

# VYUŽITÍ MONOKLONÁLNÍHO IMUNOGLOBULINU K PŘÍPRAVĚ PROTINÁDOROVÉ VAKCÍNY U NEMOCNÝCH S MNOHOČETNÝM MYELOMEM – PRVNÍ ZKUŠENOSTI Z KLINICKÉ STUDIE

## MONOCLONAL IMMUNOGLOBULIN-DERIVED VACCINE AGAINST MULTIPLE MYELOMA – FIRST CLINICAL EXPERIENCE

BÜCHLER T.<sup>1,2</sup>, HANÁK L.<sup>2</sup>, SMEJKALOVÁ J.<sup>2</sup>, KOVÁŘOVÁ L.<sup>2</sup>, KREJČÍ M.<sup>1</sup>, ADAM Z.<sup>1</sup>, MICHÁLEK J.<sup>2</sup>, PENKA M.<sup>2</sup>, VORLÍČEK J.<sup>1</sup>, HÁJEK R.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO

<sup>2</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FN BRNO

**Souhrn:** Idiotypové (Id) proteinové struktury monoklonálního imunoglobulinu produkovaného maligními buňkami mnohočetného myelomu jsou exprimovány na buněčném povrchu myelomových plazmatických buněk a dají se využít pro indukci nádorově specifických T lymfocytů. Vakcinace Id-proteinem je jednou z možností imunoterapie mnohočetného myelomu a jiných B-buněčných malignit s cílem vyvolat specifickou imunitní odpověď proti nádorovým buňkám. Vzniklá humorální i celulární anti-Id odpověď pak kontroluje růst myelomového klonu. V našem centru začala klinická studie fáze II, kde se Id-protein po konjugaci s imunogenním nosičem keyhole limpet hemocyanin (KLH) podává pacientům s mnohočetným myelomem. Ve druhé polovině léčby se k vakcíně přidává interleukin-2. Vakcína bude použita ve skupině vybraných 12 nemocných se stabilním onemocněním nebo s mírně aktivním onemocněním, u kterých není dále indikována standardní terapie. Během prvních vakcinací jsme neznamenali závažnější nežádoucí účinky postupu. Klinikou a imunologickou odpověď na vakcínu zatím nelze hodnotit.

**Klíčová slova:** mnohočetný myelom, vakcinace, imunoterapie, idiotyp, klinická studie

**Summary:** Malignant cells in multiple myeloma produce a monoclonal immunoglobulin which is tumor-specific and can be used for the induction of T lymphocytes. The idiotype (Id) is expressed at the cell surface of malignant plasma cells and allow the recognition and targeting of these cells by Id-specific T lymphocytes. Vaccination using Id-protein has been attempted in patients with multiple myeloma and other B cell malignancies. The induced humoral and cellular immune response controls the growth of the malignant cell clone. The aim of this therapy is to induce specific immune response directed against the tumor cells. A phase II clinical study has started in our center, investigating the efficacy and toxicity of Id conjugated with keyhole limpet hemocyanin (KLH) given as a vaccine with or without interleukin-2 to patients with multiple myeloma. The vaccine is to be used in 12 patients with stable disease or with slow progression not requiring systemic therapy. No significant toxicities were seen during the first series of vaccination. It is not yet possible to evaluate clinical and immunological responses to the vaccine.

**Keywords:** multiple myeloma, vaccination, immunotherapy, idiotype, clinical study

### Úvod

Maligní buňky u mnohočetného myelomu produkují monoklonální imunoglobulin, který nalézáme v séru pacientů. Idiotypové (Id) proteinové struktury jsou exprimovány a prezentovány hlavním histokompatibilním komplexem (MHC) na buněčném povrchu myelomových plazmatických buněk a takto jsou předkládány jako vysoce specifický antigen asociovaný s nádorem (tumor-associated antigen) (1-3). Tato prezentace Id-proteinu umožňuje předkládat maligní plazmatickou buňku jako terč pro Id-specifické T-buňky (4).

Vakcinace Id-proteinem je jednou z možností imunoterapie mnohočetného myelomu a jiných B-buněčných malignit s cílem vyvolat specifickou imunitní odpověď proti nádorovým buňkám. Vzniklá humorální i celulární anti-Id odpověď pak kontroluje růst myelomového klonu (3,5,6).

V našem centru začala s říjnu 2003 klinická studie, kde se Id-protein po konjugaci s imunogenním nosičem keyhole limpet hemocyanin (KLH) podává pacientům s mnohočetným myelomem. Jedná se o první protinádorovou vakcínu vyrobenou v České republice.

### Materiál a metody

#### Design studie

Vakcína bude použita ve skupině vybraných 12 nemocných se stabilním onemocněním nebo s mírně aktivním onemocněním,

u kterých není indikována standardní terapie. Jedná se o předléčené nemocné. Bude vyžadován nejméně tříměsíční odstup od ukončené chemoterapie nebo udržovací léčby proto, aby léčebný efekt mohl být přesně změřen. Pro všechny nemocné s MM bude základní podmínkou měřitelnost onemocnění pomocí imunoelktroforézy. Vakcína bude aplikována v měsíčních intervalech. Vždy se bude jednat o očkovací látku Id proteinu konjugovaného s KLH, imunogenním peptidem, který byl při vakcinacích již vyzkoušen (7-9). Pro první 3 podání vakcíny bude podána vakcína samotná, poté bude při následujících 3 podáních vakcína kombinovaná s interleukinem-2 (IL-2) v netoxické dávce vyzkoušené v první generaci našich imunoterapeutických protokolů (10). Cytokin je přidán ve snaze maximalizovat stimulační účinek vakcíny na buněčnou imunitu.

#### Vstupní kritéria

- jedná se o myelom produkující měřitelné množství sérového M-Ig
- hladina M-Ig je > 10 g/l
- onemocnění je v plató fázi (maximálně  $\pm 25\%$  kolísání hladiny M-Ig v průběhu posledních 3 měsíců) přičemž nemocný nedostal nejméně 3 měsíce žádnou specifickou léčbu na MM. Při zařazení do studie nejsou splněna kritéria progresu dle 4W

- pacient nebyl v průběhu 3 měsíců před zařazením do studie léčen glukokortikoidy
- aktivita jaterních enzymů je menší než pětinasobek horní hranice normy, hladina sérového kreatininu menší než dvojnásobek horní hranice normy
- pacient podepsal informovaný souhlas

#### Vylučovací kritéria

- jedná se o nesecernující myelom nebo relabující myelom
- u pacienta je přítomna další závažná choroba s negativním vlivem na délku života

#### Terapeutické schéma

Terapeutické schéma je uvedeno v tabulce 1.

**Tabulka 1. Terapeutické schéma vakcinace autologním Id-proteinem konjugovaným s KLH u pacientů s mnohočetným myelomem.**

|                         |           |                                                     |
|-------------------------|-----------|-----------------------------------------------------|
| <b>Cykklus A</b>        | Den 0     | Podání Id-KLH, min. 0.5 mg i.d.                     |
|                         | Den 1-28  | Bez léčby                                           |
| <b>Cykklus B – IL-2</b> | Den 0     | Podání Id-KLH, min. 0.5 mg i.d.                     |
|                         | Den 1-14  | IL-2 1x 10 <sup>6</sup> IU/m <sup>2</sup> 3 x týdně |
|                         | Den 15-28 | Bez léčby                                           |

#### Příprava vakciny

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 20min; 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 střívk (68035CY, MWCO:3,5K; BioTech), dialyzační roztok (PBS, pH 7,3), doba dialýzy 24 hod. s 3násobnou výměnou dialyzačního roztoku. Následuje stanovení koncentrace M-Ig v dialyzátu imunoturbidimetricky. Vlastní izolace M-Ig afinitní chromatografií je provedena na protein-G koloně (Sigma P4691; kapacita kolony-30mg Ig/1ml Proteinu G). Vzorek je na kolonu nanesen v množství, které odpovídá kapacitě kolony. Nenavázané frakce jsou odstraněny promytím 25-50 ml fyziologického roztoku (PBS, pH 7,3). Eluce navázaného proteinu je provedena 0,2M glycínem (pH 2,7). Jsou odebírány jednotlivé frakce po 0,9 ml, které jsou okamžitě neutralizovány přidávkou 0,1ml 1M TRIS – baze. Obsah proteinů ve frakcích je stanoven na základě měření absorbance při vlnové délce 280 nm. Dále je provedena 4 hodinová inkubace s ekvivalentním množstvím proteinu KLH (Sigma) za přítomnosti 0,1% glutaraldehydu (Sigma). Výsledný konjugát je zbaven endotoxinu inkubací s Polymyxinem B (Sigma). Následuje přečištění dialýzou a přefiltrování (0.22 µm filtr) konjugátu (11). Případná přítomnost bakteriálních endotoxinů je vyloučena zavedením LAL testu (Limus Amebocyte Lysate, Bio Whittaker).

#### Monitorování klinické a imunologické odpovědi

Vyšetření zahrnují vyhodnocení imunitního systému a jeho reakce na vakcínu, klíčové je hodnocení léčebné účinnosti (Tabulka 2). Stimulace specifické imunitní odpovědi je hodnocena proliferacím testem mononukleárních buněk v přítomnosti antigenu (thymidinový test) a ELISPOT-em. Nespecifická imunitní odpověď bude hodnocena pomocí diferenciálního krevního obrazu a výsledků flowcytometrického panelu. Specifická imunitní reakce IV. typu je hodnocena pomocí kožního testu s Id-proteinem a KLH. Současně je odebrán základní panel autoimunity pro objektivní zhodnocení možnosti rizika autoimunity (protilátky anti-thyreoglobulin IgG, ANA (ANF) screening, RF, IgE celkové).

**Tabulka 2. Plán vyšetření u vakcinovaných pacientů.**

| Měsíce po 1. podání vakcíny | MM základ | Flow panel | Proliferační testy | ELISPOT | Kožní test | Sternální punkce |
|-----------------------------|-----------|------------|--------------------|---------|------------|------------------|
| Vstup*                      | +         | +          | +                  | +       | +          | + <sup>f</sup>   |
| 1. měsíc                    | +         | +          | +                  |         | +          |                  |
| 2. měsíc                    | +         |            |                    |         | +          |                  |
| 3. měsíc                    | +         | +          | +                  | +       | +          |                  |
| 4. měsíc                    | +         |            |                    |         | +          |                  |
| 5. měsíc                    | +         |            |                    |         | +          |                  |
| 6. měsíc*                   | +         | +          | +                  | +       | +          | + <sup>f</sup>   |
| 9. měsíc                    | +         | +          | +                  | +       | +          |                  |
| 12. měsíc                   | +         | +          | +                  | +       | +          | + <sup>f</sup>   |

f – fakultativně, \* – odebrán výstupní test autoimunity stejný jako vstupní test

MM základ = KO + Urea, Kr, Na, K, Cl, Ca, CB, alb., všechny jaterní enzymy, kys. močová, dále na žádance na spec. vyš. bílkovin: denzita M-Ig v séru a v moči, CRP, beta-2 mikro, a také moč + sediment.

Flowcytometrický panel: panel protilátek pro antigeny T buněk (CD3, CD5, kombinace CD4/8) NK buněk (kombinace CD16/CD56), B buněk (kombinace CD19/CD20), monocytů (CD14), dendritických buněk (kombinace CD83/DR/11c a CD83/DR/123).

Kožní test: sleduje se kožní reakce na podání vakcíny, bude se sledovat erytém a indurace po 24 a 48 hodinách.

Rovněž jsou zamraženy 10 ml plazmy, 10 ml séra a 1x10<sup>6</sup> mononukleárních buněk před zahájením vakcinace pro potřebu dalšího hodnocení.

#### Výsledky

##### Charakteristika pacientů

Charakteristika pacientů ve studii je uvedena v tabulce 3.

**Tabulka 3. Charakteristika pacientů.**

|                                               |                                                                                                                                                  |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Počet pacientů</b>                         | 12 (9 žen, 3 muži)                                                                                                                               |
| <b>Věk (medián, rozsah)</b>                   | 62 (48-76) let                                                                                                                                   |
| <b>Typ myelomu</b>                            | 8 IgG kappa, 4 IgG lambda                                                                                                                        |
| <b>Doba od stanovení dg. (medián, rozsah)</b> | 59 (13-108) měsíců                                                                                                                               |
| <b>Předchozí léčba</b>                        | medián 8 (4-14) cyklů chemoterapie<br>5 pacientů 1 x SCT, 2 pacientů 2x SCT<br>UL: 9 pac. IFN, 1 pac. DEX, 2 pac. thalidomid                     |
| <b>Vstupní stav nemoci (medián, rozsah)</b>   | Mlg: 14,6 (10,2-34,2) g/l<br>albumin: 42,4 (36,4-46,4) g/l<br>beta 2-mikroglobulin: 2,1 (1,1-4,1) mg/l<br>infiltrace kostní dřeně: 2,4 (0-10,8)% |

SCT – autologní transplantace kmenových buněk, UL – udržovací léčba, IFN – interferon-alfa, DEX – dexamethason, Mlg – monoklonální imunoglobulin

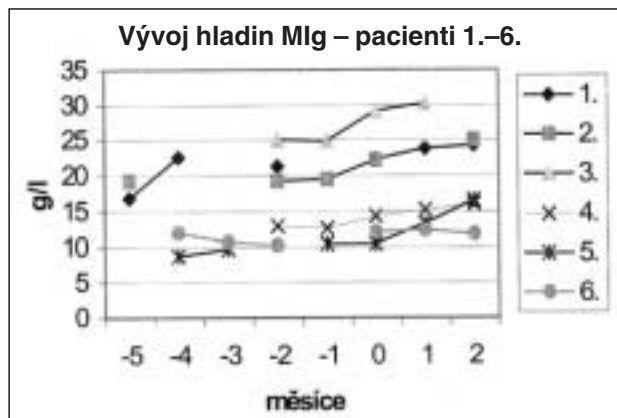
#### Sledování klinické a imunologické odpovědi na vakcínu

Základním parametrem při sledování klinické odpovědi na vakcinaci je koncentrace monoklonálního imunoglobulinu v séru pacientů. Během prvních 3 vakcinací zatím nedošlo k detekovatelné klinické odpovědi (grafy 1 a 2). Výsledky proliferčních testů jsou shrnuty v grafech 3 a 4. Vzhledem ke krátké době sledování se zatím nelze k aktivaci imunologických parametrů vakcínou vyjádřit.

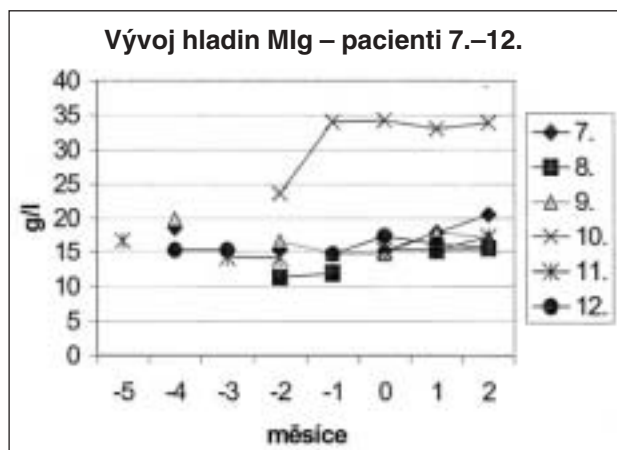
#### Nežádoucí účinky a reakce na vakcínu

Během prvních tří vakcinací jsme ve vakcinační studii zatím nezaznamenali závažnější toxickou reakci. U jednoho pacienta došlo k rozvoji exantému a febrilní po podání IL-2 během 4. cyklu vakcinace. U všech pacientů dochází po podání ke vzniku erytému v místě injekce, u asi 50 % pacientů i k vzniku indurace. Lokální obtíže vymizí do 3 dnů.

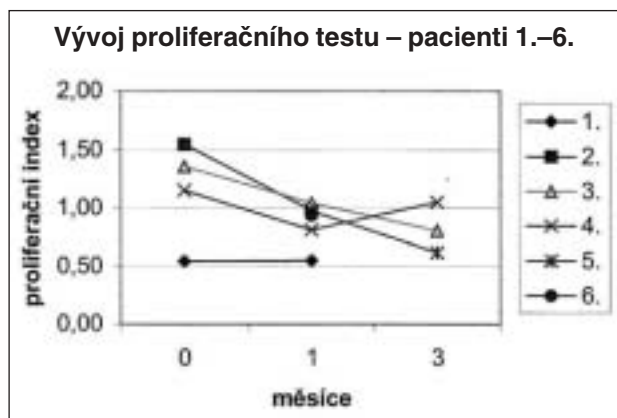
**Graf 1. Vývoj hladin monoklonálního imunoglobulinu (MIg) před vakcinací a během prvních 2 měsíců vakcinace (pacienti 1.–6.).**



**Graf 2. Vývoj hladin monoklonálního imunoglobulinu (MIg) před vakcinací a během prvních 2 měsíců vakcinace (pacienti 7.–12.).**



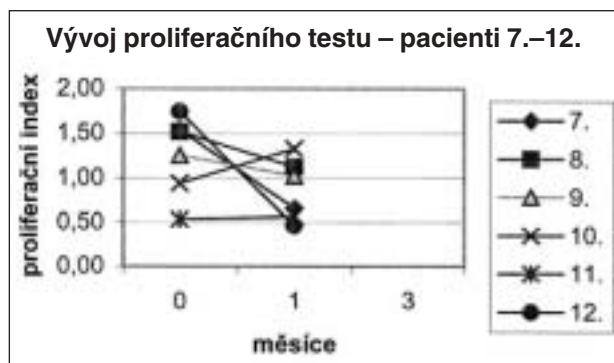
**Graf 3. Výsledky proliferačních testů během prvních cyklů vakcinace u pacientů 1.–6.**



## Diskuse

Podání vakcíny sestávající z nádorového antigenu (Id proteinu, myelomové buňky) v kombinaci s imunostimulační látkou – proteinem keyhole limpet hemocyanin (KLH) nebo bez něj má minimální toxicitu. Odborné literatuře není popsán případ, kde by došlo k závažnějšímu ohrožení nemocného. Podle dosavadních studií však účinnost těchto vakcín nepřesahuje

**Graf 4. Výsledky proliferačních testů během prvních cyklů vakcinace u pacientů 7.–12.**



je 20% léčebných odpovědí. Navíc je tato odpověď nepředpověditelná a v řadě případů nekoreluje s detekovatelnou protinádorovou imunitou u nemocného. Složení optimální vakcíny a správná schémata se hledají. Současné trendy preferují podkožní podání vakcíny namísto intravenózního, při kterém dojde k vychytání DB v játrech a plicích. Opakované podání vakcíny je upřednostněno namísto jednorázového, které má minimální účinnost.

Otázka optimálního místa aplikace protinádorové vakcíny není dořešena. Jeden milión dendritických buněk aplikovaný do lymfatické uzliny má jiný výsledný efekt než stejná dávka aplikovaná intradermálně nebo intravenózně. Dostupné studie o migraci dendritických buněk dokumentují, že jen 1% DB aplikovaných do kůže dosáhne lymfatických uzlin (12,13). DB aplikované intravenózně jsou zadrženy především v plicích, játrech a slezině, ne však v uzlinách (14). Současný konsensus vycházející ze zvířecích modelů a výše uvedených studií je aplikace intradermální nebo subkutánní. Vakcína podaná podkožně je prokazatelně účinnější oproti intravenózní vakcinaci (15). Podkožní podávání bylo již provedeno v řadě studií u pacientů s mnohočetným myelomem, intradermální podání zatím jen u pacientu s jinými nádory. U vakcinace virusem vakcinie byla účinnost s.c. a i.d. podání stejná. Z praktických důvodů autoři doporučili podkožní podávání (16). U vakcinací proti infekčním onemocněním byly zaznamenány minimální rozdíly při použití podkožního či intradermálního podání. Nicméně podkožní podání umožňuje použití většího objemu v jedné dávce (17,18).

V naší studii se plánuje opakované podání vakcíny s aktivací imunitního systému během posledních tří vakcinací pomocí IL-2, který by mohl přispět k aktivaci buněčné imunity a tím k imunoterapeutickému působení vakcíny. Pro první klinické aplikace jsme záměrně nevybrali skupinu nemocných těsně po provedení autologní transplantace, u kterých nebyla výrazná účinnost pozorována a navíc zde byla účinnost velmi obtížně monitorovatelná.

Z našich předběžných výsledků vyplývá, že protinádorová vakcinace Id proteinem konjugovaným z KLH u pacientů s mnohočetným myelomem je relativně netoxická. Zatím ještě nelze hodnotit výsledky z hlediska klinické a imunologické odpovědi. Další perspektivní imunoterapeutickou možností je využití přirozeného adjuvans, dendritických buněk (5,6). Při použití dendritických buněk dochází k výraznější aktivitě odpovědi T-lymfocytů ve srovnání se samotnou Id-KLH vakcínou. Protokol klinické studie, kde by se u pacientů s mnohočetným myelomem podávaly dendritické buňky exprimující autologní Id-protein, v současnosti připravujeme.

**Vypracováno s podporou grantu IGA MZČR NC 6763-3.**

## Literatura

1. Kwak LW, Taub DD, Duffey PL, Bensinger WI, Bryant EM, Reynolds CW, Longo DL. Transfer of myeloma idiotype-specific immunity from an actively immunized marrow donor. *Lancet* 1995; 345: 1016-20.
2. Bergenbrant S, Yi Q, Osterborg A, Bjorkholm M, Osby E, Mellstedt H, Lefvert AK, Holm G. 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.
3. Osterborg A, Yi Q, Henriksson L, Fagerberg J, Bergenbrant S, Jeddi-Tehrani M, Ruden U, Lefvert AK, Holm G, Mellstedt H. 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.
4. Titzer S, Christensen O, Manzke O, Tesch H, Wolf J, Emmerich B, Carsten C, Diehl V, Bohlen H. Vaccination of multiple myeloma patients with idiotype-pulsed dendritic cells: immunological and clinical aspects. *Br J Haematol* 2000; 108: 805-16.
5. Büchler T, Hájek R. Dendritic cell vaccines in the treatment of multiple myeloma: advances and limitations. *Med Oncol* 2002; 19: 213-8.
6. Büchler T, Musilová R, Kovářová L, Hájek R. Vakcíny v léčbě mnohočetného myelomu. *Klinická onkologie* 2002; 15 (Suppl): 44-7.
7. Massaia M, Borriore P, Battaglio S, Mariani S, Beggiato E, Napoli P, Voena C, Bianchi A, Coscia M, Besostri B, Peola S, Stiefel T, Even J, Novero D, Boccadoro M, Pileri A. Idiotype vaccination in human myeloma: generation of tumor-specific immune responses after high-dose chemotherapy. *Blood* 1999; 94: 673-83.
8. Reichardt VL, Okada CY, Liso A. Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma - a feasibility study. *Blood* 1999; 93: 2411-9.
9. Liso A, Stockerl-Goldstein KE, Auffermann-Gretzinger S, Benike CJ, Reichardt V, van Beckhoven A, Rajapaksa R, Engleman EG, Blume KG, Levy R. Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation for multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000; 6: 621-7.
10. Hájek R, Žáčková D, Büchler T, Penka M, Krahulcová E, Kořístík Z, Vinklárková J, Adler J, Janovská E, Indrák K, Faber E, Doubek M, Klabusay M, Oltová A, Kuglík P, Bourková L, Dušek L, Mareschová I, Mayer J, Vorlíček J. Treatment of chronic myeloid leukemia with autologous transplantation using peripheral blood stem cells or bone marrow cultured in IL-2 followed by IL-2, GM-CSF, and IFN-alpha administration. *Med Oncol* 2003; 20: 69-76.
11. Musilová R, Tábořská E, Bourková L, Büchler T, Hanák L, Kovářová L, Novotná H, Penka M, Hájek R. Příprava a použití nádorového antigenu z patologického imunoglobulinu pro pacienty s mnohočetným myelomem. *Transfuze a hematologie dnes* 2002; 8: 91-5.
12. Thomas DA, Kantarjian HM. Current role of thalidomide in cancer treatment. *Curr Opin Oncol* 2000; 12: 564-73.
13. Morse MA, Coleman RE, Akabani G, Niehaus N, Coleman D, Lysterly HK. Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. *Cancer Res* 1999; 59: 56-8.
14. Mackensen A, Krause T, Blum U, Uhrmeister P, Mertelsmann R, Lindemann A. Homing of intravenously and intralymphatically injected human dendritic cells generated in vitro from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Cancer Immunol Immunother* 1999; 48: 118-22.
15. Eggert AA, Schreurs MW, Boerman OC, Oyen WJ, de Boer AJ, Punt CJ, Figdor CG, Adema GJ. Biodistribution and vaccine efficiency of murine dendritic cells are dependent on the route of administration. *Cancer Res* 1999; 59: 3340-5.
16. Conry RM, Khazaeli MB, Saleh MN, Allen KO, Barlow DL, Moore SE, Craig D, Arani RB, Schlom J, LoBuglio AF. Phase I trial of a recombinant vaccinia virus encoding carcinoembryonic antigen in metastatic adenocarcinoma: comparison of intradermal versus subcutaneous administration. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2330-7.
17. Halperin W, Weiss WI, Altman R, Diamond MA, Black KJ, Iaci AW, Black HC, Goldfield M. A comparison of the intradermal and subcutaneous routes of influenza vaccination with A/New Jersey/76 (swine flu) and A/Victoria/75: report of a study and review of the literature. *Am J Public Health* 1979; 69: 1247-50.
18. Herbert FA, Larke RP, Markstad EL. Comparison of responses to influenza A/New Jersey/76-A/Victoria/75 virus vaccine administered intradermally or subcutaneously to adults with chronic respiratory disease. *J Infect Dis* 1979; 140: 234-8.