

CEPIVA PROTI RAKU DOJK: IZZIVI IN PREBOJI TER ZASNOVA SLOVENSKE RAZISKAVE

Dr. Simona Borštnar, dr. med.

Sektor za internistično onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana

Povzetek

Imunoterapija je pri raku dojk stopila pod soj žarometov po odkritju napovedne vrednosti limfocitov, ki infiltrirajo tumor, in dokazane učinkovitosti zaviralcev imunskih nadzornih točk. Tumorska cepiva so obetavno področje imunoterapije raka dojk. Delujejo tako, da spodbudijo imunski sistem bolnika k prepoznavanju in uničenju rakavih celic. Pri raku dojk so v kliničnih raziskavah v uporabi: peptidna cepiva, cepiva na osnovi beljakovin, cepiva na osnovi ogljikovih hidratov, cepiva na osnovi nukleinskih kislin, cepiva iz tumorskih celic, cepiva na osnovi dendritičnih celic in dendritične celice, zlite s tumorjem. Cepiva proti raku so v skoraj vseh kliničnih raziskavah pokazala obetavne rezultate glede varnosti, vendar pa ne pomembnega izboljšanja izhodov bolezni. K temu je lahko prispevalo več dejavnikov: heterogenost preiskovane populacije bolnikov glede na obseg bolezni in glede na podtip, preskušanje predvsem pri bolnikih z močno napredovalo boleznijo in majhno število vključenih bolnikov.

V pripravi je slovenska raziskavi faze II, v katero bomo vključili bolnike s trojno negativnim rakom dojk stadijev II in III, pri katerih po standardni neoadjuvantni kemo-imunoterapiji ne bomo dosegli popolnega odgovora. Iz ostanka tumorja bomo odvzeli avtologne tumorske celice, ki bodo obsevane in z elektrofuzijo združene z dendritičnimi celicami. Tako bo pridobljeno cepivo – imunohibridom, s katerim bodo cepljene bolnice po zaključeni dopolnilni kemoterapiji, vzporedno s standardnim dopolnilnim zdravljenjem z zaviralcem imunskih nadzornih točk.

Ključne besede: rak dojk, imunoterapija, protitumorska cepiva, imunohibridom, klinična raziskava

Uvod

Rak dojke dolgo ni veljal za imunogen rak. V zadnjih letih pa so številne raziskave pokazale, da so limfociti, ki infiltrirajo tumor (TIL), povezani z dolgoročno prognozo in tudi odzivom na zdravljenje pri bolnikih z rakom dojke. Skupaj s kliničnimi uspehi zaviralcev imunskih nadzornih točk pri trojno negativnem raku dojke je vzniknilo tudi intenzivno zanimanje za druge oblike imunoterapije raka dojke.

Strategije zdravljenja, ki temeljijo na imunskem sistemu, lahko razdelimo na pasivno in aktivno imunoterapijo. Ciljanje proti različnim tarčam z monoklonskimi protitelesi spada v prvo kategorijo. Aktivna imunoterapija pa se nanaša predvsem na cepiva proti raku. Cepivo proti raku naj bi izzvalo ali okrepilo protitumorsko delovanje z aktiviranjem avtolognih imunskih celic pri bolniku, da povzročijo terapevtski učinek.

Čeprav so bila prav cepiva prva oblika spodbujanja imunskega sistema, je njihova uporaba kot imunoterapije raka do danes ostala omejena. Profilaktična cepiva, ki ščitijo pred okužbo s humanim papiloma virusom (HPV) in virusom hepatitisa B (HBV), veljajo za cepiva proti raku, ki preprečujejo maligne bolezni, povezane s HPV in HBV. Ta cepiva se razlikujejo od terapevtskih protitumorskih cepiv, ki aktivno ciljajo na tumorske celice s terapevtskim namenom.

Kako deluje imunski sistem

Imunski sistem ima različne vloge v različnih fazah razvoja in napredovanja raka dojke. Interakcijo med tumorjem in imunskim sistem imenujemo imunsko urejanje, ki se na splošno razvija skozi tri faze: izločanje, ravnotežje in pobeg. Med fazo izločanja tumorske celice aktivirajo prirojeno imunost, vključno z zorenjem makrofagov, naravnih celic ubijalk (angl. natural killer cells, NK) in dendritičnih celic (angl. dendritic cell, DC). Te celice pomagajo pripraviti T-celice, specifične za tumor. Prek tega mehanizma je možno izkoreninjenje zgodnjih transformiranih tumorskih celic. Faza ravnotežja se začne, če kateri koli subklon tumorja preživi selekcijski pritisk gostiteljeve imunosti. Napredovanje tumorja je v tej fazi strogo omejeno ali celo začasno ustavljeno zaradi občutljivega ravnovesja med rastjo tumorja in obrambnim učinkom imunskega sistema. Prej ko slej pa se podkloni lahko izognejo imunskemu prepoznavanju in uničenju prek več mehanizmov, kot sta zmanjšanje regulacije antigen predstavitvenih molekul in povečanje izraženosti receptorjev imunskih nadzornih točk. Tumorske celice končno uspejo ubežati imunološkemu pritisku in vstopijo v zadnjo fazo imunskega urejanja – pobeg, ko imunski sistem ne more omejiti njihovega napredovanja. Imunska terapija z uporabo

zaviralcev imunskih nadzornih točk, ki z vezavo na molekule proteina 4 citotoksičnih limfocitov T (CTLA-4, molekule programirane smrti 1 (PD-1), izražene na aktiviranih limfocitih T, ter ligande molekul programirane smrti 1 (PD-L1), prisotne na tumorskih celicah, uspešno zavre negativno signaliziranje v pridobljenih celičnih imunskih odzivih, je revolucionirala pristope k zdravljenju raka. To potrjuje tudi podelitev Nobelove nagrade za fiziologijo ali medicino v letu 2018. Danes je ta terapija pomemben sestavni del terapevtskih shem pri različnih malignih boleznih, vključno s trojno negativnim rakom dojk (TNRD). Druga imunoterapevtska strategija je uporaba protitumorskih cepiv.

Zakaj uporabiti cepiva

Tumorska cepiva delujejo tako, da vzpodbudijo imunski sistem bolnika k prepoznavanju in uničenju rakavih celic. Namen njihove uporabe je, da avtologni imunski sistem prepozna ciljni antigen, kar nato povzroči terapevtski učinek. Pri raku dojk poznamo: peptidna cepiva, cepiva na osnovi beljakovin, cepiva na osnovi ogljikovih hidratov, cepiva na osnovi nukleinskih kislin, cepiva iz tumorskih celic, cepiva na osnovi dendritičnih celic in cepiva iz zlitih tumorskih in dendritičnih celic.

Peptidna cepiva

Cepiva proti raku na osnovi peptidov so običajno sestavljena iz 20–30 aminokislin, ki vsebujejo specifične epitope antigenov, za katere je znano, da so zelo imunogeni in izzovejo želeni imunski odziv. Peptidno cepivo, ki vsebuje peptidne epitope poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa (PHK) razreda I za aktiviranje imunskega odziva proti specifičnemu tumorskemu antigenu, je ena najpogostejših strategij cepljenja proti raku dojk. Antigen predstavitvene celice (APC) obdelajo vbrizgani peptid in ga predstavijo primarnim imunskim efektorskim celicam, ki bodo nato poiskale in uničile rakave celice, ki izražajo skupni antigen. V primerjavi z drugimi oblikami cepiv so kratki aminokislinski peptidi preprosti in poceni za izdelavo ter razmeroma stabilni pri transportu, kar omogoča obsežno proizvodnjo in transport. Vendar je posamezen peptid običajno omejen na določene podtippe humanega levkocitnega antigena (HLA), zato bolnikov, ki ne izražajo običajnih tipov humanega levkocitnega antigena, ni mogoče zdraviti s cepivom .

Cepivo na osnovi beljakovin

Cepivo na osnovi beljakovin je razvito s celotnim ali skrajšanim odsekom proteina tumorskega antigena, katerega aminokislinsko zaporedje je veliko daljše od peptidov. Omogoča prevzem, obdelavo in predstavitev več peptidnim epitopom poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa razreda I in II in ni omejen na humani levkocitni antigen. Toda postopek predstavitve je lahko manj učinkovit, odziv na to vrsto cepiva pa je težko izmeriti.

Cepivo z ogljikohidratnim antigenom

Ogljikohidratne antigene, ki jih nenormalno izražajo tumorske celice, lahko razpoznajo tudi imunske celice. Zato je ogljikohidratni antigen idealen kandidat za vključitev v cepivo proti raku. Na primer, Sialy-Tn (STn), disaharidni ogljikov hidrat, povezan z MUC-1, je edinstveno izražen na celični površini različnih rakavih celic, vključno z rakom dojke.

Cepivo iz tumorskih celic

Je eden najzgodnejših pristopov cepljenja proti raku z uporabo celih tumorskih celic ali produktov lize tumorskih celic za spodbujanje imunskega odziva. Temelji na skupini neznanih antigenov, pridobljenih iz avtolognih ali alogenskih tumorskih celic, zato se sproži polivalentni imunski odziv. Pomanjkljivost cepiva proti tumorskim celicam je v tem, da ta cepiva vsebujejo endogene celične antigene in lahko povzročijo avtoimunsko reakcijo.

Cepivo na osnovi nukleinskih kislin

Cepivo proti raku dojke na osnovi dezoksiribonukleinske kisline (DNK) uporablja zaporedje DNK, ki kodira tumorske antigene, ki se običajno dostavijo v obliki plazmidov. Namesto tradicionalnih pristopov, ki uporabljajo oslABLJENE ali inaktivirane dele virusov, DNK-cepiva vsebujejo genetsko informacijo za proizvodnjo specifičnih antigenov, ki jih prepozna imunski sistem kot tuje in sproži imunski odziv, s čimer telo razvije imunost proti specifičnemu virusu ali raku.

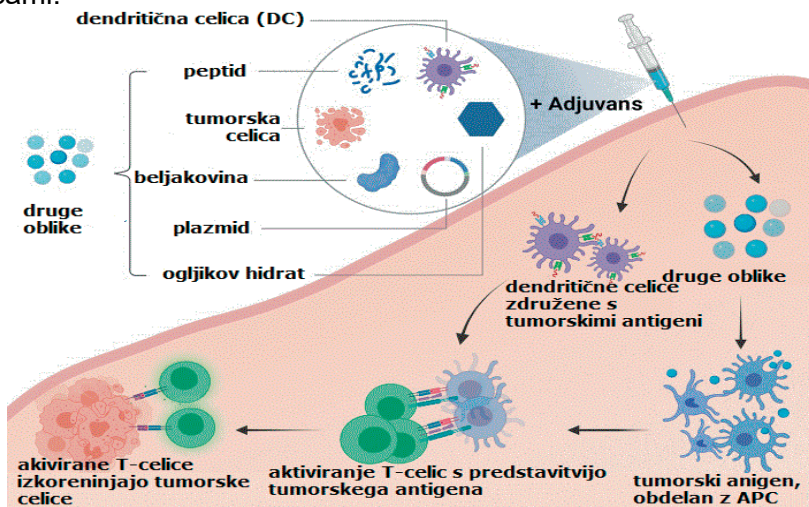
Prednosti DNK-cepiv vključujejo enostavnost izdelave in proizvodnje ter stabilnost, kar omogoča enostavno shranjevanje in transport. Poleg tega DNK-cepiva običajno sprožijo močan celični imunski odziv, ki lahko zagotovi dolgotrajno zaščito.

Cepiva na osnovi dendritičnih celic

Dendritične celice so heterogena populacija antigen predstavitvenih celic, ki učinkovito prevzemajo antigene, jih predelajo in predstavijo celicam T, pozitivnim na CD4 in CD 8, po migraciji v bezgavke. Dendritične celice lahko stimulirajo tudi celice ubijalke in celice B. Cepiva na osnovi dendritičnih celic običajno uporabljajo *ex vivo* generacijo dendritičnih celic, naloženih s tumorskimi antigeni ali transfektiranih za izražanje tumorskih antigenov. Proizvodnja cepiv na osnovi dendritičnih celic je lahko tehnično zahtevna zaradi individualiziranega postopka *ex vivo* za zorenje dendritičnih celic.

Cepivo z zlitjem dendritičnih celic s tumorskimi celicami

Eno od prizadevanj za izboljšanje strategije cepljenja, ki temelji na dendritičnih celicah, je zlitje dendritičnih celic s tumorskimi celicami. Hibride dendritičnih celic in tumorskih celic je mogoče ustvariti z izpostavitvijo dendritičnih celic in tumorskih celic določenim snovem (npr. politelen glikolu) ali si tehniko elektrofuzije. V primerjavi z dendritičnimi celicami, impulziranimi s posameznimi antigeni, lahko fuzija dendritičnih in tumorskih celic predstavi celoten repertoar tumorskih antigenov iz starševske tumorske celice, da aktivira obe poti pglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa razreda I in II. Proizvodnja tovrstnega cepiva je še težja od proizvodnje cepiv z dendritičnimi celicami.



Slika 1. Različne vrste cepiv proti raku dojke in njihovi mehanizmi. APC= antigen predstavitvena celica (povzeto po Zhu SY, et al. Frontiers in Oncology 2022).

Adjuvansi

Adjuvansi so snovi, ki povečajo imunogenost antigena in izzovejo imunski odziv, če so cepljeni z antigeni. Mehanizmi večine adjuvansov vključujejo upočasnitev sproščanja antigenov, spodbujanje privzema antigena in predstavitve APC ter spodbujanje proliferacije dendritičnih celic in makrofagov. Kot adjuvansi se lahko uporabijo citokini, mikrobi in mikrobní derivati, mineralne soli, oljne emulzije ali surfaktanti, virusni vektorji in drugi.

Klinične raziskave s cepivi

Peptidno cepivo E75, pridobljeno iz antigena HER2, je najpogostejše raziskana strategija cepljenja proti HER2 za zdravljenje bolnic z rakom dojk. Raziskovali so ga v več fazah I/II kliničnih raziskav in je prešlo v randomizirano multicentrično klinično raziskavo faze III, kjer pa ni pokazalo klinične uspešnosti. Raziskava je bila predčasno zaključena. Trojno negativni rak dojk je mutacijsko bolj obremenjen kot drugi podtipi raka dojk, zato pri njem modulacija protitumorskih imunskih odzivov s cepivi predstavlja še bolj privlačno terapevtsko strategijo. Samo pri trojno negativnem raku dojk je bilo do sedaj preskušanih skupno 32 različnih cepiv, pri čemer je tudi pri tem podtipu večina pripadala tipu cepiva na osnovi peptidov. Trenutno obstaja le nekaj objavljenih rezultatov raziskav, v okviru katerih so uporabljali zahtevnejša cepiva na osnovi dendritičnih celic na področju trojno negativnega raka dojk. Zhang in sod. so poročali o močnih T-celičnih imunskih odzivih *in vitro* na stimulacijo s hibridomi, izdelanimi z elektrofuzijo med celično linijo trojno negativnega raka dojk in zreli dendritičnimi celicami, diferenciranimi iz monocitov. Tang in sod. so razvili celično cepivo Runx2-DC tako, da so v dendritične celice, pripravljene iz monocitov, s transfekcijo vstavili lentivirusni vektor Runx2. V pogojih *in vitro* so s tem cepivom uspešno inducirali specifične citotoksične odzive limfocitov T CD8⁺ zoper tarčne celice omenjene humane celične linije (MDA-MB-231), ki izraža molekule Runx2. V okviru klinične raziskave pri trojno negativnem raku dojk in ER+/HER2-negativnem raku dojk so O'Shaughnessy in sod. med predoperativno kemoterapijo uspešno uporabili avtologne dendritične celice, pripravljene iz monocitov in opremljene z antigenom ciklin B1/WT-1/CEF, in sicer intratumorsko ter subkutano, z namenom, da bi spodbudili protitumorsko T-celično imunost.

Cepiva proti raku so v skoraj vseh kliničnih raziskavah pokazala obetavne rezultate glede varnosti, vendar pa ne pomembnega izboljšanja izhodov bolezni. K temu je lahko prispevalo več dejavnikov: heterogenost populacije glede na obseg bolezni in podtip, preskušanje

predvsem pri bolnikih z močno napredovalo razsejano boleznijo in majhno število vključenih bolnikov. Rezultatov randomiziranih, večcentričnih raziskav pri trojno negativnem raku dojk zaenkrat ni, so pa načrtovane. Nobeno cepivo pri raku dojk še ni registrirano.

Pomembno izhodišče pri načrtovanju bodočih raziskav s cepivi pri raku dojk na splošno je, da so te najučinkovitejše v razmeroma "zdravem", a ne izčrpanem tumorskem imunskem mikrokolju.

Zasnova slovenske klinične raziskave

V slovenski raziskavi bomo uporabili cepivo z avtolognimi imunohibridomskimi celicami (aHyC), ki bo pripravljeno z elektrofuzijo dendritičnih celic, pridobljenih iz avtolognih monocitov in avtolognih obsevanih tumorskih celic, torej z najzahtevnejšo in najbolj obetavno tehnologijo.

Raziskava je zasnovana kot klinično preskušanje faze II. Vključili bomo bolnice s trojno negativnim rakom dojk stadijev II do III, pri katerih s standardno neoadjuvantno imuno- kemoterapijo ne bomo dosegli popolnega odgovora. Po pisni privolitvi po poučitvi za sodelovanje v klinični raziskavi bomo bolnicam po operaciji odvzeli del rezidualnega tumorja za pripravo aHyC ter vzorce krvi. Bolniki, pri katerih bo po operaciji na razpolago dovolj tumorskega tkiva za pripravo aHyC, bodo randomizirani v dve skupini, v razmerju 1:1, in sicer: na eksperimentalno skupino, kjer bodo prejele standardno postneoadjuvantno terapijo in obsevanje ter prejem cepiva aHYC, in na kontrolno skupino, kjer bodo prejele standardno terapijo in obsevanje ter placebo.

Primarni cilji raziskave so: funkcijsko vrednotenje specifične proti tumorske citotoksične aktivnosti efektorskih citotoksičnih limfocitov T CD8+ (CLT) *in vitro*, pred (izhodišče) in po eksperimentalnem zdravljenju z aHyC, kvantitativno vrednotenje populacij in subpopulacij imunskih celic, in sicer: naravnih celic ubijalk (celice NK), limfocitov T CD8+ in CD4+, limfocitov B in celic NKT v vzorcih periferne krvi bolnikov, odvzetih pred (izhodišče), med in po uporabi cepiv aHyC. Sekundarna cilja pa sta: določitev varnosti in izvedljivosti imunske terapije s cepivom aHyC po standardnem zdravljenju trojno negativnega raka dojk ter klinični izidi (preživetje brez bolezni in celotno preživetje).

Zaključek

Kljub obetavnim rezultatom je treba poudariti, da so tumorska cepiva še vedno v fazi raziskav in razvoja, zato ni zagotovila, da bodo učinkovita pri vseh bolnikih z rakom dojk. Vendar pa njihov potencial za izboljšanje preživetja in zmanjšanje tveganja za ponovitve bolezni predstavlja pomemben korak naprej. Z nadaljnjim razvojem in kliničnimi preskušnji lahko tumorska cepiva postanejo ključno orožje v boju proti raku dojk v prihodnosti.

Literatura

1. Hosseini M, Seyedpour S, Khodaei B, Loghman AH, Seyedpour N, Yazdi MH, Rezaei N. Cancer Vaccines for Triple-Negative Breast Cancer: A Systematic Review. *Vaccines* (Basel). 2023 Jan 9;11(1):146.
2. Zhu SY, Yu KD. Breast Cancer Vaccines: Disappointing or Promising? *Front Immunol*. 2022 Jan 28;13:828386.
3. Kreidieh FY, Tawbi HA, Alexaki A, Borghaei H, Kandalaft LE. Novel Immunotherapeutics: Perspectives on Checkpoints, Bispecifics, and Vaccines in Development. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2023 Jun;43:e391278.
4. Chamani R, Ranji P, Hadji M, Nahvijou A, Esmati E, Alizadeh AM. Application of E75 peptide vaccine in breast cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Pharmacology* 2018; 831:87-93.
5. Al-Hawary SIS, Saleh EAM, Mamajanov NA, S Gilmanova N, Alsaab HO, Alghamdi A, Ansari SA, Alawady AHR, Alsaalamy AH, Ibrahim AJ. Breast cancer vaccines; A comprehensive and updated review. *Pathol Res Pract*. 2023 Sep;249:154735.
6. O'Shaughnessy J, Roberts LK, Smith JL, et al. Safety and clinical efficacy of a dendritic cell (DC) vaccine in locally advanced, triple-negative breast cancer patients (TNBC) patients. *J Clin Oncol* 2016; 34 (15_Suppl):1086.
7. Zhang P, Yi S, Li X, et al. Preparation of triple-negative breast cancer vaccine through electrofusion with day-3 dendritic cells. *PLoS One* 2014; 9:7.
8. Tang M, Liu Y, Zhang Q-C, et al. Antitumor efficacy of the Runx2-dendritic cell vaccine in triple-negative breast cancer in vitro. *Oncol Lett* 2018; 16:2813-2822
9. Haque Chowdhury H, Hawlina S, Gabrijel M, et al. Survival of castration-resistant prostate cancer patients treated with dendritic-tumor cell hybridomas is negatively correlated with changes in peripheral blood CD56 (bright) CD16(-) natural killer cells. *Clinical and translational medicine* 2021; 11(8): e505.