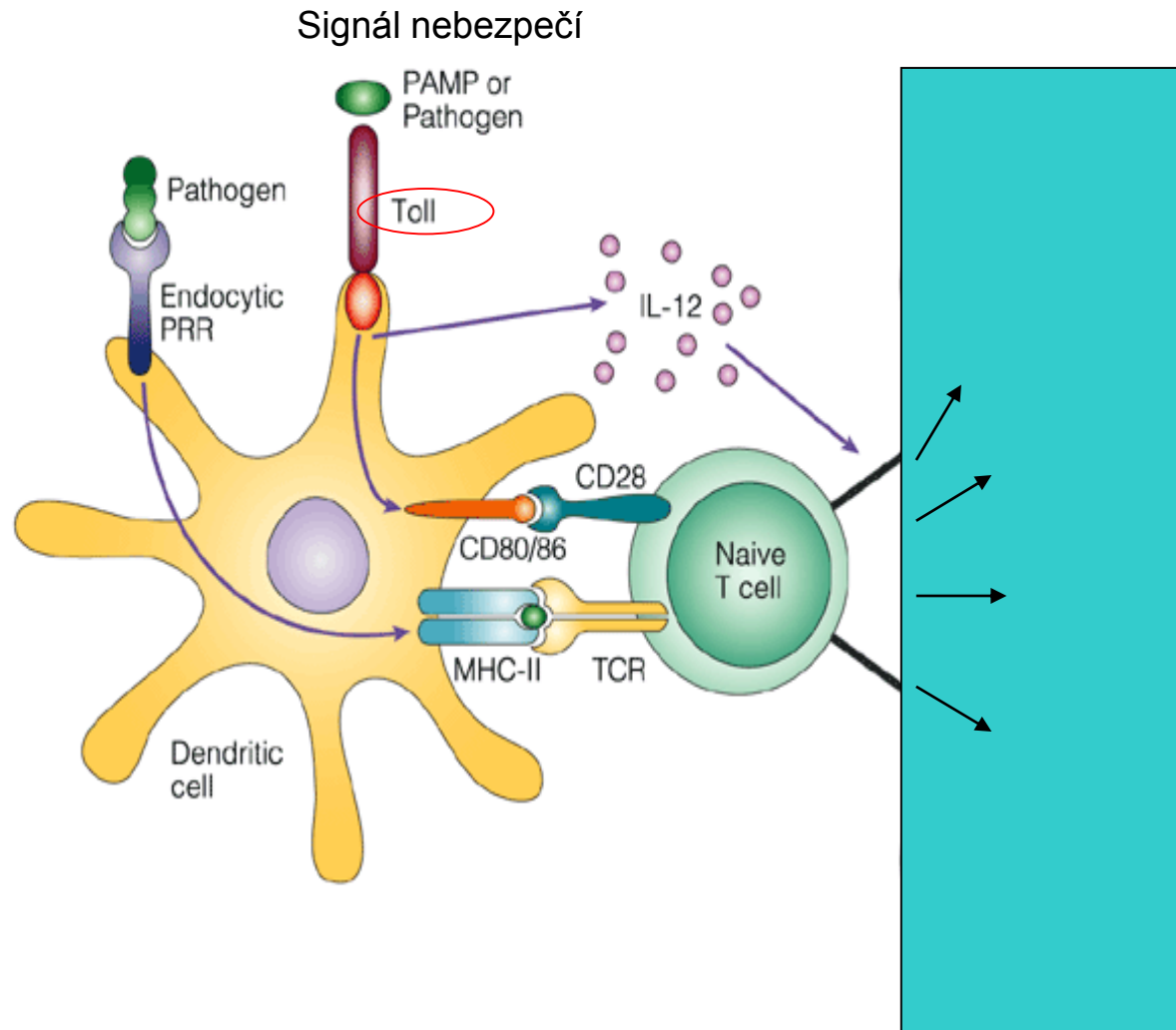


Imunoterapie nádorových chorob pomocí dendritických buněk

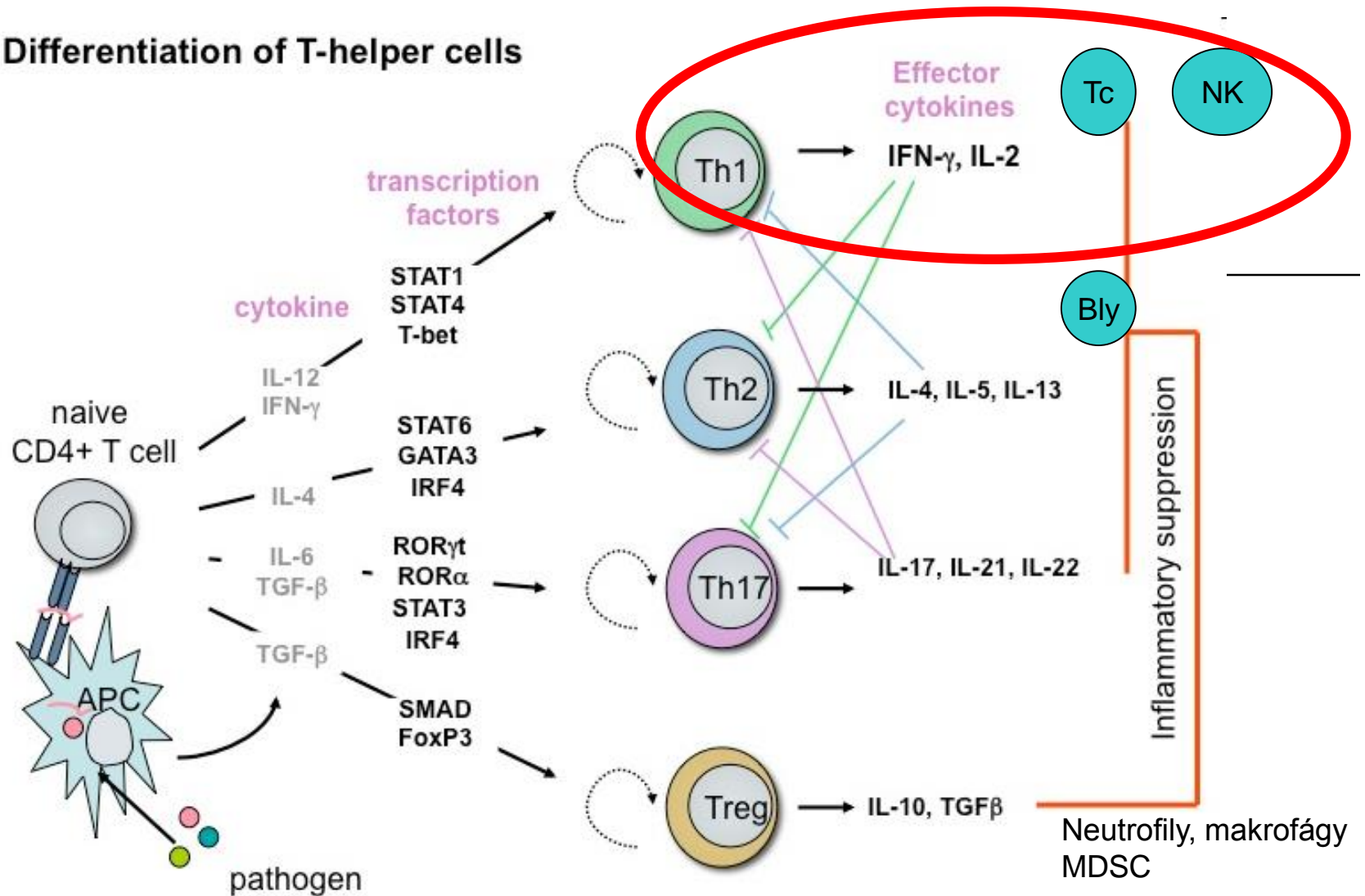


Jiřina Bartůňková za kolektiv autorů
Ústav imunologie, UK 2.LF a FN Motol, FOCIS Center of
Excellence
Sotio, a.s.

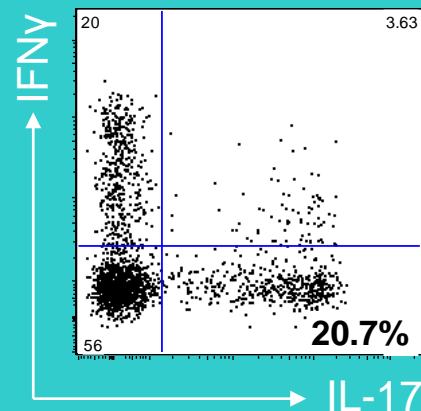
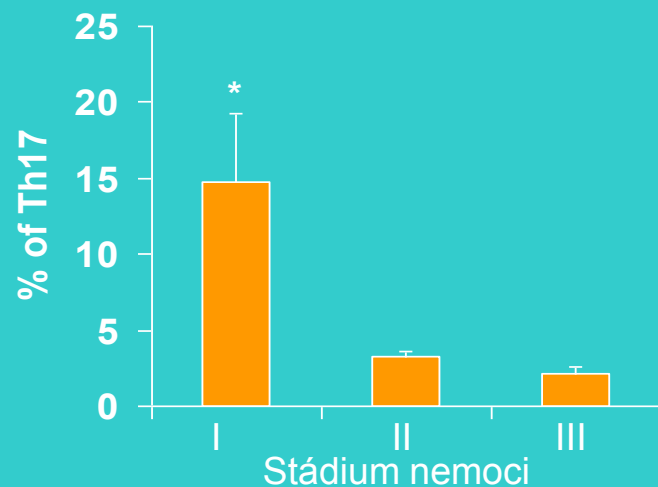
Zahájení imunitní reakce dendritickými buňkami



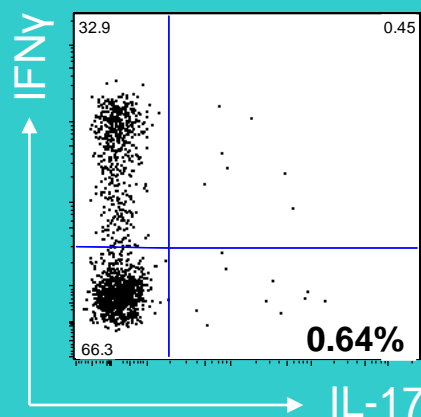
Differentiation of T-helper cells



Frekvence Th17 lymfocytů klesá při progresi onemocnění

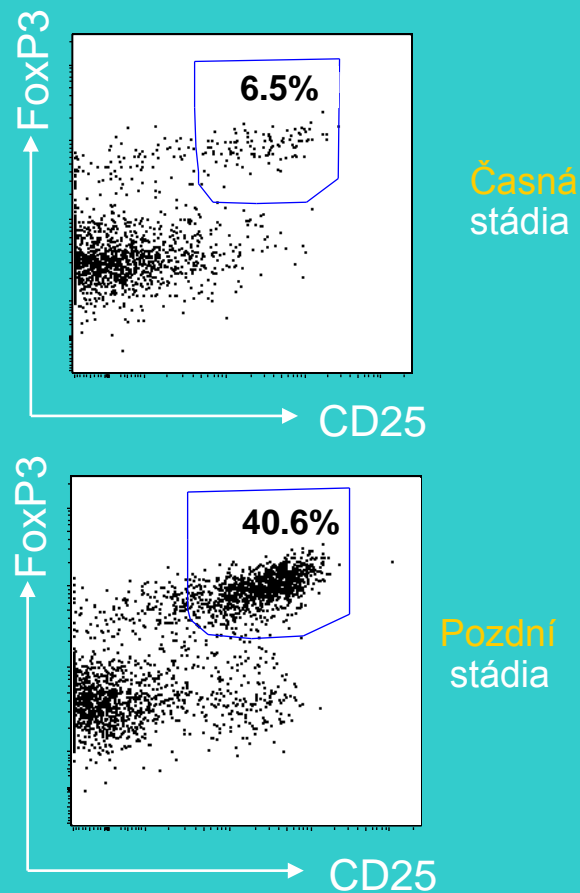
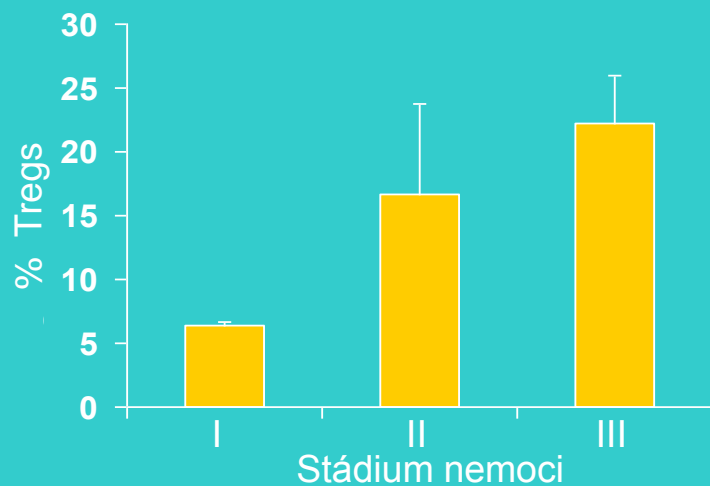


Časná
stádia

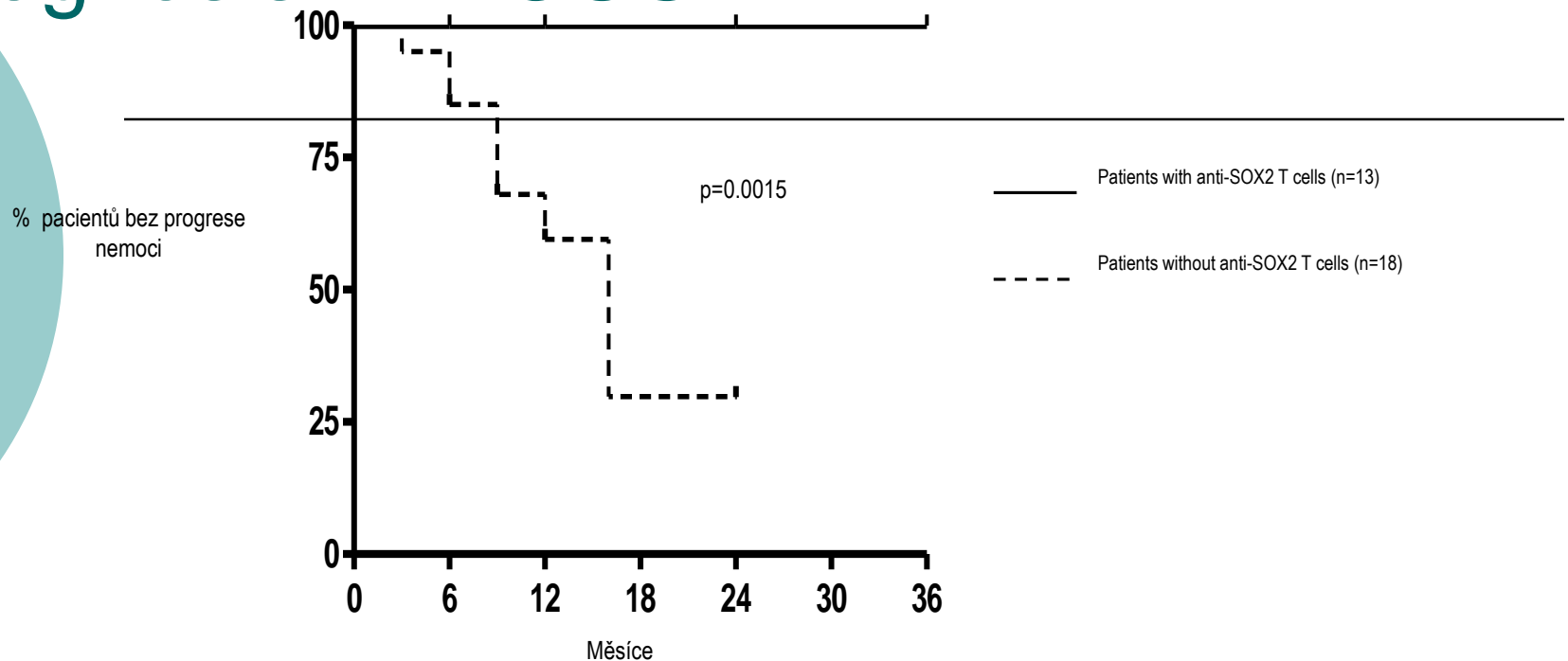


Pokročilá
stádia

Frekvence regulačních T lymfocytů roste při progresi onemocnění

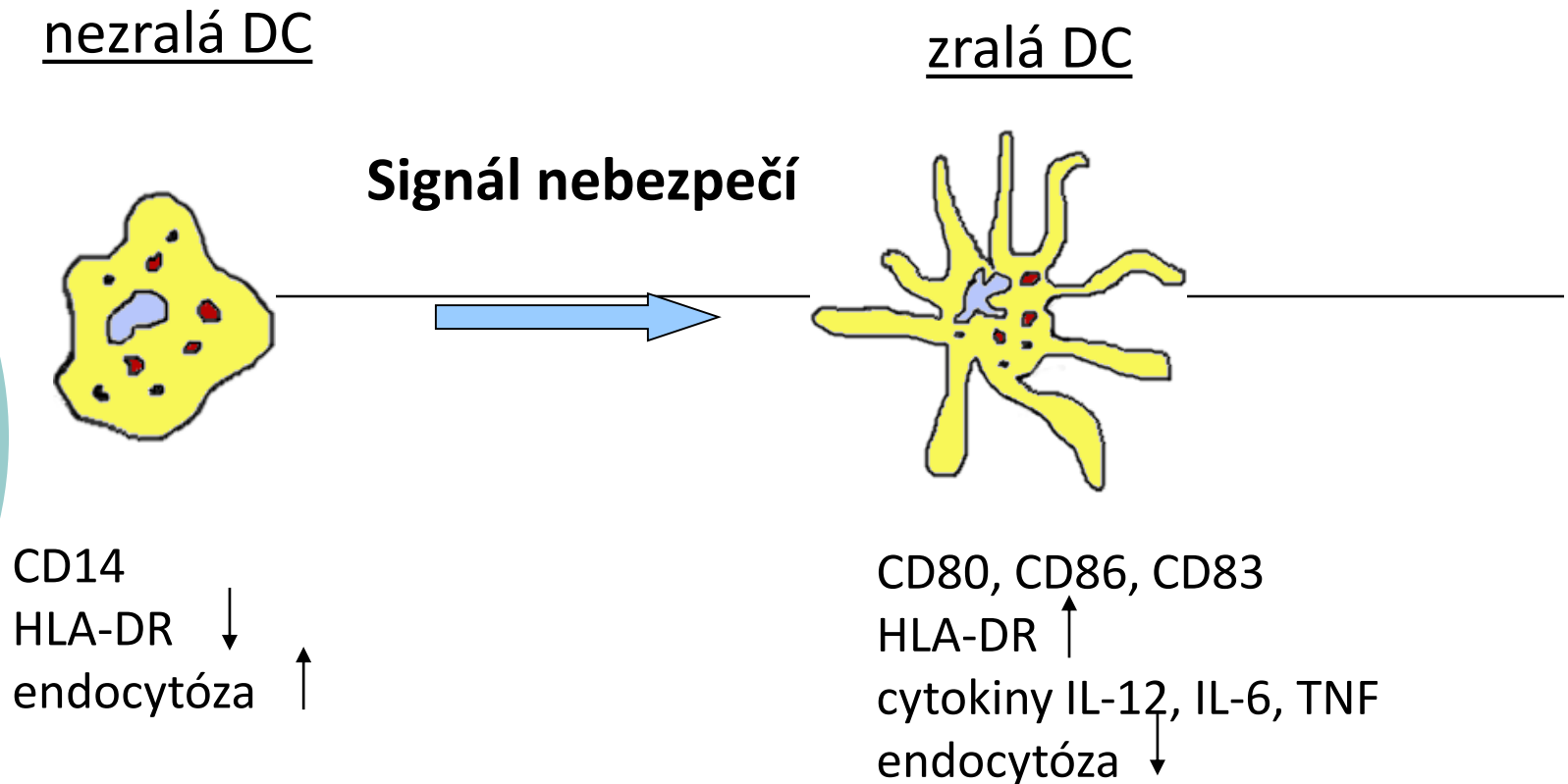


Immune response against tumor cells is connected to improved prognosis in MGUS



Specific immunity response against neoplastic cells inhibits progression into malignant stage in MGUS patients

Maturace DC



Signály nebezpečí – molekuly patogenů, zánětlivé cytokiny, endogenní signály

Molekuly asociované s patogenem – rozpoznány pomocí specializovaných receptorů

[PLoS One](#). 2014 Mar 19;9(3) 2014.

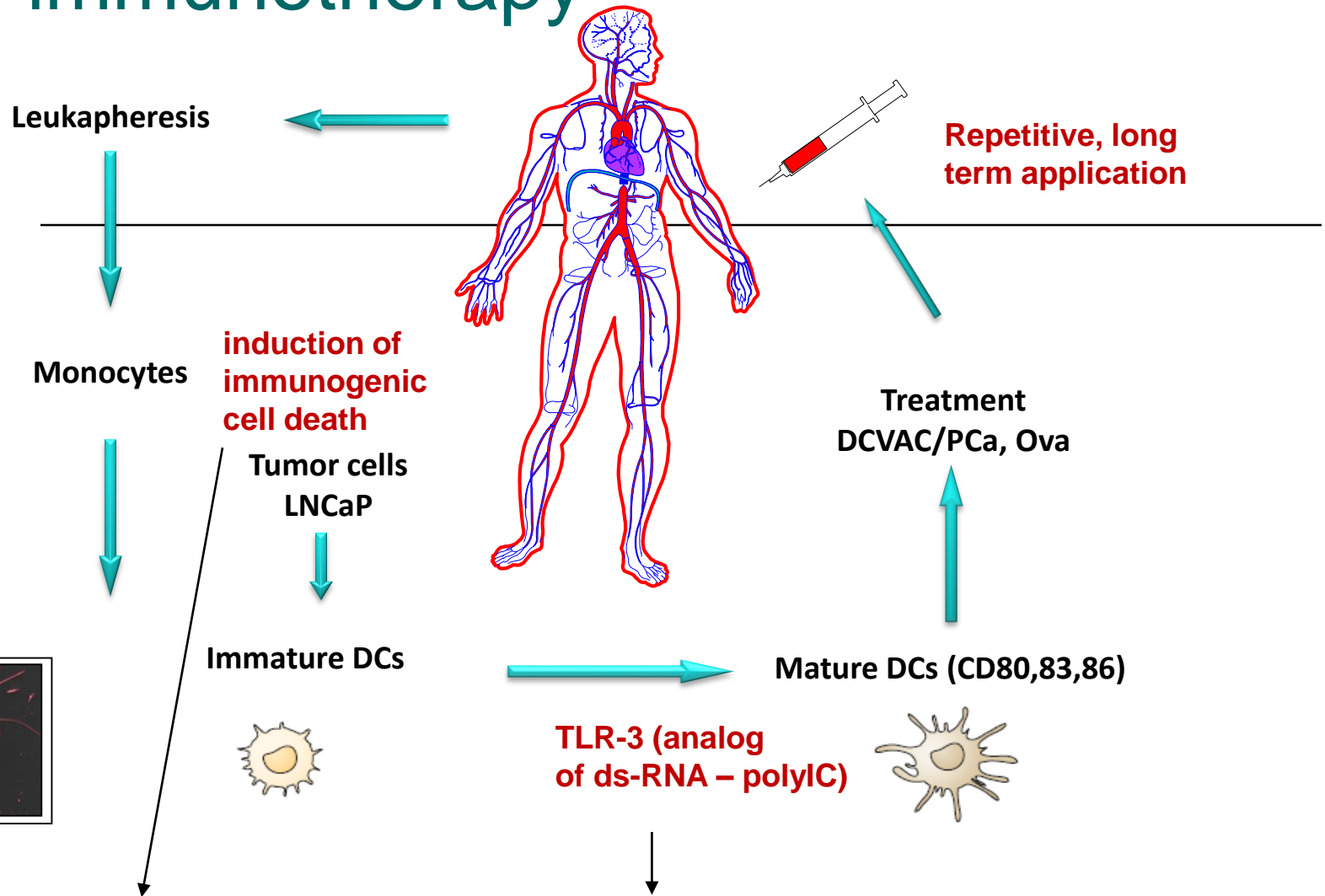
Peptide-pulsed dendritic cells have superior ability to induce immune-mediated tissue destruction compared to peptide with adjuvant.

[Dissanayake D1](#), [Murakami K2](#), [Tran MD2](#), [Elford AR2](#), [Millar DG2](#), [Ohashi PS1](#).

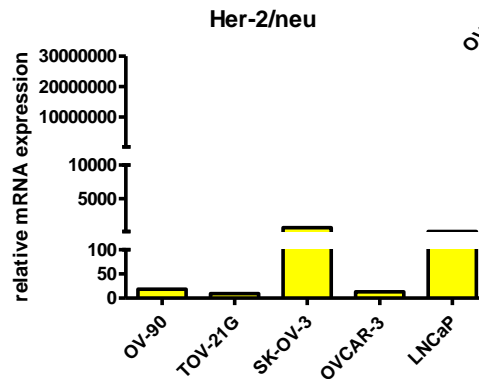
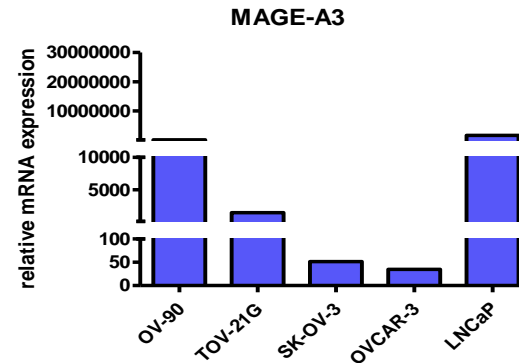
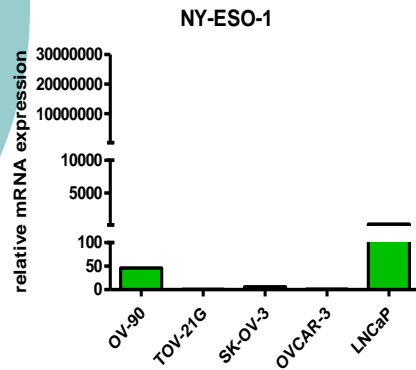
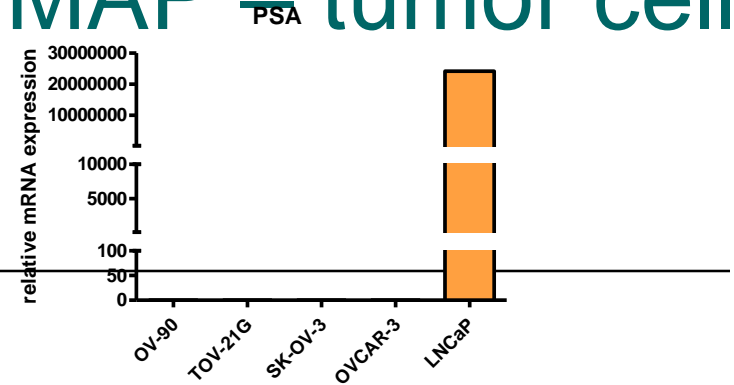
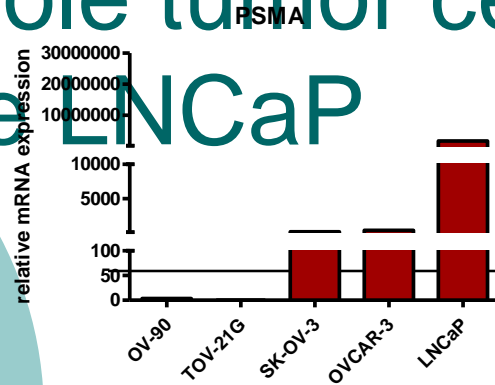
Vaccines for cancer immunotherapy are of interest but in general have not yet achieved the desired therapeutic efficacy in clinical trials. We present here a novel model to evaluate vaccine strategies by following tissue destruction in a transgenic model, where a defined antigen is expressed on pancreatic islets. We found that the transfer of syngeneic antigen-pulsed dendritic cells (DCs) resulted in autoimmune cytotoxic T-lymphocyte activation that was not observed following vaccinations that were based on peptides and adjuvants. Importantly, the induction of diabetes by DC transfer is dependent upon the maturation of DCs prior to transfer. Furthermore, diabetes induction only occurred if DCs were pulsed with the immunodominant epitope in addition to at least one other peptide, suggesting greater cytolytic activity upon engagement of multiple T-cell specificities. While the tumor environment undoubtedly will be more complex than healthy tissue, the insights gained through this model provide useful information on variables that can affect CD8-mediated tissue cytotoxicity in vivo.

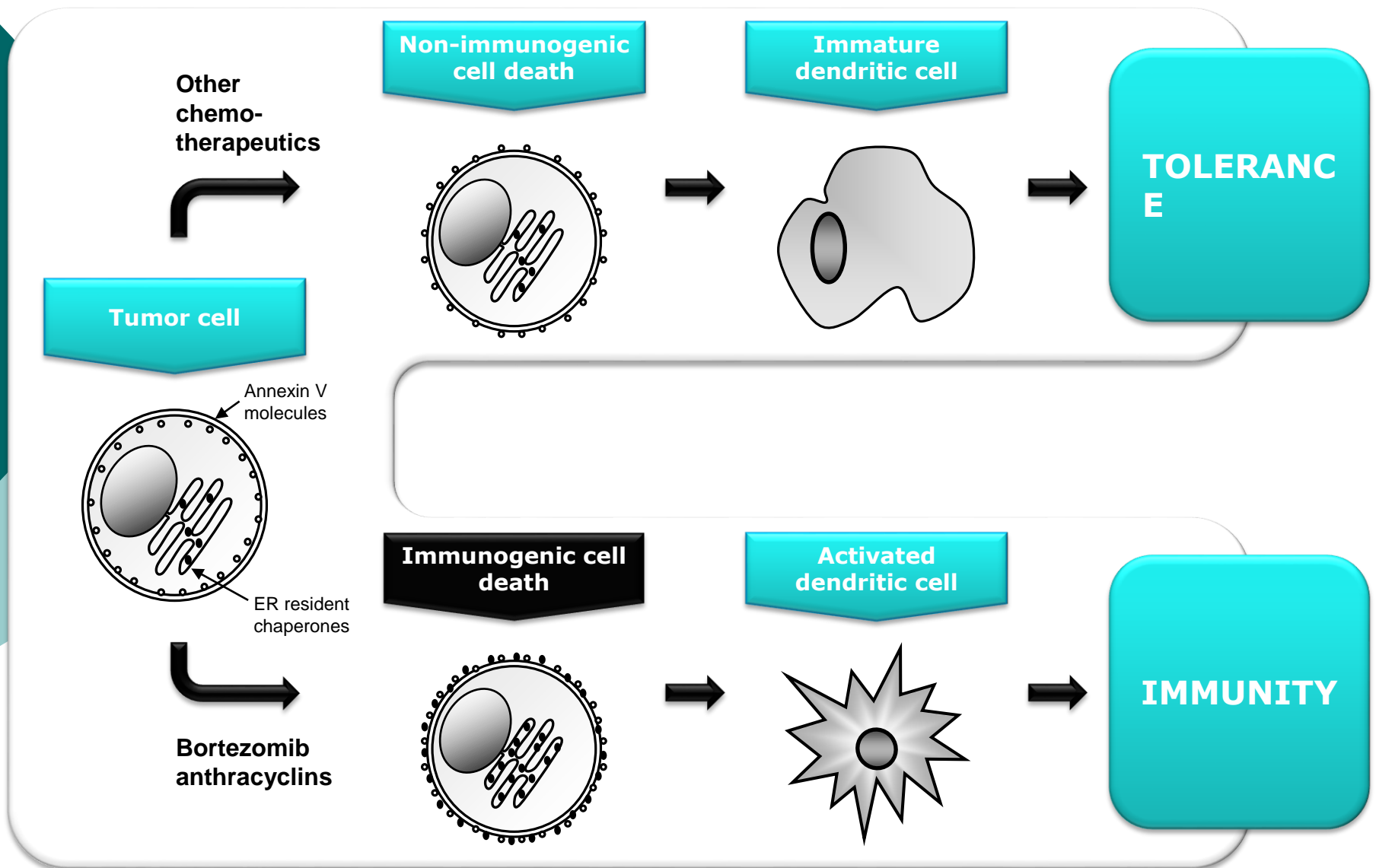
DC fungují jako (jediné dosud známé účinné) adjuvans pro indukci imunitní reakce buněčného typu (CD4+Th1+ CD8), která je nutná pro efektivní aktivní protinádorovou imunitu

Principle of dendritic-cell based immunotherapy

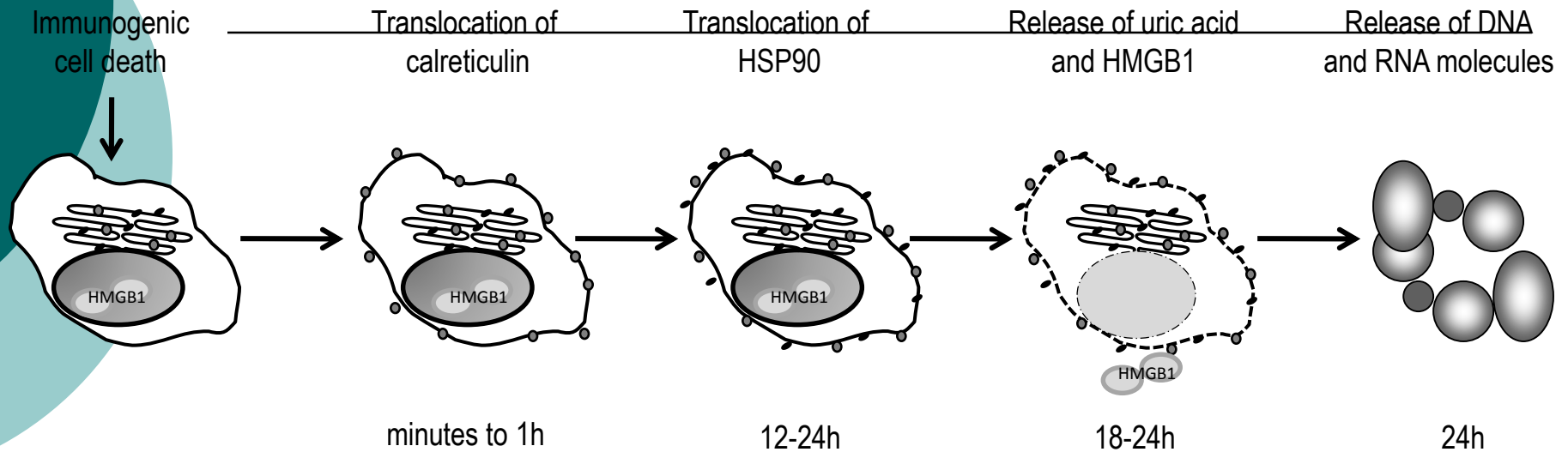


Source of tumor antigens: use of the whole tumor cell lines – MAP – tumor cell





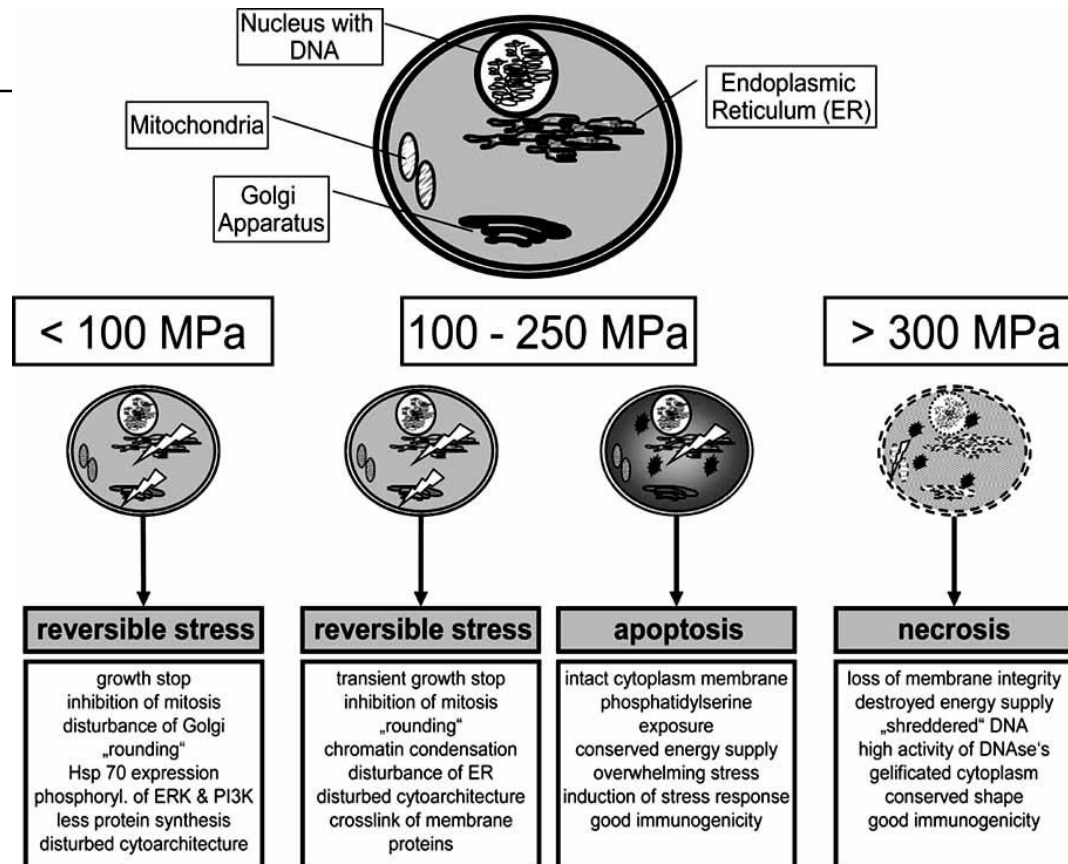
Expression of immunogenic cell death markers



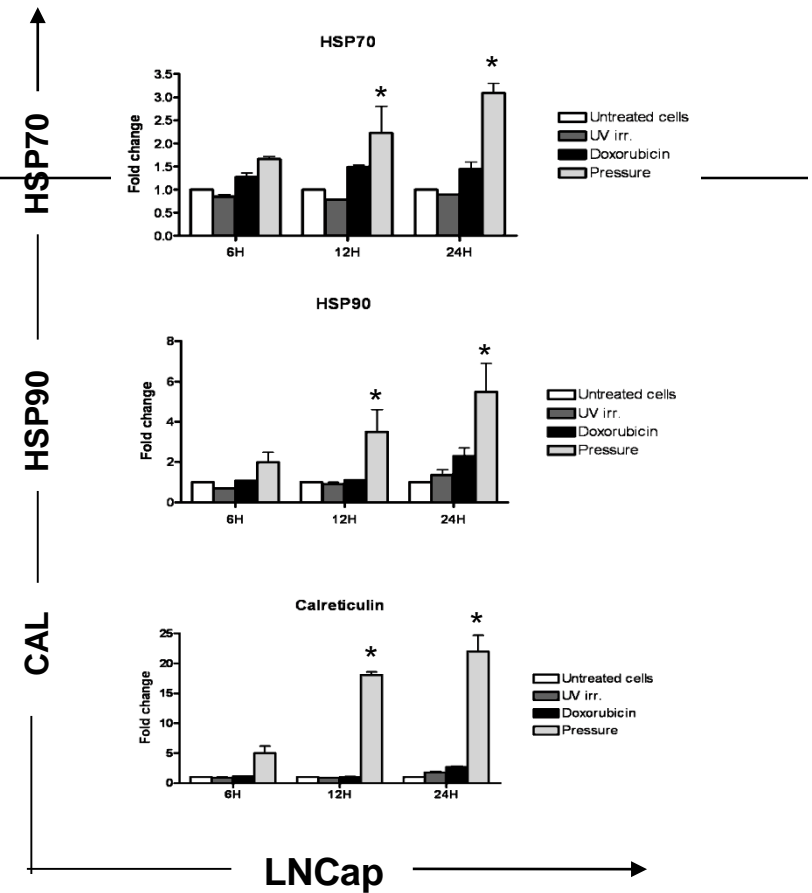
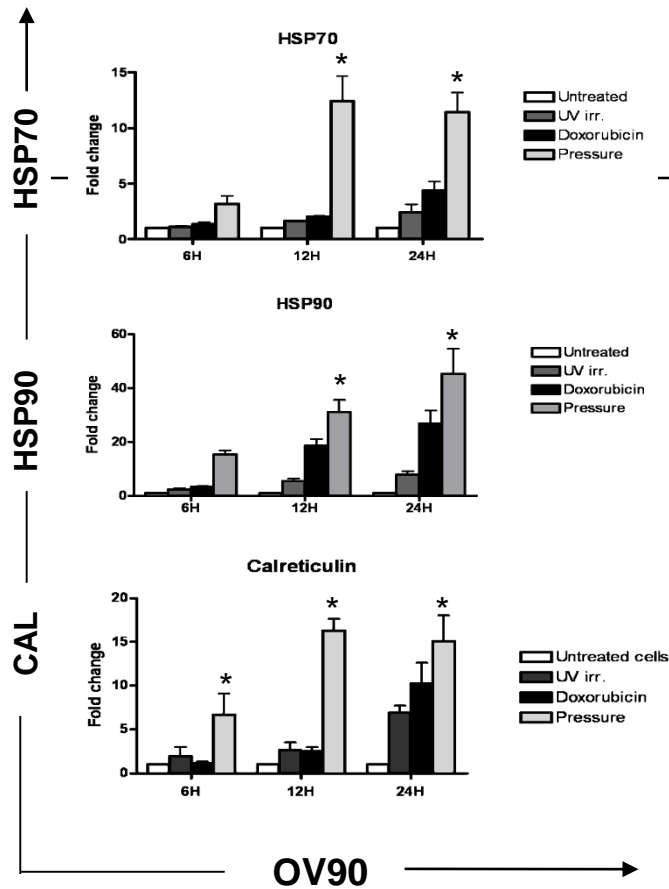
Expression of calreticulin and HSP proteins as signs of immunogenic cell death

Treatment of tumor cell lines by HHP (high hydrostatic pressure)

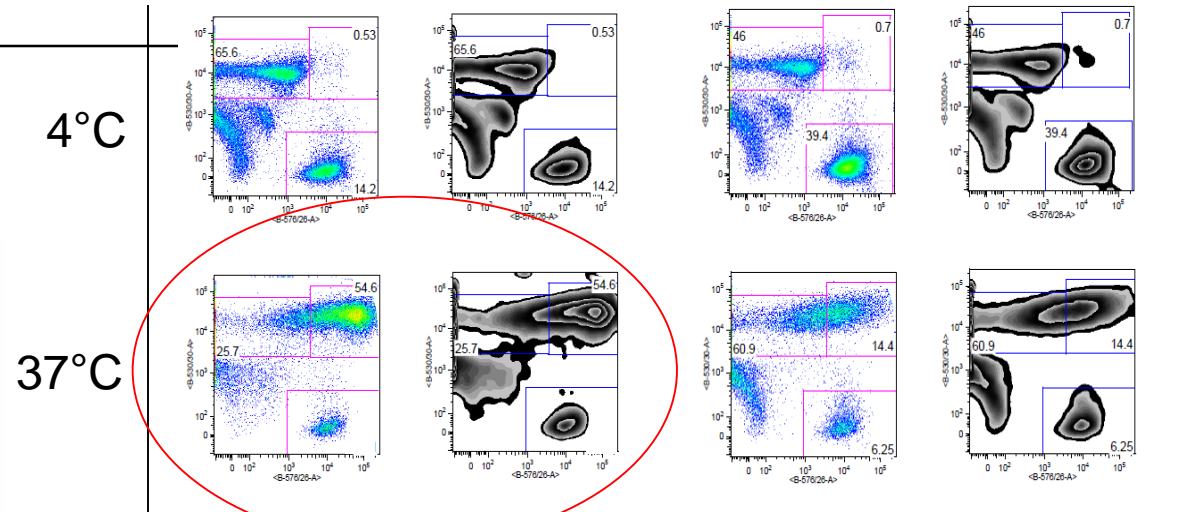
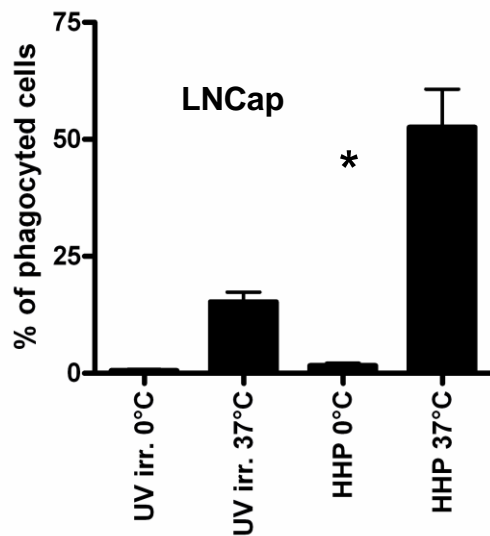
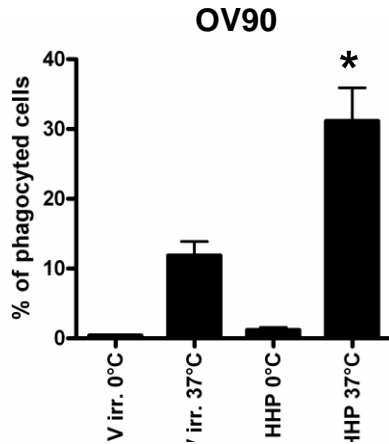
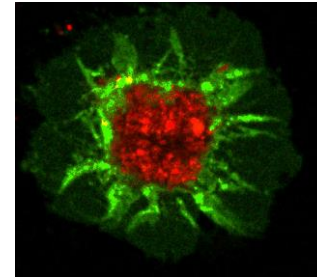
UV radiation x HHP



Detection of immunogenic markers expression induction



Phagocytosis of tumor cell lines by dendritic cells



HHP
54,6%

UV irr.
14,4%

Summary – High hydrostatic pressure effect on tumor cells

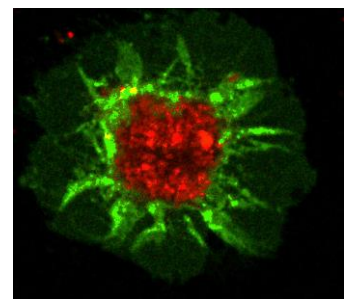
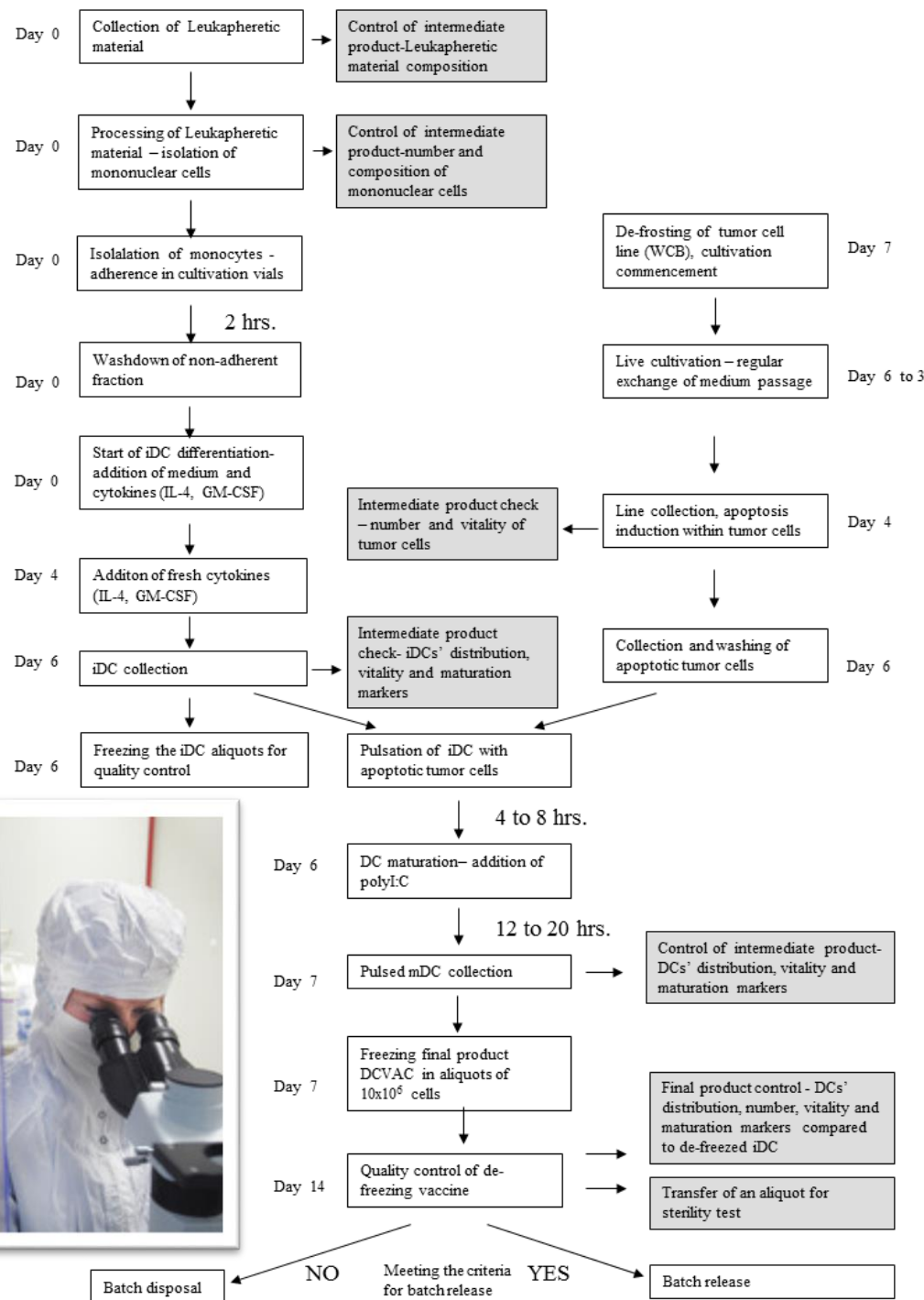
- HHP induces immunogenic cell death in human tumor cells
- Expression of immunogenic cell death markers leads to the increased rate of phagocytosis
- Expression of immunogenic cell death markers leads to the upregulation of DC maturation associated markers
- HHP treated tumor cells are superior in inducing tumor specific T cells and induce low levels of regulatory T cells

DCVAC/PCa, OvCa, LuCa

- ATMP, aktivní buněčná imunoterapie ACI
- ACI-MAP platforma (multiple antigen)
- Konečný produkt: 1 leukaferéza - cca 15 dávek, 10⁷/DC, 1 ml zamražený při -150, stabilita 24 měsíců
- V den aplikace naředění do 5 ml fyz. roztoku, aplikace s.c. na 2 místa (inguina, axila)
- Pro klinické hodnocení vyrábí firma Sotio, schválení výrobního procesu a klin.studií SUKL, EMA i FDA

DCVAC/PCa Advantages over Provenge

Provenge	DCVAC/PCa
Requires 3 leukapheresis sessions over the course of one month to make 3 doses of ACI.	A single leukapheresis can yield more than 15 doses of ACI.
Patients are treated with three doses of <i>Provenge</i> in one month followed by nothing.	Patients receive DCVAC/PCa over the long-term, with ongoing administration for more than one year.
Targets a single antigen, prostatic acid phosphatase.	Treatment of DCs with immunogenically killed whole prostate cancer cells exposes them to multiple antigens.
Used to treat patients with asymptomatic or mildly symptomatic mCRPC before chemotherapy.	Administered in combination with chemotherapy, which most mCRPC patients eventually require, with the potential to enhance the overall treatment efficacy.
Treatment is made from all white blood cells collected from leukapheresis.	Cells obtained from leukapheresis are cultured to differentiate into dendritic cells, which are the starting material for the immunotherapy.
Delivery of treatment requires carefully planned logistics and the treatment has the potential to lose potency or spoil.	After manufacturing the DCVAC/PCa is frozen for easy delivery and storage until each dose is needed. Cold storage does not reduce viability of the cells.
Patients receive the treatment over the course of many hours via intravenous dosing.	Easy subcutaneous dosing allows for out-patient administration.



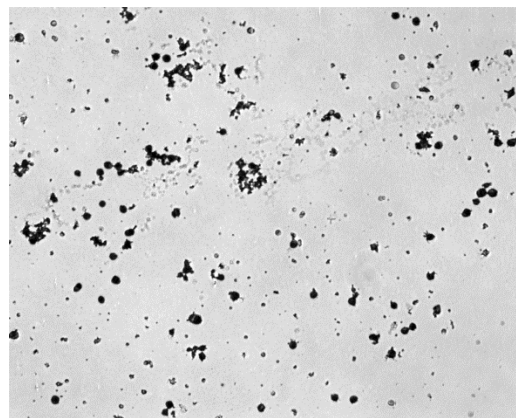
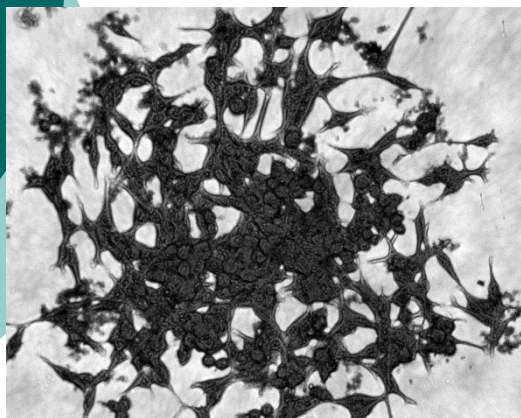
Nádorové buňky ošetřené HHP nejsou schopné proliferovat – bezpečnostní ukazatel

Detection of double negative cells
for Annexin V/DAPI by flow cytometry

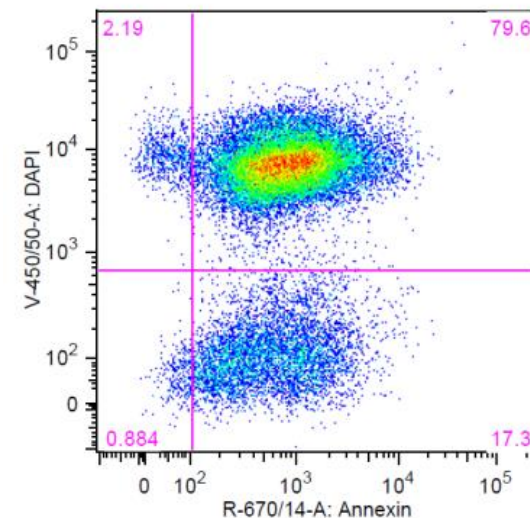
Cell morphology comparison on day 14 of cultivation (Scale bar = 100 μm)

Positive control LNCaP

HHP treated LNCaP

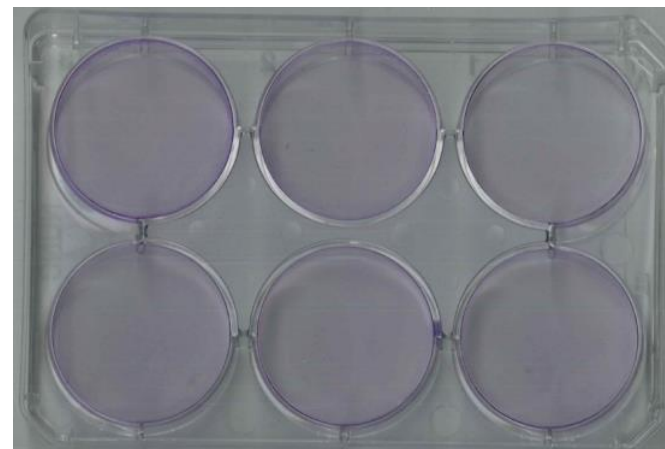
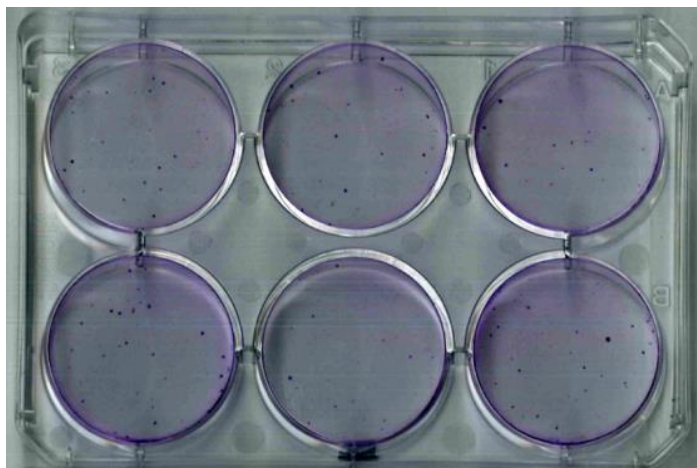


Colony forming efficiency

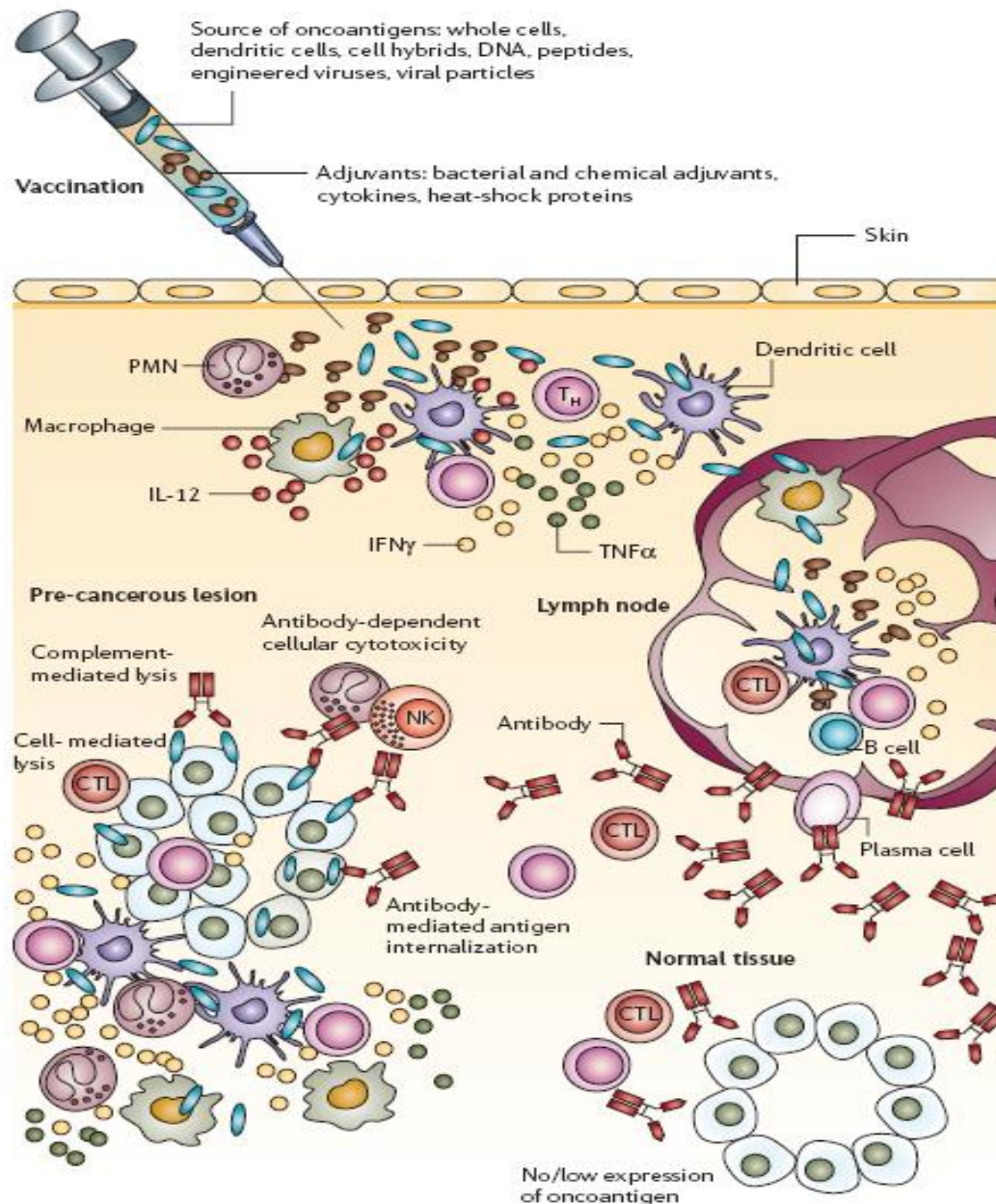


Positive control

HHP treated LNCaP



Imunoterapie – aktivace řady imunologických mechanismů

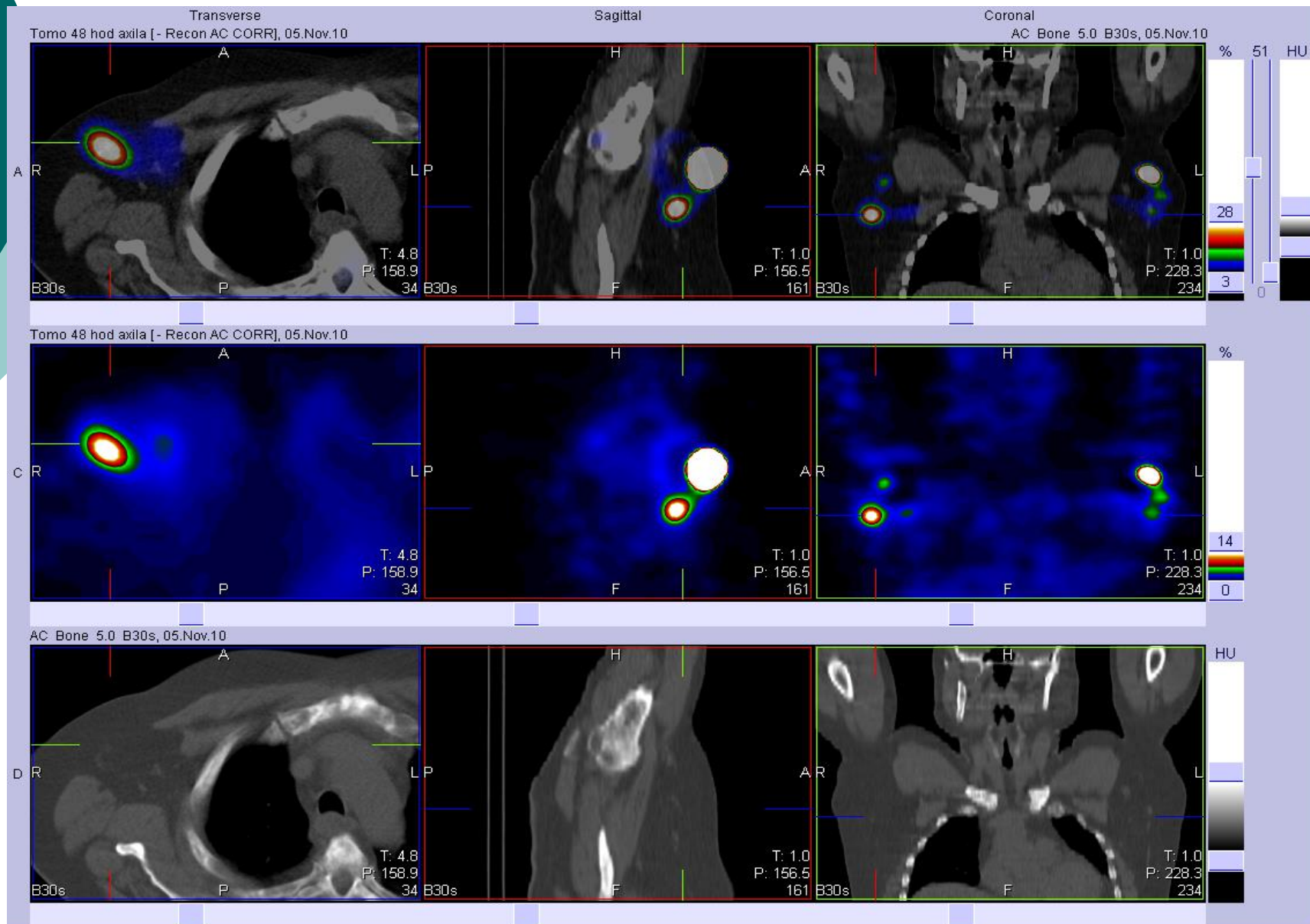




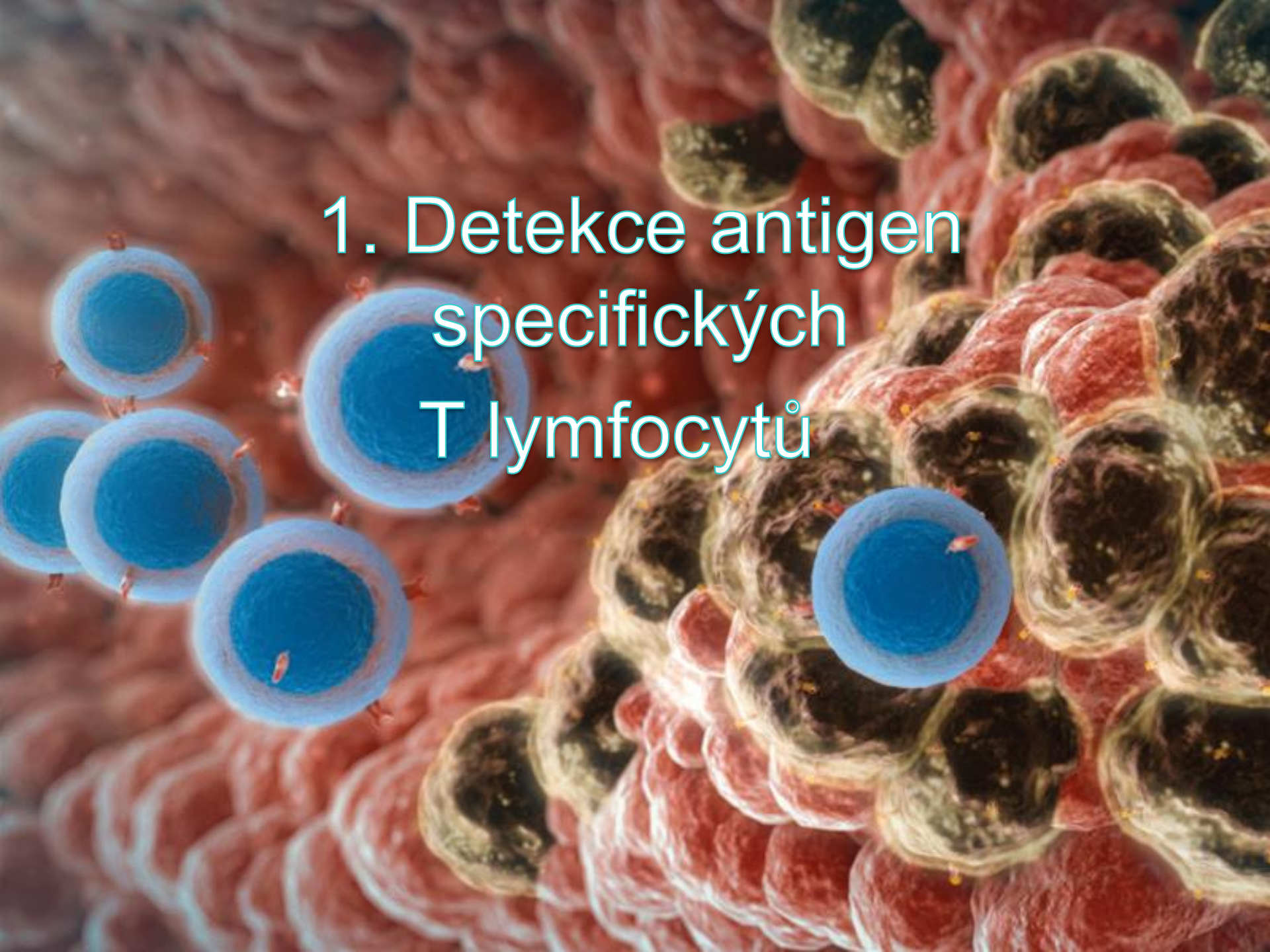
In vivo efekt DCVAC

- **Migrace do lymf. uzlin**
- **Indukce specifické protinádorové reakce**
- **Bezpečnost**
- **Klinický efekt**

Migrace DC značených 111-In oxinem do lymfatických uzlin



1. Detekce antigen specifických T lymfocytů



Detekce antigen specifických T lymfocytů

1. Optimalizace metody

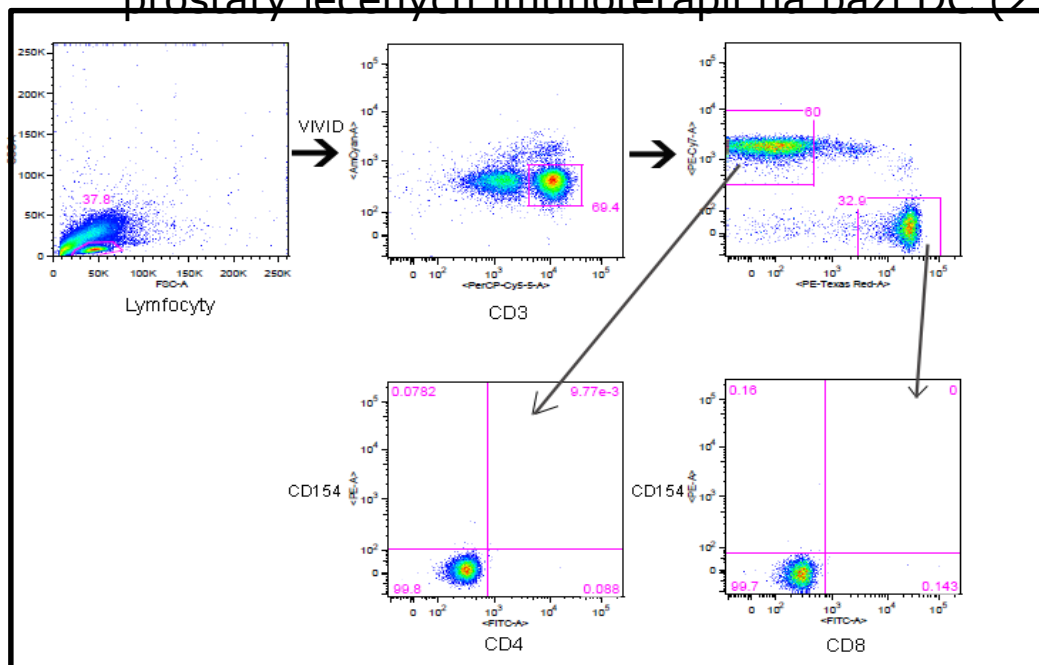
- Detekce po prodloužené době kultivace PBMC s pepmixy (PSA, NY-ESO-1, MAGE-A1 a A3)
- Signifikanční zvýšení procenta specifických CD8 T lymfocytů
- Došlo k proliferaci antigenně specifických T lymfocytů a zvýšení senzitivity metody



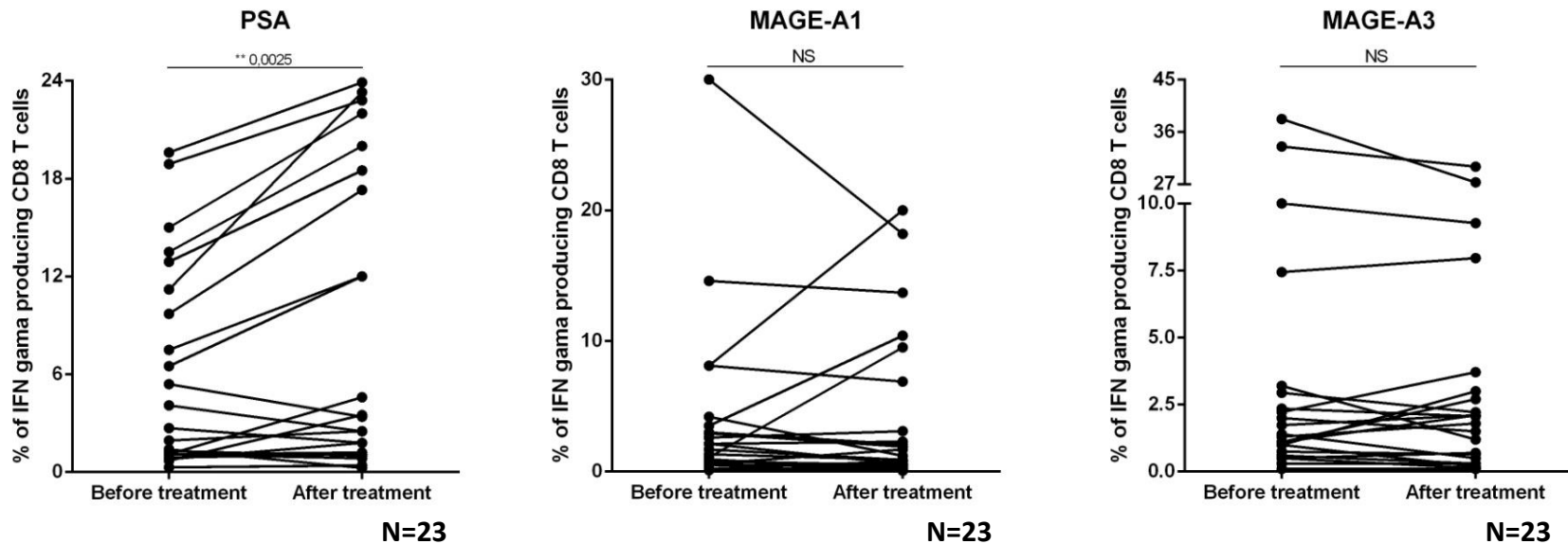
3 denní protokol

10 denní protokol

2. Stanovit populaci antigen specifických T lymfocytů v periferní krvi pacientů s karcinomem prostaty léčených imunoterapií na bázi DC (23 pacientů)

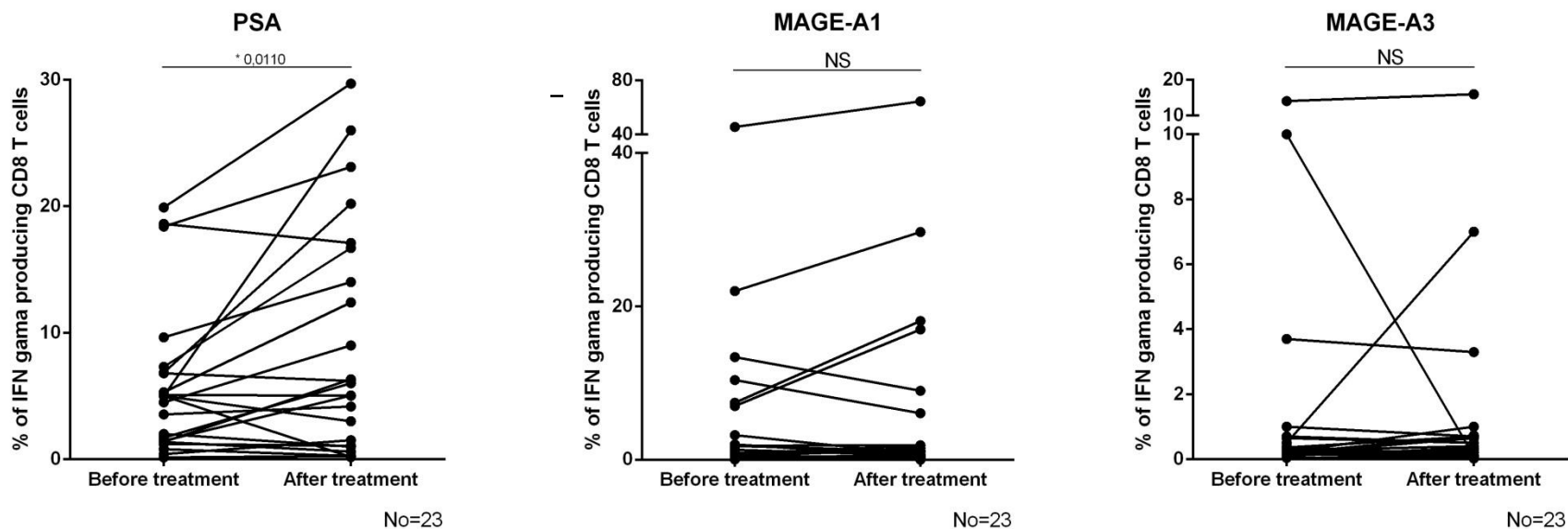


PSA, MAGE-A1 a MAGE-A3 před a po dokončení léčby pacientů s BR



- U 23 pacientů s BR se signifikantně zvyšuje procento antigen specifických T lymfocytů proti **PSA** – byl použit neparametrický párový test - Wilcoxonův
- Procento antigen specifických T lymfocytů proti **MAGE-A1 a A3** nádorovým antigenům se signifikantně nemění

Antigen specifické T lymfocyty před a po dokončení léčby hormon refrakterních pacientů



- U 23 pacientů s HR se signifikantně zvyšuje pouze procento antigen specifických T lymfocytů proti **PSA**
- Procento antigen specifických T lymfocytů proti **MAGE-A1 a A3** nádorovým antigenům se signifikantně nemění

Bezpečnost

- Krátkodobá
- Dlouhodobá

2008-2014 aplikace více než 1000 dávek
DCVAC u celkem cca 170 pacientů

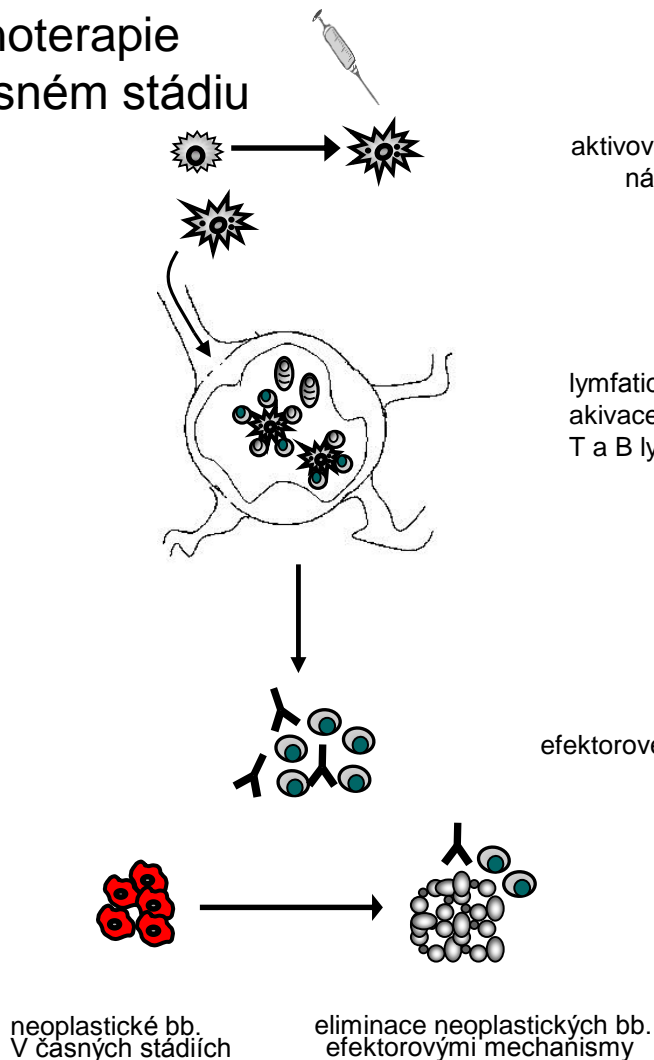
Sledování autoprotilátek a klinických
známek autoimunity

SAE – vyhodnoceny jako nesouvisející s
aplikací

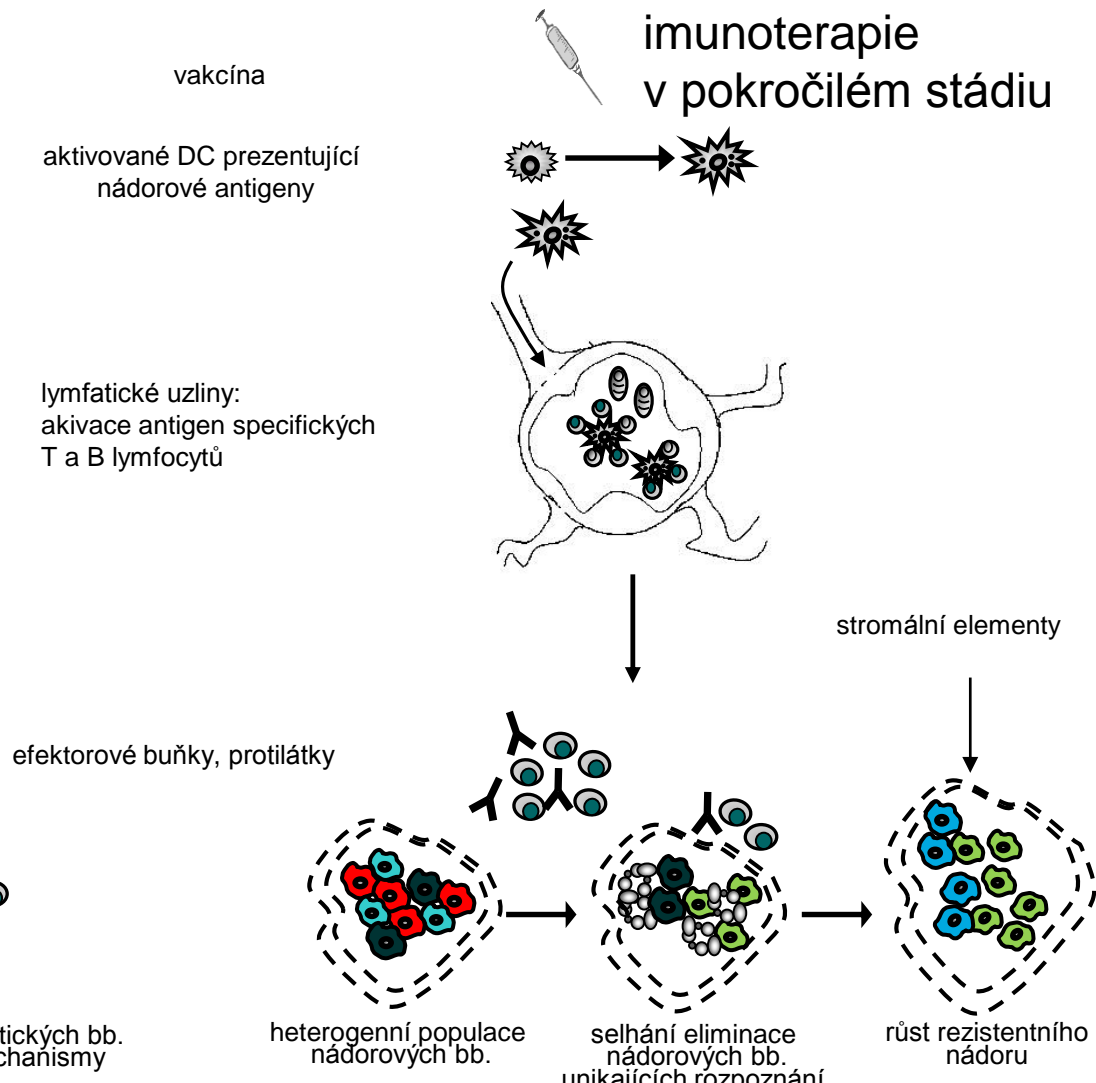
AE – únava, reakce v místě vpichu

Časování imunoterapie: v časných stádiích nádoru, než se vytvoří komplexní nádorové mikroprostředí, má větší potenciál účinnosti

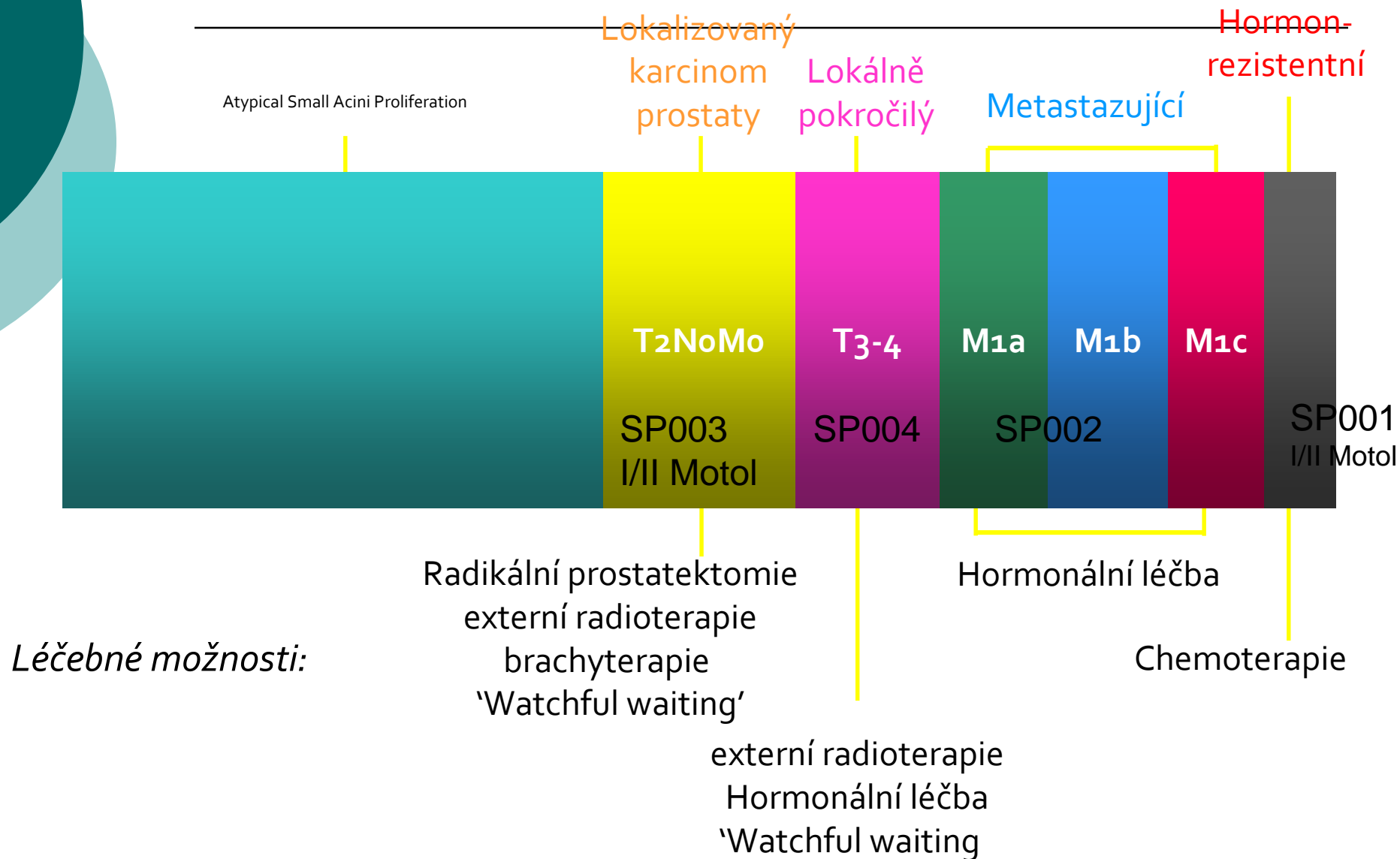
imunoterapie
v časném stádiu



imunoterapie
v pokročilém stádiu

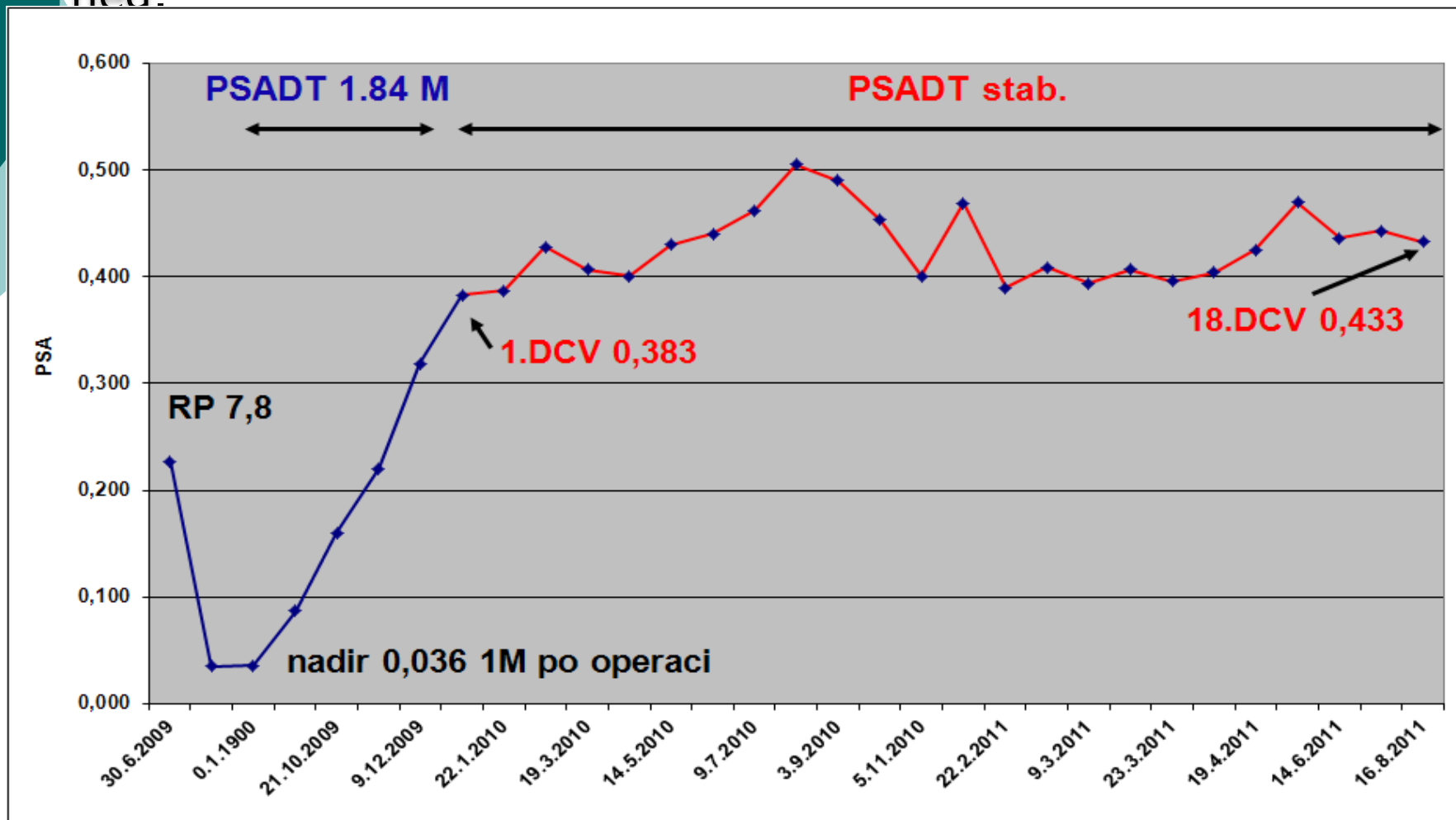


Klinické studie fáze I/II a II u ca prostaty s přípravkem DCVAC/PCa



CaP with rising PSA – case 1

- 56 y, RP 6/2009, T2cNXMO, GS 6(3+3), iPSA 7,8
- 1.DCV 1/2010–PSA 0.383, 21.DCVAC 11/2012 18F-cholin neg.



Phase I/II clinical trial in patients with the castration resistant prostate cancer

Representative case report 4

- 1937, st.p. RP 9/2003, T3aNOMX, GS 8 (3+5), iPSA 9, RT 2010
- cyberknife 11/2010 pelvic area
- mCRPC 6/2010, 1.DCV 3/2011– PSA 628, 11/2013 PSA
- 2 c. immunotherapy /23d./, 21 d. chemotherapy
- Estimated survival at the entry to the study **11 months**,
- Survival on combined chemoimmunotherapy **40 months**

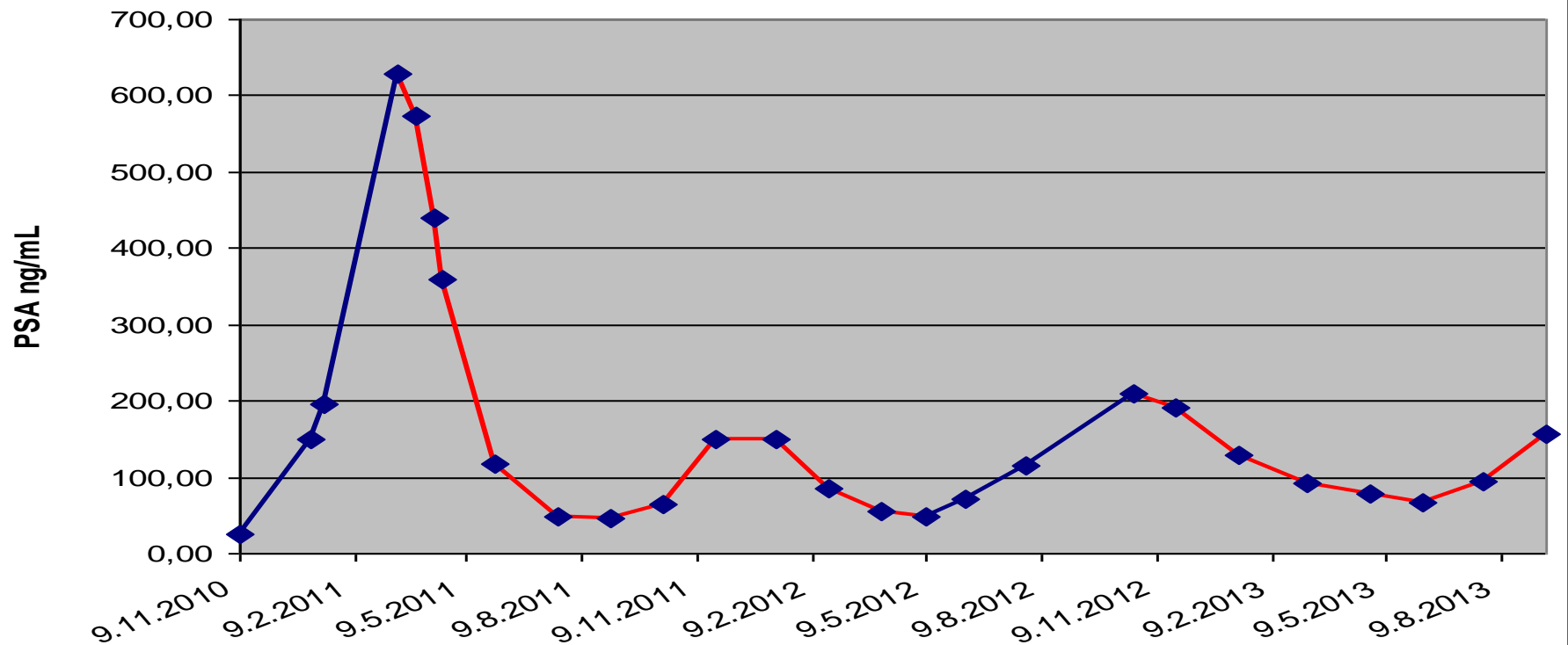
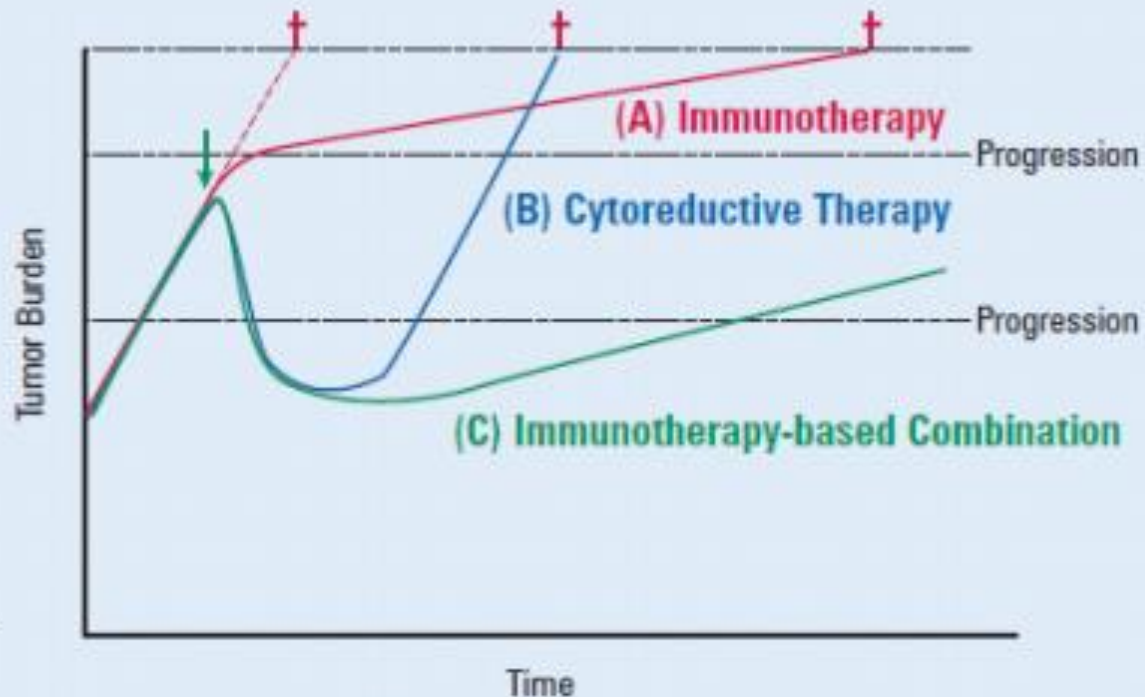


Figure. Potential Growth Moderating Effect of Immune-Based Therapies Both Alone and in Combination



Adapted from Madan et al. *Seminars in Oncology*, 2012. (PMID: 22595052)

Imunoterapie nádorů dendritickými buňkami

- Dendritické buňky jako účinné adjuvans pro indukci buněčné protinádorové imunity
- Jediný dosud registrovaný imunoterapeutický přípravek Provenge (na bázi antigen-prezentujících buněk)
- Mechanismus účinku je odlišný od standardních terapií
- Opožděná kinetika klinického účinku
- Objektivní odpověď může být nevýrazná nebo zcela chybět (RECIST)
- ,Potenciálně účinnější při menším objemu nádoru (kombinace s cytoreduktivními léky)
- Potenciálně dlouhodobý efekt a interakce s následujícími léčebnými postupy
- Vhodnost zahájení v časnějších stádiích, kdy není imunitní systém kompromitován pokročilým onemocněním a je dostatek času na rozvoj imunitní reakce
- Velmi komplikované klinické studie, obvykle pouze OS jako end-point

Poděkování

Ústav imunologie UK 2.LF

Rožková Daniela
Podrazil Michal
Ulčová Hana
Hromádková Hana
Fučíková Jitka
Lašťovička Jan



Horváth Rudolf
Kayserová Jana
Budinský Vít
Sochorová Klára
Anna Fialová
Vávrová Jitka
Koblížek Ladislav
Kyselová Ilona



Tobiášová Zuzana
Pospíšilová Dagmara
Borovičková Jiřina

Šedivá Anna

Špíšek Radek

IGA MZ, VZMSM
GAUK, GAČR



Urologická Klinika FNM

Kawaciuk Ivan
Minárik Ivoš
Jarolím Ladislav
Babjuk Marko

ÚHKT

Gašová Zdeňka

Radioterapeutické a onkol. Odd. FN Motol
Prausová Jana, Linke Zdeněk, Kubáčková Kateřina



www.sotio.com