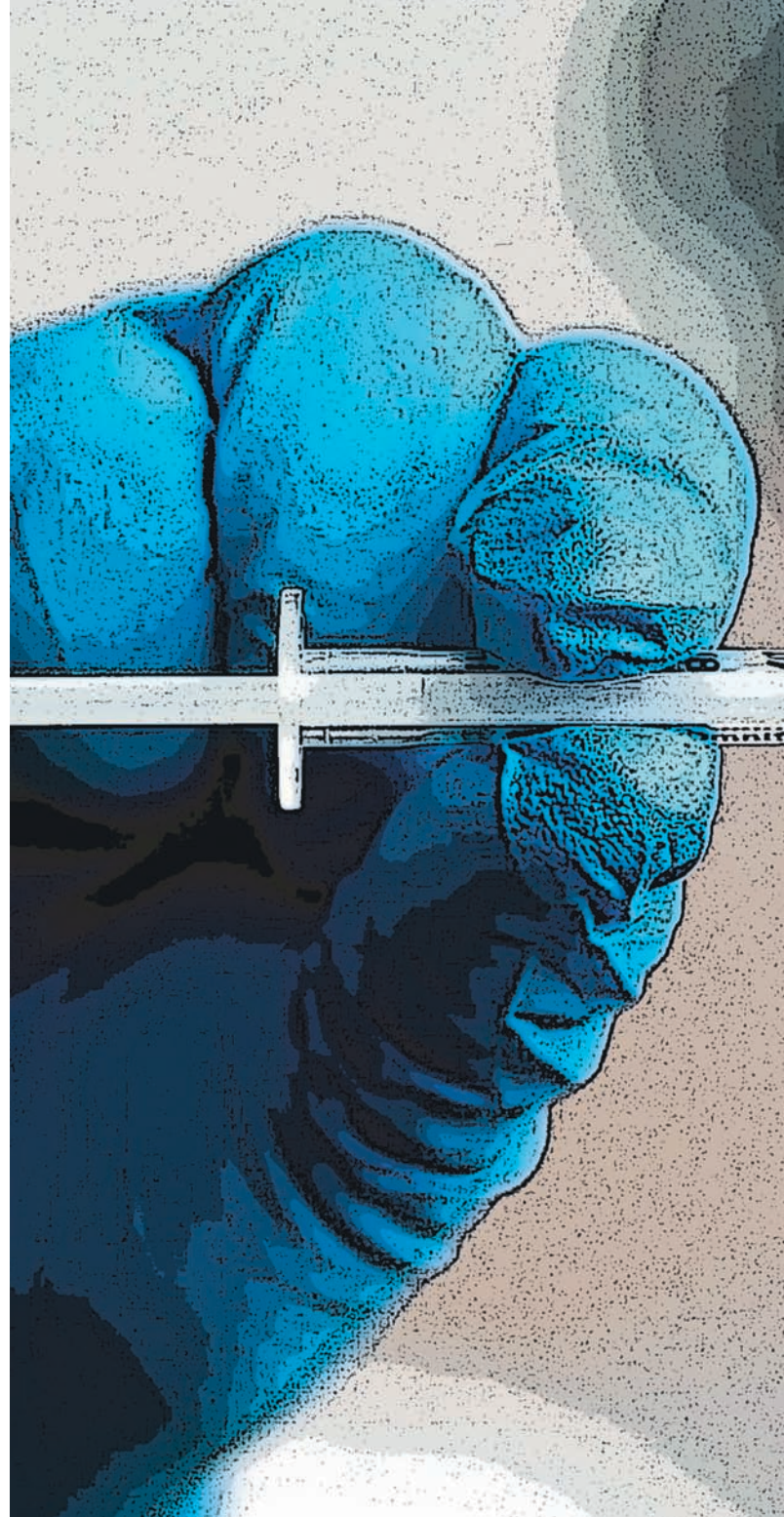


••• terapeutisk vaccinering

Terapeutisk vaccinering skulle kunna vara ett alternativ till behandling med monoklonala antikroppar vid cancer och inflammatoriska sjukdomar. "För att kringgå immunförsvaret riktar vi immunterapin mot tumörens blodkärl. Nu har vi fått lovande resultat med användningen av ett nytt, mildt men effektivt adjuvans som är godtagbart för klinisk användning. Det bör avsevärt kunna bidra till utvecklingen av terapeutiska vacciner riktade mot kroppsegna målmolekyler" säger **Anna-Karin Olsson**, docent vid Inst. för Medicinsk Biokemi and Mikrobiologi (IMBIM), Uppsala Biomedicinska Center (BMC).

En av de stora framgångarna inom human- och veterinärmedicin under de senaste 100-150 åren är vacciner mot infektionssjukdomar. Vaccin har tillsammans med antibiotika sannolikt varit medicinens mest framgångsrika verktyg för människors och sällskapsdjurs hälsa. Breda vaccinationsprogram har hjälpt till att praktiskt taget utrota invalidiserande och livshotande tillstånd som polio, difteri och smittkoppor. Framgången med vacciner har ökat intresset för att använda dessa även för behandling av icke-smittsamma sjukdomar som allergier, autoimmunitet och cancer.

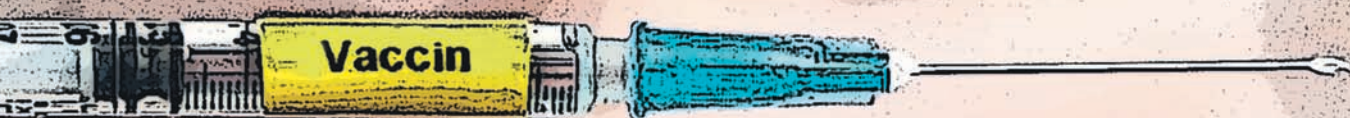
Utveckling av vaccin mot icke-infektiösa sjukdomar är emellertid betydligt mer utmanande, eftersom målmolekylen oftast är kroppsegen (ett själv-antigen).



Det innebär att tumörceller har utvecklat strategier för att undkomma kroppens immunsystem. Man måste därför hitta sätt att kringgå immunsystemets tolerans för att skapa ett immunsvaret mot målmolekylen. Proteiner som istället uttrycks av tumörens blodkärl kan därför erbjuda intressanta alternativ för riktad behandling.

För att uppnå ett anti-själv svar behövs en effektiv immuniseringsstrategi samt ett effektivt och säkert adjuvans. Hittills har detta inte funnits.

En annan viktig aspekt är att målmolekylen har ett sjukdomsspecifikt uttrycksmönster, vilket säkerställer att immunsvaret inte ger oönskade biverkningar. Dessa aspekter lägger extra krav på ett terapeutiskt vaccin för icke-smittsamma



VACCINERING MOT TUMÖRERS BLODKÄRL

sjukdomar, jämfört med de profylaktiska vacciner som de flesta av oss har fått i barndomen.

TERAPI RIKTAD MOT TUMÖRENS BLODKÄRL

Utvecklingen av cancertvacciner har hittills inte varit tillräckligt framgångsrik för att etablera dem som en standardbehandling i kliniken. Ett undantag är de vacciner (Cervarix, Gardasil) som skyddar mot infektion av vissa typer av humant papillomvirus (HPV). Eftersom HPV-proteiner kan inducera cervixcancer, ger vaccinet ett skydd mot denna tumörtyper. De flesta cancerformer har dock ingen tydlig koppling till en infektion och är därför ingen lätt måltavla för vaccination.

Anledningarna till att det är svårt att utveckla effektiva cancertvacciner är alltså många. Som diskuterats ovan är de molekyler som är involverade i utveckling av cancer i huvudsak själv-antigener. Det är väl etablerat att även enstaka punktmutationer i viktiga proteiner kan generera kraftfulla onkogen. Dessa små modifieringar känns inte alltid igen av immunsystemet som främmande.

Tumörceller har utvecklat ett antal olika strategier för att undkomma igenkänning, samt för att undertrycka immunsystemet.

Ett alternativt tillvägagångssätt är därför att rikta immunterapi mot tumörens blodkärl, eftersom tumörens tillväxt

••• terapeutisk vaccinering

är beroende av dessa. Endotelcellerna som bygger upp blodkärlen är dessutom mer genetiskt stabila än tumörcellerna och har inte utvecklat samma strategier för att gömma sig för immunsystemet. En annan fördel är att blodkärlen är lättillgängliga för de immunceller och antikroppar som finns i cirkulationen. Det har uppskattats att en enda endotelcell stöder cirka 100 tumörceller, varför det finns en potentiell förstärkning av effekten genom att rikta immunsvaret mot tumörkärlen. Slutligen, det breda uttrycksmönstret av vissa tumörkärls-antigener gör det också möjligt att använda samma strategi för behandling av många olika tumörtyper¹.

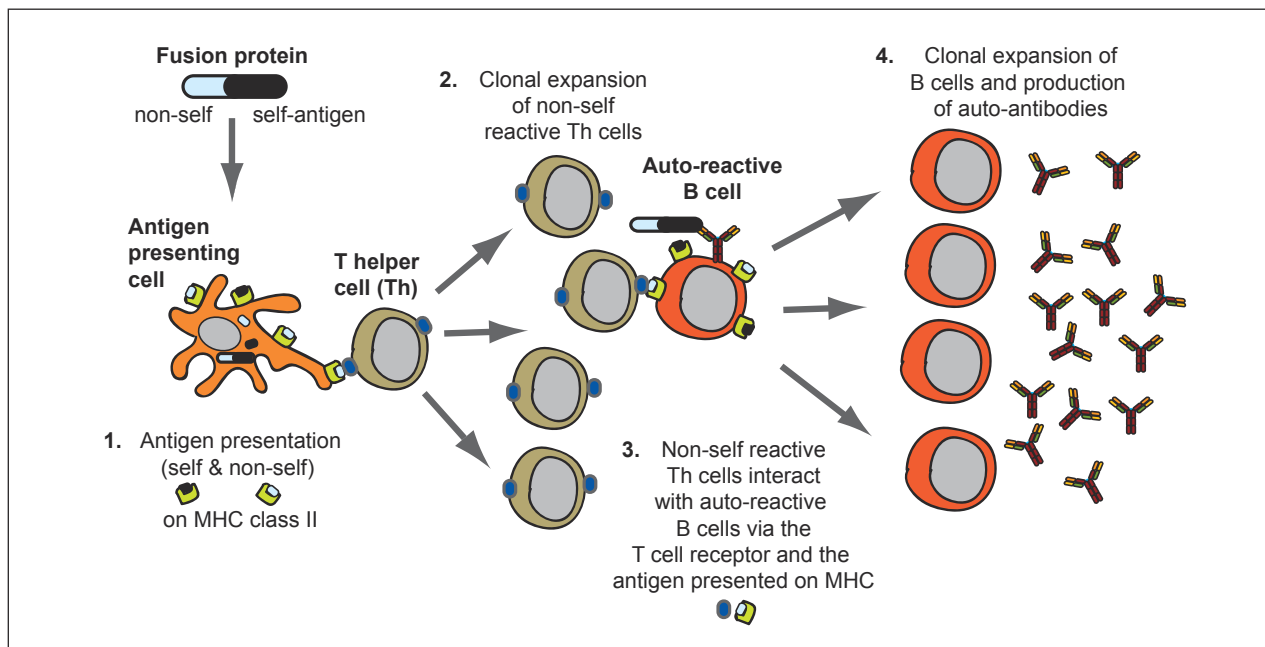
ATT KRINGGÅ IMMUNOLOGISK TOLERANS

B- och T-celler som utgör det adaptiva immunsystemet är utbildade för att inte angripa vävnader i våra egna kroppar. Bortsortering av autoreaktiva T-celler sker i tymus under utvecklingen. Epitelcellerna i tymus presenterar då själv-antigen för de T-celler som bildas. Transkriptionsfaktorn AIRE spelar en avgörande roll i denna process och slår på uttryck av själv-antigener som normalt inte uttrycks i tymus, eller först senare i livet, för att möjliggöra ett negativt urval av autoreaktiva T-celler. Den centrala roll AIRE spelar i processen illustreras av det faktum att avsaknad av denna transkriptionsfaktor resulterar i svåra problem med autoimmunitet². Autoreaktiva T-celler som av någon anledning undgår negativ selektion i benmärgen hålls i ett inaktivt tillstånd med hjälp av perifera toleransmekanismer såsom reglerande T-, B- eller myeloida celler och/eller brist på co-stimulerande aktiverings-signaler.

B-celler som visar stark affinitet för membranbundna själv-antigener i benmärgen under utvecklingen får signalen att gå i apoptos, om inte deras specificitet kan förändras genom så kallad "receptor-editering". En betydande del av de autoreaktiva B-celler som bildas i benmärgen släpps dock ut i cirkulationen. Dessa celler utgör inte ett problem för individen, eftersom de hålls inaktiva via toleransmekanismer i periferin (utanför benmärgen).

Dessa mekanismer inkluderar brist på aktiveringshjälp från autoreaktiva T-celler, eftersom dessa sorterats bort i tymus. Hjälp från T-celler krävs för aktivering, klonal expansion och antikroppsproduktion av B-cellerna. Dessutom får B-cellen en signal för inaktivering när den möter sitt antigen utan samtidig hjälp från T-cellerna. Under hela vuxenlivet, kan nya specificiteter hos B-cellerna bildas (inklusive anti-själv reaktivitet) genom somatisk hypermutation, som äger rum i germinalcentra i perifera lymfoida organ. Detta illustrerar beroendet av perifera toleransmekanismer för att hålla autoreaktiva B-celler inaktiva och därmed förhindra autoimmunitet.

Närvaron av en relativt stor repertoar av autoreaktiva B-celler i våra kroppar kan utnyttjas för terapeutisk vaccination. Det är möjligt att kringgå den perifera B-cellstoleransen och inducera ett antikroppsvar mot ett själv-antigen genom att använda sig av fusionsproteiner som består av en främmande (icke-själv) del fuserad till det själv-protein man vill skapa immunsvaret mot. Dessa fusionsproteiner kommer att "lura" T-celler att ge aktiveringshjälp till de autoreaktiva B-celler med specificitet mot själv-delen i fusionsproteinet³ (Figur 1).



Figur 1. Fusionsproteinet tas upp av antigenpresenterande celler¹, och peptider från både icke-själv och själv-delen av fusionsproteinet presenteras på MHC klass II. De främmande peptiderna känns igen av T-celler, vilket leder till expansion av den aktiverade T-cellen². Själv-peptiderna känns inte igen av T-celler, eftersom autoreaktiva T-celler sorterats bort i tymus under utvecklingen. Däremot finns alltid autoreaktiva B-celler närvarande i kroppen. Dessa kommer selektivt att ta upp fusionsproteinet via sin B-cellsreceptor (IgM) och därefter presentera både själv- och icke-själv peptider på MHC klass II. De främmande peptider som presenteras av auto-reaktiva B-celler känns nu igen av de aktiverade T-cellerna³, som därmed aktiverar de autoreaktiva B-cellerna att expandera, producera antikroppar mot målmolekylen⁴ och därmed initiera ett immunsvaret mot vävnaden som uttrycker målmolekylen.

I prekliniska modeller har denna teknik använts framgångsrikt för att bryta tolerans mot själv-antigener såsom IgE, IL-5, TNF- α och HER2³ och kliniska prövningar har inletts för vaccination mot IgE (allergi), TNF- α (reumatoid artrit), och HER2 (bröstcancer). Det immunsvaret som skapas med denna strategi är reversibelt (dvs antikropparna försvinner med tiden)⁴, vilket är fördel om biverkningar skulle upptäckas.

”Utveckling av vaccin mot icke-infektiösa sjukdomar är emellertid betydligt mer utmanande, eftersom mål-molekylen oftast är kroppsegen (ett själv-antigen).”

EXTRA DOMÄN-A OCH -B HOS FIBRONEKTIN SOM MÅL-MOLEKYLER I TUMÖRKÄRL

Ett litet antal molekyler har hittills identifierats som uttrycks specifikt av tumörkärl i den vuxne individen, antingen av endotelcellerna, pericyter eller av den omgivande extracellulära matrixen⁵. Avsaknaden av uttryck av dessa molekyler i frisk vävnad gör dem högintressanta för riktade cancerterapi. Två exempel på dessa tumörkärlsmarkörer är extra domän-A och -B (ED-A och ED-B) hos fibronectin som uttrycks genom alternativ splicing vid bildandet av ett kärlsystem i embryot, men därefter i huvudsak inte kan upptäckas alls under normala förhållanden i den vuxna individen. Dessa domäner uttrycks emellertid på nytt i situationer med kärlnybildning, såsom sårsläkning och tumörtillväxt⁶. Fibronectin utgör en central del av det vaskulära basalmembranet⁶. Prekliniska studier i murina tumörmodeller med olika radiomärkta eller cytokin-kopplade monoklonala antikroppar riktade mot ED-A och ED-B visar en hög selektivitet för tumörkärl och imponerande terapeutiska svar, vilket stärker möjligheten att kunna genomföra vaccination mot samma antigener⁷.

Genom att immunisera möss med ett fusionsprotein som består av det bakteriella proteinet tioredoxin (TRX) och ED-B har vi visat att det är möjligt att kringgå tolerans mot ED-B och inducera ett starkt antikroppssvar mot ED-B. Immuniserade möss visade en minskning av tumörstorlek med 70% och nedsatt funktion hos tumörkärlen jämfört med kontroll-immuniserade möss utan anti-ED-B-antikroppar⁸. Histologisk analys av tumörvävnaden visade att immunisering mot ED-B framkallar flera förändringar som tyder på en attack av immunsystemet. Ett viktigt fynd var att sårsläkning inte påverkades av anti-ED-B immunisering.

DEN KLINISKA SITUATIONEN

Även om dessa resultat utgör ett viktigt bevis för att tumörtillväxt kan begränsas genom att inducera ett immunsvaret mot

dess kärl, kommer den kliniska situationen vara annorlunda.

I ED-B studien skapade vi ett immunsvaret innan tumörtillväxten startades. I verkligheten kommer patienter som redan diagnostiserats med cancer, eller metastaser, att vara i behov av en effektiv behandling. Det var därför mycket viktigt att undersöka om tillväxten av redan etablerade tumörer kan begränsas med denna metod.

Av den anledningen använde vi oss av en musmodell för metastaserande bröstcancer och startade ett immunsvaret mot ED-A (som uttrycks högt i bröstcancer) när tumörerna redan var tydligt etablerade. Vi fann att vaccinet hämmade tillväxten av brösttumörerna och gav en minskning av mängden metastaser med 80 procent, vilket är ett viktigt fynd med tanke på att en majoritet av alla cancer-relaterade dödsfall orsakas av tumörer som spridit sig i kroppen⁹.

En viktig aspekt av denna studie är att vaccinationsstrategin vi använt oss av inte är förebyggande utan terapeutisk. Immuniteten skapas när tumören redan bildats, ett scenario som efterliknar den kliniska situationen bättre än förebyggande vaccinering.

Dessa studier tyder på att terapeutisk vaccination mot tumörkärlsantigen skulle kunna erbjuda en ny och kraftfull behandlingsstrategi för solida tumörer och metastaserande cancer. Jämfört med behandling som baseras på monoklonala antikroppar är terapeutisk vaccinering dessutom ett kostnadseffektivt alternativ, vilket diskuteras längre fram i artikeln.

DEN CENTRALA ROLLEN AV ADJUVANS

Trots flera mycket lovande prekliniska studier har utvecklingen av cancervacciner hittills inte varit tillräckligt framgångsrik för att etablera dessa läkemedel som en standardbehandling på kliniken. En viktig orsak till frånvaron av terapeutiska vacciner som riktar sig mot själv-molekyler i kliniken, är bristen på effektiva, men samtidigt säkra och biologiskt nedbrytbara adjuvans för användning i människor. De flesta prekliniska studier utförs med Friends kompletta och inkompleta adjuvans, vilket är en mycket kraftfull men också relativt irriterande adjuvans. På grund av dess innehåll av mineralolja och avdödade mycobakterier är Friends inte godkänd för klinisk användning.

Vi genomförde därför en stor screen i syfte att identifiera ett mildare adjuvans som skulle kunna stödja ett antikroppssvar mot ett kroppseget protein¹⁰. Olika immunstimulerande föreningar adderades till det skvalen-baserade adjuvanset Montanide ISA 720 (MN720). Skvalen är en fettmolekyl och utgör en byggsten för kolesterol. Nivåerna av anti-själv antikroppar i närvaro av MN720 i kombination med de olika immunostimulerarna jämfördes med de antikropps-nivåer som inducerades i närvaro av Friends.

Två olika enkelsträngade CpG DNA-oligonukleotider ingick i screenen och visade sig vara lika potenta som Friends med avseende på produktion av anti-själv antikroppar. Därefter gjordes en detaljerad jämförelse av det immunsvaret som skapades mot ED-B med hjälp av adjuvanset MN720/CpG, med svaret som framkallades i närvaro av Friends adjuvans¹¹. I flera av de aspekter som analyserades (antikropps-nivåer och variation i svaret, affinitet hos antikropparna och hur

••• terapeutisk vaccinering

snabbt immunsvaret startade), visade sig MN720/CpG ha bättre egenskaper än Freund's, som allmänt anses som det mest potenta adjuvans vi känner¹.

Dessa fynd bör avsevärt bidra till utvecklingen av terapeutiska vacciner riktade mot själv-antigener.

KOSTNADSEFFEKTIVT ALTERNATIV

Terapier baserade på användandet av monoklonala antikroppar har gjort ett viktigt bidrag till nuvarande behandlingsstrategier för cancer och autoimmuna sjukdomar. Men kostnaden för dessa nya läkemedel innebär en betydande belastning på vårdekonomin, vilket resulterar i begränsad tillgång för patienter. Som ett exempel kan behandling med anti-VEGF-antikroppen bevacizumab (Avastin) kosta upp till 50 000 kr per månad². Dessutom pågår diskussioner om hur man ska ta dessa kostnader i beaktande vid utformningen av kliniska prövningar. Detta står i kontrast till tanken att kliniska prövningar bör utformas endast på kliniska grunder. Baserat på dessa incitament är det högst relevant att undersöka potentialen hos alternativa terapier som ger likvärdig klinisk effekt, men till en lägre kostnad. Terapeutisk vaccination, definierad som induktion av ett kroppseget antikroppsvar, skulle kunna vara ett sådant alternativ. Medan antikroppsbaseade terapier kräver stora mängder högkvalitativt GMP (Good Manufacturing Practice)-producerat rekombinant protein (några hundra milligram, upp till gram per vecka), behövs vanligtvis 10 000-20 000 gånger lägre mängd rekombinant protein för vaccinering, vilket är betydligt mer kostnadseffektivt.

FÖRFATTARENS TACK

Jag vill tacka Lars Hellman, Uppsala universitet, för intellektuell och experimentell input genom åren rörande alla aspekter av terapeutisk vaccination. Tack också till alla tidigare och nuvarande medlemmar i min grupp för deras värdefulla bidrag till arbetet med utvecklingen av terapeutiska cancertvacciner, i synnerhet Elisabeth JM Huijbers, Julia Femel och Falk Saupe. Finansieringen för projektet har erhållits från Cancerfonden, Vetenskapsrådet MH och Svenska Läkaresällskapet.

REFERENSER

1. Matejuk, A., Leng, Q., Chou, S. T., and Mixson, A. J. (2011) Vaccines targeting the neovasculature of tumors, *Vasc Cell* 3, 7.
2. Liston, A., Lesage, S., Wilson, J., Peltonen, L., and Goodnow, C. C. (2003) Aire regulates negative selection of organ-specific T cells, *Nat Immunol* 4, 350-354.

3. Hellman, L. (2008) Therapeutic vaccines against IgE-mediated allergies, *Expert Rev Vaccines* 7, 193-208.
4. Vernersson, M., Ledin, A., Johansson, J., and Hellman, L. (2002) Generation of therapeutic antibody responses against IgE through vaccination, *Faseb J* 16, 875-877.
5. Neri, D., and Bicknell, R. (2005) Tumour vascular targeting, *Nat Rev Cancer* 5, 436-446.
6. Astrof, S., and Hynes, R. O. (2009) Fibronectins in vascular morphogenesis, *Angiogenesis* 12, 165-175.
7. Pasche, N., Wulhfard, S., Pretto, F., Carugati, E., and Neri, D. (2012) The antibody-based delivery of interleukin-12 to the tumor neovasculature eradicates murine models of cancer in combination with paclitaxel, *Clin Cancer Res* 18, 4092-4103.
8. Huijbers, E. J., Ringvall, M., Femel, J., Kalamajski, S., Lukinius, A., Abrink, M., Hellman, L., and Olsson, A. K. (2010) Vaccination against the extra domain-B of fibronectin as a novel tumor therapy, *FASEB J* 24, 4535-4544.
9. Femel, J., Huijbers, E. J., Saupe, F., Cedervall, J., Zhang, L., Roswall, P., Larsson, E., Olofsson, H., Pietras, K., Dimberg, A., Hellman, L., and Olsson, A. K. (2014) Therapeutic vaccination against fibronectin ED-A attenuates progression of metastatic breast cancer, *Oncotarget*.
10. Ringvall, M., Huijbers, E. J., Ahooghalandari, P., Alekseeva, L., Andronova, T., Olsson, A. K., and Hellman, L. (2009) Identification of potent biodegradable adjuvants that efficiently break self-tolerance--a key issue in the development of therapeutic vaccines, *Vaccine* 28, 48-52.
11. Huijbers, E. J., Femel, J., Andersson, K., Bjorkelund, H., Hellman, L., and Olsson, A. K. (2012) The non-toxic and biodegradable adjuvant Montanide ISA 720/CpG can replace Freund's in a cancer vaccine targeting ED-B--a prerequisite for clinical development, *Vaccine* 30, 225-230.
12. Schmidt, C. (2009) Costly cancer drugs trigger proposals to modify clinical trial design, *J Natl Cancer Inst* 101, 1662-1664.

ANNA-KARIN OLSSON, PH.D, DOCENT, INST. FÖR MEDICINSK BIOKEMI AND MIKROBIOLOGI (IMBIM)
UPPSALA BIOMEDICINSKA CENTER (BMC), ANNA-KARIN.OLSSON@IMBIM.UU.SE

