

244 Využití buněk vybraných typů nádorů při vývoji protinádorových imunoterapeutických přípravků v autologních a alogenních podmínkách.

Hanák L.^{1,2}, Lauerová L.², Matějková E.¹, Smejkalová J.^{1,2}, Vidláková P.¹, Kyjovská D.¹, Stejskalová A.¹, Němečková I.², Hošková A.², Sekaninová R.², Nenutil R.², Křen L.⁴, Kocák I.², Fait V.², Oltová A.⁵, Žaloudík J.², Hájek R.¹, Michálek J.^{1,3}

1) Centrum buněčné imunoterapie (CBI) LF MU Brno

2) Masarykův onkologický ústav (MOÚ) Brno

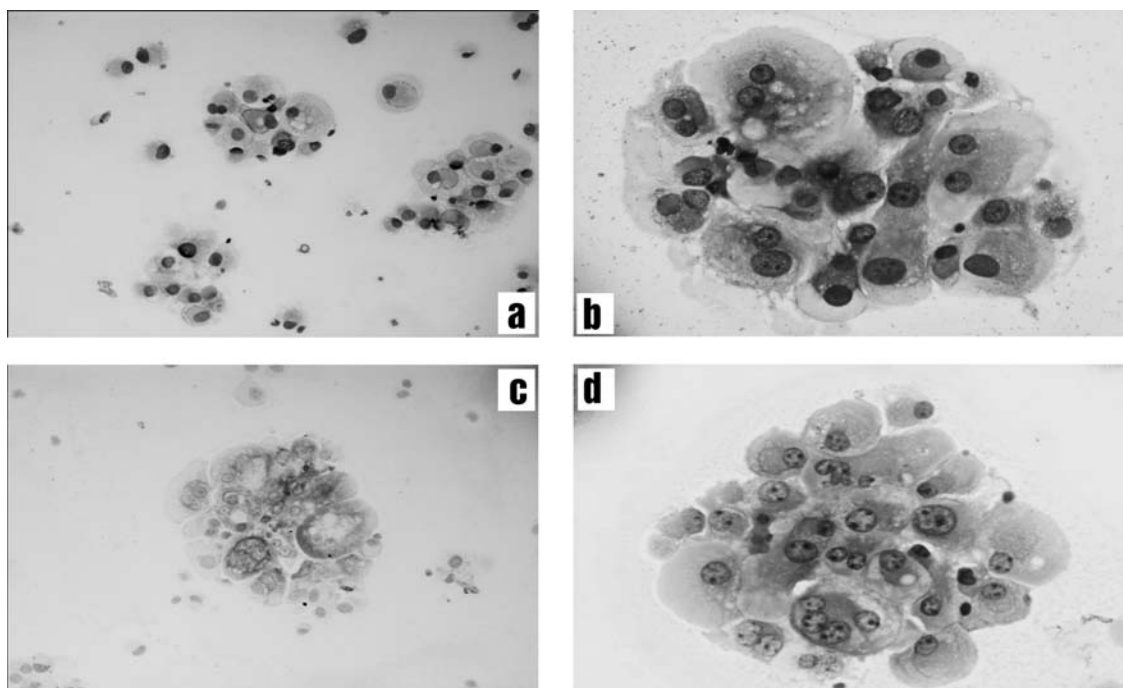
3) I. dětská interní klinika FN Brno

4) Ústav patologie FN Brno

5) Oddělení lékařské genetiky FN Brno

Kultivace buněk primárního karcinomu ledvin

Hlavním účelem projektu „Národní program výzkumu II“ je vývoj biotechnologie vedoucí k bezpečné alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk (SCT) tak, aby na jedné straně byla zcela potlačena nežádoucí a často smrtelná reakce štěpu proti hostiteli (GVHD) vyvolaná alogenními lymfocyty dárce, a na druhé straně, aby byl maximálně využit protinádorový potenciál (GVL/GVT; graft-versus-leukemia/tumor) alogenních lymfocytů. Jeden ze způsobů jak eliminovat GVH-reaktivní klonny dárce T lymfocytů spočívá v jejich aktivaci nenádorovými buňkami příjemce v tzv. smíšené lymfocytární reakci a poté v jejich eliminaci specifickým imunotoxinem. Následně jsou ostatní lymfocyty aktivovány kultivovanými nádorovými buňkami (po jejich ozáření, aby byl zpřístupněn nádorový antigen) za účelem dosažení maximálního efektu GVL/GVH. Všechny kroky jsou prováděny v in vitro podmínkách. Kompletní remise po aplikaci infuze dárce lymfocytů byla pozorována především u chronické myeloidní leukémie, ale také u pacientů s dalšími nádorovými onemocněními, především u akutní myeloidní leukémie, mnohočetného myelomu a renálního karcinomu. Zatímco část projektu týkající se krevních malignit je již ve fázi povolené studie testování účinku na vybraných pacientech, s renálními karcinomy probíhá v současné době základní laboratorní výzkum.



Obr. 1: Hodnocení zastoupení nádorových buněk (cytospin, pacient 3, zvětšeno 200x)

a) Pasáž 1 (hematoxilin)

b) Před aktivací lymfocytů (Giemsa)

c) Pasáž 1 (pancytokeratin)

d) Před aktivací lymfocytů (PAP)

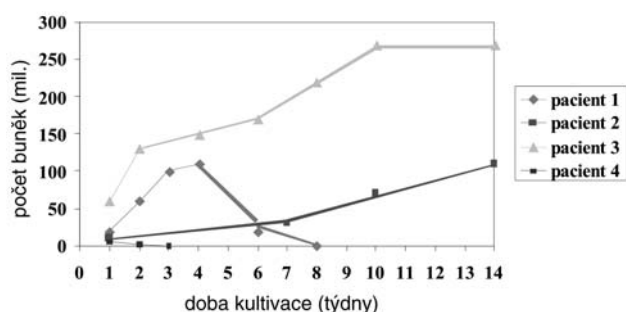
Pro stimulaci protinádorové aktivity T-lymfocytů je nutné zajistit prezentovatelný nádorový antigen, jehož zdrojem může být kultura příslušných nádorových buněk pacienta. Ty jsou získávány izolací z resekátu nádorové tkáně (ohledané patologem) získané od pacientů MOÚ Brno s primárním karcinomem ledvin, převážně po nefrektomii. Kultivace v laboratorní pak umožňuje jejich namnožení a selekci od nenádorových buněk za účelem vypěstování primokultury, jednak jako zdroje zmiňovaného nádorového antigenu a jednak pro její zamražení pro pozdější stimulaci lymfocytů mrtvými nádorovými buňkami. Vzhledem k tomu, že renální buňky patří k velmi obtížně kultivovatelným typům nádorů, bylo stěžejním úkolem na základě zkušeností nečetných

EXPERIMENTÁLNÍ ONKOTERAPIE

prací vybrat vhodné médium, jehož základ tvořilo DMEM suplementované 15% fetálním sérem, antibiotiky penicilinem a streptomycinem, inzulinem, pyruvát, glutaminem stabilizovaným proti rozkladu a glukózou. Buňky uvolněné z nastříhaných kousků tkáně jsou kultivovány na Petriho miskách do 1. pasáže (1-4 týdny), poté je část pěstována v R. lahvičkách pro realizaci výše zmíněných testů v laboratořích CBI LF Brno. Zbývající část se dále kultivuje v laboratoři MOÚ Brno pro navýšení počtu buněk, které jsou při dostatečném počtu zamrazeny na sucho (mrtvé buňky). Reprezentativní zastoupení vitálních nádorových buněk v kultuře je kontrolováno cytospinovým barvením patologem před 1. pasáží (MOÚ Brno) a před aktivací lymfocytů (FN Brno). Výsledky barvení vybraného pacienta ukazující na v podstatě výhradní zastoupení živých buněk tumoru jsou znázorněny na **Obr.1**.

V úvodní části projektu (září – prosinec 2006) byly zpracovány a pěstovány buňky pocházející z karcinomu ledvin 4 pacientů. Z **Obr. 2** je patrné, že u tří z nich se podařilo vypěstovat primokulturu a namnožit dostatečný počet buněk alespoň pro 1. fázi pokusů s živými buňkami, u dvou z nich (pacienti 2 a 3) pak i do další části s buňkami mrtvými. Pacienti 1 a 2 byli pasážováni 2x, pacient 3 3x. Z nastříhané tkáně posledního pacienta se uvolnilo jen velmi málo vitálních buněk, které by adherovaly na dně kultivačních misek a po 3 týdnech kultura odumřela.

Jak již bylo zmíněno, ze zkušeností ve světě vyplývá, že nádorové buňky ledvin nevykazují přílišnou schopnost žít a rozrůstat se, ať již byla pro kultivace použita různá média. Práce na toto téma jsou spíše kusé, obšírnější výsledky publikuje Ueda a spol., kde z 52 primárních karcinomů ledvin se polovinu podařilo udržet alespoň do 1. pasáže a 17% do šesté. Za těchto podmínek je možné dosavadní zde uváděné výsledky hodnotit jako úspěšné s tím, že projekt je teprve na začátku a zpracován je zatím jen malý soubor pacientů.



Obr.2: Výsledky kultivace buněk renálního karcinomu

Využití buněk metastatického melanomu při vývoji protinádorových imunoterapeutických přípravků

Cílem této pilotní studie je využití protinádorového potenciálu expandovaných tumor infiltrujících lymfocytů (TIL) aktivovaných nádorovým antigenem u pacientů s metastatickým melanomem. Účinnost adoptivního převodu T lymfocytů při léčbě nádorového onemocnění byla prokázána u laboratorních zvířat a v současné době také u pacientů s metastatickým melanomem.

V tomto projektu byly nádorové buňky využívány ke stimulaci cytotoxické aktivity lymfocytů jiným způsobem než vlastní separovanou kultivací. Nádorová tkáň pacientů MOÚ Brno byla v laboratoři po posouzení patologem na kousky nastříhána a v médiu X-VIVO 15 (zohledňující potřeby růstu lymfocytů) tentýž den posílána do LEHABI OKH FN Brno k 1-2 měsíční expanzi TIL pomocí vysokých dávek IL-2 (1000 IU/ml) a jednorázově phytohemaglutininem (10g/ml) in vitro za přítomnosti tzv. „feeder cells“, což jsou ozářené alogenní mononukleáry jiného zdravého dárce. Jejich specifická cytotoxická aktivita je zajištěna přítomností nádorových buněk jak napřed přirozeně v nádorové tkáni tak posléze v kultuře.

Přípravek	Počet buněk		Závěr
	počátek kultivace	konec kultivace	
TIL-1	15,8 x 10 ⁶	27,0 x 10 ⁹	vyhověl
TIL-2	2,9 x 10 ⁶	56,0 x 10 ⁹	vyhověl
TIL-3	15,8 x 10 ⁶	34,0 x 10 ⁹	vyhověl
TIL-4	2,2 x 10 ⁶	12,1 x 10 ⁶	nevyhověl
TIL-5	120 x 10 ⁶	45 x 10 ⁹	vyhověl
TIL-6	120 x 10 ⁶	28 x 10 ⁹	vyhověl
TIL-7	50 x 10 ⁶	22 x 10 ⁹	vyhověl

Tab. 1

Prospektivně byly validovány mononukleáry periferní krve 5 zdravých dárců (stimulovány in vitro buněčnou linií ARH 77 mnohočetného myelomu – jednalo se o průkaz expanze nádorově specifických T lymfocytů nádorovým antigenem s cílem simulovat expanzi TIL in vitro) a poté 7 pacientů s metastazujícím melanomem. V rámci schvalovacího procesu přípravku jako léčiva musela být vedle jeho jakosti provedena i validace bezpečnosti sestávající z endotoxinového testu a vyšetření sterility bez-

EXPERIMENTÁLNÍ ONKOTERAPIE

prostředně před hlubokým zmrazením přípravku TIL, dále vyšetření na přítomnost Mycoplasma sp., HBV, HCV, Parvoviru B19, HIV, mykobakterie. Pro sledování případných cytogenetických změn v průběhu kultivace bylo provedeno cytogenetické vyšetření periferní krve pacientů před začátkem kultivace a onkocytogenetické vyšetření expandovaných TIL.

V šesti případech ze 7 pacientů se jednalo o lymfatickou uzlinu, postiženou nádorovým procesem a v jednom případě se jednalo o primární ložisko kožního melanomu. V případě všech nádorových uzlin byla expanze TIL zahajována s počtem buněk splňující spodní limit 2×10^6 a po 5-7 týdenní kultivaci podle postupů navržených v této studii došlo k nárůstu převyšujícímu minimální požadavek 5×10^9 TIL buněk (**Tab. 1**). V případě kultivace TIL z primárního ložiska (TIL-4) nádoru došlo pouze k minimálnímu nárůstu z $2,2 \times 10^6$ na $12,1 \times 10^6$ TIL po 8-týdenní kultivaci. Z tohoto důvodu je rovněž v protokolu klinické studie navrhováno využívat pouze lymfatických uzlin postižených nádorovým procesem a nikoliv primárních ložisek nádoru, která jsou zpravidla fibrózní a neumožňují požadovanou expanzi TIL.

Kultivace TIL in vitro je možná za sterilních podmínek v CBI LF Brno, jež má schválené prostory pro výrobu léčiva bez vzniku kontaminace. Expanze TIL je reálná z lymfatických uzlin postižených metastázami maligního melanomu na hodnoty použitelné v klinické praxi.

Podporováno grantem MŠMT NPVII – 2B06058

Literatura

1. Ueda R., Shiku H., Pfreundschuh M. et al. Cell surface antigens of human renal cancer defined by autologous typing, J Exp Med. 1979,150: 564-679.
2. Childs R., Chernoff A., Contentin N. et al. Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation. The New England Journal of Medicine 2000, 343 (11): 750-758.
3. Greenberg PD. Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. Adv Immunol 1991, 49: 281-9.
4. Rosenberg SA. Progress in human tumor immunology and immunotherapy. Nature 2001, 411: 380-6.
5. Dudley ME, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. Science 2002, 298: 850-4.
6. Michálek J., Svoboda M.: Buněčná imunoterapie nádorů. Klinická onkologie 2003, 16: 145-148.