

VAKCÍNY V LÉČBĚ MNOHOČETNÉHO MYELOMU

VACCINES IN THE TREATMENT OF MULTIPLE MYELOMA

BÜCHLER T.^{1,2}, MUSILOVÁ R.², KOVÁŘOVÁ L.^{1,2}, HÁJEK R.^{1,2}

¹ INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO

² LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHAB), ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FN BRNO

Korespondence

MUDr. Tomáš Büchler, Interní hematatoonkologická klinika, FN Brno, Jihlavská 20, 63900 Brno, tel: 05/4719 2633, fax: 05/4719 3603, mail: buchler@fnbrno.cz

Souhrn: Idiotypické (Id) proteinové struktury monoklonálního imunoglobulinu produkovaného maligními buňkami mnohočetného myelomu jsou exprimovány na buněčném povrchu myelomových plazmatických buněk a dají se využít pro indukci nádorové specifických T lymfocytů. Jsou předkládány imunitnímu systému jako vysoce specifický antigen asociovaný s nádorem. Vzniklá humorální i celulární anti-idiotypická odpověď pak kontroluje růst myelomového klonu. Vakcinace Id-proteinem je jednou z možností imunoterapie mnohočetného myelomu a jiných B-buněčných malignit, s cílem vyvolat specifickou imunitní odpověď proti nádorovým buňkám. Id-protein se využívá pro bezbuněčné vakcíny, kde se podává samotný nebo s vhodným adjuvans, a pro vakcíny buněčné, ve kterých se podávají Id-protein exprimující dendritické buňky. Náš přehledný článek shrnuje preklinické a klinické výsledky Id-specifických vakcinací u mnohočetného myelomu.

Klíčová slova: mnohočetný myelom, vakcinace, imunoterapie, dendritické buňky, idiotyp

Summary: Malignant cells in multiple myeloma produce a monoclonal immunoglobulin which is tumor-specific and can be used for the induction of T lymphocytes. Idiotypic (Id) structures are expressed at the cell surface of malignant plasma cells and allow the recognition and targeting of these cells by Id-specific T lymphocytes. The induced humoral and cellular immune response controls the growth of the malignant cell clone. Vaccination using Id-protein has been attempted in patients with multiple myeloma and other B cell malignancies. The aim of this therapy is to induce specific immune response directed against the tumor cells. Id-protein may be used for cell-free vaccines where it is administered alone or after conjugation with a suitable adjuvans, and for cellular vaccines where it is loaded into dendritic cells. We review preclinical and clinical results of Id-specific vaccinations for multiple myeloma.

Keywords: multiple myeloma, vaccination, immunotherapy, dendritic cells, idotype

1. Význam imunoterapie u mnohočetného myelomu

Mnohočetný myelom je charakterizován zhoubnou proliferací jednoho klonu plazmatických buněk, které produkují jedinečný typ monoklonálního imunoglobulinu. Vyvolání alogenní reakce štěpu proti myelomu (graft-versus-myeloma effect) u relabujících nemocných s myelomem po alogenní transplantaci je léčebnou modalitou s odpovědí dosahující až 35-40% kompletních remisí při 60% celkových odpovědích (12, 43). Účinnost této terapie ukazuje na výskyt vysoce imunogenních antigenů na povrchu myelomových buněk.

Maligní buňky u mnohočetného myelomu produkují monoklonální imunoglobulin, který nalézáme v séru pacientů. Idiotypické (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) (4, 20, 31). Tato prezentace Id-proteinu umožňuje předkládat maligní plazmatickou buňku jako terč pro Id-specifické T-buňky (41).

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 (31). Id-protein se využívá jednak pro přípravu bezbuněčných vakcín, kde se podává samotný nebo navázaný na vhodné adjuvans, jednak pro přípravu vakcín buněčných, ve kterých se podávají Id-protein exprimující dendritické buňky. Nevýhodou použití Id-proteinu jako terče imunoterapie u mnohočetného myelomu je skutečnost, že maligní plazmatické buňky zmíněný monoklonální imunoglobulin ve větší míře sekretují. Proto může dojít k vysycení specifických T buněk nebo anti-Id protilátek cirkulujícím monoklonálním imunoglobulinem, přičemž pro protinádorový účinek specifických imunitních efektorů je nutné, aby reagovali s Id-determinanty exprimovanými na buněčném povrchu myelomových buněk (36).

Další imunoterapeutická modalita, léčba anti-CD20 protilátkami, která se osvědčila u lymfomů a chronické lymfatické leukémie z B-buněk, se zkoušela i u mnohočetného myelomu, zatím však bez většího úspěchu. V našem přehledném článku

se imunoterapií monoklonálními protilátkami nezabýváme, problematiku shrnují např. Treon a Anderson (42).

2. Vakcinace bezbuněčnými vakcínami na bázi idiotypového proteinu

2.1. Úvod

Id-protein k přípravě vakcíny se získává izolací monoklonálního imunoglobulinu z periferní krve od pacientů s mnohočetným myelomem metodou afinitní chromatografie. Jedná se o metodu založenou na vazbě na specifický nosič, který má afinitu k IgG či IgM molekulám. Pro odstranění případné endotoxinové kontaminace je přípravek smíchán s polymyxinem B, dialyzován a filtrován (28). Prezentace takto připraveného antigenu imunitnímu systému vedla k vytvoření tumor-specifických cytotoxických (CD8+) T a pomocných (CD4+) T buněk. Pro zvýšení účinku vakcíny jsou testovány vakcinační protokoly s Id-proteinem v kombinaci s vysoce imunogenním peptidem KLH (keyhole limpet hemocyanin), s ligandy (Flt3-L), či s cytokiny (GM-CSF, IL-2) (47).

2.2. Preklinické studie

Autoři Lynch a Eisen (26) prokázali jako první imunogenní účinek Id proteinu na vyšším modelu. Bylo pozorováno vytvoření T buněk specifických pro Id-determinanty autologního monoklonálního proteinu u myši s myelomem a u pacientů s B-buněčným lymfomem (26, 30). Imunizace autologním Id proteinem indukuje zvýšení titru anti-Id protilátek u myši (19). Výsledkem použití bezbuněčné vakcíny na bázi Id-proteinu bylo zvýšení vytvoření ochranné anti-Id imunity u myších modelů. Id-specifická odpověď byla přitom závislá na dávce (5).

2.3. Klinické studie bezbuněčných vakcín u mnohočetného myelomu

Kwak a spolupracovníci úspěšně testovali imunizaci dárce myelomovým imunoglobulinem z příjemcova štěpu (20, 21). Massaia prokázal indukci Id-reaktivních T buněk *in vivo* s použitím kožního testu u pacientů s myelomem po vakcinaci autologním, z nádoru pocházejícím Id-proteinem, následovaném nízkodávkovaným IL-2 a GM-CSF (28). Bylo potvrzeno, že T buňky se specifitou pro Id-struktury mohou zprostředkovat

šimpanzech prokázaly, že dendritické buňky po podkožním podání rychle migrují do regionálních lymfatických uzlin, kde zůstávají minimálně 5 dní (1, 2).

3.3. Zkušenosti z používání dendritických buněk v klinické praxi

Klinické využití dendritických buněk bylo zahájeno až po nedávném vynalezení přípravy a expanze dendritických buněk v dostatečném množství a v dostatečně čisté formě (3, 34). Úspěšná vakcinace dendritickými buňkami u folikulárního lymfomu (15, 19) otevřela cestu k vakcinacím u dalších malignit z B-buněk. Poprvé byla použita vakcinace Id-antigenem používající dendritické buňky u pacientů s mnohočetným myelomem v roce 1996, poté následovala série klinických studií fáze I a II (Tabulka 2) (8).

Vakcína byla ve všech publikovaných studiích dobře tolerovaná, vyskytly se pouze toxické reakce stupně I a II podle WHO (erytém, indurace a bolest v místě vpichu, krátkodobé febrilie zvládnutelné paracetamolem). Při intravenózním podání byl zaznamenán jeden případ tromboflebitidy na horní končetině po infuzi vakcíny.

Největší klinickou studií fáze II s autologními dendritickými buňkami aktivovanými Id-proteinem u myelomu, jež v současnosti probíhá v USA, je studie firmy Dendreon s přípravkem Mylovenge. Přípravek dostal od úřadu FDA přívlastek „orphan drug“, podobně jako jeho protějšek Provenge, určen k imunoterapii karcinomu prostaty. Mylovenge byl již podán více než 75 pacientům s myelomem. Pacienti byli výrazně předlženi – všichni absolvovali 1-6 cyklů chemoterapie, 45% z nich radioterapii. Dendritické buňky pro přípravek Mylovenge jsou získávány kultivací mononukleárních buněk z leukaféryzy. Vakcína se podává ve 3 dávkách s intervalem 2 týdny. Výsledky studie ještě nejsou zhodnoceny, výrobce však udává, že u značného procenta těchto pacientů došlo k rozvoji specifické imunitní odpovědi. Pacienti průměrně dostávali $2,235 \pm 1,521 \times 10^6$ buněk, z kterých $17.0 \pm 11.4\%$ bylo buněk dendritických. Zatím nejsou dostupné informace, že by v rámci klinických zkoušek fáze I a II došlo k závažným nežádoucím reakcím (17).

3.4. Nežádoucí účinky vakcín na bázi dendritických buněk

Jsou zprávy o příznacích autoimunity u myši po podání dendritických buněk v kombinaci s transgenními fibroblasty exprimujícími CD40L a IL-2 (35). Byla zjištěna cytotoxická odpověď proti fibroblastům, poruchy krvetvorby, hepatosplenomegalie a ztráta srsti. Protinádorová odpověď byla však asociovaná s touto indukci autoimunity. Při podání nižších dávek dendritických buněk se autoimunitní, ale ani protinádorové účinky neobjevily. V některých experimentech na myších podané dendritické buňky indukovaly toleranci vůči

exprimovanému antigenu. Tato tolerance se dala potlačit podáním interleukinu-12 (10, 11). Potenciálním rizikem podávání dendritických buněk je tedy vyvolání tolerance proti nádorovému antigenu. Tento problém se zatím vyskytl pouze v experimentu na myších (10, 11). V klinické praxi nebyl zjištěn případ akcelerované progresy tumoru po podání dendritických buněk. Z dostupných údajů se zdá, že při podání dendritických buněk aktivovaných autologním Id-proteinem nedochází ke skřížené imunitní reakci proti jiným buňkám či tkáním. Dendritické buňky prokázaly v klinických studiích vysoký stupeň bezpečnosti – nežádoucím účinkem jsou zpravidla pouze omezené a lokální reakce, které se navíc v některých případech dají připsat na vrub konkomitantního podávání cytokinů.

4. Bezpečnostní panel při použití vakcinací v klinické praxi

Před klinickou aplikací produktů buněčné imunoterapie je nezbytné dodržet bezpečnostní pravidla, která v maximální míře omezí riziko podání kontaminované vakcíny. Podle bezpečnostního protokolu používaného v naší laboratoři v preklinických studiích s dendritickými buňkami mezi standardní vyšetření patří aerobní a anaerobní kultivace vzorků odebraných den 0 a den 6 kultivace, stanovení endotoxinu a testy na kontaminaci mykoplasmaty v den 6 kultivace (24, 38) a mikroskopické vyšetření po barvení podle Grama bezprostředně před podáním vakcíny. Při přípravě bezbuněčné vakcíny s použitím Id-proteinu se provádí stanovení endotoxinu.

5. Závěr

V klinických studiích vakcinací u mnohočetného myelomu byly klinické odpovědi pozorovány pouze u menšíny pacientů. Podle výsledků laboratorních a klinických studií se zdá, že protinádorová imunita u pacientů s mnohočetným myelomem selhává následkem dysregulací cytokinové sítě, poruchy v expresi povrchových kostimulačních receptorů a defektů repertoáru T-lymfocytů (8). Tyto mechanismy se společně podílejí na tom, že nádorové buňky uniknou efektům imunitního systému. V současnosti probíhá intenzivní výzkum nových strategií, které by zlepšily účinnost imunoterapie u myelomu využitím nových způsobů aktivace imunitního systému (8). Už nyní se však dá říci, že preklinické a klinické vakcinační studie u mnohočetného myelomu významně přispěly k našim znalostem o imunitních aspektech nádorových chorob. Tyto výzkumy budou bezpochyby přínosem pro tvorbu nové generace imunoterapeutických protokolů.

Práce byla podpořena grantem GAČR 301/00/0405 a výkumným záměrem VZ MZČR 6526 9705.

Literatura

1. Barratt-Boyes SM, Watkins SC, Finn OJ. Migration of cultured chimpanzee dendritic cells following intravenous and subcutaneous injection. *Adv Exp Med Biol*. 1997;417:71-5
2. Barratt-Boyes SM, Watkins SC, Finn OJ. In vivo migration of dendritic cells differentiated in vitro: a chimpanzee model. *J Immunol* 1997, 158: 4543-4547.
3. Bender A, Sapp M, Schuler G, Steinman RM, Bhardwaj N: Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods* 1996, 196: 121-135.
4. Bergenbrant S, Yi Q, Österborg A, et al.: Modulation of anti-idiotypic immune response by immunization with the autologous M-component protein in multiple myeloma patients. *Brit J Haematol* 1996, 92: 840-846.
5. Bianchi A, Massaia M. Idiotypic vaccination in B-cell malignancies. *Mol Med Today* 1997;3:435-41.
6. Brossart P, Wirths S, Brugger W, Kanz L. Dendritic cells in cancer vaccines. *Exp Hematol* 2001; 29:1247-1255.
7. Büchler T, Hájek R, Bourková L, et al.: Generation of antigen-loaded dendritic cells in a serum-free medium using different cytokine combinations. *Vaccine* 2002 (v tisku).

8. Büchler T, Hájek R. Dendritic cell vaccines in the treatment of multiple myeloma - advances and limitations. *Medical Oncology* 2002 (v tisku).
9. Cull G, Durrant L, Stainer C, Haynes A, Russell N. Generation of anti-idiotypic immune responses following vaccination with idiotypic-protein pulsed dendritic cells in myeloma. *Br J Haematol* 1999; 107:648-655.
10. Finkelman FD, Lees A, Birnbaum R, Gause WC, Morris SC. Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion. *J Immunol*. 1996 Aug 15;157(4):1406-14.
11. Grohmann U, Bianchi R, Ayroldi E, et al. A tumor-associated and self antigen peptide presented by dendritic cells may induce T cell anergy in vivo, but IL-12 can prevent or revert the anergic state. *J Immunol*. 1997 Apr 15;158(8):3593-602.
12. Hájek R, Adam Z, Křivanová A, et al.: Current role of immunotherapy in multiple myeloma. *Acta Medica Austriaca* 1998, 25, 3: 79-86.
13. Hájek R, Butch AW. Dendritic cell biology and the application of dendritic cells to immunotherapy of multiple myeloma. *Med Oncol*. 2000 Feb;17(1):2-15.
14. Hart DNJ.: Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997, 90: 3245-3287.
15. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, et al.: Vaccination of patients with B-cell

- lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nature Med* 1996; 2: 52-58.
16. Ingulli E, Mondino A, Khoruts A, Jenkins MK. In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4(+) T cells. *J Exp Med*. 1997 Jun 16;185(12):2133-41.
17. Ishisaka T, Nevin B, Valone FH, Kothari SS, Peshwa MV. Comparison of Cryopreserved Versus Fresh Formulation of Idiotypic-Loaded Autologous Dendritic Cell Vaccine. Program and abstracts of the 43rd Annual Meeting of the American Society of Hematology; December 7-11, 2001; Orlando, Florida. Abstract 4989.
18. Kamath AT, Pooley J, O'Keeffe MA, et al. The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. *J Immunol*. 2000 Dec 15;165(12):6762-70.
19. Kwak LW, Campbell MJ, Czerwinski DK, Hart S, Miller RA, Levy R. Induction of immune responses in patients with B-cell lymphoma against the surface-immunoglobulin idiotype expressed by their tumors. *N Engl J Med*. 1992 Oct 22;327(17):1209-15.
20. 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.
21. Kwak LW, Thielemans K, Massaia M: Idiotypic Vaccination as Therapy for Multiple Myeloma. *Semin Hematol* 1999, 6, 1(Suppl 3): 34-37.
22. Lim SH, Bailey-Wood R. Idiotypic protein-pulsed dendritic cell vaccination in multiple myeloma. *Int J Cancer* 1999;83:215-22.
23. Lim SH, Bailey-Wood R: Idiotypic protein-pulsed dendritic cell vaccination in multiple myeloma. *Int J Cancer* 1999; 83:215-222.
24. Lincoln CK, Gabridge MG. Cell culture contamination: sources, consequences, prevention, and elimination. *Methods Cell Biol*. 1998; 57: 49-65.
25. Liso A, Stockerl-Goldstein KE, Auffermann-Gretzinger S, et al. Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation for multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000; 6:621-627.
26. Lynch RG, Graff RJ, Sirisinha S, Simms ES, Eisen HN. Myeloma proteins as tumor-specific transplantation antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972;69:1540-4.
27. MacKenzie M, Strang G, Peshwa M, Sopapan J, Valone F: Phase I/II trial of immunotherapy with idiotype-loaded autologous dendritic cells (APC8020) for refractory multiple myeloma. *Blood* 1998; 92 (Suppl 1): abstr 108a.
28. 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 Jul 15;94(2):673-83.
29. Mayordomo JJ, Zorina T, Storkus WJ, et al. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat Med*. 1995 Dec;1(12):1297-302.
30. Österborg A, Masucci M, Bergenbrant S, Holm G, Lefvert AK, Mellstedt H. Generation of T cell clones binding F(ab')₂ fragments of the idiotypic immunoglobulin in patients with monoclonal gammopathy. *Cancer Immunol Immunother* 1991;34:157-62.
31. Österborg 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: 2459-2466.
32. Reichardt VL, Okada CY, Liso A, et al. Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma - a feasibility study. *Blood* 1999; 93: 2411-2419.
33. Romani N, Koide S, Crowley M, et al.: Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 1989, 169: 1169-1178.
34. Romani N, Reider D, Heuer M, et al.: Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 1996, 196: 137-151.
35. Roskrow MA, Dilloo D, Suzuki N, Zhong W, Rooney CM, Brenner MK. Autoimmune disease induced by dendritic cell immunization against leukemia. *Leuk Res*. 1999 Jun;23(6):549-57.
36. Ruffini PA, Kwak LW. Immunotherapy of multiple myeloma. *Semin Hematol* 2001;38:260-7.
37. Sallusto F, Cella M, Daniel C, Lanzavecchia A: Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products [see comments]. *J Exp Med* 1995, 182: 389-400.
38. Stacey A, Doyle A. Routine testing of cell cultures and their products for mycoplasma contamination. *Methods Mol Biol*. 1997;75:305-11.
39. Steinman RM.: Dendritic cells and immune-based therapies. *Exp Hematol* 1996, 24: 859-862.
40. Timmerman JM, Levy R. Linkage of foreign carrier protein to a self-tumor antigen enhances the immunogenicity of a pulsed dendritic cell vaccine. *J Immunol* 2000; 164:4797-4803.
41. Titzer S, Christensen O, Mancke O, et al. Vaccination of multiple myeloma patients with idiotype-pulsed dendritic cells: immunological and clinical aspects. *Br J Haematol* 2000; 108:805-816.
42. Treon SP, Anderson KC. The use of rituximab in the treatment of malignant and nonmalignant plasma cell disorders. *Semin Oncol* 2000;27 (Suppl 12):79-85.
43. Tricot G, Vesole DH, Jagannath S, et al.: Graft-versus-myeloma-effect: Proof and principle. *Blood* 1996, 87: 1196-1197.
44. Wen YJ, Barlogie B, Yi Q. Idiotype-specific cytotoxic T lymphocytes in multiple myeloma: evidence for their capacity to lyse autologous primary tumor cells. *Blood* 2001 15;97:1750-5.
45. Wen YJ, Ling M, Bailey-Wood R, Lim SH: Idiotypic protein-pulsed adherent peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells prime immune system in multiple myeloma. *Clinical Cancer Research* 1998, 4: 957-962.
46. Yang S, Darrow TL, Vervaert CE, Seigler HF: Immunotherapeutic potential of tumor antigen-pulsed and unpulsed dendritic cells generated from murine bone marrow. *Cellular Immunol* 1997, 179: 84-95.
47. Zeis M, Zunkel T, Steinmann J, Schmitz N, Uharek L. Enhanced antitumoral effectiveness of idiotype vaccination induced by the administration of Flt3 ligand combined with interleukin 2 against a murine myeloma. *Br J Haematol* 2002;117:93-102.