

39 Protinádorová vakcína dendritickými buňkami naloženými Id proteinem u nemocných s mnohočetným myelomem – interní analýza bezpečnosti podání.

Zahradová L.^{1,2}, Očadlíková D.², Kovářová L.², Büchler T.², Krejčí M.¹, Adam Z.¹, Pour L.^{1,2}, Křivanová A.¹, Sandecká V.¹, Penka M.², Vorlíček J.¹, Michálek J.^{2,3}, Hájek R.^{1,2,3}

1) Interní hematologická klinika, FN Brno a LF MU v Brně

2) Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie (LEHABI), Oddělení klinické hematologie, FN Brno

3) Univerzitní centrum buněčné imunoterapie LF MU v Brně

1. Úvod

Nádorové buňky mají imunogenní povahu a buněčná imunita hraje při ochraně organismu proti nádorovému onemocnění jednu z klíčových rolí. Buňky imunitního systému jsou za jistých podmínek schopny nádorové buňky rozpoznat a v konečném důsledku je zničit. Jednou z perspektivních možností léčby nádorových onemocnění je proto imunoterapie, konkrétně použití protinádorových vakcín [1,2,3,4].

Ve snaze zvýšit účinnost protinádorových vakcín se v posledním desetiletí zkoušejí buněčné vakcíny, které obsahují přímo antigen prezentující buňky schopné stimulovat imunitní systém. Nejnadějnější jsou v současnosti imunoterapeutické protokoly využívající dendritické buňky (DB), které sehrávají v protinádorových vakcinacích centrální úlohu. Dendritické buňky jsou nejúčinnější buňky předkládající antigen, mají extrémní schopnost zpracovat cizorodý antigen a následně jej předložit nezadaným (naive) T lymfocytům [5,6,7]. Jedinečné vlastnosti DB prezentovat antigen mohou hrát klíčovou roli v aktivaci cytotoxických T buněk a tedy ve vyvolání specifické imunitní odpovědi proti nádorovým buňkám [8].

Plazmatické buňky u mnohočetného myelomu produkují monoklonální imunoglobulin, přičemž idiotyp (Id) myelomového imunoglobulinu (Id-protein) lze použít jako unikátní nádorově specifický antigen [9,10,11,12,13,14].

Na našem pracovišti proběhla v letech 2003-2004 klinická studie fáze II zkoušející první generaci protinádorových vakcín, kdy se pacientům s mnohočetným myelomem podával Id-protein. U pacientů byla zaznamenána imunologická odpověď (pozitivita kožního testu, zvýšení počtu paměťových B buněk), klinická odpověď na vakcinaci zaznamenána nebyla, taktéž nebyla zaznamenána významná toxicita či nežádoucí účinky vakcíny [15].

V letech 2004-2005 byla prováděna u dětských pacientů v terminální fázi solidního nádorového onemocnění vakcinace dendritickými buňkami naloženými autologním nádorovým antigenem vyrobených na našem pracovišti [16]. Ani v této studii nebyla prokázána významná toxicita vakcín.

V našem centru začala v červnu 2006 klinická studie fáze II, kde se podává pacientům s mnohočetným myelomem vakcína z dendritických buněk naložených autologním Id proteinem. Vakcinační protokol dosud dokončili 4 pacienti.

2. Soubor nemocných a metody

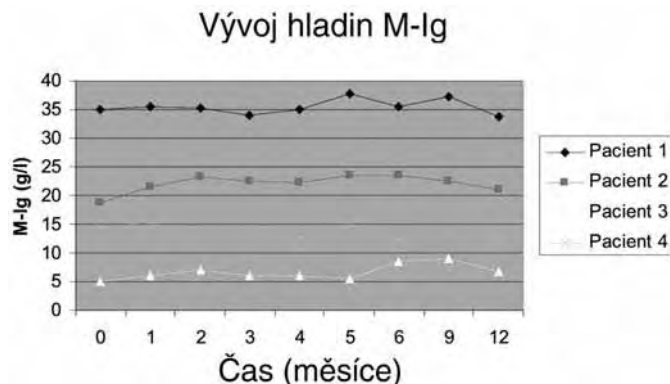
DESIGN STUDIE

Vakcína bude použita ve skupině vybraných 12 nemocných s mnohočetným myelomem se stabilním nebo s mírně aktivním onemocněním, u kterých není indikována standardní terapie. Jedná se o předléčené nemocné. Je vyžadován nejméně tříměsíční odstup od ukončené chemoterapie nebo udržovací léčby proto, aby léčebný efekt mohl být přesně změřen. Pro všechny nemocné je základní podmínkou měřitelnost onemocnění pomocí imuno elektroforézy. Vakcína je aplikována celkem šestkrát v měsíčních intervalech.

Vstupní a vylučovací kritéria studie

Vstupní kritéria: jedná se o myelom produkující měřitelné množství sérového M-Ig; hladina M-Ig je > 5 g/l; onemocnění je v platé fázi (maximálně ± 25% kolísání hladiny M-Ig v průběhu posledních 3 měsíců) nebo v pomalé progresi nevyžadující léčbu dle zvyklostí pracoviště, přičemž nemocný nedostal nejméně 3 měsíce žádnou specifickou léčbu. Při zařazení do studie nejsou splněna kritéria progresu dle platných guidelines pro mnohočetný myelom; pacient nebyl v průběhu 3 měsíců před zařazením do studie léčen glukokortikoidy; aktivita jaterních enzymů je menší než pětinašobek horní hranice normy, sérový kreatinin je menší než dvojnásobek horní hranice normy; pacient podepsal informovaný souhlas.

Vylučovací kritéria: jedná se o nesecernující nebo relabující myelom; u pacienta je přítomna další závažná choroba s negativním vlivem na délku života; nepředléčený, nově diagnostikovaný nemocný s mnohočetným myelomem; potenciální možnost otěhotnění u žen zařazených do studie; zjištěná nebo susp. precitlivělost na IL-2 a/nebo jakoukoli látku použitou při vakcinaci; pacienti s vážným srdečním onemocněním; pacienti s akutním těžkým infekčním onemocněním vyžadujícím ATB léčbu; pacienti s pO₂ méně než 60 mmHg v klidu; pacienti s vážnou dysfunkcí životně důležitých orgánů; pacienti s metastázami do CNS nebo záchvatovitým onemocněním CNS; abnormální laboratorní odchylky: leuko < 4 x 10⁹/l, trombo < 100 x 10⁹/l, hematokrit < 30%, bilirubin mimo hranice normy, kreatinin méně než dvojnásobek horní hranice normy, AST, ALT > 3x horní hranice normy



Graf 1

Vývoj hladin monoklonálního imunoglobulinu (M-Ig) v průběhu vakcinací a 6 měsíců po ukončení vakcinací.

CHARAKTERISTIKA PACIENTŮ

Z plánovaného počtu 12 pacientů byla vakcína aplikována 4 pacientům. Jednalo se o tři ženy a jednoho muže s mnohočetným myelomem typu IgG kappa s mediánem věku 63 let (60-67) a mediánem doby od stanovení diagnózy 92,5 měsíců (55-122). Ve všech případech se jednalo předléčené nemocné minimálně čtyřmi cykly chemoterapie.

PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Příprava Id proteinu

Izolace Id proteinu je provedena z periferní krve nemocných s mnohočetným myelomem technikou afinitní chromatografie. Po vysrážení imunoglobulinové frakce síranem amonným v poměru 1:1 je směs míchána 24 hod.; 4°C. Následuje centrifugace 20 min; 10 000 rpm. Získaný precipitát je rozpuštěn v minimálním množství fyziologického roztoku (PBS, pH 7,3) a dialyzován pro odstranění srážecího činidla. Při dialýze je použito dialyzační střívků (68035CY, MWCO:3,5K; BioTech), dialyzační roztok (PBS, pH 7,3), doba dialýzy 24 hod. s 3 násobnou výměnou dialyzačního roztoku. Koncentrace M-Ig v dialyzátu se stanoví imunoturbidimetricky. Vlastní izolace M-Ig afinitní chromatografií je provedena na protein-G koloně (Sigma P4691; kapacita kolony – 30 mg Ig/1 ml Proteinu G). Nenavázané frakce jsou odstraněny promytím 25-50 ml fyziologického roztoku. Eluce navázaného proteinu je provedena 0,2M glycinem (pH 2,7). Jednotlivé frakce po 0,9 ml jsou okamžitě neutralizovány přidávkou 0,1 ml 1M TRIS – baze. Obsah proteinů ve frakcích je stanoven měřením absorbance při vlnové délce 280nm. Roztok je zbaven endotoxin inkubací s Polymyxinem B (Sigma), přečištěn dialýzou a přefiltrován (0,22 µm filtr) (17). Přítomnost bakteriálních endotoxinů je vyloučena zavedením LAL testu (Limus Amebocyte Lysate, Bio Whittaker).

Příprava dendritických buněk

Dendritické buňky pacientů jsou kultivovány z mononukleárních buněk periferní krve pacientů podle podmínek GMP po dobu 9 dnů za přítomnosti GM-CSF a IL-4. V den 5+ kultivace jsou DB naloženy Id-proteinem a v den 6+ kultivace plně maturovány pomocí TNF-α. V den 0 a 9+ kultivace je měřena vitalita buněk a v den 0, 5+ a 9+ sledována jejich morfologie. Vitalita buněk v den podání má být ≥ 80%. V rámci testování bezpečnosti vakcíny je prováděno testování na přítomnost mykoplazmat (den 8+) a bakteriálního endotoxinu (den 8+) ve vakcíně. Limitní množství endotoxinu je ≤ 350 U/ml vakcíny, mykoplazmata musí být negativní. Dále je prováděno mikrobiologické testování-Gramm-Giemsovo barvení (den 8+), aerobní a anaerobní kultivace (den 5+), aerobní kultivace supernatantu po sklizení buněk (den 9+). Imunofenotypizace DB je měřena na průtokovém cytometru v den 0, 5+ a 9+ kultivace. Jsou sledovány následující povrchové markery: CD3, CD14, HLA-DR, CD80, CD86 a kombinace HLA-DR/CD80 a HLA-DR/CD86.

MONITOROVÁNÍ KLINICKÉ A IMUNOLOGICKÉ ODPOVĚDI

Klíčové bylo hodnocení léčebné účinnosti pomocí hodnot monoklonálního imunoglobulinu. Další vyšetření zahrnují vyhodnocení imunitního systému a jeho reakce na vakcínu. Stimulace specifické imunitní odpovědi je hodnocena ELISPOT-em. Nespecifická imunitní odpověď je hodnocena pomocí diferenciálního krevního obrazu a výsledků flowcytometrického panelu. Specifická imunitní reakce IV. typu je hodnocena pomocí kožního testu s Id-proteinem.

Pro objektivní zhodnocení možnosti rizika autoimunity je před zahájením vakcinace a po jejím ukončení odebrán základní panel autoimunity (protilátky anti-thyreoglobulin IgG, anti-pankreat buňky (ICA) IgG, ANA (ANF) screening, ASLO, RF, IgE celkové). Rovněž jsou zamrazeny 3 ml plazmy a 3 ml séra před zahájením vakcinace pro další případné hodnocení.

3. VÝSLEDKY

PARAMETRY VAKCÍNY

U 4 pacientů bylo podáno celkem 24 vakcín. Ze 60x10⁶ mononukleárních buněk periferní krve bylo získáno 7,8x10⁶ DB (0,89-32,0x10⁶), medián (min-max). Počet buněk byl stanoven v den 0, 5+ a 9+. Množství získaných DB bylo velmi různorodé a lišilo se jak mezi pacienty, tak mezi jednotlivými experimenty u stejného pacienta. Medián vitality všech 24 vakcín v den podání

byl 88,63% (66,0-98,0%). Bezpečnostní kritéria byla splněna u všech 24 podaných vakcín. Pro kontaminaci nebyly podány 3 vakcíny z celkového počtu 27 vyrobených.

SLEDOVÁNÍ KLINICKÉ A IMUNOLOGICKÉ ODPOVĚDI NA VAKCÍNU

Základním parametrem při sledování klinické odpovědi na vakcinaci je koncentrace M-Ig v séru pacientů. U 3 pacientů přetrvávala fáze plató, u 1 pacienta pomalá progresse onemocnění (graf 1). U 75% pacientů (3/4) byla zaznamenána imunologická odpověď měřená pomocí ELISPOTu (graf 2), která částečně korelovala s vývojem hladin M-Ig. Kožní test Id proteinem byl zcela negativní u pacienta č. 2, pozitivní u pacienta č. 1 a 3 a nehodnotitelný u pacienta č. 4, kdy byl kožní test pozitivní již při zahájení vakcinací. Výsledky flow cytometrického panelu není zatím možné statisticky zhodnotit vzhledem k malému počtu pacientů.

NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY A REAKCE NA VAKCÍNU

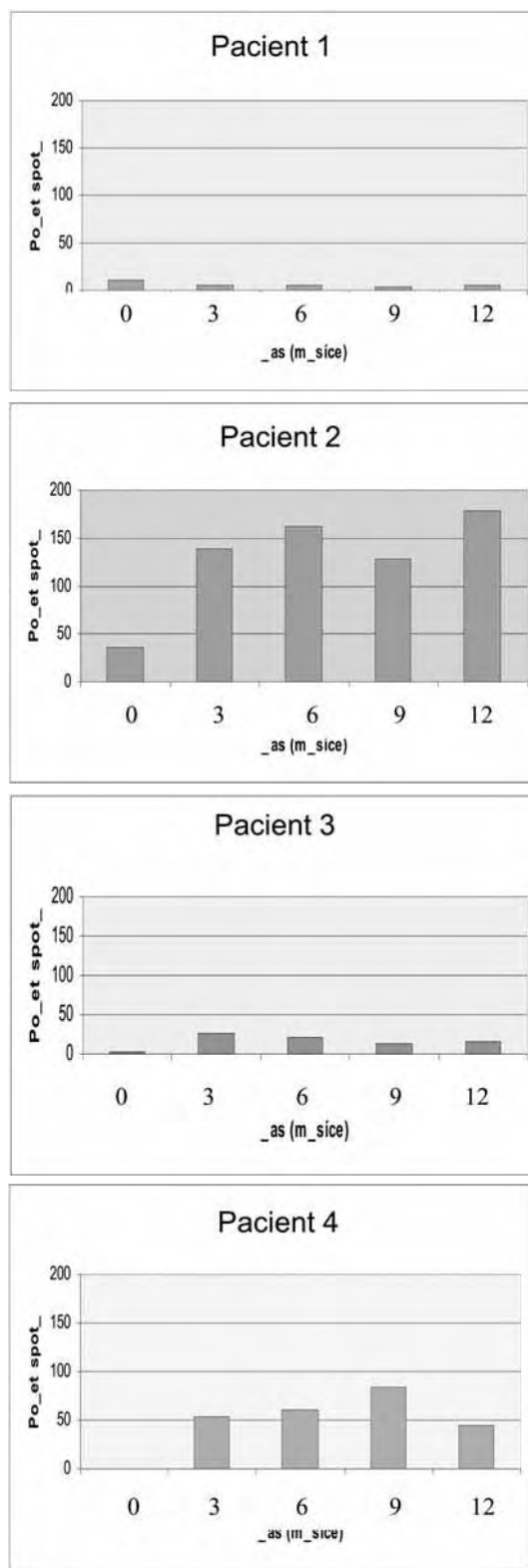
U prvních čtyřech pacientů, respektive 24 podaných vakcín, jsme v průběhu vakcinační studie nezaznamenali závažnější toxickou reakci. U 29,17% aplikací (7/24) došlo po podání vakcíny ke vzniku erytému v místě injekce, což lze v případě vakcinace považovat za žádoucí reakci, u 62,5% (15/24) aplikací došlo i ke vzniku indurace. Medián vymizení lokální reakce byl 4 dny (2-6). U jednoho pacienta byly zaznamenány subfebrilie do 37,2 °C po každém podání vakcíny.

4. Závěr

V případě prvních čtyř pacientů s mnohočetným myelomem, kteří podstoupili vakcinaci dendritickými buňkami naloženými autologním Id-proteinem nebyla zaznamenána závažnější toxická reakce po podání celkem 24 vakcín. Přestože byla zaznamenána imunologická odpověď u 75% (3/4) pacientů, klinická odpověď zjištěná nebyla, avšak interval sledování je dosud krátký a soubor pacientů malý pro validní hodnocení. Ve vnitřní analýze zaměřené na bezpečnost jsme prokázali minimální nežádoucí účinky vakcíny, v protokolu budeme tedy pokračovat do zařazení celkového plánovaného počtu 12 pacientů.

Literatura

1. Coscia M, Mariani S, Battaglio S et al. Long-term follow-up of idiotype vaccination in human myeloma as a maintenance therapy after high-dose chemotherapy. *Leukemia* 2004; 18:139-145
2. Timmerman JM, Czerwinski DK, Davis AT et al. Idiotype-pulsed dendritic cells vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune response in 35 patients. *Blood* 2002. 99:1517-1526.
3. Wiernecky J, Müller MR, Wirths S et al. Immunologic and clinical response after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients. *Cancer Res* 2006, 66(11): 5910-5918.
4. Büchler T, Musilová R, Kovářová L et al. Vakcíny v léčbě mnohočetného myelomu. *Klinická onkologie* 2002; 15 (Supl): 44-7.
5. Hart NDJ. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997, 90: 3245-3287.
6. Steinman RM. Dendritic cells and immune-based therapies. *Exp Hematol* 1996, 24: 859-862.
7. Hájek R, Butch AW. Dendritic cell biology and application of dendritic cells to immunotherapy of multiple myeloma. *Med Oncol* 2000, 17(1): 2-15.



Graf 2

Výsledky ELISPOTu u jednotlivých pacientů na začátku vakcinací a 3, 6, 9 a 12 měsíců od zahájení vakcinací.

NÁDOROVÁ IMUNOLOGIE

8. Hájek R, Křivanová A, Bourková L, et.al. Biologie dendritických buněk a jejich příprava pro klinické užití (přehled a předběžné výsledky). *Klinická onkologie* 2001, 14: 79-84.
9. Kwak LW, Taub DD, Duffey PL et al.: Transfer of myeloma idiotype-specific immunity from an actively immunised marrow donor. *Lancet* 1995, 345: 1016-1020.
10. Bergenbrant S, Yi Q, Osterborg A et al. Modulation of anti-idiotypic immune response by immunization with the autologous M-component protein in multiple myeloma patients. *Br J Haematol* 1996; 92: 840-6.
11. Osterborg A, Yi Q, Henriksson L et al. Idiotype immunization combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in myeloma patients induced type I, major histocompatibility complex-restricted, CD8- and CD4-specific T-cell responses. *Blood* 1998; 91: 2459-66.
12. Titzer S, Christensen O, Manzke O et al. Vaccination of multiple myeloma patients with idiotype-pulsed dendritic cells: immunological and clinical aspects. *Br J Haematol* 2000;108:805-16.
13. Massaia M, Borriore P, Battaglio S et al. Idiotype vaccination in human myeloma: generation of tumor-specific immune responses after high-dose chemotherapy. *Blood* 1999; 94: 673-83.
14. Cull G, Durrant L, Stainer C et al. Generation of anti-idiotypic immune responses following vaccination with idiotype-protein pulsed dendritic cells in myeloma. *Br J Haematol* 1999. 107: 648-55.
15. Zahradová L, Büchler T, Smejkalová J et al. Protinádorová vakcína s využitím monoklonálního imunoglobulinu u nemocných s mnohočetným myelomem – výsledky klinické studie fáze II. In *Klinická onkologie*, 2006, 1: 26-29.
16. Michálek J, Stejskalová A, Vidláková P et al. Prvá protinádorová vakcína na bázi dendritických buněk připravená v ČR u dětských pacientů: předběžné výsledky klinické aplikace. In Žaloudík, Jan; Vyzula, Rostislav (ed.). *Edukační sborník XXIX. Brněnské onkologické dny s XIX. Konferencí pro sestry a laboranty: 26.-28.5.2005*. Brno: Masarykův onkologický ústav, 2005, s. 299.
17. Musilová R, Táborská E, Bourková L et al. Příprava a použití nádorového antigenu z patologického imunoglobulinu pro pacienty s mnohočetným myelomem. *Transfuze a hematologie dnes* 2002; 8: 91-5.