

# Ocena rezultatov vakcinacije z dendritičnimi celicami pri zdravljenju raka pri ljudeh

## Critical issues regarding dendritic cell vaccination for human cancer

Frank O. Nestle

Department of Dermatology, University of Zurich Medical School, Zurich, Switzerland

---

**Povzetek:** Melanom je imunogeni tumor z znanimi tumorskimi antigeni. Pomemben terapevtski cilj je indukcija specifičnih citotoksičnih T limfocitov (CTL) proti melanomu. Dendritične celice (DC) so se v večjih mišjih modelih pokazale kot primerne za indukcijo specifičnih CTL proti melanomu. Razpravljali bomo o trenutnih rezultatih pri uporabi DC za zdravljenje raka pri ljudeh, kot je pridobivanje in uporaba humanih DC, uporaba nadomestnih helperskih antigenov, različnih metodah za odkrivanje za antigen specifičnih imunskih odzivov. Predstavili bomo tudi nekaj naših kliničnih ugotovitev, ki obravnavajo vakcinacijo bolnikov z melanomom v IV stadiju in razpravljali o vzrokih za neodzivnost na zdravljenje.

**Ključne besede:** melanom - zdravljenje, imunologija; dendritične celice; T-limfociti citotoksični; novotvorbe, vakcine

**Abstract:** Melanoma is an immunogenic tumor with defined tumor antigens. An important therapeutical aim is the induction of anti-melanoma specific cytotoxic T-lymphocytes (CTL). Dendritic cells (DC) as natural adjuvant have proven to be suitable for the induction of anti-melanoma specific CTL in several murine models. We will discuss current issues in the use of DC for treatment of human cancer such as the generation and application of human DC, use of surrogate helper antigens, various methods to detect antigen-specific immune response and briefly touch on some of our clinical data relating to vaccination of stage IV melanoma patients. Finally, we will propose reasons for missing response to DC therapy.

**Key words:** melanoma - therapy - immunology; dendritic cells; T-lymphocytes, cytotoxic; cancer vaccines

---

### Uvod

Dendritične celice (DC) ščitijo imunski sistem in predstavljajo antigen perifernih tkiv, kot je koža, sekundarnim limfatičnim organom, kot so bezgavke.<sup>1</sup> So visoko specializirane anti-

gen-prezentirajoče celice (APC) za aktivacijo za antigen specifičnih efektorskih T celic, ki recirkulirajo v sekundarnih limfatičnih organih. V zadnjih desetih letih je porast razumevanja biologije DC odprl nove možnosti za aplikacijo teh celic v imunoterapiji raka. Predstavili bomo zadnje izsledke pridobivanja in aplikacije DC, uporabo nadomestnih helperskih antigenov, različne metode za odkrivanje za antigen specifičnih imunskih odgovorov,

Naslov avtorja: Frank O. Nestle, M.D., Department of Dermatology, University of Zurich Medical School, Gloriastrasse 31, 8091 Zurich, Switzerland. Tel: +41 1 255 2550; Fax: +41 1 225 4403; E-mail: nestle@derm.unizh.ch

na kratko bomo predstavili nekaj naših kliničnih izsledkov o vakcinaciji bolnikov z melanomom v IV stadiju, s pulzom DC, povzročeni z antigenom. Nazadnje bomo predlagali razloge za neodzivnost odgovora na terapijo z DC.

### Pridobivanje DC

Še pred nekaj leti je bila izolacija in pridobivanje DC časovno zamudna in komplicirana, kar je uspelo le nekaterim raziskovalnim skupinam. Z možnostjo diferenciacije DC, v prisotnosti nekaterih citokinov, npr. IL-4 in GM-CSF, od plastičnih adherentnih prekursorjev monocitov, se je povečalo število raziskav DC in možne terapevtske aplikacije le teh.<sup>2,3</sup> Istočasno so prenehali veljati kriteriji, ki so pred tem zadostovali za definicijo DC.

Nekatera ključna vprašanja pri trenutnih raziskav DC so: je plastična adherentna celica, ki je pridobljena iz krvnih monocitov v mediju brez seruma in v prisotnosti IL-4 in GM-CSF, v sedmih dneh, resnična DC? Kako stabilen je fenotip omenjene celice in koliko je zrela? Je potreben dodaten maturacijski stimulus za stabilni fenotip omenjene celice in za bolj potentno T-celično stimulatívno kapaciteto? Kakšna je migratorna kapaciteta različnih tipov DC? Katera DC je bolj primerna za specifični T-celični odgovor *in vivo* proti tumorskemu antigenu, nezrela ali zrela?

Ker dihotomnost nezrele in zrele DC ni zlahka prenosljiva iz človeka na miš, so odgovori na takšna vprašanja težka, pri modelih z glodalci. Obsežne raznolike klinične pilotne študije, s skrbno načrtovanimi in izvedenimi sistemi interpretacije rezultatov, nam bodo dale odgovor za optimalno metodo priprave DC. V času začetka klinične aplikacije DC je bila edina tehnika pridobivanja DC v telečjem serumu (FCS) z IL-4 in z granulocitnim/makrofagnim stimulacijskim faktorjem kolonije (GM-CSF). FCS-DC nosijo veliko količino MHC molekul in kostimulatornih molekul na

svoji površini in so potentni stimulatorji T celic. Od svojih dvojnikov, ki so pridobljeni v mediju brez seruma, se razlikujejo z večjo ekspresijo kostimulatornih molekul in z boljšo T celično stimulatívno kapaciteto. Rajši uporabljamo DC, ki so pridobljene brez seruma. Zadovoljiva maturacijska stimulanta bi bila LPS in CD40L, vendar nista na voljo v zadostni količini za klinično uporabo. Za indukcijo maturacije DC smo pričeli uporabljati monocitni supernatant, ki se je izkazal kot primeren.<sup>4,5</sup> Kjub temu ima supernatant slabost, namreč induktorji maturacije, citokini, se lahko spreminjajo od pripravka do pripravka. Zaradi tega uporabljamo kot maturacijske stimulse mešanico citokinov IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  +/- PGE2.<sup>6</sup> Takšna mešanica zagotavlja zanesljivo maturacijo DC in stabilen fenotip s potentno T celično stimulatívno kapaciteto. Za kontrolo kvalitete uporabljamo markerje vezane na funkcijo CD, kot so CD 80, CD 86, CD 40 in HLA-DR. Nadomestni markerji zrelih DC, kot je CD 83, so lahko koristni, vendar korelacija ekspresije CD 83 z imunološko in klinično učinkovitostjo še ni dokazana.

### Uporaba DC

Vnos DC v bolnika je pomembnejše vprašanje, kot je pridobivanje DC. Možnih je več načinov, kot so intravenozni, intradermalni, subkutani ali intranodalni. Več raziskovalnih skupin uporablja intravenozni način vnosa. Injicirane DC se sprva transportirajo do pljuč, kar vodi do razpada DC antigenskih kompleksov in to je lahko zaskrbljujoče. Prosti disseminirani antigeni lahko v telesu sprožijo nepačen imunološki odziv, kar lahko privede do tolerance, namesto do imunološke aktivacije. Za pridobivanje zadostnih DC prekursorjev se uporablja intravenska aplikacija velikega števila DC, kar zahteva levkoferezo; slednja je za bolnika naporen in neprijeten postopek. Če ekstrapoliramo podatke, ki so dobljeni iz živalskih modelov, se zdi intradermalna apli-

kacija vnosa DC primerna. Domneva se, da intradermalno vnesene DC migrirajo iz aferentnih limfnih vodov do bezgavk. Dosedanje študije niso z zanesljivostjo potrdile migratorno kapaciteto *in vivo* vnesenih DC. Migratorna kapaciteta in število DC, ki se transportirajo do bezgavk, sta ključni vprašanji nadaljnjih študij.

V času naše raziskave še niso bili na voljo zadovoljujoči podatki o migratorni kapaciteti humanih DC, zato smo se odločili, da bomo injicirali DC v inguinalne bezgavke pod kontrolo ultrazvoka. Kot smo že povedali, je bezgavka primerno mesto, kjer komunicirata DC in T celice in je tako, gledano teoretično, zaželjeno mesto iniciranja z antigeni vezane DC. Injicirali smo  $1 \times 10^6$  DC v 500  $\mu$ l fosfatnega pufra (PBS). Injiciranje je potekalo pod kontrolo z ultrazvokom. Porast hipohogena območja v bezgavki je odgovarjalo injiciranemu mediju z DC. Uspešnost injiciranja je zelo visoka in reproducibilna.

### Hemocianin (KLH) kot nadomestni helperski antigeni

Peptidno pulziranje DC bo verjetno generiralo samo nekaj specifičnih kompleksov peptidov z MHC, tako da bodo tekmovali z nizko vezavno afiniteto lastnih peptidov in z označevanjem nekaterih »praznih« MHC površinskih molekul razreda I. Pod temi pogoji obstaja majhna verjetnost za nastanek citotoksičnih T celic (CTL), brez dodatnih signalov. Šibki antigeni, kot so tumorski antigeni, sami po sebi niso učinkoviti za tvorbo učinkovitih specifičnih CTL, kar je bilo dokazano na večih živalskih modelih. Takšen dodaten signal zagotavljajo citokini ali posebni helperski T limfociti. Sklepali smo, da bi nadomestni helperski antigen general zadostne helperske signale. Izbrali smo hemocianin (KLH), neoantigen z visoko potentno imunostimulatorno kapaciteto, ki je pridobljen iz polžev. Takšen antigen nam dopušča

(i) kontrolo indukcije odgovora CD 4 pozitivnih helperskih T celic in (ii) predstavitev potentnega T celičnega odgovora na mestu aktivacije T celic, torej v injicirani bezgavki. KLH je prinešen k DC eksogeno, preko antigenske predstavitve in po intranodalnem injiciranju inducira zelo močen KLH specifični spominski odgovor *in vivo*. Mnogo KLH specifičnih spominskih T celic v injiciranih bezgavkah prispeva k maturaciji in indukciji produkcije DC s pomočjo IL-12, preko CD 40/ CD 40 L signaliziranja in tudi vodi do nastanka »super aktiviranih« DC, ki so sposobne aktivirati ubijalske T celice brez prisotnosti pomagalk.<sup>7,8</sup>

### Zaznavanje od antigena specifičnega imunskega odgovora

Zaznavanje od antigena specifičnega imunskega odgovora je pomemben nadomestni marker kon trole za učinkovitost strategije vakcinacije, čeprav bo korelacija s kliničnim odgovorom najpomembnejše vprašanje. Klasična pot detekcije aktivnosti CTL je merjenje litične aktivnosti označenih tarčnih celic s <sup>51</sup>Cr. Ker je pogostotst prekurzorjev nizka, je za zadostno detekcijo CTL s citotoksičnimi analizami potrebna dva do trikratna *in vitro* restimulacija. Takšne tehnike so časovno zamudne in lahko privedejo do artefakta, ki omejuje kvantitativne analize. Ta metoda je navkljub vsemu zlati standard za merjenje litične aktivnosti efektorskih celic, torej tiste funkcionalne aktivnosti, ki jo želimo inducirati *in vivo*. Nedavno so predstavljene metode, ki merijo sproščanje citokinov iz CTL, po stiku z antigenom. Citokine je mogoče izmeriti z ELISA-o (ELISPORT), ali jih intracelularno kvantificirati s pretočno citometrijo, po predhodnem barvanju. Težave z ELISPORT metodo je nizka reproducibilnost, zaradi različne individualne subjektivne ocene rezultatov. Druga težava je v tem, da detekcija sproščanja citokinov ne korelira nujno z citolitično aktivnostjo določene celice. Mi smo

izvedli dodatno metodo testiranja specifičnih imunskih odgovorov na peptid, zakasnele hipersenzitivnosti (DTH). Sam peptid ali DC s peptidom so bili injicirani intradermalno, na mestu katere se je pojavila induracija in eritem po 48 urah. Pri vseh naših bolnikih smo dobili zelo dobro korelacijo med pozitivnim DTH odgovorom in kliničnim odzivom. Ta tehnika je pomembna tako za bolnike kot za zdravnike, ker slednji lahko nemudoma opazujejo morebitno pojavnost ali odsotnost imunoreaktivnosti. DTH testiranje s peptidom je bilo uspešno uporabljeno v različnih mišjih modelih.<sup>9</sup> Pri ljudeh smo opazili tudi pojav specifičnih T celic proti peptidu, na mestu injiciranja.<sup>10</sup>

Trenutno potekajo razprave o uporabi HLA-peptidnih tetramernih kompleksov.<sup>11-13</sup> Po biotilaciji smo pripravili tetramerno strukturo z dodanim streptavidinom, ki je bil fluorescentno označen. Takšni kompleksi se vežejo na specifične T celice, ki se lahko odkrivajo s pretočno citometrijo. Pomanjkljivost je nizka senzitivnost, ki je pogosto potrebna za pri *in vitro* restimulaciji T celic za specifični antigen. S tetrameri ne moremo odkriti T celic s spreminjajočo se ali z nizko afiniteto, ki pa so pomembne predvsem pri vakcinaciji proti lastnim antigenom (diferencijski antigeni pri melanomu).

### Stranski učinki

Pri zdravljenju 30 bolnikov z napredovalim melanomom, s peptidom ali z lizatoma pulznih DC, nismo zaznali pomembnih stranskih učinkov. Pri nekaj bolnikih smo zaznali blag porast telesne temperature po vakcinaciji ali boleče bezgavke. Ker smo uporabili peptidne antigene, ki smo jih pridobili iz melanocitnih diferenciacijskih antigenov, se lahko pojavijo avtoimunim podobne reakcije. V času vakcinacije se lahko pojavi progresivni vitiligo ali depigmentacija melanocitnih nevusov. Težjih destruktivnih avtoimunih reakcij nismo zaznali, razen indukcijo protiteles proti ščit-

ničnim receptorjem, proti jedrnih protiteles in revmatoidnega faktorja, pri nekaterih bolnikih.

### Klinični rezultati

Čeprav je indukcija specifičnega imunskega odziva proti antigenu pomemben dejavnik kontrole uspešne vakcinacije, je bil naš cilj regresija tumorskih lezij. Za evaluacijo bolnikov, ki so se odzvali na terapijo, smo oblikovali natančen kriterij. Poseben pomen smo pripisali objektivni hitrosti odziva (tako popolnega kot delnega), trajanje odziva, kot tudi lokaciji metastaz, ki so regrediirale. Pri več kot 30 zdravljenih bolnikih so objektivne hitrosti odziva v skladju s predhodno objavljenimi raziskavami. Trenutno potekajo tudi mnoge multicentrične študije, v katerih se obravnavajo različni režimi zdravljenja napredovelega melanoma z DC vakcinacijo in rezultati bi morali pokazati dejansko klinično učinkovitost DC vakcinacije. Obstaja več zanimivih kliničnih opažanj, o katerih lahko razpravljamo. Tako je večkrat opisan popoln odziv na terapijo, ki je trajal 2 leti; to kaže na dolgotrajni anti tumorski učinek. Rezultati neobjavljenih preliminarnih študij kažejo na to, da bi morda bila ponovljena vakcinacija potrebna za vzdrževanje učinka terapije. Tumorska regresija se pojavi v različnih organih, kot so pljuča, žlezi slinavki, bezgavkah in v koži. Obstaja zelo dobra korelacija med odgovorom na terapijo in imunskim odzivom. Ponavljajoča se vakcinacija je morebiti koristna za bolnike in odgovor na vakcinacije korelira z imunskim odzivom. Pri vseh bolnikih, razen pri enem, ki so bili vključeni v naše prejšnje raziskave, je bila s 4h-kromom dokazana indukcija od peptida specifičnih CTL. Ena od dogem imunoterapije je bila, da samo bolniki z majhnim tumorjem lahko odreagirajo na terapijo z DC vakcinacijo. Dokazali smo, da lahko tudi bolniki z obsežnim tumorjem odreagirajo na vakcinacijo z DC; odgovor je v veliki meri odvisen od eks-

presije tarčnih antigenov na tumorskih celicah in ne od velikosti tumorja.

### Razlogi za neodzivnost na zdravljenje

Medtem ko obstaja zmerni optimizem in čedalje več dokazov, da lahko DC vakcinacija zelo dobro inducira imunski odziv na specifični antigen in posledično na klinični odziv obolelih za rakom, pa je malo znanega, zakaj se nekateri bolniki na zdravljenje ne odzivajo. Predpogoj za uspešno uničevanje celic je ekspresija peptidov/MHC na površini melanomskih celic, ki jih lahko prepoznavajo ubijalski T limfociti. Najbolj sposobne celice ubijalke, ki so inducirane s super aktiviranimi DC, ne morejo uničevati tarčnih celic, če tarčni kompleksi niso izraženi na tarčni celici. Tumorski antigen se mora izraziti na površini tumorske celice. Večina proteinov se v proteasomih razcepi v manjše peptide. Slednji se transportirajo v endoplazemski retikulum, kjer se vežejo z MHC kompleksi. Kompleksi peptidov/MHC se končno izrazijo na celični površini, kjer jih prepoznavajo T celice ubijalke. Na sveže ekscidiranih metastazah *in situ* smo proučevali ekspresijo različnih proteinov, ki so bili potrebni za antigensko procesiranje in za izražanje na celični površini. Pri vseh bolnikih, ki se na terapijo z DC niso odzivali, smo opazili poškodbe in izgube različnih molekul, ki so potrebne za procesiranje antigenov in za njihovo izražanje na celični površini. Zaključimo lahko, da tudi pri najboljšem režimu vakcinacije bolnikov z napredovalim melanomom ne moremo zaznati kliničnega odgovora v visokem odstotku. Tako bi s pre-screeningom v primerih imunskega pobega lahko zagotovili večji uspeh terapije z vakcinacijo

### Literatura

- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells in the control of immunity. *Nature* 1998; **392**: 245-52.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-4 and downregulated by tumor necrosis factor-alpha. *J Exp Med* 1994; **179**: 1109-18.
- Romani N, Gruner S, Kämpgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994; **180**: 83-93.
- Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, et al. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 1996; **196**: 137-51.
- Bender A, Sapp M, Schuler G, Steinmann RM, Bhardwaj N. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods* 1996; **196**: 121-35.
- Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, et al. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 3135-42.
- Lanzavecchia A. License to kill. *Nature* 1998; **393**: 413-4.
- Ridge JP, di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ t-helper and a T-killer cell. *Nature* 1998; **393**: 474-7.
- Puccetti P, Bianchi R, Fioretti MC, Ayroldi E, Uyttenhove C, Peel AV, et al. Use of a skin test to determine tumor-specific CD8+ T cell reactivity. *Eur J Immunol* 1994; **24**: 1446-52.
- Nestle FO, Lijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, et al. Vaccination of melanoma patients with peptide or tumor lysate pulsed dendritic cells. *Nature Med* 1998; **4**: 328-32.
- Ogg GS, McMichael AJ. HLA-peptide tetrameric complex. *Curr Opin Immunol* 1998; **10**: 393-6.
- Dunbar PR, Ogg GS, Chen J, Rust N, van der Bruggen P, Cerundo V. Direct isolation, phenotyping and cloning of low-frequency antigen-specific cytotoxic T lymphocytes from peripheral blood. *Curr Biol* 1998; **8**: 413-6.
- Altman JD, Moss PAH, Goulder PJR, Barouch DH, McHeyzer WMG, et al. Phenotyping analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 1996; **274**: 94-6.