

Liečba indolentných B-bunkových lymfómov personalizovanou vakcínou BiovaxID

Mgr. Michaela Fajtová, PhD.¹, MUDr. Miriam Ladická²

¹Laboratórium imunológie národov, Ústav experimentálnej onkológie SAV, Bratislava

²Oddelenie klinickej hematológie a transfuziológie C, NOÚ, Bratislava

BiovaxID je personalizovaná protinádorová vakcína novej generácie určená na liečbu indolentných B-bunkových non-Hodgkinových lymfómov. Vakcína je určená pre pacientov v kompletnej remisii 6 – 12 mesiacov po ukončení liečby. Jej účinok spočíva v stimulácii imunitného systému pacienta a vytvorení T-bunkovej imunitnej odpovede proti malígnym B-bunkám, čo má za následok predĺženie prežívania pacientov bez choroby. V roku 2008 Biovax vakcína úspešne prešla fázou III. klinických skúšok, ktoré potvrdili, že podanie Biovax vakcíny pacientom s folikulovým lymfómom je bezpečné, liečba je dobre tolerovaná a predlžuje prežívanie bez choroby z 30,6 na 44,2 mesiaca. V súčasnosti prebieha schvaľovací proces Biovax vakcíny na liečbu folikulového lymfómu v americkej FDA, Health Canada a európskej EMA.

Kľúčové slová: personalizovaná protinádorová vakcína, indolentné B-bunkové lymfómy.

Treatment of indolent B-cell lymphomas by the personalized cancer vaccine BiovaxID

BiovaxID is personalized antilymphoma cancer vaccine intended to the treatment of indolent B-cells non-Hodgkin's lymphoma. Vaccine represents the first of a new class of cancer vaccines designed for patients who have successfully achieved complete remission 6-12 months after treatment completion. Biovax stimulates the patient's own T-cells to recognize and destroy the cancerous B-cells that extend disease-free survival and prevent lymphoma from returning. In 2008 Biovax completed Phase III clinical trials, which have shown that vaccine is safe, well-tolerated and significantly prolonged disease-free survival from 33.6 to 44.2 months in patients with follicular lymphoma. At present, the approval process of Biovax vaccine for the treatment of follicular lymphoma is ongoing by the U.S. FDA, Health Canada and European EMA.

Key words: personalized antilymphoma cancer vaccine, indolent B-cell lymphomas.

Úvod

Folikulový lymfóm (FL) je v Európe najčastejšie sa vyskytujúca forma malígneho lymfómu a tvorí približne 20 – 25 % všetkých lymfómov. Ochorenie u väčšiny pacientov sa začína asymptomaticky, zväčšením periférnych alebo centrálnych uzlín. Neskôr progreduje lymfadenopatia, môže nastať poškodenie parenchymatóznych orgánov, kostnej drene a oslabuje sa imunitná ochrana. Diagnóza FL sa stanovuje na základe histologického vyšetrenia postihnutého tkaniva. Podľa pomeru zastúpenia malígnych B-buniek sa stanovujú formy FL grade 1 – 3. Folikulový lymfóm grade 1 a 2 sa správa ako typická indolentná proliferácia, grade 3b je agresívna forma ochorenia, ktorá je klinickým priebehom podobná difúznemu veľkobunkovému lymfómu (DLBCL) (1).

Preferovanou formou liečby u asymptomatických pacientov v klinickom štádiu I a II bez veľkej masy tumoru je lokálna rádioterapia. Časť pacientov s diseminovaným asymptomatickým ochorením nevyžaduje okamžité začatie liečby a je iba sledovaná. Za optimálnu liečbu u ostatných pacientov v klinickom štádiu IV. a III. je považovaná kombinovaná chemoimunoterapia s použitím rituximabu, monoklonovej anti-CD20

protilátky. Hoci sa po tejto liečbe predĺžilo prežívanie bez ochorenia a celkové prežívanie, FL je stále nevyliciteľné ochorenie. S počtom relapsov klesá počet liečebných odpovedí a skraca sa dĺžka remisii. V priebehu ochorenia môže nastať histologická transformácia FL do viacej agresívnych foriem B-NHL. Je asociovaná so zlou prognózou a jej riziko vzniku sa zvyšuje s dĺžkou ochorenia (1).

Väčšina ľudských lymfómov vzniká malígnou transformáciou B-buniek. B-bunky exprimujú na svojom povrchu imunoglobulínovú molekulu. Imunoglobulín (Ig) každej B-bunky je jedinečný, vytvorený z 2 variabilných regiónov, ktoré slúžia ako rozpoznávacie miesta cudzorodých antigénov. Variabilné regióny B-buniek vznikajú jedinečným preskupením zárodočných imunoglobulínových génov, čím vzniká nesmierna diverzita variabilných regiónov rozpoznávajúcich širokú škálu cudzorodých antigénov. Malígnou transformáciou B-lymfocytov vzniká klonálna bunková populácia, z ktorej každá bunka exprimuje na svojom povrchu rovnaký Ig variabilný región alebo „idiotyp“. Variabilný región nádorových buniek je odlišný od variabilných regiónov normálnych B-buniek. Preto jedným z novovyvíjaných liečebných postupov FL sú

terapeutické vakcíny založené na princípe anti-idiotypových protilátok konjugovaných s imunogénnou látkou, ktoré špecificky rozpoznávajú len nádorový Ig idiotyp a indukujú imunitnú odpoveď pacienta len proti nádorovým bunkám (2). Personalizovaná vakcína Biovax je perspektívna anti-idiotypová vakcína vyvinutá na liečbu FL, ktorej výsledky fázy III klinického skúšania ukončené v roku 2008 preukázali bezpečnosť a efektivitu.

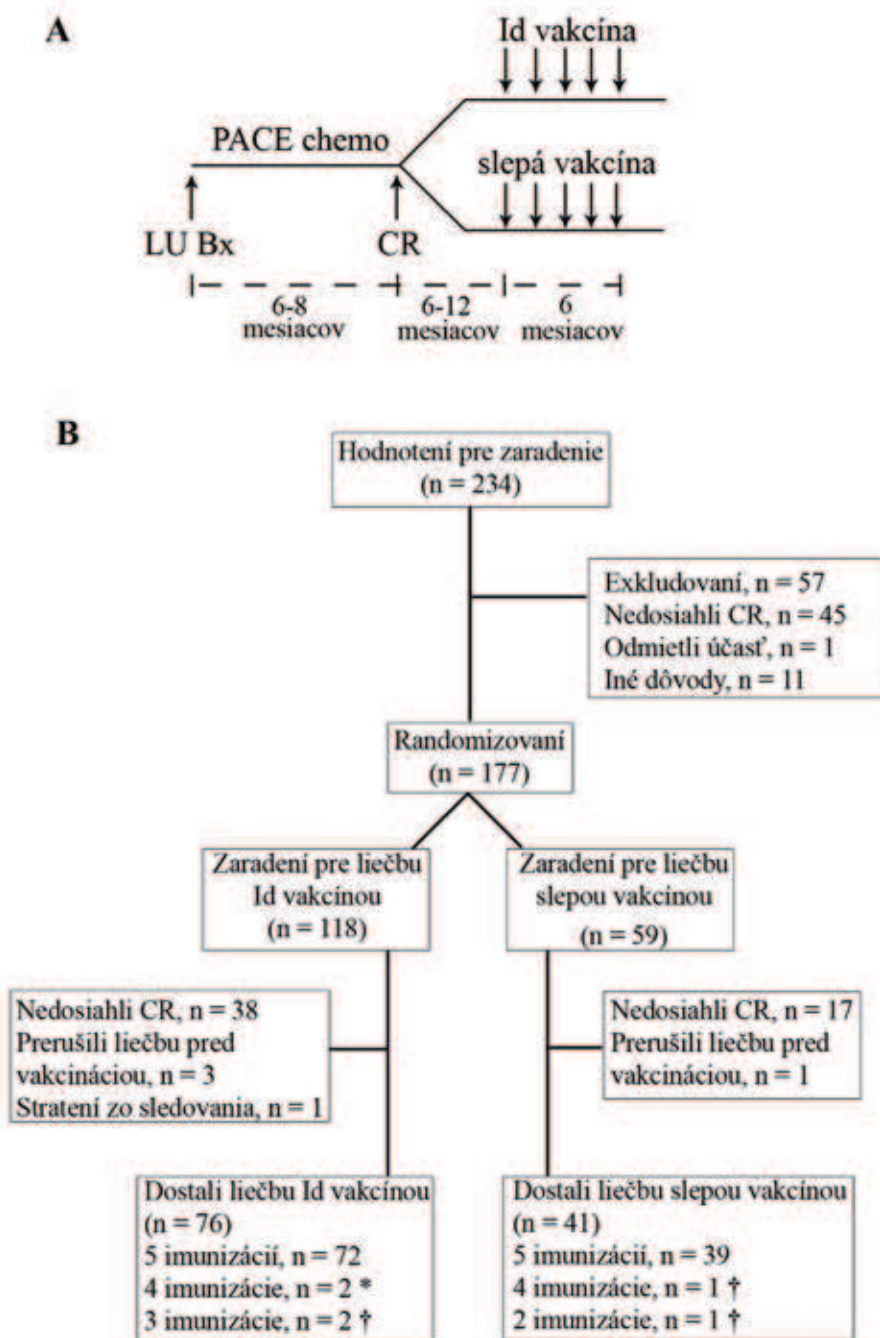
Imunizácia anti-idiotypovou protilátkou

Účinnosť imunizácie pomocou Id determinanty myelómového proteínu bola prvýkrát dokázaná na zvieracích modeloch v práci Sirisinha a Eisen (3). Imunizáciou zvierata došlo k indukcii jeho imunitného systému a k následnému odvrhnutiu nádorových buniek, ktoré boli nositeľmi cieľných idiotypových antigénov.

Prvé klinické testy využitia anti-Id monoklonovej protilátky v liečbe lymfómov uskutočnila skupina stanfordských vedcov a výsledky publikovala v práci Davis et al. (2). V rokoch 1981 – 1993 bola 45 pacientom s indolentnými B-bunkovými lymfómami podávaná pre pacienta špecifická anti-Id monoklonová

Onkológia (Bratisl.), 2013; roč. 8(4): 256–259

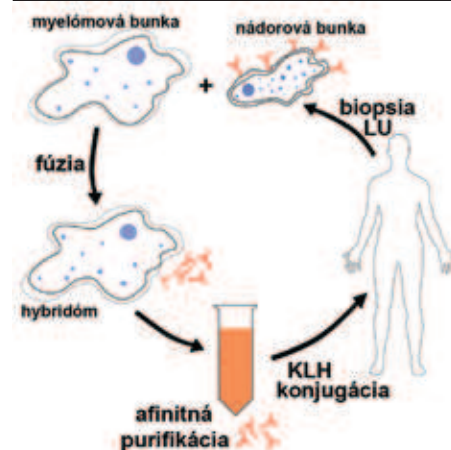
Obrázok 1. A. Schéma štúdie. Predtým neliečení pacienti v pokročilom štádiu FL podstúpili biopsiu lymfatickej uzliny (LU Bx) a PACE chemoterapiu. Pacienti v CR boli náhodne rozdelení podľa medzinárodného prognostického indexu (IPI nízky, stredne nízky, stredne vysoký, vysoký) a počtu cyklov chemoterapie (< 8 cyklov alebo ≥ 8 cyklov) na skupinu pacientov, ktorým bolo podaných 5 Id vakcín, a skupinu pacientov, ktorým bolo podaných 5 slepých vakcín. **B. Diagram zaradenia, liečby a randomizácie** (*pacienti vyradení zo štúdie; † pacienti s relapsom pred ukončením liečby) (Schuster et al., 2011).



protilátka v kombinácii s interferónom α, chlórambucilom a interleukínom 2 (IL2). U 66 % pacientov protilátka indukovala celkovú odpoveď na liečbu a u 18% pacientov došlo ku kompletnej remisii. U 13 % pacientov bola v periférnej krvi alebo kostnej dreni molekulárno-biologickými technikami identifikovaná prítomnosť reziduálnych nádorových buniek, ktoré však boli inaktívne a pacienti zotrvali v predĺženej klinickej remisii 4 – 10 rokov po ukončení terapie.

Ďalšie experimenty ukázali, že nádorovo-špecifická imunitná odpoveď indukovaná anti-Id protilátkou môže byť zosilnená konjugáciou Id proteínu s imunogénnym metaloproteínom KLH („keyhole limpet hemocyanin“) (4), podaním granulocytové a monocytové kolónie stimulujúceho faktora (GM-CSF) (5). Ďalej sa zistilo, že hybridómová technológia použitá na produkciu nádorovo-špecifických Id vakcín zachováva imunogenicitu vakcíny (6).

Obrázok 2. Produkcia Id vakcíny hybridómovou technológiou. Z biopsiou odobratej lymfatickej uzliny (LU) sa extrakciou izolujú malígne B-bunky, ktoré sa fúzuju s myelómovými bunkami za vzniku hybridómových buniek. Hybridómové bunky veľmi dobre rastú v laboratórnych podmienkach a produkujú veľké množstvá unikátneho Id proteínu (Schuster et al., 2010).



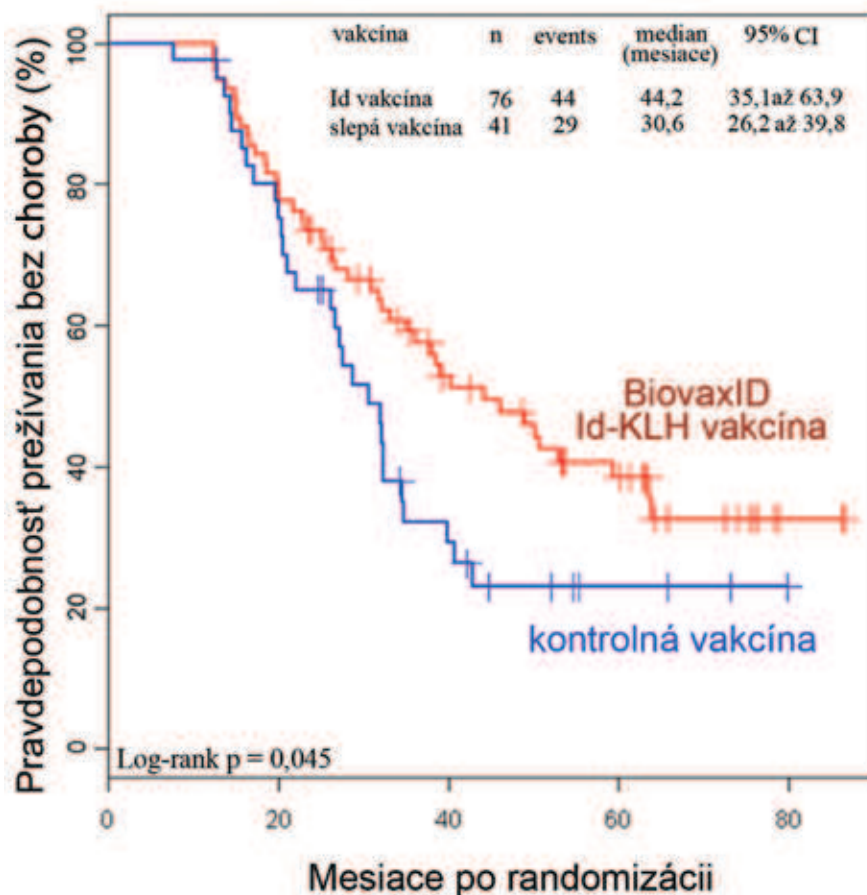
Personalizovaná terapia Biovax

V roku 1999 bola v National Cancer Institute USA (NCI) ukončená fáza II klinického skúšania Id-KLH + GM-CSF vakcíny Biovax produkovanej hybridómovou technológiou na pacientoch s FL v prvej kompletnej remisii po PACE chemoterapii (prednizón, doxorubicín, cyklofosfamid a etopozid). Výsledky testov potvrdili pre lymfóm špecifickú CD8 + T-bunkovú odpoveď u 95 % vakcinovaných pacientov, molekulovú remisiu a dlhodobé prežívanie pacientov bez ochorenia (7).

Fáza III klinického skúšania vakcíny Biovax bola začatá v roku 2000 a ukončená v roku 2008 (8). Vakcína bola podávaná v NCI a v ďalších 17 centrách v USA a v Európe pacientom s FL grade 1, 2 a 3a, s postihnutou lymfatickou uzlinou väčšou než 2 cm a expresiou IgM alebo IgG na povrchu nádorových buniek.

V počiatočnej fáze bolo do sledovania zaradených 234 novodiagnostikovaných pacientov s FL, ktorým bola podávaná 6 – 8 mesiacov PACE chemoterapia, od roku 2007 R-CHOP (rituximab, cyklofosfamid, adriamycín, vin-kristín a prednizón). Pacienti boli stratifikovaní podľa medzinárodného prognostického indexu (IPI) a podľa počtu podaných cyklov liečby (obrázok 1). Štúdia bola dvojito zaslepená. Len 177 pacientov v kompletnej remisii (CR) po podaní PACE chemoterapie bolo následne zaradených do testovania Biovax vakcíny. Šiesti pacienti, ktorým bola podaná R-CHOP chemoterapia, nakoniec neboli zaradení do testovania vakcíny v dôsledku uzavretia štúdie (3 pacienti) a nedosiahnutia CR (3 pacienti). Zo 177 pacientov v CR bolo randomizovaných na

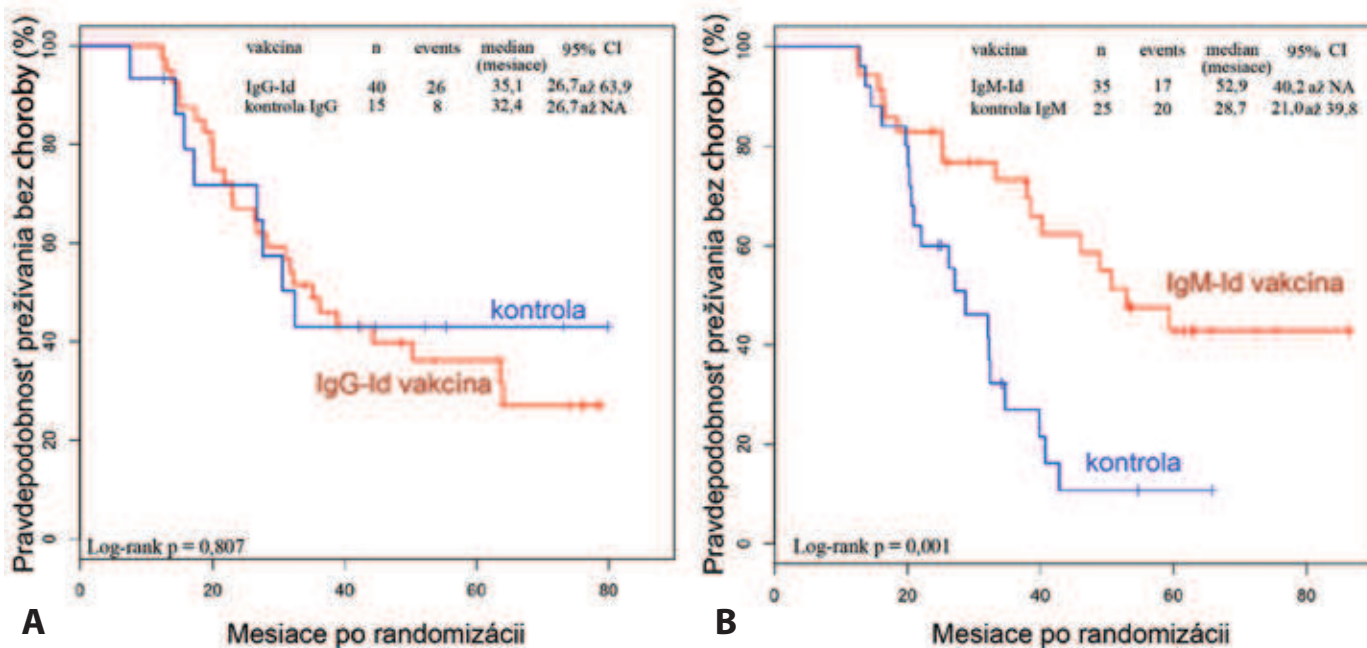
Obrázok 3. Kaplan-Meierová krivka pre prežívanie bez choroby (DFS) randomizovaných pacientov (117), ktorým bola podaná Id vakcína (76) alebo kontrolná vakcína (41) (Schuster et al., 2010).



Id-vakcinovanú skupinu 118 pacientov a 59 na kontrolnú skupinu. Pred vakcináciou 55 randomizovaných pacientov z vakcinovaného aj kontrolného ramena relabovalo a 6 pacientov bolo vyradených z testovania v dôsledku uzavretia alebo prerušenia testov. Nakoniec

bolo na testovanie Id vakcíny vhodných 76 pacientov. Výroba pre pacienta špecifickej Id vakcíny hybridómovou technológiou (obrázok 2) trvala 6 – 12 mesiacov. Pacientom bolo podaných päť izotypovo zhodných (IgM/IgG) pacient-špecifických Id-KLH + GM-CSF

Obrázok 4. Kaplan-Meier krivka pre prežívanie bez choroby (DFS) randomizovaných pacientov, ktorým bola podaná IgG-Id vakcína alebo kontrolná vakcína (A); IgM-Id alebo kontrolná vakcína (B) (Schuster et al., 2010).



alebo slepých KLH + GM-CSF vakcín 1, 2, 3, 4 a 6 mesiac po produkcii Id vakcíny, 0,5 mg subkutánne v deň 1, GM-CSF 100 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{d}$ subkutánne v deň 1 až 4 (obrázok 1).

Výsledky III. fázy klinických testov Biovax vakcíny ukázali, že v rámci všetkých randomizovaných 177 pacientov, súčasťou ktorých bolo aj 60 nevakcinovaných pacientov v dôsledku relapsu a iných dôvodov, medián prežívania bez choroby („disease-free survival“, DFS) medzi Id-vakcinovanou a kontrolnou skupinou pacientov nebol štatisticky signifikantný 23 versus 20,6 mesiaca ($p = 0,255$; hazard ratio[HR] 0,81; 95 % CI, 0,56-1,16; $p = 0,256$).

Štatisticky signifikantne sa predžilo DFS v skupine pacientov, ktorým bola podaná Id vakcína (44,2 mesiaca) v porovnaní s kontrolnou skupinou pacientov, ktorým bola podaná slepá KLH + GM-CSF vakcína (30,6 mesiaca) ($p = 0,045$; HR = 0,62; 95 % CI: 0,39 – 0,99, $p = 0,047$) s mediánom sledovania 56,6 mesiaca (obrázok 3). Výsledky klinického skúšania ukazujú, že potenciálne aktívnu formu imunoterapie predstavuje aj slepá vakcína KLH + GM-CSF, ktorej podanie pacientom kontrolnej skupiny predžilo DFS v porovnaní s DFS pacientov, ktorí neboli vakcinovaní.

V neplánovanej analýze DFS vakcinovaných pacientov podľa nádorového Ig-izotypu ťažkých a ľahkých reťazcov výsledky klinických skúšok ďalej ukázali, že izotyp konštantného regiónu môže ovplyvniť imunogenicitu variabilných oblastí epitopov. Medián DFS u pacientov s IgM-Id vakcínou bol 52,9 mesiaca versus 28,7 mesiaca u pacientov v kontrolnej skupine ($p = 0,001$;

HR 0,34; 95 % CI, 0,17-0,68; $p = 0,002$) (obrázok 4). Medián DFS u pacientov s IgG-IgD vakcínou bol 35,1 mesiaca oproti 32,4 mesiaca v kontrolnej skupine ($p = 0,807$; HR 1,1; 95 % CI, 0,50-2,44; $p = 0,807$) (obrázok 4). Už v práci Reitan a Hannestad, 2002 (10) bolo dokázané, že Id vo forme IgG sú tolerogénne a Id vo forme prekurzorov IgM sú vysoko imunogénne. Rovnako v práci De Groot et al. (11) bolo ukázané, že Fc región IgG má epitopy proti hlavným histokompatibilným komplexom II T-bunkových epitopov, ktoré špecificky aktivujú regulačné T-lymfocyty a posúvajú imunitnú odpoveď skôr k tolerancii ako imunogenicite.

Výsledky fázy III klinického skúšania ukázali, že počas mediánu 4,7 roka sledovania bola Id aj slepá vakcína bezpečná, dobre tolerovateľná a efektívna – pacienti vakcinovaní Biovax vakcínou vykazovali o 38 % nižšie riziko recidívy ochorenia v porovnaní s pacientmi, ktorým bola podaná slepá vakcína. Okrem lokálnej kožnej reakcie v mieste podania injekcie (erytém a in-durácia) 1 a 2 stupňa u > 80 % pacientov, neboli u vakcinovaných pacientov pozorované prakticky žiadne ďalšie nežiaduce účinky (8).

Okrem vakcíny BiovaxID boli vyvíjané podobné Id vakcíny – MyVax a FavID, ktoré však neprešli fázou III klinického skúšania (8). Efekt Id vakcín bol pozorovaný v malých jednoramenných štúdiách. Dve veľké randomizované placebo kontrolované klinické skúšky pre pacientov s neliečeným FL však nepreukázali benefit v prospech ramien so skúšanou vakcínou. Príčinou zlyhania vakcín mohlo byť použitie rekombinantného DNA derivovaného Id proteínu, produkovaného na cicavčích bunkových kultúrach (MyVax) alebo na bunkách hmyzu (FavID), u ktorého nesprávnou posttranslačnou modifikáciou (napríklad glykozilácia) v produkčnom systéme mohlo dôjsť k závažným zmenám v terciárnej štruktúre, a teda vo funkčnosti proteínu. Súčasťou oboch vakcín bol zároveň univerzálny Fc región IgG, ktorý mohol spôsobiť nízku imunogenicitu vakcín. Na rozdiel od Id proteínov produkovaných DNA rekombinantnou technológiou, Id proteíny vytvorené hybridómovou technológiou sú viac podobné natívnej forme Ig na povrchu nádorových buniek. Navyše hybridómová technológia prináša Id proteíny s IgM alebo IgG Fc regiónmi, ktoré sú identické nádorovému Ig izotypu. Ďalším významným rozdielom, ktorým sa líšia uvedené dve štúdie od Biovaxovej štúdie, bolo zaradenie pacientov nielen s dosiahnutou CR, ale aj parciálnou remisiou, respektíve stabilizovaným ochorením. Zdá sa, že je veľmi dôležité, aby boli pacienti

v CR. Prítomnosť veľkého počtu malígnych buniek môže spôsobiť, že imúnne prostredie nie je schopné vytvoriť adekvátnu imúnnu odpoveď na vakcináciu. Na druhej strane skutočnosť, že do štúdie s Biovaxom boli zaradení iba pacienti s CR trvajúcou 6 – 12 mesiacov od ukončenia liečby, vedie k zamysleniu, či títo pacienti nemali menej agresívne ochorenie, respektíve ochorenie s vyššou citlivosťou na podanú chemoterapiu, čím sa mohla vytvoriť skupina pacientov s lepšou prognózou ochorenia.

V čase začatia štúdie bola použitá v indukčnej liečbe v tom období štandardná chemoterapia bez rituximabu. V súčasnosti je súčasťou liečebnej schémy u pacientov s FL monoklonová protilátka rituximab, ktorá zlepšila počet celkových odpovedí, trvanie prežívania bez progresie ako aj celkové prežívanie. Rituximab indukuje dlhotrvajúcu deléciu B-lymfocytov a spomaľuje indukciu humorálnej odpovede po Id vakcinácii, avšak výsledky klinických skúšok ukázali, že tvorba tumor-špecifckej bunkovej imunity nie je ovplyvnená. Hoci relatívna dôležitosť humorálnej verzus bunkovej imunity v efektívite Id vakcinácie je nejasná, bunková imunita indukovaná Id vakcináciou by mohla dopĺňať účinok imunochemoterapie rituximabom, a tak minimalizovať vznik nádorových buniek, ktoré unikajú imunitnému systému. Práve preto FDA stoplo schvaľovací proces Biovax vakcíny a vyžiadalo si ďalšiu štúdiu fázy III, ktorá by potvrdila benefit aj pre pacientov liečených rituximabom. Predpokladá sa, že pomocou efektívnejšej indukčnej liečby, ktorá sa používa v súčasnosti, ale v čase štúdie s Biovaxom nebola dostupná, by sa mohol znížiť počet pacientov s včasnými relapsmi, a tak zvýšiť možnosť vakcinácie u viacerých pacientov (8).

Okrem liečby folikulového lymfómu sa plánuje do budúcnosti využitie Biovax vakcíny aj v liečbe ďalších typov indolentných B-bunkových lymfómov. V súčasnosti prebieha II. fáza klinických skúšok použitia vakcíny na liečbu lymfómu z plášťových buniek (MCL) a predpokladá sa využitie vakcíny aj v liečbe chronickej lymfocytovej leukémie (B-CLL) a mnohopočetného myelómu (MM).

Záver

Aktívna imunizácia cestou vakcinácie sa javí ako jedna z nových perspektívnych liečebných prístupov u pacientov s FL. Jej významnou výhodou je doteraz pozorovaná veľmi nízka toxicita. Keďže medián veku pacientov s FL je 60 rokov, hľadajú sa nové netoxické liečebné prístupy do konsolidačnej liečby. Ďalším argumentom zástancov vakcinácie je použitie nových lie-

kov účinkujúcich iným mechanizmom, čím sa môže predísť vzniku refraktérneho ochorenia. Nevýhodou je časovo náročná príprava vakcíny. Počas jej výroby sa vytvára časová medzera medzi ukončením liečby a vakcináciou. Táto perióda čakania je potrebná na imúnnu rekonštrukciu pred aplikáciou vakcíny. V čase používania chemoimunoterapie v indukcii a dvojročnej udržiavacej liečby rituximabom v bežnej praxi je potreba nových klinických štúdií, ktoré by jednoznačne potvrdili terapeutický benefit tejto liečebnej modality.

Literatúra

1. Adam Z, Krejčí M, Vorlíček J, et al. Hematologie, přehled maligních hematologických nemocí. Grada 2008.
2. Davis TA, Maloney DG, Czerwinski DK, et al. Anti-idiotype antibodies can induce long-term complete remissions in non-Hodgkin's lymphoma without eradicating the malignant clone. *Blood* 1998; 92(4): 1184–90.
3. Sirisinha S, Eisen HN. Autoimmune-like antibodies to the ligand-binding sites of myeloma proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68(12): 3130–5.
4. Kaminski MS, Kitamura K, Maloney DG, et al. Idiotype vaccination against murine B cell lymphoma. Inhibition of tumor immunity by free idiotype protein. *J Immunol.* 1987; 138(4): 1289–96.
5. Kwak LW, Young HA, Pennington RW, et al. Vaccination with syngeneic, lymphoma-derived immunoglobulin idiotype combined with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor primes mice for a protective T-cell response. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(20): 10972–7.
6. Kwak LW, Campbell MJ, Czerwinski DK, et al. Induction of immune responses in patients with B-cell lymphoma against the surface-immunoglobulin idiotype expressed by their tumors. *N Engl J Med.* 1992; 327(17): 1209–15.
7. Bendandi M, Gocke CD, Kobrin CB, et al. Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-monocyte colony-stimulating factor against lymphoma. *Nat Med.* 1999; 5(10): 1171–7.
8. Schuster SJ, Neelapu SS, Gause BL, et al. Vaccination with patient-specific tumor-derived antigen in first remission improves disease-free survival in follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* 2011; 29(20): 2787–94.
9. Schuster SJ, Santos CF, Neelapu SS, et al. Vaccination with IgM but Not IgG Idiotype Prolongs Remission Duration In: Follicular Lymphoma Patients. 52rd Annual Meeting of the American Society of Hematology. 2010; Session: Lymphoma - Therapy with Biologic Agents, excluding Pre-Clinical Models: Immunotherapy for Indolent Lymphoma; paper number: 429.
10. Reitan SK, Hannestad K. Immunoglobulin heavy chain constant regions regulate immunity and tolerance to idiotypes of antibody variable regions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99(11): 7588–93.
11. De Groot AS, Moise L, McMurry JA, et al. Activation of natural regulatory T cells by IgG Fc-derived peptide „Tregitopes“. *Blood* 2008; 112(8): 3303–11.

Mgr. Michaela Fajtová, PhD.

Laboratórium imunológie národov
Ústav experimentálnej onkológie SAV
Vlárska 7, 833 91 Bratislava
michaela.fajtova@savba.sk