

Kratek pregled trenutnega stanja na področju tumorskih vakcin in povzetek našega dela na tem področju

Srdjan Novaković

Povzetek

Tumorske vakcine predstavljajo obliko biološkega (imunskega) zdravljenja, s katerim skušamo sprožiti učinkovit sistemski imunski odziv proti tumorskim antigenom, s tem pa tudi proti tumorskim celicam v celoti. Učinek tumorskih vakcin je tako odvisen od: 1) prisotnosti/odsotnosti prepoznavnih tumorskih antigenov, 2) prisotnosti kostimulatornih molekul, ki sodelujejo pri aktivaciji efektorskih celic, 3) učinkovitosti predstavljanja antigenov in kostimulatornih molekul efektorskim celicam, 4) razvoja specifične protitumorske imunosti in 5) razvoja procesov, s katerimi se tumorske celice izogonejo imunskemu nadzoru. Glede na osnovne metode oblikovanja tumorskih vakcin in glede na njihovo pričakovano učinkovitost jih razdelimo v dve skupini: 1) vakcine prve generacije, ki temeljijo na načelih klasične imunologije – t. i. *klasične tumorske vakcine*, in 2) vakcine druge generacije, ki temeljijo na načelih molekularne imunologije – *gensko spremenjene* in *rekombinantne tumorske vakcine*. V tem članku želim predstaviti kratek pregled glavnih pristopov k oblikovanju tumorskih vakcin in raziskave s tega področja, ki potekajo na Onkološkem inštitutu.

Tumorske vakcine

Zdravljenje rakavih bolezní je še vedno premalo učinkovito. Večina sedanjih konvencionalnih sistemskih zdravljenj temelji na uporabi kombinacij citostatikov, ki niso specifični za tumorske celice, predvsem pa ne dovolj učinkoviti, da bi jih v celoti uničili. Njihovo učinkovitost pogosto dodatno zmanjšuje razvoj odpornosti tumorskih celic proti različnim citostatikom, kar privede do tega, da bolniki potrebujejo drugačno zdravljenje. Velik napredek v imunologiji, molekularni in tumorski biologiji pa po drugi plati omogoča razvoj bolj specifičnih oblik zdravljenja. Med temi biološkimi oblikami zdravljenja imajo ravno tumorske vakcine prav posebno mesto. Predstavljajo namreč popolnoma novo obliko sistemskega zdravljenja. V nasprotju s konvencionalnimi zdravljenji, ki delujejo neposredno na tumorske celice, so tumorske vakcine usmerjene predvsem v sproženje protitumorskega imunskega odziva obolelega organizma. Glavni namen zdravljenja s tumorskimi vakcinami je tako vzpostavitev aktivnega sistemskega imunskega odgovora proti antigenom, ki jih izražajo tumorske celice. Glavni merili, ki ju morajo tumorske vakcine izpolniti, preden postanejo učinkovita protitumorska zdravila, pa sta profilaktična in terapevtska učinkovitost. To pomeni, da morajo tumorske vakcine sprožiti takšen sistemski imunski odgovor, ki bo

povzročil zavračanje tumorskih celic in hkrati omogočil dolgotrajen imunski spomin, s katerim bo vakcinirani gostitelj zaščiten pred ponovitvijo rakaste bolezni.

Glavni omejitvi pri oblikovanju takšnih vakcin sta težavna identifikacija ustreznega tumorskega antigena in slaba imunogenost teh antigenov. Obe omejitvi izhajata iz dejstva, da tumorske celice nastanejo iz normalnih celic in da so antigeni, ki jih izražajo, prisotni tudi v normalnih tkivih. To pomeni, da jih gostiteljev imunski sistem zaznava kot »lastne« antigeni. Tako postane razumljivo, da so raziskovanja s področja oblikovanja tumorskih vakcin usmerjena predvsem v modulacijo (spreminjanje) prepoznavanja antigenov in v modulacijo stanja gostiteljevega imunskega sistema.

Vakcine prve generacije – **klasične tumorske vakcine** – temeljijo na predstavitvi kar največjega možnega števila antigenskih determinant, ki se nahajajo na tumorskih celicah. Zato so sestavni deli vakcin obsevane tumorske celice v celoti ali njihovi lizati. V šestdesetih letih dvajsetega stoletja so raziskovalci okužili tumorske celice z virusi in uporabili njihove lizate kot tumorske vakcine ravno z namenom, da bi napravili predstavljene antigene čim bolj prepoznavne (imunogene) (1). Naslednji pristop k pripravi klasičnih tumorskih vakcin pa predstavlja kombinacija obsevanih tumorskih celic in nespecifičnega imunomodulatorja, kot so BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*), MDP (muramil dipeptid), CP (*Corynebacterium parvum*), KLH (»keyhole limpet hemocyanin«) ali Detox (endotoksin iz *Salmonelle minesota* in citoskelet iz *Mycobacterium phlei*). V sedanjem času se v klinični praksi med klasičnimi tumorskimi vakcinami uporabljajo predvsem vakcine za maligni melanom. Najbolj poznani sta CancerVax in Melacin (2).

Naša raziskovalna skupina na Onkološkem inštitutu je pripravila klasično tumorsko vakcino iz obsevanih singenskih celic malignega melanoma in MVE-2 (nespecifični imunomodulator). S predkliničnimi raziskavami smo potrdili njeno izjemno učinkovitost (3, 4). Z eno samo vakcinacijo 7 dni pred vbrizganjem tumorskih celic smo več kot 45 % cepljenih živali zaščitili pred razvojem tumorja (močno tumorogenega malignega melanoma). S ponovljeno vakcinacijo smo delež živali, ki so bile zaščitene pred razvojem tumorja, povečali na 90 %. Potrdili smo tudi razvoj dolgotrajne zaščitne imunosti pri 60 % živali, ki so bile cepljene dvakrat, in pri 20 % živali, ki so bile cepljene enkrat (diagrama 1 in 2). Izkazalo se je, da je naša vakcina specifična za tip tumorskih celic in da je glavni način, prek katerega vakcina sproži protitumorsko zaščito, aktivacija peritonealnih makrofagov. Hkrati z

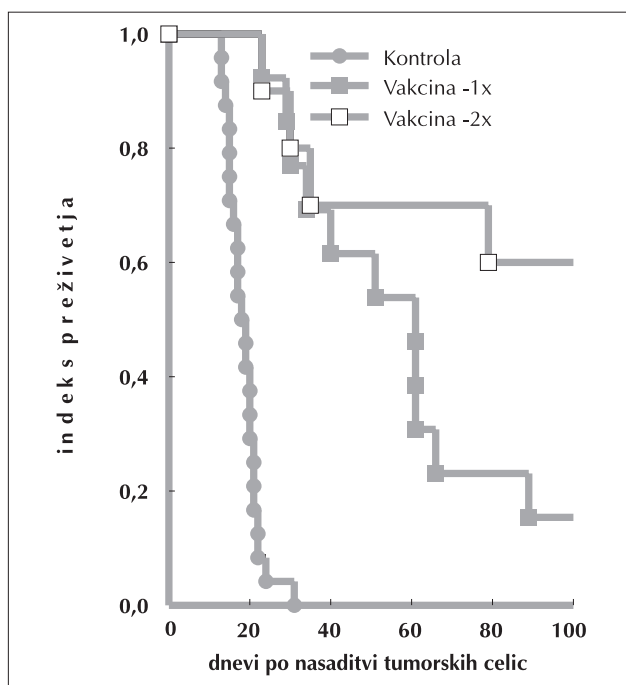


Diagram 1. Preživetje živali z i. p. tumorji B-16 po enkratnem ali dvakratnem cepljenju s tumorsko vakcino, ki je vsebovala 1×10^6 obsevanih tumorskih celic B-16 in 25 mg/kg MVE-2 (nespecifični imunostimulator).

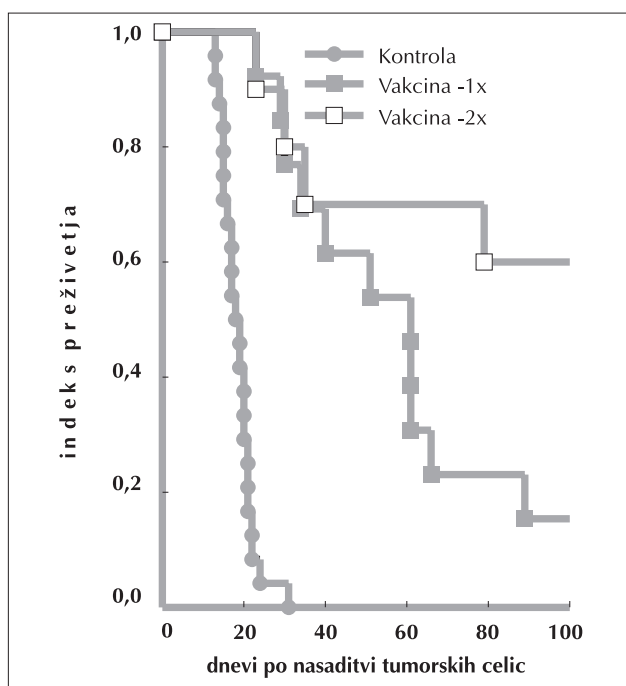


Diagram 2. Ocena dolgotrajne zaščitne imunosti pri miškah, ki so predhodno prejele vakcino. Preživelim mišim iz skupin, ki so dobile tumorsko vakcino enkrat (7 dni pred prvo i. p. aplikacijo 5×10^5 živih tumorskih celic B-16) – vakcina 1 – in preživelim mišim iz skupin, ki so dobile enako vakcino dvakrat (7 dni pred prvo aplikacijo tumorskih celic in 7 dni po njej) – vakcina 2 – smo znova vbrizgali i. p. 5×10^5 živih tumorskih celic B-16 101 dan po prvem vbrizganju tumorskih celic.

aktivacijo makrofagov smo opazili tudi povečanje deleža peritonealnih T-celic (CD3+, CD4+).

Tumorske vakcine druge generacije vključujejo najnovejša odkritja molekularne biologije in imunologije; njihova priprava temelji na regulaciji bolj specifičnih procesov v aktivaciji imunskega sistema. To skupino vakcin lahko razdelimo na **rekombinantne** in **gensko spremenjene tumorske vakcine** (tabela 1).

Tabela 1. Osnovna razdelitev tumorskih vakcin glede na način priprave.

KLASIČNE TUMORSKE VAKCINE

1. obsevane avtologne ali alogene tumorske celice
2. lizati tumorskih celic z virusnimi antigeni
3. obsevane tumorske celice z nespecifičnimi imunomodulatorji (BCG, MDP, CP)*

REKOMBINANTNE IN GENSKO SPREMENJENE TUMORSKE VAKCINE

1. rekombinantne vakcine

- a. kratki peptidi, ki se izražajo prek MHC-razreda I in II
- b. oligopeptidi
- c. fuzijski proteini
- d. imunoglobulini

2. vakcine, pripravljene na podlagi gensko spremenjenih tumorskih celic

- a. vnos genov za različne citokine
- b. vnos genov za peptide, ki se izražajo prek MHC-razreda I
- c. vnos genov, ki kodirajo kostimulatorne molekule

3. vakcine, pripravljene na podlagi gensko spremenjenih netumorskih celic

- a. aktivirane dendrične celice
- b. gensko spremenjene dendrične celice
- c. priprava hibridomov iz dendričnih in tumorskih celic

*BCG – Bacillus Calmette-Guerin; MDP – muramil dipeptid; CP – Corynebacterium parvum;

Skupina rekombinantnih tumorskih vakcin vključuje peptide, fuzijske proteine in imunoglobuline.

Imunski odgovor lahko sprožimo z dvema glavnima skupinama peptidov. Peptidi z 8 do 11 aminokislinskimi ostanki, ki so predstavljeni prek MHC-razreda I na antigen predstavitevni celicah, sprožijo prek vezave s celičnimi receptorji T-limfocitov aktivacijo CTL (citotoksični T-limfociti CD8+). Druga skupina peptidov z 11 do 15 aminokislinskimi ostanki so predstavljeni prek MHC-razreda II na predstavitevni celicah. Ti peptidi so odgovorni za aktivacijo limfocitov CD4+. Tudi oligopeptide, ki vključujejo oba epitopa (epitop MHC-razreda I in epitop MHC-razreda II) lahko uporabljamo kot tumorske vakcine. Večino uporabljenih oligopeptidov kot tumorske vakcine uporabljajo pri bolnikih z malignim melanomom (MAGE-1, MAGE-3, MART-1, gp100, tirozinaza, gp75), kolorektalnim karcinomom (CEA) in karcinomom dojke (MUC-1).

Druga oblika rekombinantnih vakcin so fuzijski proteini s citokini. Ena od obetavnih vakcin tega tipa so monoklonalna protitelesa, vezana z molekulo IL-2 (6).

Vakcine, ki temeljijo na uporabi samih imunoglobulinov, so razmeroma pogosto uporabljene v klinični praksi. To so predvsem protitelesa proti specifičnim antigenskim determinantam na tumorskih celicah. Ta skupina vključuje

protitelesa proti Her-2/Neu pri karcinomu dojke (Herceptin), protitelesa proti CD20 pri B-celičnih limfomih (MabThera) in protitelesa proti CD52 pri KLL (MabCampath) (6, 7).

Načeloma poteka njihovo delovanje na dva načina – tako, da preprečijo vezavo rastnih faktorjev na tumorsko celico ali da sprožijo litične procese v tumorskih celicah (neposredno citotoksično delovanje, vezava komplemента, opsonizacija in aktivacija citotoksičnih limfocitov).

Gensko spremenjene tumorske vakcine naprej razdelimo v skladu z vrsto celic, ki jih uporabimo za njihovo pripravo, na: a) vakcine, pripravljene z gensko spremenjenimi tumorskimi celicami; in b) vakcine, pripravljene z gensko spremenjenimi netumorskimi celicami (tabela 1).

Tumorske vakcine, pripravljene z gensko spremenjenimi tumorskimi celicami, vključujejo naslednje pristope: i) transfekcija tumorskih celic z geni, ki kodirajo različne citokine ali rastne faktorje; ii) transfekcija tumorskih celic z geni za specifične antigenske determinante, ki se izražajo prek MHC I/II; in iii) transfekcija tumorskih celic z geni, ki kodirajo kostimulatorne molekule, značilne za antigen predstavitvene celice.

Med geni, ki kodirajo različne citokine ali rastne faktorje, večina raziskovalcev najpogosteje uporablja gene za IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF in G-CSF. Učinek vakcin je odvisen od vrste citokina, ki ga tvorijo celice, od količine nastalega citokina in od vrste tumorskih celic, ki sestavljajo vakcino. Različni raziskovalci so potrdili, da tumorske vakcine, ki vključujejo preneseni gen za IL-2, učinkovito aktivirajo T-limfocite, medtem ko tiste, ki vključujejo preneseni gen za TNF- α , spodbujajo aktivacijo makrofagov (posredno torej CTL) in tudi neposredno citotoksično delovanje na tumorske celice (prek TNF-receptorjev). Za zdaj so se kot najučinkovitejše vakcine tega tipa izkazale tiste, ki vključujejo GM-CSF (8).

Naša raziskovalna skupina je uspešno oblikovala kar nekaj vakcin te vrste. Pripravili smo ekspresijske kasete s plazmidnimi vektorji in geni, ki kodirajo naslednje citokine: hTNF- α , IL-2, IFN- γ , G-CSF in GM-CSF. Pravilno vstavitve genov v plazmidne vektorje smo potrdili z encimsko restrikcijsko analizo, s PCR-analizo in z neposrednim DNA-sekveniranjem. Z biološkimi testi in testi ELISA pa smo nadalje dokazali sposobnost tranzientne ekspresije (tvorba in izločanje citokinov) pripravljenih ekspresijskih kaset v različnih tipih humanih celic (9–11).

Priprava vakcin s prenosom genov za strukture, ki se izražajo prek MHC-razreda I/II v tumorske celice, je precej identična uporabi vakcin, ki vsebujejo kratke peptide. Razlika je v tem, da so antigenske strukture v tem primeru nastale znotraj samih tumorskih celic in so predstavljene skupaj z drugimi antigeni, ki so prisotni na tumorskih celicah. Tako lahko učinkoviteje sprožimo specifično aktivacijo CTL (CD8+) in T-celic pomagalk (CD4+). Tako kot pri kratkih peptidih tudi

v ta namen najpogosteje uporabljamo gene, ki kodirajo MAGE, MART, MUC-1 in CEA.

Transfekcija tumorskih celic z geni za kostimulatorne molekule, kot sta B7.1 (CD80) in B7.2 (CD86) ligand, omogoča neposredno aktivacijo CTL, s čimer obidememo vlogo antigen predstavitvenih celic. Raziskave, pri katerih so vnesli gen za B7 v tumorske celice, so potrdile preobrazbo neimunogenih tumorskih celic v močno imunogene tumorske celice, kar je privedlo do zavrnitve tumorja *in vivo*. (12). Podoben je bil tudi učinek transfekcije tumorskih celic z geni za druge kostimulatorne molekule, kot sta ICAM-1 in LFA-3.

Priprava tumorskih vakcin z gensko spremenjenimi netumorskimi celicami temelji predvsem na uporabi dendritskih celic, ki jih uvrščamo med najpomembnejše antigen predstavitvene celice. Takšna priprava tumorskih vakcin predstavlja poskus čimučinkovitejše aktivacije efektorskih celic prek manipulacije s »super oboroženimi« dendritskimi celicami. Obstajajo trije temeljni pristopi k pripravi tumorskih vakcin na podlagi dendritskih celic: i) *in vitro* aktivacija dendritskih celic s specifičnimi antigenskimi strukturami, kot so OVA peptid, gp 100 in MelanA/MART; ii) transfekcija dendritskih celic z geni za različne proteine, kot so MART-1, MUC-1, β -galaktozidaza, PSA; in iii) priprava hibridomov iz dendritskih in tumorskih celic (13).

V nadaljevanju našega dela s tumorskimi vakcinami sedaj poteka optimizacija metod za izolacijo dendritskih celic in pripravo hibridomov. Ker dendritske celice predstavljajo heterogeno skupino usmerjenih (»profesionalnih«) antigen predstavitvenih celic, ki dozorevajo iz prekurzorskih mononuklearnih celic (fenotip CD14, CD11c, CD13), večino raziskovalnega dela usmerjamo v monocite, izolirane iz »buffy coata«. V prvih poskusih poskušamo določiti razmere za uspešno dozorevanje dendritskih celic in za elektrofuzijo s tumorskimi celicami (diagram 3 in slika 1).

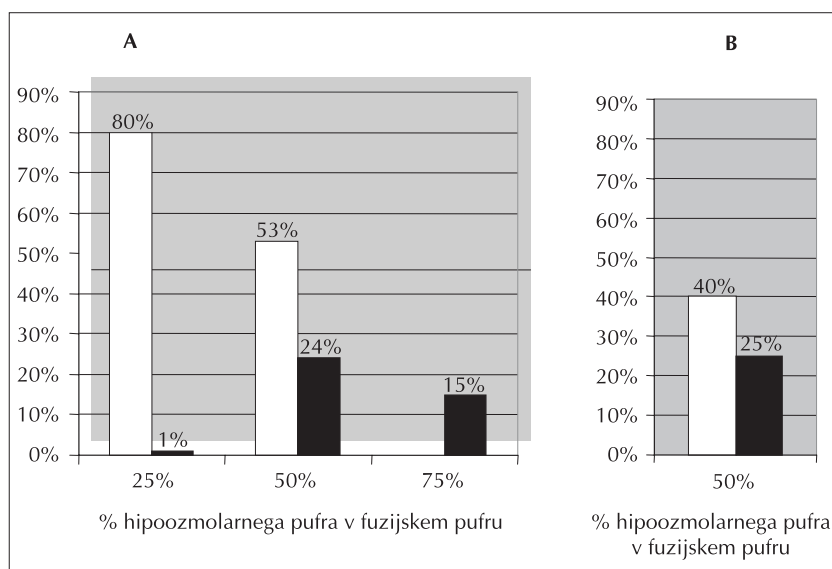
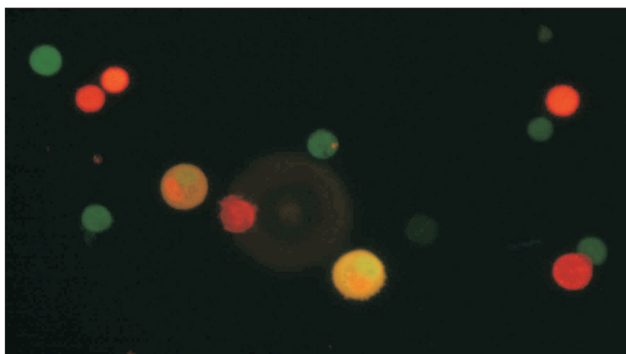


Diagram 3. Elektrofuzija monocitov (A) ali celic malignega melanoma (B-16F1) (B). Določanje deleža živih celic (?) in deleža fuziranih celic (■) v pufrih za elektrofuzijo z različno osmolarnosti.



Slika 1. Fuzija celic, označenih s fluorescentnima barviloma CMTMR in CMFDA, ki obarvata citoplazmo zeleno ali rdeče. Fuzirane celice so dvojno obarvane.

Sklep

Raziskave tumorskih vakcin so nakopičile vznemirljive predklinične podatke, ki potrjujejo, da lahko z različnimi vrstami vakcin sprožimo specifičen imunski odgovor proti tumorskim celicam. Žal pa večina preliminarnih kliničnih rezultatov prinaša razočaranje. Možnih razlag za neuspehe v kliničnih raziskavah je kar nekaj: (1) bolnikov imunski sistem je lahko postal toleranten ali neodziven na tumorske antigene; (2) prisotna so že predhodno nastala nevtralizirajoča protitelesa; (3) najprimernejši antigen se ne izraža na tumorskih celicah; (4) tumorske vakcine preizkušamo na napačno izbrani skupini bolnikov. Če upoštevamo navedene možnosti, potem sploh ni presenetljivo, da so klasične tumorske vakcine pogosto enako ali celo učinkovitejše kot novejša, ravno zaradi pristopov, ki jih uporabimo pri njihovi pripravi. Moderne vakcine so namreč velikokrat v svoji aktivnosti preveč specifične, s čimer omogočijo, da se tumorske celice izognejo imunski prepoznavi. Prihodnost tumorskih vakcin zato verjetno predstavlja priprava vakcin, ki bodo vsebovale različne temeljne strukture, potrebne za aktivacijo imunskega sistema (npr. hibridomi), ali pa kombinirana uporaba že poznanih vakcin.

Viri

- Schirmacher V, Hoegan P, Schlag P, Liebrich W, et al. Active specific immunotherapy with autologous tumor cell vaccines modified by Newcastle disease virus: Experimental and clinical studies. In: Schirmacher V, Schwartz-Abiez R, eds. *Cancer Metastasis*. Berlin: Springer-Verlag, 1989: 157–70.
- Chan AD, Morton DL. Active immunotherapy with allogeneic tumor cell vaccines: present status. *Semin Oncol* 1998; 25: 611–622.
- Novaković S, Ihan A, Wraber B, Jezeršek B. An effective tumor vaccine against malignant melanoma: irradiated autologous tumor cells admixed with MVE-2. *Int J Mol Med* 1999; 3: 95–102.
- Novaković S, Ihan A, Jezeršek B. Effectiveness of a simply designed tumor vaccine in prevention of malignant melanoma development. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90: 1130–8.
- Schlom J, Abrams IS. Tumor immunology. In: Bast CR, Kufe WD, Pollock ER, Weichselbaum RR, Holland FJ, Frei E, eds. *Cancer medicine*. London: B.C. Decker Inc. 2000: 153–67.
- Ghetie MA, Bright H, Vitetta ES. Homodimers but not monomers of Rituxan (chimeric anti-CD20) induce apoptosis in human B-lymphoma cells and synergize with a chemotherapeutic agent and an immunotoxin. *Blood* 2001; 97: 1392–8.
- Hock H, Dorsch M, Kunzendorf Uquin Z, Diamanstein T, Blankenstein T. Mechanisms of rejection induced by tumor cell-targeted gene transfer of interleukin 2, interleukin 4, interleukin 7, tumor necrosis factor, or interferon γ . *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2774–8.
- Novaković S, Knežević M, Golouh R, Jezeršek B. Transfection of mammalian cells by the methods of receptor mediated gene transfer and particle bombardment. *J Exp Clin Cancer Res* 1999; 18: 531–6.
- Novaković S, Čegovnik U, Menart V, Galvani V, Wraber B. Construction of an expression cassette with hTNF- α gene for transient expression of the gene in mammalian cells. *Anticancer Res* 2001; 21: 365–72.
- Čegovnik U, Novaković S. Setting optimal parameters for in vitro electrotransfection of B16F1, SA1, LPB, SCK, L929 and CHO cells using predefined exponentially decaying electric pulses. *Bioelectrochem* 2004; 62: 73–82.
- Sivasubramanian B, Ostrand-Rosenberg S, Nabavi N, et al. Constitutive expression of B7 restore immunogenicity of tumor cells expressing truncated major histocompatibility complex class II molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5687–90.
- Nestle FO, Banchereau J, Hart D. Dendritic cells: On the move from bench to bedside. *Nature Med* 2001; 7: 761–5.