

Study of immunomodulating effect of lenalidomide in up front therapy of follicular lymphoma

Darima S. Badmazhapova, Irina V. Galtseva, Yulia O. Davydova, Nikolay M. Kapranov, Evgeni E. Zvonkov, Elena N. Parovichnikova

National Research Center for Hematology, Moscow, Russia

Contact: Dr. Darima S. Badmazhapova
 E-mail: badmazhapova-darima@mail.ru

Introduction

According to modern concepts of lymphoma pathogenesis tumor cells could evade the immune surveillance and cause T-cell anergy. This is the basis for using immunomodulatory drugs in therapy, such as lenalidomide. It enhances the immune synapse formation by increasing the expression of costimulatory molecules on tumor B-cells, cytotoxic activity of T-cells and differentiation of T-helpers. Our aim was to study the changes in PD-1, PD-L1, FAS, CD80, CD86 proportion in tumor cells and subpopulations of T-cells during therapy with lenalidomide in a patient with follicular lymphoma.

Clinical case and methods

The study was performed in one patient (m, 32 y.o.) with follicular lymphoma (t(14;18), cytological type 2, stage IVB, high risk FLIPI-2), who underwent an upfront therapeutic protocol: iv rituximab 375 mg/m² once, lenalidomide with an initial dose 5 mg/day with gradual escalation up to 20 mg/day for 27 days. Lenalidomide was interrupted due to the remaining large tumor mass, and R-CHOP was started. Blood samples were tested prior to and after rituximab, on day 1, day 2, day 5, day 7 and day 21 of lenalidomide and in day 3 after its interruption.

PD-1-, PD-L1-, FAS-, CD80-, CD86-positive cells were evaluated from all the tumor cells. PD-1- and PD-L1-positive cells were determined from CD4+ and CD8+ T cells and a subset of naïve (NV, CD28+CD95-), effector (EF, CD28-CD95+), memory cells (ME, CD28+CD95+) by flow cytometry (BD FACS CantoII). Twenty-nine donor blood samples were studied as a control.

Results

Before treatment, there were 35.6% CD4+PD-1+ cells (in donors, 2.0%-20.7%); CD8+PD-1+ 23.6% (in donors, 1.8%-

23.5%). The following results were seen after rituximab: CD4+PD-1+ decreased by 3.5 times (10.8%); CD8+PD-1+, by 2.5 times (9.4%). During lenalidomide therapy: CD4+PD-1+ gradually increased to 25.0%; CD8+PD-1+ shifted up to 18.8%. After lenalidomide interruption, the CD4+PD-1+ population increased to 44.9%.

On day 2 of lenalidomide therapy, the CD4+PD-L1+ increased by 6.8 times (from 0.5% to 3.4%), CD8+PD-L1+ increased 4 times (from 0.3 to 1.2%). On day 21: CD4+PD-L1+, and CD8+PD-L1+ showed a 4.4% and 2.5% increase, respectively. After lenalidomide interruption, CD4+PD-L1+ and CD8+PD-L1+ decreased to 1.1% and 0.5%, respectively.

CD4+ memory effectors (MEs) increased from 42.9% to 70.6%, and CD4+ naïve (NVs) decreased from 56.4% to 27.9% during lenalidomide therapy. After its interruption, there was a growth of NV cells to 32.8% and decrease of ME to 66.2%. On day 5: CD8+EFs increased from 19.3% to 59.9%. CD8+EFs decreased and reached baseline on the 3rd day after lenalidomide interruption.

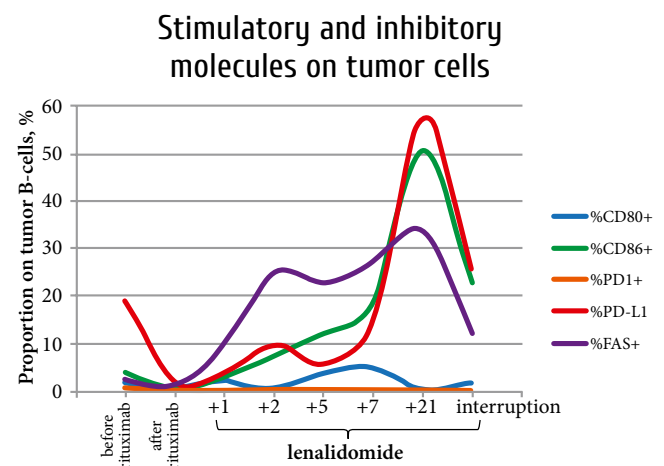


Figure 1.

Co-expression rates of stimulatory and inhibitory molecules on tumor cells were low: CD80+, 1,9% (in donor B cells, 0.0%-33.6%); CD86+, 3,9% (in donors, 0.0%-32.0%); FAS+, 23% (in donors 5.4%-38.0%); PD-1 0.7% (in donors 0.0%-3.8%); PD-L1+, 19.1% (in donors, 5.6%-69.4%) before lenalidomide. During lenalidomide therapy, amount of tumor cells expressing CD86, FAS, PD-L1 increased up to 50.8%, 33.9%, 57.6%, and decreased after therapy interruption to 23.3% 12.5%, 26.1%, respectively. Tumor B- cells CD19+CD80+, CD19+PD-1+ did not change during all the period of therapy (Figure 1).

Conclusion

PD-L1 on tumor cells lead to their anergy by binding with PD-1 on T cells. During lenalidomide therapy, the propor-

tion of PD-L1+ T-cells increased, and PD-1+ T cells were reduced, CD4+MEs and CD8+EFs were increased. This results suggests activation of cytotoxic response and abrogation of T-cell anergy. On the other hand, expression of co-stimulatory molecules increased on the tumor cells, but PD-L1+ on tumor cells did also show an increase. In this case, lenalidomide provided an immunomodulatory effect, but the patient's tumor cells continued to persist, thus suggesting their ability to evade apoptosis by additional pathways.

Keywords

Lenalidomide, flow cytometry, immune response, follicular lymphoma.

Исследование иммуномодулирующего эффекта леналидомида в терапии первой линии фолликулярной лимфомы

Дарима С. Бадмажапова, Ирина В. Гальцева, Юлия О. Давыдова, Николай М. Капранов, Евгений Е. Звонков, Елена Н. Паровичникова

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, Москва

Введение

Согласно современной концепции патогенеза лимфопролиферативных заболеваний, опухолевые клетки обладают способностью уклоняться от иммунного надзора и вызывать Т-клеточную анергию. Данный факт является оправданным для применения при лимфомах иммуномодулирующих средств, таких как леналидомид. Это способствует более вероятному формированию иммунного синапса за счет увеличения экспрессии ко-стимуляторных молекул на опухолевых В-клетках и усиления цитотоксической активности Т-клеток. Цель нашей работы состояла в изучении изменений экспрессии на опухолевых клетках PD-1, PD-L1, FAS, CD80, CD86, а также изменения в субпопуляциях Т-лимфоцитов во время терапии леналидомидом в первой линии при фолликулярной лимфоме.

Клиническое описание и методы

Пациент (м, 32 года) с фолликулярной лимфомой (2-й цитологический тип, IVB стадия, высокий риск по FLIPI-2). Проводилась терапия: в/в ритуксимаб 375 мг/м², леналидомид с начальной дозой 5 мг/день с постепенной эскалацией до 20 мг/день в течение 27 дней. Терапия леналидомидом была отменена из-за сохраняющейся большой опухолевой массы, и начат курс R-СНОР. Образцы крови исследовали до и после введения ритуксимаба, на 1-й, 2-й, 5-й, 7-й и 21-й день терапии леналидомидом и на 3-й день после отмены.

С помощью проточной цитометрии (цитометр BD FACS Canto II) определяли долю PD-1-, PD-L1-, FAS-, CD80-, CD86-позитивных клеток по отношению ко всем опухолевым клеткам. PD-1- и PD-L1-позитивные клетки определяли среди CD4+ и CD8+ Т-клеток и определяли субпопуляции наивных (NV, CD28+CD95-), эффекторных (EF, CD28-CD95+) и клеток памяти (ME, CD28+CD95+). В качестве контроля исследовали кровь 29 доноров.

Результаты

До лечения доля CD4+PD-1+ Т-клеток составила 35,6% (у доноров 2,0-20,7%), CD8+PD-1+ Т-клеток - 23,6% (у доноров 1,8-23,5%). После введения ритуксимаба отмечалось снижение доли CD4+PD-1+ клеток в 3,5 раза, до 10,8% и CD8+PD-1+ клеток в 2,5 раза, до 9,4%. На фоне терапии леналидомидом доля CD4+PD-1+ нарастала до 25%, а CD8+PD-1+ до 18,8% но не достигала исходных значений. После отмены леналидомида отмечалось значимое нарастание доли PD-1 на CD4+ Т-клетках до 44,9%. На второй день терапии леналидомидом доля CD4+PD-L1+ увеличилась в 6,8 раза (от 0,5% до 3,4%), CD8+PD-L1+ в 4 раза (от 0,3 до 1,2%). На 21-й день соответственно увеличились CD4+PD-L1+ и CD8+PD-L1+ до 4,4% и 2,5%. После отмены леналидомида доли CD4+PD-L1+ и CD8+PD-L1+ уменьшались до 1,1% и 0,5%, соответственно.

Доля CD4+ME клеток увеличилась с 42,9% до 70,6%, а количество CD4+NV клеток снизилось с 56,4% до 27,9%

во время терапии леналидомидом. После его отмены наблюдался рост количества наивных клеток до 32,8% и снижение ME до 66,2%. На 5-й день доля CD8 + EF клеток увеличилась с 19,3% до 59,9%. CD8 + EF лимфоциты достигли базового уровня в течение 3х дней после отмены леналидомида.

Экспрессия ко-стимулирующих и ингибирующих антигенов на опухолевых клетках была низкой: CD80 + 1,9% (в В-клетках донора 0,0%-33,6%), CD86 + 3,9% (у доноров 0,0% -32,0%), FAS + 23% (У доноров 5,4% -38,0%), PD-1 0,7% (у доноров 0,0% -3,8%), PD-L1 + 19,1% (у доноров 5,6% -69,4%) до леналидомида. Во время терапии леналидомидом количество опухолевых клеток, экспрессирующих CD86, FAS, PD-L1, увеличилось до 50,8%, 33,9%, 57,6% и уменьшилось после его отмены до 23,3% 12,5%, 26,1%, соответственно. Экспрессия CD80 и PD-1 на опухолевых В-клетках не изменялась в течение всего периода терапии (Рис. 1).

Заключение

PD-L1 на опухолевых клетках приводит к анергии Т-клеток. Во время терапии леналидомидом увеличивалась доля PD-L1 + и снизилась PD-1 +Т-клеток, количество CD4 + ME и CD8 + EF лимфоцитов увеличивалось. Это указывает на активацию цитотоксического ответа и исчезновение анергии Т-клеток. С другой стороны, экспрессия ко-стимулирующих молекул на опухолевых клетках увеличивалась, однако экспрессия PD-L1 также увеличивалась. Таким образом, леналидомид обеспечил иммуномодулирующий эффект, но наличие остаточных опухолевых клеток в крови пациента указывает на способность опухолевых клеток избегать апоптоз иными способами.

Ключевые слова

Леналидомид, проточная цитометрия, иммунный ответ, фолликулярная лимфома.