



Вакцина от нейробластомы: опыт Республики Беларусь

*VIII Школа по диагностике и лечению
эмбриональных опухолей*



Пролесковская И.В., Мелешко А.Н.

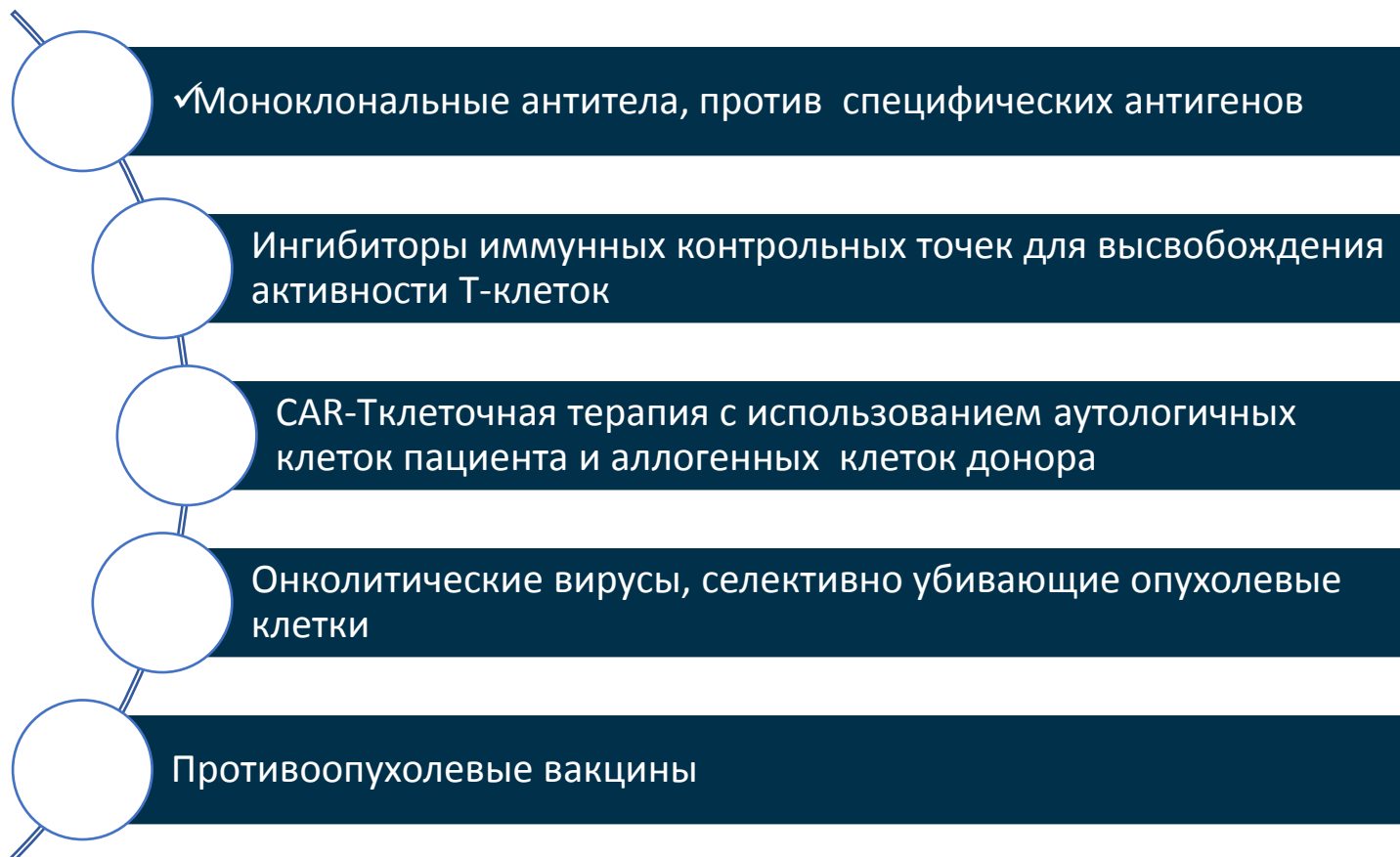
*Республиканский научно-практический
центр детской онкологии,
гематологии и иммунологии*



30 сентября 2023 г., Москва

Актуальность

Основные типы иммунотерапии, используемые при лечении опухолей



Преимущества

Недостатки

Эффективность

Иммуно-опосредованные побочные эффекты

Высокая стоимость этих видов лечения

Рост интереса к иммунотерапии, как новой терапевтической опции для онкологических пациентов

Опухолевые антигены

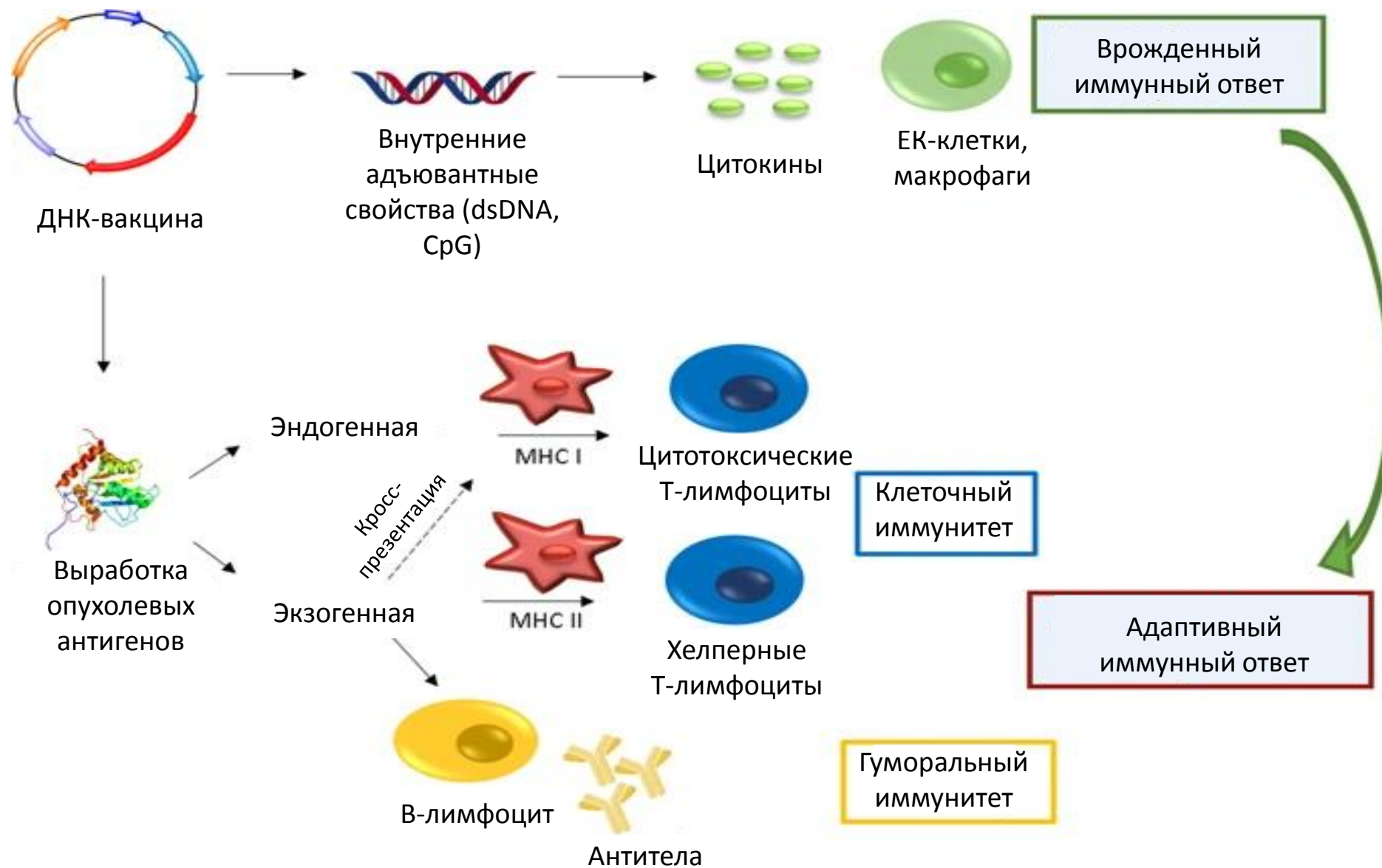
Противоопухолевая вакцинация - многообещающая стратегия для индуцирования специфического продолжительного иммунного ответа против опухолевых антигенов.

Опухолевые антигены - это в основном белки сверхэкспрессированные в опухолевой ткани, играющие центральную роль в возникновении опухоли, ее прогрессии и метастазирования.

Категории опухолевых онкогенов

Категория	Подтип	Пример
Мутационные антигены	Продукты мутированных онкогенов (TSA)	P53, Ras, Bcr-Abl
	Неоантигены	Специфические мутации
Антигены, ассоциированные с опухолью (TAAs)	Продукты молчащих генов	Антигены рака яичка (α-фетопротеин, MAGE-1, NY-ESO1)
	Дифференцировочные антигены	Gp100, тирозиназа, Melan-A, MART-1, TRP-1/- 2
	Универсальные опухолевые антигены	Her2/неу, теломераза, сурвивин
	Онковирусные антигены, ассоциированные с опухолью	HPV E6, E7, EBV-латентные мембранные белки

Врожденная и адаптивная иммунная активация, индуцированная ДНК-вакцинами



Усовершенствование методов доставки:

- внутримышечное введение,
- внутрикожное,
- подкожное,
- через слизистые.
- физические методы: электропорация, сонопорация, ДНК-татуаж, ДНК-«пистолет».



Слабая иммуногенность ДНК-вакцин в исследованиях на людях



Оптимизация кодонов – это метод генной инженерии, который позволяет заменять синонимичные кодоны для увеличения продукции белка и иммуногенности плазмиды.

К сожалению, успех в терапевтической вакцинации все еще ограничен даже в доклинических моделях.

Проблемы

Механизмы устойчивости во время развития опухоли:

Потеря или изменение эпитопов, распознаваемых иммунными клетками

Источ

Антиг
имму
клетк

Произ
ассоц

которые продуцируют иммунодепрессивные цитокины (TGF- β , IL-10 и т. д.) и лишают клетки питательных веществ и кислорода

Следовательно, чтобы полностью уничтожить опухоль, необходимы новые стратегии.

Проблемы

Пути решения

01

рациональный выбор кодируемого антигена(-ов) может выправить иммуногенность ДНК-вакцины и вызвать широкий иммунный ответ, преодолевая проблемы, связанные с потерей, модификацией и переносимостью антигена.

02

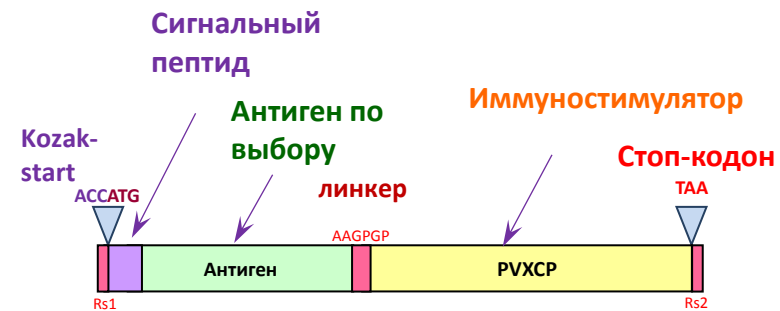
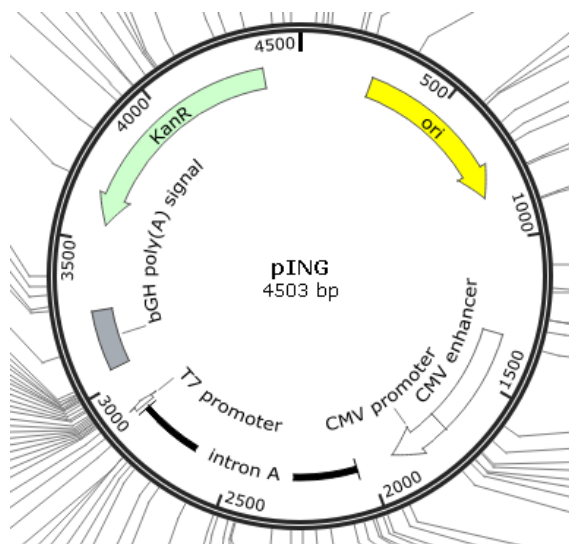
для уменьшения иммуносупрессии в микроокружении опухоли были реализованы стратегии, которые сочетают различные методы лечения для предотвращения инфильтрации иммуносупрессивными клетками и продукции иммуносупрессивных цитокинов.

Увеличение иммуногенности ДНК-вакцин



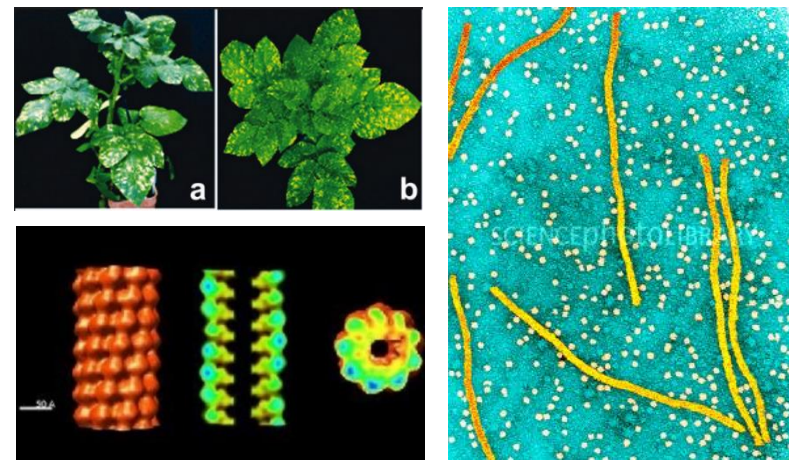
Сборка генетических конструкций ДНК-вакцин

Вектор **pING**
Предоставлен Prof. Jedd D. Wolchok (США)



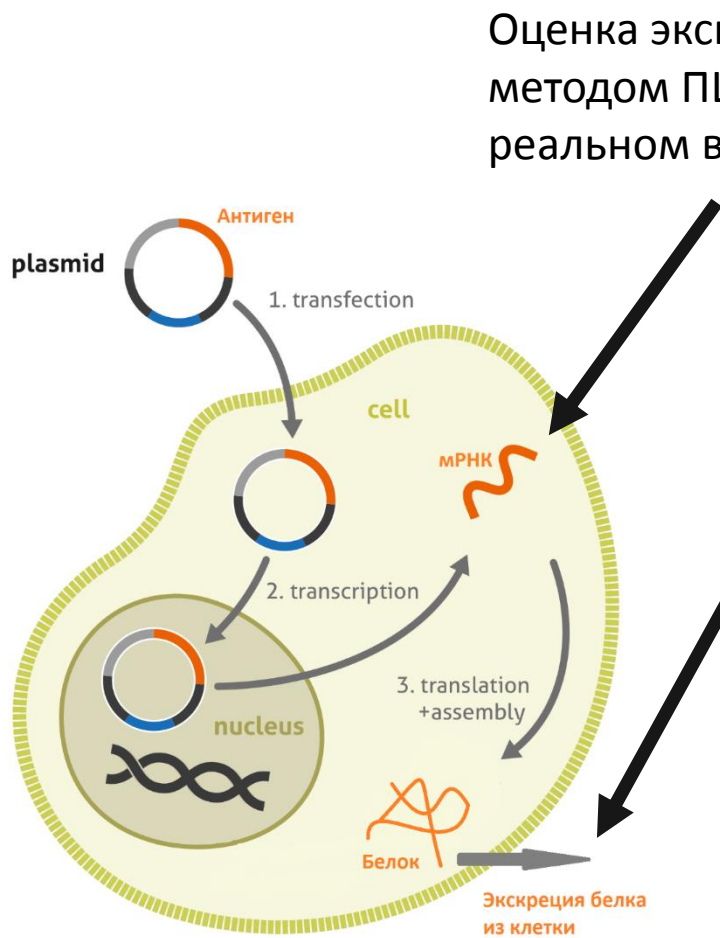
PVXCP - potato virus X coat protein
Белок капсида вируса X картофеля

Миниген **TH**
Phox2B
Survivin
MAGE-A1,
MAGE-A3
PRAME

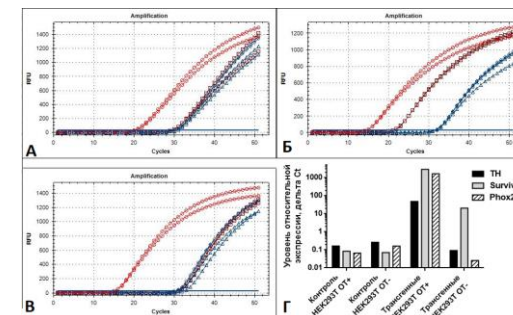


Проверка экспрессии собранных конструкций ДНК-вакцин на уровне РНК и белка

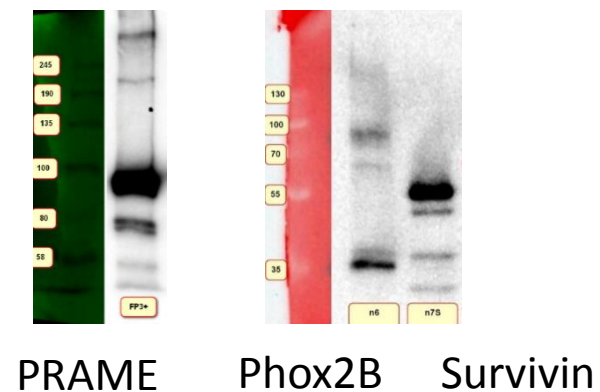
Проведена трансфекция клеточной линии НЕК293Т плазмидной ДНК



Оценка экспрессии РНК методом ПЦР в реальном времени

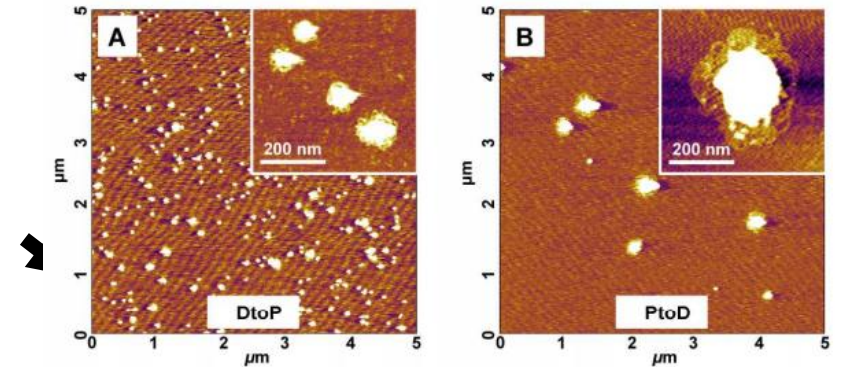
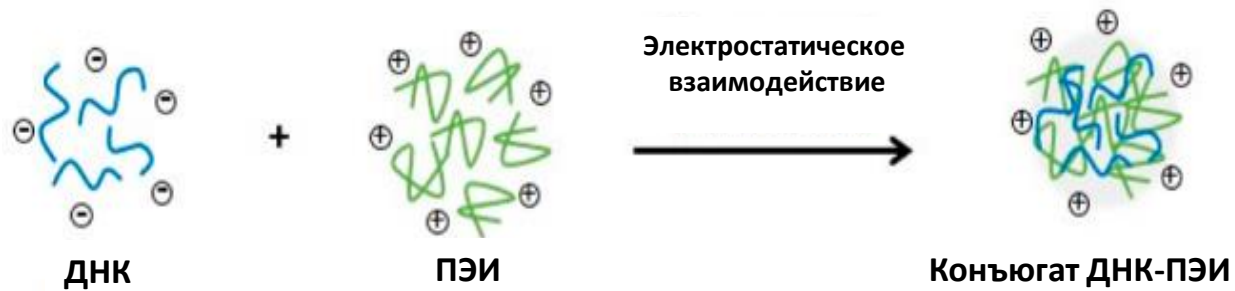


Оценка экспрессии белка методом Вестерн иммуноблоттинга



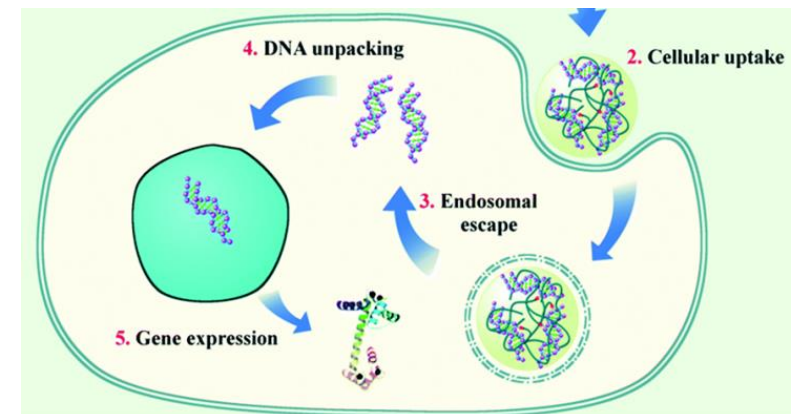
Конъюгат ДНК-вакцина + ПЭИ

Полиэтиленимин (ПЭИ) – катионный полимер, образующий с ДНК наночастицы, обладающие высокой трансфецирующей активностью

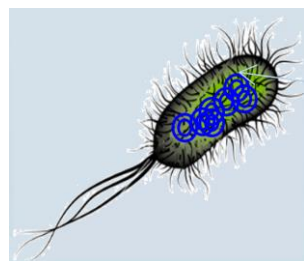


Эффекты ПЭИ:

- Облегчают транспорт через мембрану клетки
- Предохраняет от деградации
- Увеличивают цитоплазматическую мобильность



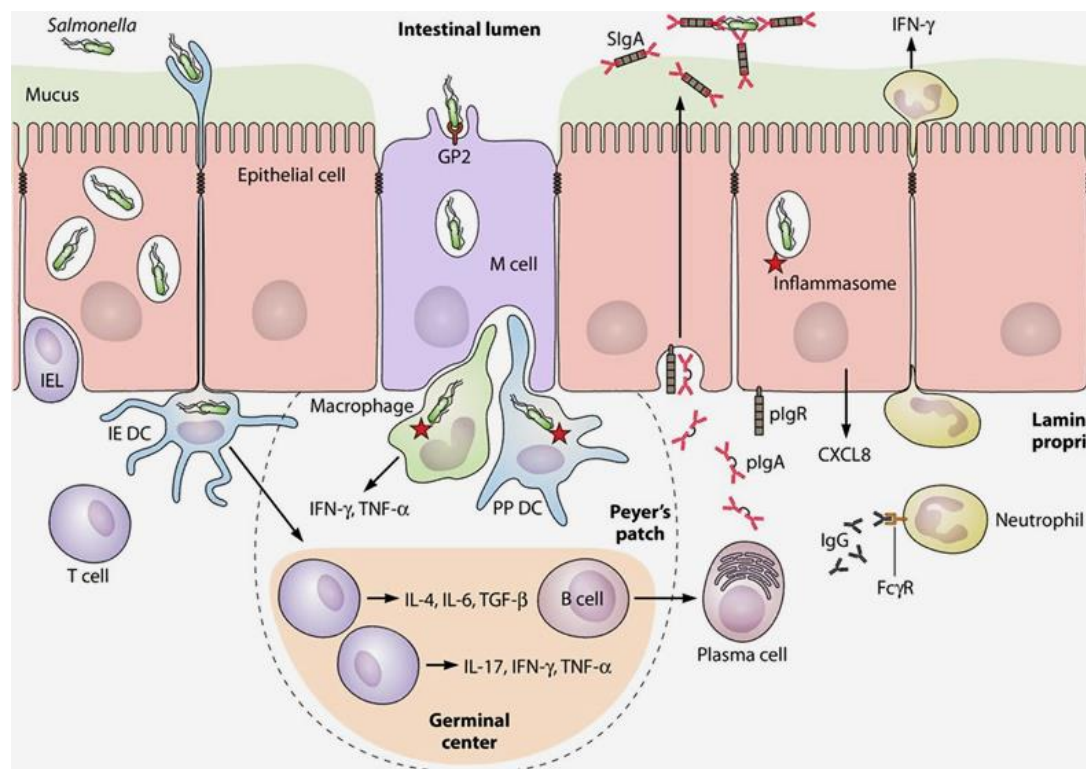
Пероральная форма ДНК вакцины на основе бактериальной доставки



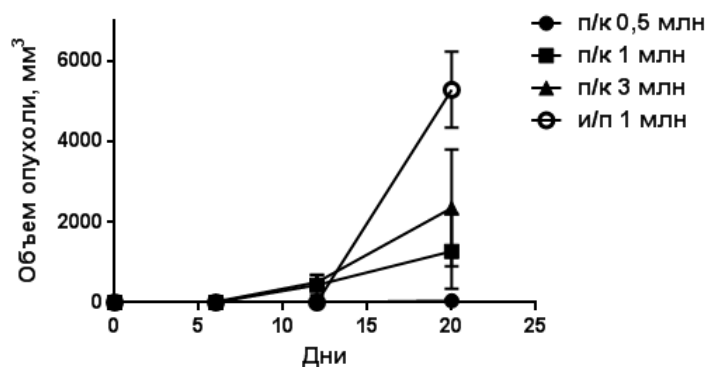
ДНК-вакцина

Бактериальный носитель
Salmonella enterica serovar Typhimurium
Аттенуированный штамм
SL7207 – мутант *aroA*

Аттенуированный штамм
SS2017 – двойной ауксотрофный мутант *aroA*, *guaAB*



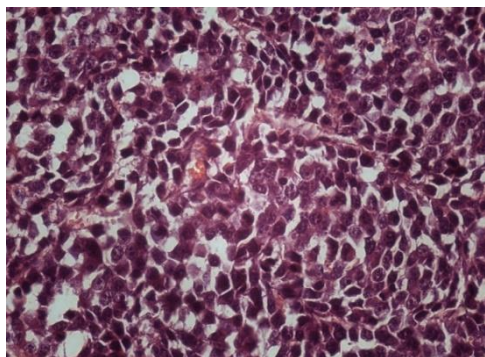
Динамика роста опухоли при разных дозах и путях прививки



Клетки нейробластомы NB41A3
Мыши линии А/Ж



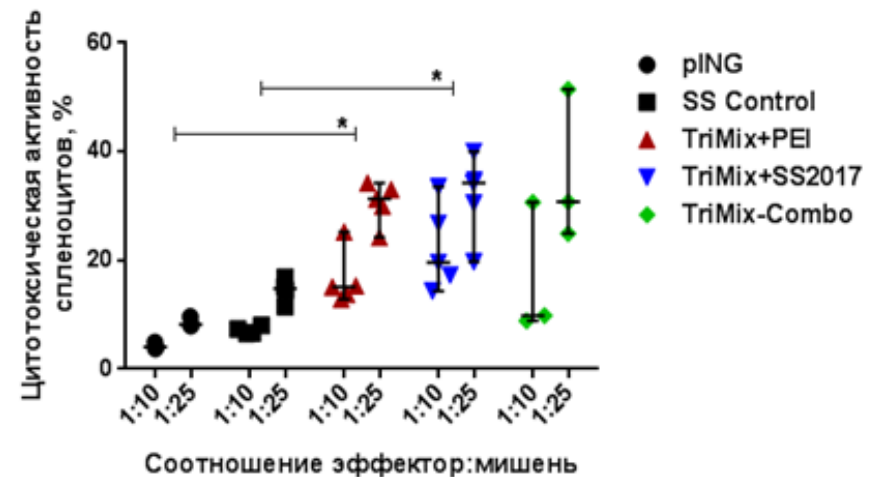
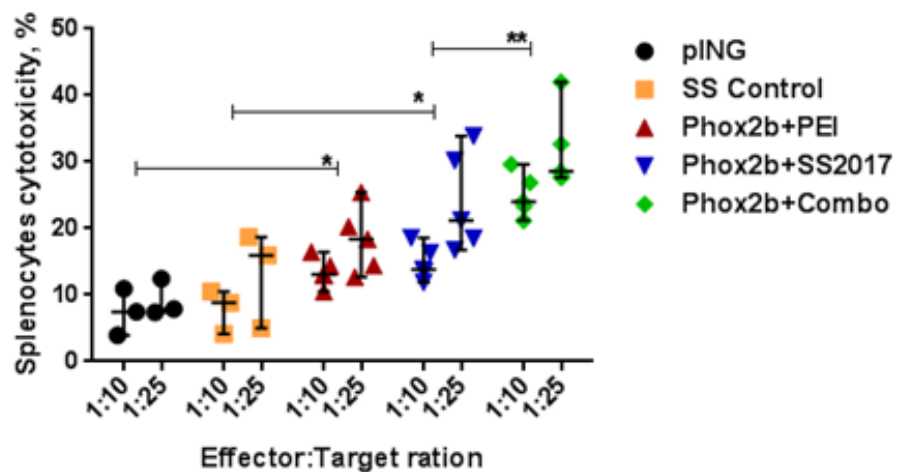
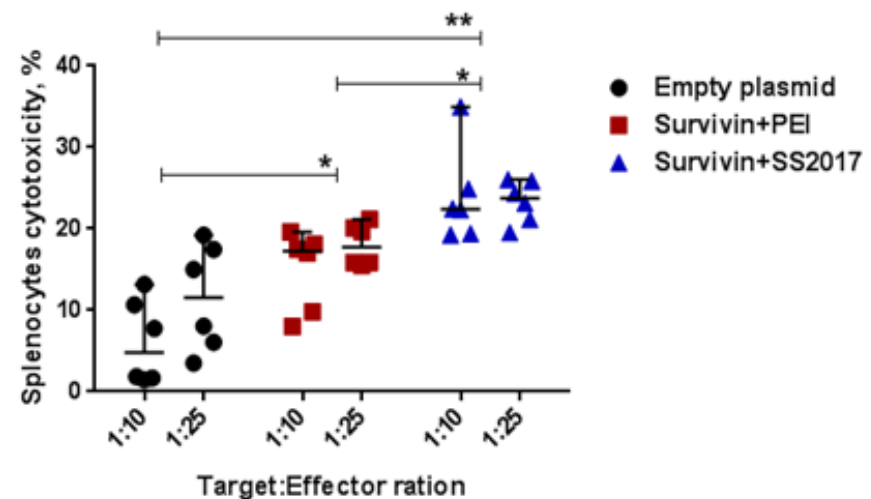
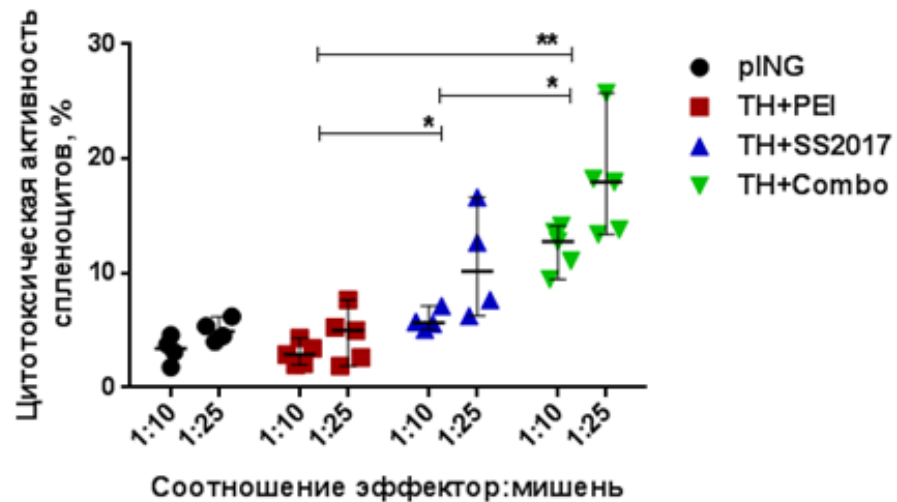
Гистологический срез опухоли
(увеличение x40)



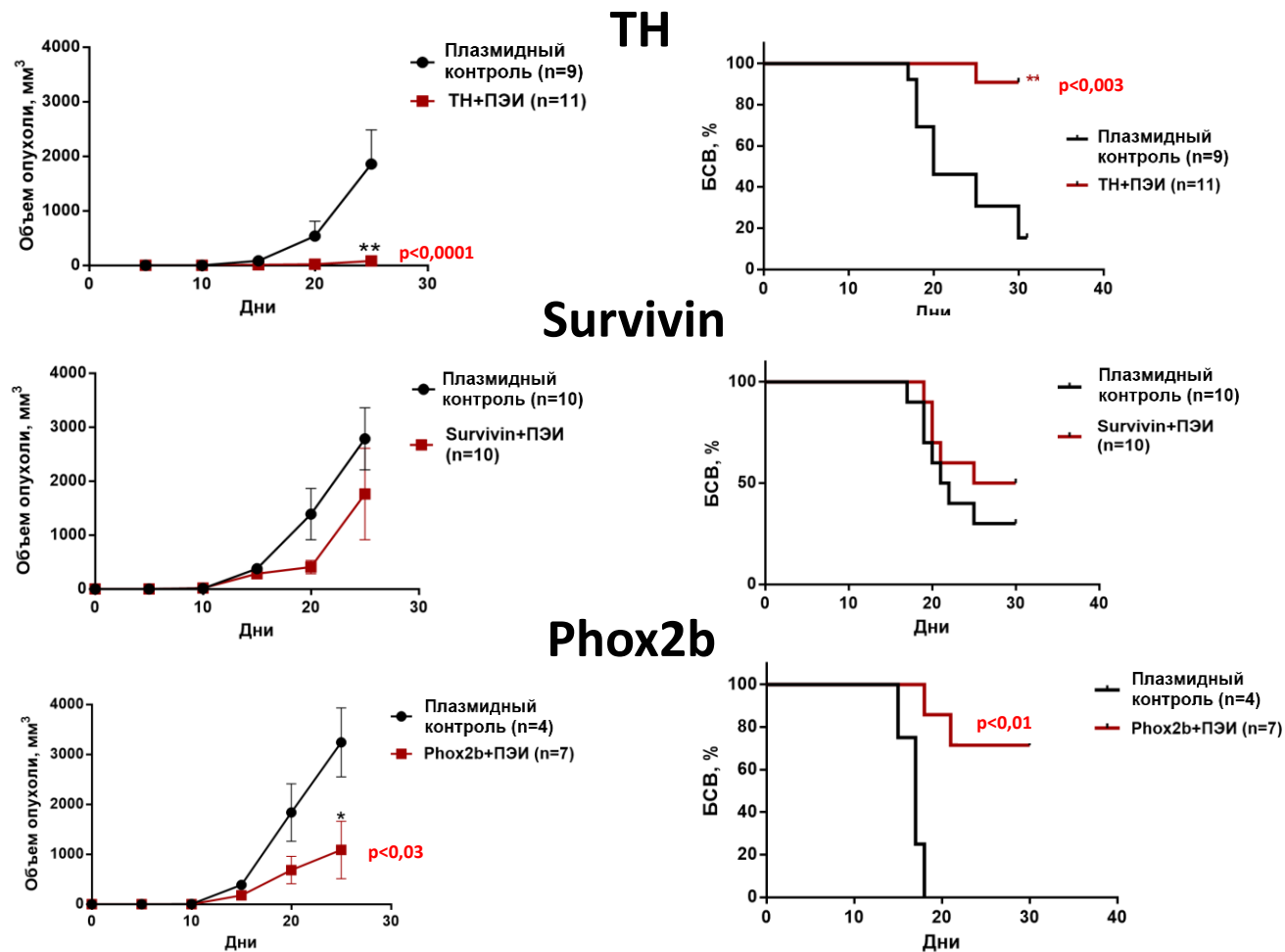
- Микроскопически – недифференцированная нейробластома с крупными очагами коагуляционных некрозов.
- Метастаз в печени и прилежащих лимфотических узлах не обнаружено ни у одного животного.

Характеристика опухолевой модели

Цитотоксическая активность спленоцитов (медиана±мин/макс) у мышей в вакцинированных группах



Терапевтическая эффективность в/м ДНК-ПЭИ вакцины



Динамика роста опухоли (среднее ± со)

Бессобытийная выживаемость мышей

Дизайн исследования

Цель настоящего исследования – проверить безопасность и иммуногенность ДНК-вакцинации против нейробластомы.

Задачи исследования:

1. Опробовать композицию вакцины в форме конъюгата плазмидной ДНК с синтетическим носителем для внутримышечного введения;
2. Опробовать метод перорального приема вакцины с использованием аттенированных бактерий *Salmonella* в качестве носителей ДНК-вакцины.
3. Определить иммунный ответ на применяемую вакцину. Исследовать активацию лимфоцитов, продукцию цитокинов и гуморальный иммунный ответ. Разработать метод оценки иммунного ответа на проводимую вакцинацию.
4. Оценить клинический ответ на проведенную вакцинацию. Отследить минимальную остаточную болезнь в КМ, а также длительность ремиссии у пациентов.

Первичная конечная точка – безопасность и переносимость вакцинации.

Вторичная конечная точка – иммунологический ответ на вакцину.

Выбор антигена

TN	Тирозингидроксилаза – как правило (более 90%), самый высокий уровень экспрессии
Phox2B	Paired-like homeobox 2b (PHOX2B), транскрипционный фактор при нейробластоме - всегда
Survivin	Ингибитор апоптоза (очагово в половине случаев)
MAGE-A1 MAGE-A3	Белки из семейства Cancer/testis antigens – универсальные раковые антигены (как правило, уровень экспрессии варьирует)
NY-ESO1	(экспрессия NY-ESO1 при нейробластоме не подтвердилась)
PRAME	Примерно в половине случаев высоко экспрессирован

Выбор антигенов для вакцинации каждого пациента обусловлен частотой их встречаемости и подтверждении экспрессии методами ПЦР и ИГХ.

TN и Phox2B присутствуют во всех случаях типичной нейробластомы, и нуждаются в подтверждении только в случае очень низкоспецифичной нейробластомы с атипичной цитологией.

Вакцинация включает 3 антигена по выбору

01

- Диагноз рецидива нейробластомы с морфологическим / цитологическим подтверждением.

02

- Наличие опухолевой ткани для биопсии.

03

- Отсутствие прогрессии или большой массы опухоли (bulky disease).

04

- Физический статус по шкале ECOG 0 – 2.

05

- Ожидаемая продолжительность жизни не менее 12 месяцев.

06

- Возраст пациентов от 1 до 20 лет.

07

- Показатели клеточного иммунитета крови: WBC – не менее $2 \cdot 10^9$ /л, лимфоциты – не менее $1 \cdot 10^9$.

08

- Наличие письменного информированного согласия пациента на участие в данном протоколе.

09

- Способность пациента выполнять предписания врача-исследователя и соблюдать план исследования.

Критерии включения в исследование

Критерии исключения из исследования

А. Основанные на анамнезе:

- Наличие любого первичного иммунодефицита;
- Наличие первично-множественной злокачественной опухоли;
- Наличие аутоиммунных заболеваний в анамнезе (кроме тиреоидита Хашимото);
- Полиаллергия;
- Тяжелые заболевания, в том числе протекающие с выраженными симптомами, не леченные воспалительные и инфекционные процессы, из-за которых пациент не может получать лечение в соответствии с протоколом исследования.
- Социально-экономические или географические обстоятельства, которые не могут гарантировать должное соблюдение требований протокола лечению и дальнейшему наблюдению.

Б. Основанные на данных обследования:

- Отсутствие экспрессии в ткани опухоли двух и более антигенов, используемых в протоколе;
- Уровень лейкоцитов периферической крови $< 1,5 \times 10^9$ /л, тромбоцитов $< 50,0 \times 10^9$ /л., гемоглобин < 80 г/л;
- Положительные тесты на вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), гепатит В или С.
- Выраженное нарушение функции печени – уровни АСТ/SGOT или АЛТ/SCPT превышают верхнюю границу нормы в 5 раз и более.

Форма вакцины и схема вакцинации

Внутримышечная инъекция конъюгата ДНК-ПЭИ

Объем введения 3-6 мл
ДНК: ПЭИ 20 kDa = 1:2

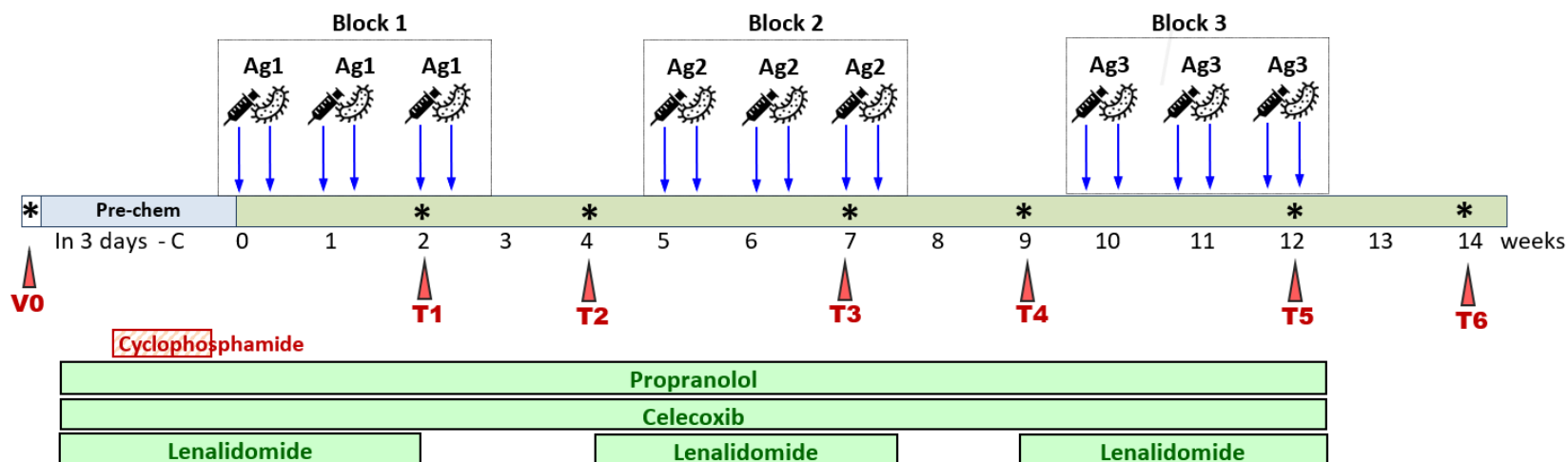
Доза ДНК 500 мкг
Смешение с ПЭИ в шприце

Пероральный прием суспензии бактерий SS2017

Пероральная форма,
1 доза = 10^{10} КОЕ



В желатиновой капсуле в 50% глицероле.
(готовится перед приемом)



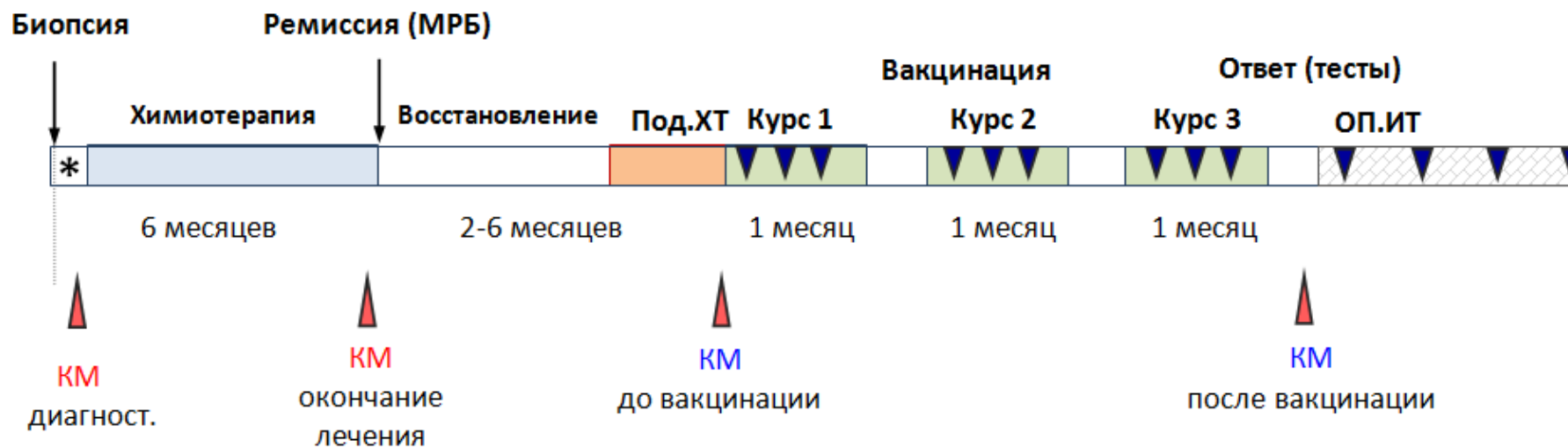
* cryopreservation of peripheral blood MNCs

Сопроводительная терапия

Пропранолол.	Антиангиогенный препарат. Обладает адъювантным эффектом для противоопухолевых и бактериальных вакцин. Полностью совместим и желателен до, во время и после вакцинации.
Целекоксиб.	Поддерживает противоопухолевый иммунитет в животных моделях. Снижает активность IDO в опухолевом микроокружении. Входит в состав некоторых клинических испытаний вакцин. Полностью совместим и желателен до, во время и после вакцинации.
Циклофосфамид	Подавляет микроокружение опухоли, снижает количество Treg. Допустим и желателен перед вакцинацией как кондиционирование.
Леналидомид	Наиболее эффективно подавляет микроокружение опухоли, снижает количество Treg, MDSC, TAM. Желателен перед и во время вакцинации.

Схема вакцинации и точек мониторинга МОБ

- Вакцинация проводится курсами по 1 месяц с перерывами 2-4 недели.
- Всего возможно проведение 3-4 курсов.
- Один курс включает три введения вакцин против одного антигена.
- Каждый последующий курс включает новый (дополнительный) антиген



В течение 10 дней до начала вакцинации и в течение 10 дней после третьего курса проводится пункция КМ для анализа МОБ.

Типы и сроки обследований в период вакцинации

	До/ после химиотерапии D0	Перед вакцинацией V0	После вакцинации T1	После вакцинации T2	Поддерживающая вакцинация
Диссеминация / объем опухоли МРТ	+	+	-	+	+
Анализ МОБ в КМ	+	+	-	+	-
Гуморальный ответ (ИФА) против PVXCP или белка антигена	контроль	Контроль	+	+	+
Определение продукции INF-γ лимфоцитов в присутствии пептидов антигена (ELISPOT)	контроль	Контроль	+	+	+
Определение цитотоксической активности МНК вакцинированных пациентов	контроль	контроль	+	+	+

Пациенты

7 пациентов из Республики Беларусь:

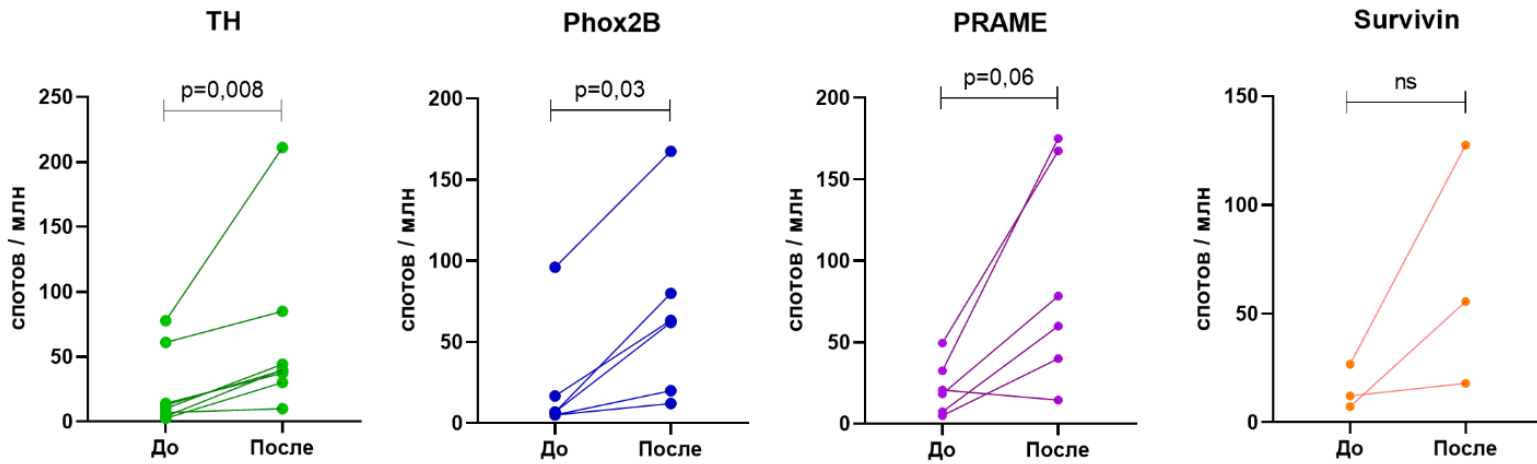
Все пациенты получили вакцину в рецидиве заболевания, после проведения терапии 2-й линии и достижения как минимум частичного ответа на лечение.

Трое пациентов получили иммунотерапию дважды.

2 пациента из России:

1 – в первой линии терапии, через 6 месяцев после иммунотерапии динутуксимабом-бета,

2 – в рецидиве после гаплогТГСК получила 1,5 курса. На середине второго курса развилась РТПХ, что было причиной остановки терапии.



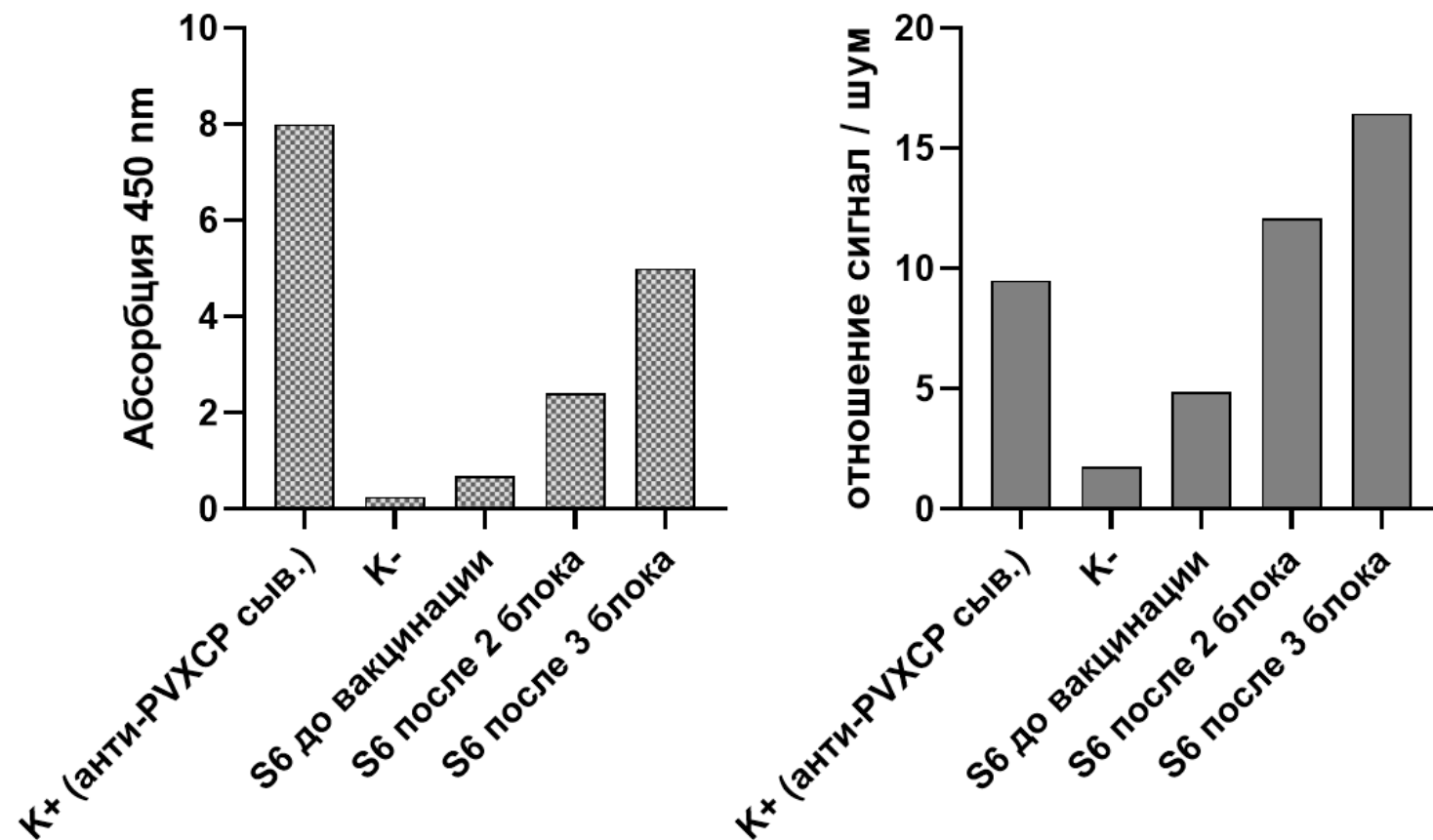
Динамика Т-клеточного иммунного ответа у пациентов на основные антигены

	до	1 блок	2 блок	3 блок	месяц	
Пациент В1 курс 1	12,50	40,00	47,50	30,00	30,00	1 - 10
Пациент В1 курс 2	31,67	40,00	51,67	80,00	21,70	10-20
Пациент В2	20,81	39,46	52,59	25,38	17,38	20-30
Пациент К3	8,00	10,00	12,50	15,00	17,38	30-40
Пациент М4 курс 1	96,04	242,36	224,3	167,45	155,5	40-50
Пациент М4 курс 2	60,83	74,00	85,00	175	130	50-60
Пациент М5	14,11	8,26	37,34	39,88	62,04	60-100
Пациент S6	16,73	40,25	60,00	63,33	60,00	> 100

Т-клеточный иммунный ответ пациентов на вакцинацию (ELISpot)

Сравнительная интенсивность максимального иммунного ответа, выраженная в среднем количестве спотов / млн. клеток

Гуморальный иммунный ответ (ИФА)

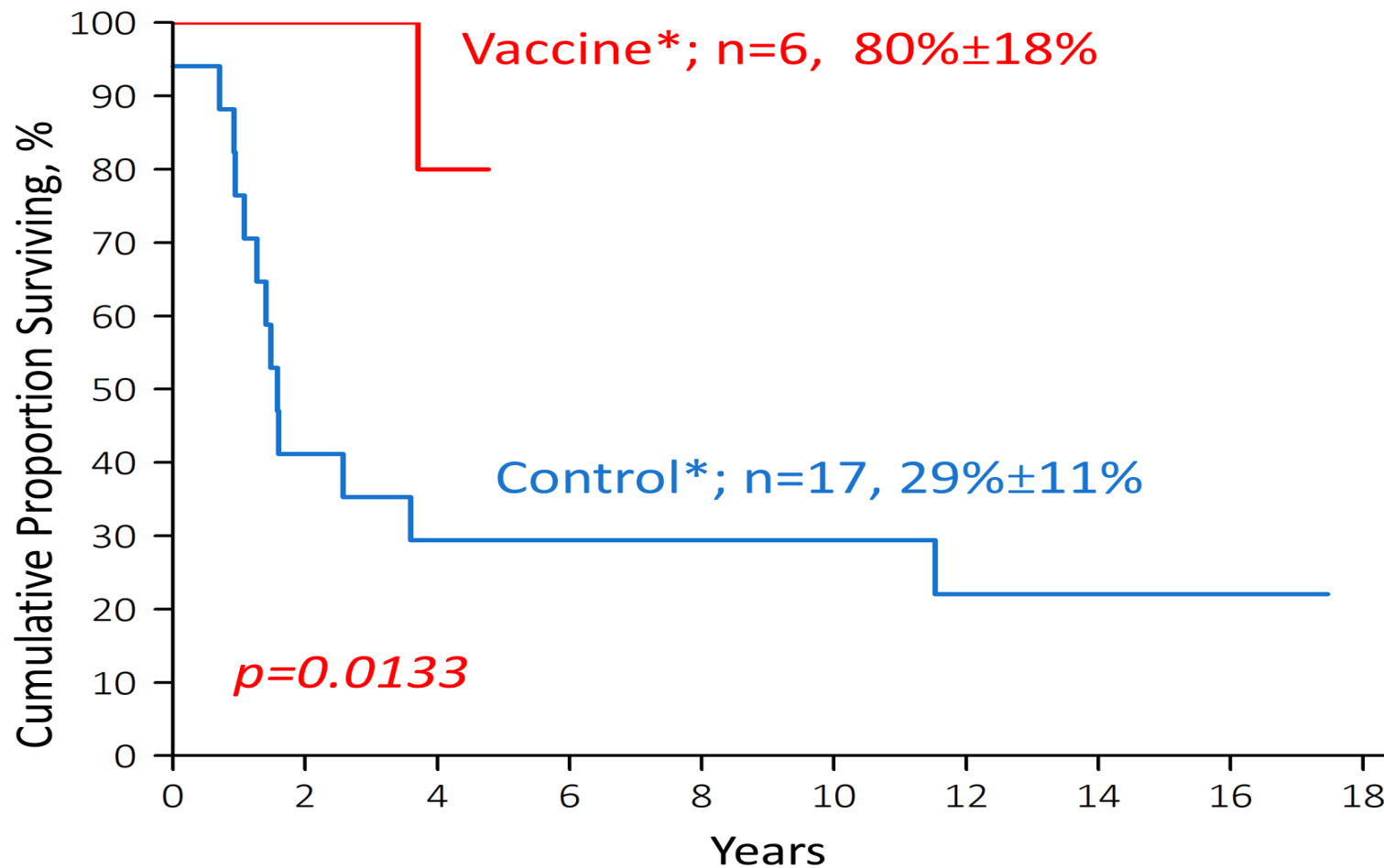


Антительный ответ у пациента С6 против общего вакцинального белка иммуностимулятора PVXCP.

	Control group		Vaccine group		p
	n	%	n	%	
Total	17	100.0	6	100.0	
Gender					
male	11	64.7	3	50.0	0.5257
female	6	35.3	3	50.0	
Age					
minimum	0.05		2.78		0.6523*
median	4.25		3.62		
maximem	7.71		5.45		
Stage					
2B	1	5.9	0	0.0	0.5435
3	4	23.5	0	0.0	0.1911
4	12	70.6	6	100.0	0.1331
Risk group					
ImRG	2	11.8	0	0.0	0.3792
HRG	15	88.2	6	100.0	
NMYC status					
NMYC+	6	35.3	3	50.0	0.5257
NMYC-	11	64.7	3	50.0	
First line protocol					
NB2004	11	64.7	6	100.0	0.0905
nb 199902	4	23.5	0	0.0	0.1911
opec/ojec	2	11.8	0	0.0	0.3792
Auto HSCT in 1st line	15	88.2	6	100.0	0.3792

Сравнение двух групп рецидивных пациентов

Бессобытийная выживаемость пациентов с нейробластомой во второй линии терапии



Результаты вакцинации 6 пациентов показал хорошую переносимость и безопасность вакцинации, проведенной во второй линии терапии

Наиболее распространенным осложнением была боль в месте инъекции в течение одного – трех дней. В отдельных случаях после вакцинации наблюдалось небольшое повышение температуры, недомогание или сонливость, которые проходили без лечения. Системных реакций более тяжелого уровня не было, как и осложнений со стороны ЖКТ.

Применяемая схема вакцинации позволила достичь измеримой иммуногенности для большинства пациентов и всех антигенов. Т-клеточный иммунный ответ определяемый в тесте ELISpot оказался превалирующим над антительным ответом, выявленным только для одного пациента.

Вакцина позволила достигнуть иммунного ответа у большинства пациентов, а также улучшение безрецидивной выживаемости.

Данный вид иммунотерапии может быть рекомендован для пациентов с нейробластомой высокой группы риска в первой и последующих линиях терапии при наличии как минимум частичного ответа на терапию основного заболевания.

Заключение

Регистрация клинического испытания и метода лечения

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
Богдан Е.Л.
2021 г.
Регистрационный № 060-0621

Метод лечения пациентов с нейробластомой
с применением ДНК вакцины
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии».

АВТОРЫ: к.б.н., Мелешко А.Н., к.м.н., доцент Пролесковская И.В., к.б.н. Стеганцева М.В.

Минск, 2021

Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

СОГЛАСОВАНО
Председатель комитета
по этике, к.м.н.
Углова Т.А.
« 9 » 01 2019 г.

УТВЕРЖДАЮ
Директор Центра детской онкологии,
гематологии и иммунологии
д.м.н., проф., член-корр. НАН
Алейникова О.В.
« 9 » 01 2019 г.

УДК: 616-097:577.213.32

ПРОТОКОЛ
Пилотного клинического исследования ДНК-вакцинации против нейробластомы

Sponsor:

Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology

Information provided by (Responsible Party):

Alexander Meleshko, Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology

ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04049864

Recruitment Status ⓘ : Recruiting

First Posted ⓘ : August 8, 2019

Last Update Posted ⓘ : August 8, 2019

See [Contacts and Locations](#)

Алгоритм
обращения
для
проведения
ДНК-
вакцинации в
РБ

Платные услуги для иностранных граждан



+375 29 838 40 46 (viber,WhatsApp,Telegram)
+375 17 287 10 05



e-mail: oncology.by@gmail.com



режим работы: 9.00 – 15.40 (ПН.-ПТ.)



Координатор Емельянова Ирина Владимировна

Предоставить выписку из медицинских документов, данные визуализации, парафиновые блоки с опухолью (первичная/рецидивная) для анализа экспрессии антигенов

Алгоритм обращения для проведения ДНК- вакцинации в РБ

- Отдел платных услуг высылает приглашение
- Вакцинация хорошо переносится и проводится в условиях дневного стационара.
- Есть возможность проживания в условиях пансионата для родителей и пациентов (об этом желании сообщить координатору)
- Стоимость терапии и нахождения на дневном стационаре в среднем составляет 5000-5500 долларов США.





Благодарю за
внимание!