلول‌هایی می‌گردد که قادر به تهاجم و حمله سیستماتیک بوده اما به‌طور اختصاصی بر علیه سلول‌های گلیوبلاستوما عمل نمی‌کنند. فاز اول آزمایش‌های بالینی با استفاده از این روش تا حد زیادی بی‌اثر بوده است (۲۴).

دیلمان و همکاران نتایج بررسی‌ها بر روی ۳۶ بیمار را منتشر کردند که لنفوکاین اتولوگ سلول‌های کشنده طبیعی فعال شده دریافت کرده بودند. میانگین بقاء ۲۰ ماهه در ۷۵٪ بیماران در یک سال گزارش شد (۲۴، ۲۵). رویکرد دیگر استفاده از لنفوسیت‌های T سایتوتوکسیک آلونژیک تحریک شده به‌وسیله سلول‌های اتولوگ تومور به‌عنوان یک منبع آنتی ژنی می‌باشد. در آزمایش‌های بالینی لنفوسیت‌ها از خون محیطی و گره‌های لنفاوی پس از تزریق محیطی سلول‌های توموری اتولوگ غیر فعال شده با اشعه و GM-CSF جمع‌آوری شدند. این سلول‌ها سپس در محیط *In vitro* فعال شده و دوباره به بیماران تزریق شدند (۲۶).

بررسی واکسن علیه گلیوماهای بدخیم

روش‌های مبتنی بر واکسن که ایمنی فعال را بر علیه گلیوبلاستوما فعال می‌کنند، در آزمایش‌های بالینی با استفاده از درمان‌هایی بر

واکسن‌های سلولی تومور 9L rat GBM برای تولید IL-4 و TK و به‌منظور درمان GBM داخل جمجمه‌ای طراحی شده‌اند. ایمونیزاسیون زیر جلدی موش‌های صحرایی با سلول‌های اشعه ندیده 9L-IL-4 یا 9L-IL-4-TK به دنبال درمان گانسیکلوویر موش‌های صحرایی، سبب ممانعت از ورود تومورهای تیپ وحشی 9L به درون جمجمه می‌شود (۱۸). درمان خفیف اما مداوم (۳ روزه) تومورهای 9L داخل جمجمه‌ای، ایمنی ضد توموری سلولی را القاء کرده و باعث بقای طولانی مدت (بیش از ۱۰۰ روز) در ۴۵-۲۵٪ موش‌های صحرایی گردید (۱۸) که نشان‌دهنده این است که ژن درمانی به‌واسطه طراحی واکسن‌های ضد تومور ممکن است ایمنی ضد توموری را افزایش دهد.

مهار سرکوب ایمنی با واسطه TGF-β

یکی از مولکول‌های سرکوبگر سیستم ایمنی تولید شده به‌وسیله سلول‌های GBM، فاکتور TGF-β می‌باشد که باعث مهار تکثیر و فعال شدن سلول‌های B و T می‌شود. این سایتوکاین ترشح مولکول‌های پیش التهابی را کاهش می‌دهد و باعث کاهش بیان MHC II در سلول‌های GBM می‌شود. به‌منظور فایق آمدن بر GBM، تلاش‌های بسیاری با استفاده از روش‌های مختلف ژن درمانی برای محدود کردن فعالیت TGF-β صورت گرفته است. عرضه سیستمیک اولیگونوکلوئیدهای آنتی سنس TGF-β (سکانس‌های مکمل TGF-β بر روی DNA) با استفاده از نانو ذرات پلی بوتیل سیانو آکریلات^{۳۳} در موش‌های مبتلا به F98 GBM به‌صورت داخل جمجمه‌ای، به‌منظور ارتقاء پاسخ ایمنی ضد توموری به‌وسیله ایمونیزاسیون محیطی با سلول‌های توموری آلوده با ویروس بیماری نیوکاسل^{۳۴} انجام شده است (۱۹). اگرچه این درمان به بقای طولانی مدت منجر نمی‌گردد، اما میانگین بقای موش‌های صحرایی مبتلا به تومور را ارتقاء می‌دهد و به افزایش سطوح سلول‌های T فعال شده ختم می‌گردد که بیان‌کننده این مطلب است که محدود کردن TGF-β ممکن است به عنوان یک راهبرد کمکی سیستم ایمنی، ارزش درمانی داشته باشد (۲۰).

راهبرد دیگر برای محدود کردن TGF-β، بیان بالای گیرنده‌های محلول TGF-β می‌باشد که برای باند شدن لیگاند به گیرنده خود رقابت می‌کند و سبب مهار اثرات TGF-β می‌گردد و عرضه گیرنده‌های محلول TGF-β با استفاده از ناقلین آدنوویروسی، رشد GBM انسانی پیوند شده به موش *nude* در محیط *In vivo* را به تأخیر می‌اندازد (۲۱). اگرچه در این مدل توموری اثرات ایمنی این راهبرد قابل ارزیابی نیست، بررسی اثرات مستقیم ضد توموری محدود کردن با استفاده از این ناقل در GBM مدل‌های موشی سینژنیک^{۳۵} مربوطه اطلاعات معتبرتری را عرضه می‌نماید (۲۲).

تلاش‌هایی برای مسدود کردن فعالیت TGF-β به‌وسیله بیان بالای decorin (یک پروتئوگلیکان کوچکی است که باعث غیر فعال شدن TGF-β می‌گردد)، با استفاده از ناقلین آدنوویروسی در مدل موش صحرایی صورت گرفته است. بیان decorin به‌وسیله پروموتور hCMV^{۳۶} و پروموتور GFAP^{۳۷} اختصاصی سلول گلیال کنترل می‌گردد (۲۲). بیان بالای decorin، پیشرفت گلیوما را در محیط *In vivo* کند می‌کند و همچنین بیان بالای decorin فعالیت زیستی و بیان در سلول‌های سرطان انسانی در *In vitro*

³³ Poly n-butyl cyanoacrylate

³⁴ Newcastle disease virus

³⁵ Syngeneic

³⁶ Human cytomegalovirus

³⁷ Glial fibrillary acidic protein

TGF- β و میانگین کلی بهبود مرتبط است (۲۸).

تحقیقات در دهه گذشته نشان داده که ایمونوتراپی برای گلیوما بدخیم یک پاسخ ایمنی را به راه می‌اندازد. سؤالات زیادی در این مورد باقی مانده است، به‌ویژه اینکه آیا این درمان‌ها به‌راستی بقاء بیماران را بهبود می‌بخشد. وجود اختلافات در روش‌ها و پروتکل‌های درمانی، تعداد محدود بیماران و عدم وجود آزمایش‌ها و بررسی‌های وسیع بالینی، سدی در برابر پاسخ به این پرسش‌های مهم شده است. همچنان که دانش ایمونوتراپی افزایش می‌یابد، ما امید به درک بهتر اثرات بدخیمی گلیوما بر روی سیستم ایمنی و توسعه راهبردهای درمانی جدید برای بهبود پیامدهای درمانی داریم (۳۰، ۲۹).

نتیجه‌گیری

GBM باوجود پیشرفت در روش‌های درمانی، مثل جراحی مغز، رادیوتراپی و شیمی‌درمانی، همچنان با چالش‌های درمانی عمده‌ای مواجه می‌باشد. افزایش ایمنی سیستم میزبان به‌طور خاص برای از بین بردن سلول‌های توموری در مغز بدون آسیب به نواحی سالم اطراف تومور، از جمله تحقیقات رو به پیشرفت می‌باشد. از ویژگی‌های GBM، تهاجمی بودن آن و این واقعیت است که تومور همیشه اتفاق می‌افتد. بررسی‌های اخیر نشان داده‌اند که روش‌های ایمونوتراپی، پتانسیل یافتن و از بین بردن نفوذ سلول‌های GBM در مغز را دارند.

علاوه بر این، ایمونوتراپی به‌واسطه سلول‌های T خاطره‌ای خاص تومور که قابلیت ریشه‌کن کردن عود تومور را دارند، دارای پتانسیل فوق‌العاده‌ای برای درمان مؤثر GBM است. آن‌ها می‌توانند به همراه درمان‌های کنونی به کار گرفته شوند. اگرچه چندین راهبرد مؤثر در مدل‌های حیوانی به‌صورت بالینی در GBM ثابت شده است اما این مطالعات هنوز به مرحله آزمایش‌های بالینی انسانی نرسیده‌اند. انتظار می‌رود که یافته‌های گزارش شده در این حوزه بررسی‌ها و اجرای آزمایش‌های بالینی بیشتر را تحریک نماید.

اساس سلول یا پپتید صورت می‌گیرد. واکسیناسیون با سلول‌های دندریتیک یکی از درمان‌هایی است که به‌طور وسیع مطالعه شده است. تا به امروز ۲۰ فاز آزمایش‌های بالینی I و II شامل واکسن‌های DC^{۳۸}، برای بیماران بزرگسال گلیوبلاستوما منتشر شده است. در اکثر مطالعات بالینی سلول‌های دندریتیک با استفاده از تمایز مونوسیت‌های خون محیطی با IL-4 و GM-CSF کشت داده شده‌اند. اگرچه در پژوهش‌های مختلف، ترکیبی از عوامل دیگر شامل آگونیست گیرنده TLR، TNF α ، IL1 β و IFN γ برای بلوغ سلول‌های دندریتیک استفاده شده است. هرچند منبع آنتی ژنی در میان آزمایش‌ها متغیر است، اما به‌طور معمول دربرگیرنده عصاره اتولوگ تومور، پپتیدهای اختصاصی تومور، mRNA های جدا شده از عصاره تومور یا پپتیدهای حاصل از تومور اتولوگ می‌باشند.

واکسن‌ها بیشتر به‌صورت زیر جلدی، داخل جلدی یا داخل جمجمه‌ای تزریق می‌گردند. به نظر می‌رسد واکسن‌های DC به‌خوبی تحمل می‌شوند و دارای حداقل اثرات سمی درجه II نظیر بیماری شبه آنفولانزا، سردرد و غیره می‌باشند. در حال حاضر تنها یک فقره از ادم پریتومورال و بی‌حسی در مقالات گزارش شده است. به نظر می‌رسد ایمونوتراپی با استفاده از سلول‌های دندریتیک اثر مفیدی در برخی از بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما دارد، از ۲۰ گزارش منتشر شده، ۱۳ مورد بقاء در مقایسه با گروه کنترل نشان داده شده است.

یاماناکا و همکاران نتایج فاز II/II، ۲۴ بیمار با گلیوبلاستومای جدید یا راجعه که سلول‌های اتولوگ تومور همراه با DC + هموسیانین دریافت کرده بودند را منتشر ساختند. این سلول‌ها یا به‌صورت داخل جلدی به‌تنهایی یا به‌صورت داخل جلدی همراه با تزریق داخل جمجمه‌ای به کار گرفته شدند. نتایج مطالعه ارتقاء بقاء را در بیمارانی که هم تزریق زیر جلدی و هم داخل جمجمه‌ای گرفته بودند و همین‌طور بیماران واکسینه شده با DC های بالغ گزارش کردند (۲۷). Liao و همکاران نشان دادند که یک پاسخ ایمونولوژیکی در بیمار (نفوذ سلول T به درون بافت) با کاهش

منابع

1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007; 114(2): 97-109.
2. Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL. Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin.* 2007; 25(4): 867-90.
3. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005; 352(10): 987-96.
4. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005; 352(10): 997-1003.

5. Choi C, Gillespie GY, Van Wagoner NJ, Benveniste EN. Fas engagement increases expression of interleukin-6 in human glioma cells. *J Neurooncol.* 2002; 56(1): 13-9.
6. Candolfi M, Yagiz K, Foulad D, Alzadeh GE, Tesarfreund M, Muhammad AK, et al. Release of HMGB1 in response to proapoptotic glioma killing strategies: efficacy and neurotoxicity. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(13): 4401-14.
7. King GD, Kroeger KM, Bresee CJ, Candolfi M, Liu C, Manalo CM, et al. Flt3L in combination with HSV1-TK-mediated gene therapy reverses brain tumor-induced behavioral deficits. *Mol Ther.* 2008; 16(4): 682-90.
8. Tsurushima H, Yuan X, Dillehay LE, Leong KW. Radioresponsive tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) gene therapy for malignant

³⁸ Dendritic cell vaccines

brain tumors. *Cancer Gene Ther.* 2007; 14(8): 706-16.

9. Jarboe JS, Johnson KR, Choi Y, Lonser RR, Park JK. Expression of interleukin-13 receptor alpha2 in glioblastoma multiforme: implications for targeted therapies. *Cancer Res.* 2007; 67(17): 7983-6.

10. Debinski W, Gibo DM, Obiri NI, Kealiher A, Puri RK. Novel anti-brain tumor cytotoxins specific for cancer cells. *Nat Biotechnol.* 1998; 16(5): 449-53.

11. Kim HA, Park JH, Cho SH, Lee J, Lee M. Glia/ ischemia tissue dual specific gene expression vector for glioblastoma gene therapy. *J Control Release.* 2011; 152 Suppl 1: e146-8.

12. Tsurushima H, Yuan X, Dillehay LE, Leong KW. Radioresponsive tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) gene therapy for malignant brain tumors. *Cancer Gene Ther.* 2007; 14(8): 706-16.

13. Chen B, Timiryasova TM, Andres ML, Kajioka EH, Dutta-Roy R, Gridley DS, et al. Evaluation of combined vaccinia virus-mediated antitumor gene therapy with p53, IL-2, and IL-12 in a glioma model. *Cancer Gene Ther.* 2000; 7(11): 1437-47.

14. Haghighat P, Timiryasova TM, Chen B, Kajioka EH, Gridley DS, Fodor I. Antitumor effect of IL-2, p53, and bax gene transfer in C6 glioma cells. *Anticancer Res.* 2000; 20(3A): 1337-42.

15. Mineharu Y, King GD, Muhammad AK, Bannykh S, Kroeger KM, Liu C, et al. Engineering the brain tumor microenvironment enhances the efficacy of dendritic cell vaccination: implications for clinical trial design. *Clin Cancer Res.* 2011; 17(14): 4705-18.

16. Aboody KS, Brown A, Rainov NG, Bower KA, Liu S, Yang W, et al. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(23): 12846-51.

17. Vetter M, Hofer MJ, Roth E, Pircher HP, Pagenstecher A. Intracerebral interleukin 12 induces glioma rejection in the brain predominantly by CD8+ T cells and independently of interferon-gamma. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009; 68(5): 525-34.

18. Okada H, Giezeman-Smits KM, Tahara H, Attanucci J, Fellows WK, Lotze MT, et al. Effective cytokine gene therapy against an intracranial glioma using a retrovirally transduced IL-4 plus HSVtk tumor vaccine. *Gene Ther.* 1999; 6(2): 219-26.

19. Schneider T, Becker A, Ringe K, Reinhold A, Firsching R, Sabel BA. Brain tumor therapy by combined vaccination and antisense oligonucleotide delivery with nanoparticles. *J Neuroimmunol.* 2008; 195(1-2): 21-7.

20. Bahrami AA, Ghaemi A, Tabarraei A, Sajadian A, Gorji A, Soleimanjahi H. DNA vaccine encoding HPV-16 E7 with mutation in L-Y-C-Y-E pRb-binding motif induces potent anti-tumor responses in mice. *J Virol Methods.* 2014; 206: 12-8.

21. Naumann U, Maass P, Gleske AK, Aulwurm S, Weller M, Eisele G. Glioma gene therapy with soluble transforming growth factor-beta receptors II and III. *Int J Oncol.* 2008; 33(4): 759-65.

22. Biglari A, Bataille D, Naumann U, Weller M, Zirger J, Castro MG, et al. Effects of ectopic decorin in modulating intracranial glioma progression in vivo, in a rat syngeneic model. *Cancer Gene Ther.* 2004; 11(11): 721-32.

23. De Bonis P, Albanese A, Lofrese G, de Waure C, Mangiola A, Pettorini BL, et al. Postoperative infection may influence survival in patients with glioblastoma: simply a myth? *Neurosurgery.* 2011; 69(4): 864-8; discussion 868-9.

24. Dillman RO, Duma CM, Ellis RA, Cornforth AN, Schiltz PM, Sharp SL, et al. Intralesional lymphokine-activated killer cells as adjuvant therapy for primary glioblastoma. *J Immunother.* 2009; 32(9): 914-9.

25. Tsuboi K, Saijo K, Ishikawa E, Tsurushima H, Takano S, Morishita Y, et al. Effects of local injection of ex vivo expanded autologous tumor-specific T lymphocytes in cases with recurrent malignant gliomas. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(9): 3294-302.

26. Plautz GE, Barnett GH, Miller DW, Cohen BH, Prayson RA, Krauss JC, et al. Systemic T cell adoptive immunotherapy of malignant gliomas. *J Neurosurg.* 1998; 89(1): 42-51.

27. Yamanaka R, Homma J, Yajima N, Tsuchiya N, Sano M, Kobayashi T, et al. Clinical evaluation of dendritic cell vaccination for patients with recurrent glioma: results of a clinical phase I/II trial. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(11): 4160-7.

28. Liao LM, Prins RM, Kiertscher SM, Odesa SK, Kremen TJ, Giovannone AJ, et al. Dendritic cell vaccination in glioblastoma patients induces systemic and intracranial T-cell responses modulated by the local central nervous system tumor microenvironment. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(15): 5515-25.

29. Wheeler CJ, Black KL, Liu G, Mazer M, Zhang XX, Pepkowitz S, et al. Vaccination elicits correlated immune and clinical responses in glioblastoma multiforme patients. *Cancer Res.* 2008; 68(14): 5955-64.

30. Sampson JH, Archer GE, Mitchell DA, Heimberger AB, Herndon JE 2nd, Lally-Goss D, et al. An epidermal growth factor receptor variant III-targeted vaccine is safe and immunogenic in patients with glioblastoma multiforme. *Mol Cancer Ther.* 2009; 8(10): 2773-9.