

PŘÍPRAVA MYELOM-SPECIFICKÝCH T LYMFOCYTŮ AKTIVOVANÝCH DENDRITICKÝMI BUŇKAMI NALOŽENÝMI NONAPEPTIDY ODVOZENÝMI OD MUCINOVÉHO PROTEINU MUC1 A KATALYTICKÉ PODJEDNOTKY TELOMERÁZY hTERT

THE PREPARATION OF MYELOMA-SPECIFIC T CELLS ACTIVATED WITH DENDRITIC CELLS LOADED WITH NONAPEPTIDES DERIVED FROM MUCIN PROTEIN MUC1 AND CATALYTIC SUBUNIT OF TELOMERASE hTERT

OČADLÍKOVÁ D.¹, KOVÁŘOVÁ L.¹, HÁJEK R.^{1,2}, MICHÁLEK J.^{1,3}

¹LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE, ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FN BRNO

²INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO

³I.DĚTSKÁ INTERNÍ KLINIKA, FN BRNO

Souhrn

Východiska: Mnohočetný myelom je nevléčitelné onemocnění. Jako standardní terapie je využívána vysokodávkovaná chemoterapie s autologní transplantací kmenových buněk či alogenní transplantací. Relaps onemocnění je však neodvratný, a proto jsou rozvíjeny i jiné směry léčby. Jedním z nich je buněčná imunoterapie, která využívá potenciálu cytotoxických T lymfocytů. Jako nádorový antigen lze využít nádorově specifické proteiny, jako jsou nonapeptidy hTERT, odvozený od katalytické podjednotky telomerázy, a MUC1, odvozený od mucinového proteinu, vážající se na HLA-A2 systém molekul. **Typ studie a soubor:** V *in vitro* studii byla na souboru zdravých HLA-A2 pozitivních dárců testována možnost aktivace, identifikace, imunomagnetická separace a expanze myelom-specifických T lymfocytů s využitím hTERT a MUC1 jako nádorových antigenů. **Metody a výsledky:** Z mononukleárních buněk periferní krve byly kultivovány T lymfocyty a dendritické buňky. Dendritické buňky byly naloženy nonapeptidy hTERT a MUC1. Po opakované stimulaci T lymfocytů takto naloženými dendritickými buňkami došlo k jejich aktivaci charakterizované produkcí interferonu gama. Poté byly aktivované T lymfocyty imunomagneticky separovány a expandovány *in vitro* do množství využitelných v klinických aplikacích. **Závěry:** Tato práce ukazuje možnost specifické aktivace, identifikace separace a expanze protinádorových T lymfocytů, které lze využít při léčbě mnohočetného myelomu.

Klíčová slova: Mnohočetný myelom, imunoterapie, interferon gama, hTERT, MUC1 protein.

Summary

Backgrounds: Multiple myeloma is an incurable hematological disease. High-dose chemotherapy including autologous stem cell transplantation is recently considered a standard therapy for myeloma. Unfortunately, a relapse of the disease is inevitable. Therefore, new approaches such as immunotherapy have been considered recently. A specific activation of cytotoxic T cells can be reached using dendritic cells loaded with tumor-specific antigens. The HLA-A2-specific nonapeptides as hTERT derived from catalytic subunit of telomerase and MUC1 derived from mucin protein can be used. **Design and subjects:** Activation, identification, separation and expansion of myeloma-specific T cells from healthy HLA-A2 blood donors were tested in an *in vitro* study using hTERT and MUC1 nonapeptides as tumor-specific antigens. **Methods and results:** T cells and dendritic cells were obtained from peripheral blood. T cells were repeatedly stimulated with hTERT and MUC1 nonapeptide-loaded dendritic cells. Activated myeloma-specific T cells produced interferon gamma and were evaluated by flow cytometry. The activated T cells were immunomagnetically separated and *in vitro* expanded to the number usable in clinical trials. **Conclusions:** This study demonstrates feasibility of a specific activation, identification, separation and expansion of tumor-specific T cells that can be used in myeloma therapy.

Key words: Multiple myeloma, immunotherapy, interferon gamma, hTERT, MUC1 protein.

1. Úvod

1.1 Význam buněčné imunoterapie v léčbě mnohočetného myelomu

Za posledních 15 let byly učiněny velké pokroky v léčbě mnohočetného myelomu (MM), přesto je stále považován

za nevléčitelné, avšak dlouhodobě léčitelné onemocnění (1).

Vysokodávkovaná chemoterapie s autologní transplantací je dnes zlatým standardem v léčbě MM, nicméně její využití je limitováno věkem a celkovým zdravot-

ním stavem pacienta (2). Mezi standardní léky u MM patří v současnosti také imunomodulační látky povahy imidů jako thalidomid, jeho derivát revlimid (komerční název Lanalidomid) a inhibitor proteazomu bortezomib (komerční název Velcade) (3-6).

Avšak i přes úspěšné přijetí transplantátu či dosažení kompletní remise (complete remission; CR) přežívají v organismu pacienta nádorové buňky, tzv. zbytkové nádorové onemocnění (minimal residual disease; MRD), které je příčinou dalších relapsů a opakovaného propuknutí choroby (7, 8). Proto jsou hledány nové cesty, jak zlepšit jeho prognózu.

Jednu z nich představuje protinádorová imunoterapie, která zaznamenala značný úspěch u melanomu a renálního karcinomu (9, 10). V posledním desetiletí byly rovněž podány experimentální důkazy o možnostech navození imunitní reaktivity i vůči méně imunogenním nádorům včetně MM (11, 12). Imunitní systém může být aktivován specifickými nádorovými antigeny, zpravidla prostřednictvím dendritických buněk (DB). DB jsou naloženy specifickým nádorovým antigenem, který prezentují T lymfocytům (TL). Sestrávají tak klíčovou úlohu v indukci specifických protinádorových TL schopných cytotoxicky zabít nádorové buňky (13).

1.2. Nádorové antigeny u MM

U MM byly využity DB ve spojení s myelom-specifickým antigenem, tzv. Id-proteinem nebo lyzátem z nádorových buněk (14, 15). V současné době jsou testovány různé druhy potenciálních nádorových antigenů: apoptotická tělíška připravená ozářením nádorových buněk, nádorové specifické proteiny či peptidy, nádorová mRNA a DNA (16, 17, 18).

Na našem pracovišti jsme testovali dva velmi známé a univerzální peptidy odvozené od katalytické podjednotky telomerázy (hTERT) a mucinového proteinu (MUC1) jako nádorové antigeny u MM, které byly nebo v současné době jsou testovány klinicky.

1.3. hTERT jako nádorový antigen

hTERT je katalytická podjednotka enzymu telomerázy, jejímž úkolem je syntéza koncových úseků eukaryotických chromozómů-telomer, které mají ochrannou funkci (19, 20). Mezi aktivitou telomerázy a maligním potenciálem nádorových buněk existuje velmi úzká korelace. Pokud buňka vykazuje telomerázovou aktivitu, exprimuje na svém povrchu peptidy odvozené od hTERT (21). Více než 85% lidských nádorů vykazuje telomerázovou aktivitu (22).

Bylo prokázáno, že hTERT je schopna indukovat odpověď cytotoxických TL (CTL) u mnoha nádorových onemocnění včetně MM jak *in vitro* (23, 24), tak *in vivo* (19, 25). Peptidy odvozené od hTERT nesou motivy pro nejběžnější alely HLA systému I.třídy (HLA-A2), což je jeden z důležitých předpokladů pro úspěšnou aktivaci TL a imunoterapeutické protokoly nové generace (19, 22, 26). U zdravých jedinců nebyla pozorována imunitní reakce proti hTERT. Přesto bylo prokázáno, že hTERT-specifické TL mohou být identifikovány *ex vivo* jak u zdravých jedinců, tak i u nemocných s nádory

(27). Nedávno byly zahájeny klinické aplikace protinádorových vakcín využívajících hTERT jako nádorového antigenu (28).

1.3. MUC 1 jako nádorový antigen

MUC1 je typ I transmembránového glykoproteinu, který je exprimován na epiteliálních, ale také non-epiteliálních nádorových buňkách. Jeho extracelulární doména je složena z různého počtu (20-60) tandemových repetitivních 20 aminokyselin (29, 30) (tandemová repetitivní doména; TRD). V oblasti TRD se vyskytují antigenní epitopy (31). MUC1 je hojně exprimován u hematologických malignit, zejména u MM (92%), byl nalezen v séru pacientů s MM (32, 33) a je rovněž exprimován na myelomových buněčných liniích ARH 77 (34, 35).

Bylo prokázáno, že na HLA-neomezené CTL z periferní krve (PK) pacientů s MM rozpoznávají epitopy MUC1 proteinu lokalizované v TRD (30, 33, 36). Po imunizaci MUC1 proteinem mohou být indukovány také na HLA-omezené CTL (37).

Klinické studie využívající autologní DB naložené nonapeptidy odvozené od MUC1 proteinu byly provedeny u různých nádorových onemocnění (38, 39). Vakcína byla velmi dobře tolerována a byla zaznamenána i klinická odpověď včetně regrese metastáz (38, 39).

Bylo zjištěno, že MUC1 je exprimován také zdravými buňkami např. gastrointestinálního traktu hemopoetickými buňkami v kostní dřeni (KD). U vakcinační pomoci MUC1 proteinu nebyla však nikdy pozorována žádná autoimunitní reakce ani anémie (38). Pro detekci maligních buněk či imunoterapii musí být pečlivě voleny cílové epitopy (40).

1.4. Aktivace T lymfocytů naloženými dendritickými buňkami

V naší práci jsme jako nádorové antigeny využili HLA-A2 specifické nonapeptidy hTERT I₅₄₀ (aminokyselinová sekvence ILAKFLHWL) a MUC1 (aminokyselinová sekvence TSAPDTRPA), který je lokalizován v TRD a je rozpoznáván MUC1 specifickými CD8⁺ TL (41, 42). DB naložené těmito nádorovými antigeny byly využity k opakované stimulaci TL, které se aktivovaly a produkovaly měřitelné množství interferonu gama (IFN- γ). Aktivované IFN- γ ⁺ byly imunomagneticky separovány a expandovány *in vitro* na množství využitelná v klinických aplikacích.

2. Materiál a metody

2.1. Buněčné kultury

2.1.1. Mononukleární buňky periferní krve

Mononukleární buňky (MN) byly izolovány z nesrážlivé PK zdravých dárců z Transfuzní stanice ve FN Brno po podepsání informovaného souhlasu metodou gradientové centrifugace (Histopaque 1077, Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) a kultivovány v médiu obsahujícím X-VIVO 10 (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) s tepelně inaktivovaným 10% lidským ABsérem (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika), s 80U/ml DNAsy (Boehringer, Mannheim, Německo) a 1mM L-glutaminem (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) v 6-jamkových miskách při 37°C v atmosféře 5% CO₂

a 4,5% O₂. Iničiální buněčnost byla 3,3x10⁶ buněk/ml tohoto média.

2.1.2. T lymfocyty

Po 2-hodinové kultivaci byla suspenze rozdělena na adherentní a neadherentní frakci. Byl odebrán supernatant s neadherentní frakcí bohatou na TL a tyto buňky byly kultivovány v kompletním médiu (KM) obsahujícím X-VIVO 15, 50mg/l gentamycin, 2mM L-glutamin, 25mM hepes pufr (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA), 10% lidské AB-sérum (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) a 10 IU/ml interleukinu 2 (IL-2) (Proleukin, Chiron, Amsterdam, Holandsko) po dobu 7 dnů při 37°C v atmosféře 5% CO₂.

2.1.3. Dendritické buňky

Adherentní frakce bohatá na prekurzory DB byla dále kultivována v médiu pro DB: X-VIVO 10 (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) se 100 ng/ml interleukinu 4 (IL-4) (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika), 800 U/ml granulocyty a makrofágy stimulujícím faktorem (GM-CSF) (Schering Plough, New Jersey, USA) a 40 ng/ml tumor-nekrotizujícím faktorem alfa (TNF-α) (Bender Medsystems Diagnostics, Vídeň, Rakousko) po dobu 6 dnů při 37°C v atmosféře 5% CO₂ a 4,5% O₂. Médium pro DB včetně IL-4, GM-CSF a TNF-α bylo měněno každé 2 dny (43, 44).

2.2. Příprava antigenu

Jako antigeny byly využity nonapeptid I₅₄₀ odvozený od hTERT s aminokyselinovou sekvencí ILAKFLHWL a nonapeptid odvozený od MUC-1 s aminokyselinovou sekvencí TSAPDTRPA specifické pro HLA-A2 třídu (Clinalfa, Läufelfingen, Švýcarsko). Jako negativní kontrola byl využit nonapeptid ⁴⁷⁶ILKEPVHGV⁴⁸⁴ odvozený od HIV-1 reverzní transkriptázy (HIV-1) (Clinalfa, Läufelfingen, Švýcarsko) vázající se rovněž na alelu HLA-A2 (22, 38). Pracovní roztoky byly připraveny rozpuštěním 274,4 μg nonapeptidu hTERT v 1 ml sterilní TKV nebo 298,0 μg nonapeptidu MUC1 v 1 ml 0,9% NaCl. hTERT a MUC1 byly k DB přidávány ve formě takto připravených pracovních roztoků (22, 38).

Pracovní roztok HIV-1 nonapeptidu (nestimulující, referenční peptid) sloužícího jako kontrola byl připraven rozpuštěním 249,0 μg nonapeptidu HIV-1 v 1 ml sterilní TKV a v této formě byl přidáván k DB (38).

2.3. Naložení dendritických buněk nádorovým antigenem

7.den kultivace byly DB naloženy antigenem. Jako antigeny byly přidávány hTERT, MUC1 či referenční peptid HIV-1 ve formě pracovního roztoku (viz 2.2.) (22, 38) v množství 20 μg peptidu/200 000 DB (38).

2.4. Stimulace a restimulace T lymfocytů

8. den kultivace byly naložené či samotné DB smíchány s TL v poměru 20:1 (TL:DB). Část DB byla zamrazena a uchovávána při -80°C pro pozdější restimulaci. DB byly 2 hod před restimulací kultivovány v KM. Restimulace byla prováděna naloženými či samotnými DB v restimulačním poměru 2:1 (TL:DB) (44).

2.5. Značení pomocí interferonu gama

Antigenem aktivované TL produkující IFN-γ byly zhodnoceny pomocí Secretion Assay Cell Enrichment And Detection Kit (MACS Reagens, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Německo) podle pokynů výrobce (44, 45). Stejným způsobem byly zpracovány i TL stimulované samotnými DB či pomocí HIV-1.

2.6. Imunomagnetická separace

Imunomagnetická separace byla prováděna v den značení TL (na IFN-γ) restimulovaných DB naloženými hTERT, MUC-1 a HIV-1 nonapeptidy nebo samotnými DB (negativní kontrola) na koloně umístěné v magnetickém poli přístroje Vario MACS (MACS Reagents, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Německo). Nabarvené TL byly označeny paramagnetickou kuličkou pomocí Secretion Assay Cell Enrichment And Detection Kit (MACS Reagens, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Německo) podle pokynů výrobce (44, 45). Pozitivní frakce byla získána dvojitou separací pro zvýšení čistoty. V pozitivní i negativní frakci byly spočítány buňky a přidány protilátky (viz. 2.7.). Z každé frakce byl odevzdán vzorek na měření na průtokovou cytometrii. Zbylé buňky pozitivní frakce byly expandovány *in vitro* (viz 2.8.).

2.7. Průtoková cytometrie

TL (1x10⁶) po restimulaci naloženými DB byly inkubovány 15 minut s monoklonálními protilátkami anti-CD4 značenými fluoroisothiokyanátem (FITC), anti-CD8 FITC, anti-CD3 phycoerythrin-cyaninem (PE-Cy) (Immunotech, Marseille, Francie) a s anti-IFN-γ phycoerythrinem (PE) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Německo). TL byly analyzovány na průtokovém cytometru CytomicsTM FC 500 (Beckman Coulter, Miami, Florida, USA) ve vstupní frakci před magnetickou separací a v pozitivní a negativní frakci po separaci. Jako negativní kontrola byly využity nestimulované TL a TL stimulované samotnými DB.

2.8. Expanze IFN-γ⁺ hTERT a MUC1 specifických T lymfocytů

IFN-γ⁺ hTERT a MUC1 specifické TL po imunomagnetické separaci byly expandovány *in vitro* v KM obohačeném o interleukin 2 (IL-2) v množství 500 IU/ml KM (Proleukin, Chiron, Amsterdam, Holandsko). 1.den expanze byl přidán phytohemaglutinin (PHA) (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) v množství 5μg/ml KM. Po celou dobu expanze byla udržována buněčnost kultury 1-3 x 10⁶ lymfocytů/ml KM. KM včetně IL-2 bylo vyměňováno 2 x týdně a 1 x týdně byly v rámci výměny média k buňkám přidávány alogenní MNPK ozářené dávkou 30 Gy (tzv. „Feeder cells“).

2.9. Statistické hodnocení:

Ke statistickému zpracování výsledků byly využity mediány a mediány diferencí po odečtení pozadí v negativní kontrole s jejich minimy a maximy. Ke zjištění statistické významnosti aktivace TL byl využit Mediánový test a Wilcoxonův test (tab.č. 1, 2).

T lymfocyty (TL)	CD4 ⁺ TL (%)		CD8 ⁺ TL (%)	
	Medián diference (minimum-maximum)	P	Medián diference (minimum-maximum)	P
IFN- γ ⁺ CD3 ⁺ stimulace hTERT (n=9)	1,60 (0,50-3,18)	0,076 (MT)	2,36 (0,35-5,85)	0,031 (MT)
IFN- γ ⁺ CD3 ⁺ stimulace MUC1 (n=8)	1,37 (0,40-4,85)	0,073 (MT)	2,75 (0,48-8,80)	0,008 (MT)
IFN- γ ⁺ CD3 ⁺ stimulace HIV-1 (n=4)	0,71 (-0,30-1,11)		0,80 (-0,10-0,90)	
IFN- γ ⁺ CD3 ⁺ stimulace DB samotné (n=7)	1,33 (-0,38-2,16)		0,83 (0,70-3,80)	

Tabulka č. 1: Identifikace hTERT- a MUC1-specifických T lymfocytů po stimulaci.

Procentuální zastoupení (mediány diferencí) stimulovaných a nestimulovaných IFN- γ ⁺ CD3⁺ CD4⁺ a IFN- γ ⁺ CD3⁺ CD8⁺ hTERT-, MUC1- a HIV-1-specifických TL a TL aktivovaných samotnými DB s jejich minimy a maximy v závorkách. Měřeno na průtokovém cytometru 48 hod po stimulaci, TL byly stimulovány DB naloženými hTERT a MUC1 nonapeptidy, HIV-1 nestimulujícím nonapeptidem a samotnými DB. Data byla vyhodnocena pomocí Mediánového testu (MT), kde n je počet experimentů a p statistická významnost.

T lymfocyty (TL)	CD4 ⁺ TL (%)		CD8 ⁺ TL (%)	
	Medián diference (minimum-maximum)	P	Medián diference (minimum-maximum)	P
IFN- γ ⁺ CD3 ⁺ restimulace hTERT (n=9)	9,88 (1,2-15,55)	0,005 (MT)	10,35 (1,36-27,17)	0,005 (MT)
IFN- γ ⁺ CD3 ⁺ restimulace MUC1 (n=8)	6,07 (1,0-15,30)	0,008 (MT)	8,56 (0,96-22,28)	0,030 (MT)
IFN- γ ⁺ CD3 ⁺ restimulace HIV-1 (n=4)	1,30 (0,30-4,36)		2,00 (0,04-3,43)	
IFN- γ ⁺ CD3 ⁺ restimulace DB samotné (n=7)	0,76 (-0,30-0,81)		0,96 (-0,20-1,40)	

Tabulka č. 2: Identifikace hTERT- a MUC1-specifických T lymfocytů po restimulaci.

Procentuální zastoupení (mediány diferencí) restimulovaných a nestimulovaných IFN- γ ⁺ CD3⁺ CD4⁺ a IFN- γ ⁺ CD3⁺ CD8⁺ hTERT- a HIV-1-specifických TL a TL aktivovaných samotnými DB s jejich minimy a maximy v závorkách. Měřeno na průtokovém cytometru 24 hod po restimulaci, TL byly stimulovány DB naloženými hTERT a MUC1 nonapeptidy, HIV-1 nestimulujícím nonapeptidem a samotnými DB. Data byla vyhodnocena pomocí Mediánového testu (MT), kde n je počet experimentů a p statistická významnost.

3. Výsledky

3.1. Aktivace T lymfocytů dendritickými buňkami naloženými nonapeptidy hTERT a MUC1

Na základě dříve publikovaných optimalizačních experimentů (44) byla provedena stimulace a restimulace TL DB naloženými nonapeptidy hTERT (9 experimentů) a MUC1 (8 experimentů). 48 hod po stimulaci a 24 hod po restimulaci byla provedena identifikace protinádorových myelom-specifických TL (44) na průtokovém cytometru. Procento aktivovaných TL na základě produkce IFN- γ bylo hodnoceno pro CD4⁺ a CD8⁺ TL po stimulaci a restimulaci. V tab.1 resp. 2 jsou uvedeny mediány diference CD4⁺ a CD8⁺ TL získaných rozdílem procentuálních hodnot IFN- γ ⁺ stimulovaných resp. restimulovaných a nestimulovaných TL s jejich minimy a maximy.

TL byly stimulovány rovněž samotnými DB, které sloužily jako negativní kontrola. Tyto 3 soubory TL (re)stimulovaných pomocí DB samotných, DB naložených HIV-1 nonapeptidem a DB naložených hTERT(MUC1) byly vzájemně statisticky porovnány Mediánovým testem. Statistická významnost aktivace CD4⁺ TL po stimulaci byla p=0,076 resp. 0,073 a CD8⁺ TL 0,031 resp. 0,008 pro hTERT resp. MUC1 stimulované TL (tab.č. 1). Pro restimulované CD4⁺ TL byla p=0,005 resp. 0,008 a pro CD8⁺ TL 0,005 resp. 0,030 (tab.č. 2). Nejvyšší produkce IFN- γ byla zaznamenána u TL aktivovaných DB naloženými hTERT nonapeptidem po restimulaci, pro CD4⁺ resp. CD8⁺ TL byla 9,88% (1,2%-15,55%) resp. 10,35% (1,36%-27,17%), medián diference (minimum-maximum) (tab.č. 2).

3.2. Imunomagnetická separace T lymfocytů aktivovaných dendritickými buňkami naloženými nonapeptidy hTERT a MUC1

Bylo provedeno celkem 6/5 experimentů zahrnujících stimulaci, restimulaci a magnetickou separaci hTERT-/MUC1-specifických TL. Po restimulaci byly aktivované IFN- γ ⁺ TL identifikovány na průtokovém cytometru a poté imunomagneticky separovány na přístroji *Vario MACS*. Procentuální zastoupení aktivovaných TL (CD4⁺ a CD8⁺) ve vstupní frakci před separací bylo 1,08 – 16,31% (medián 3,79%) pro CD4⁺ a 1,96 – 17,99% (medián 3,93%) pro CD8⁺ hTERT-specifické TL (viz tab.č.3 a) a 1,43 – 3,55% (medián 1,62%) pro CD4⁺ a 1,94 – 10,08% (medián 2,02%) pro CD8⁺ MUC1-specifické TL (viz tab.č.3 b). Separace IFN- γ ⁺ frakce byla provedena dvakrát pro zvýšení čistoty. Po separaci došlo k obohacení aktivovaných TL v pozitivní frakci na 30,22 – 79,00% (medián 63,55%) pro CD4⁺ a 31,54 – 86,63% (medián 71,70%) pro CD8⁺ pro hTERT-specifické TL a na 35,56 – 71,50% (medián 43,00%) pro CD4⁺ a 52,38 – 75,98% (medián 62,93%) pro CD8⁺ pro MUC1-specifické TL oproti frakci negativní (tab.č.3 a, b).

Pokus	Vstup [%]		Pozitivní frakce [%]		Negativní frakce [%]	
	CD4 ⁺ IFN γ ⁺	CD8 ⁺ IFN γ ⁺	CD4 ⁺ IFN γ ⁺	CD8 ⁺ IFN γ ⁺	CD4 ⁺ IFN γ ⁺	CD8 ⁺ IFN γ ⁺
1.	1,08	1,96	64,10	77,40	0,67	1,21
2.	3,26	3,18	61,98	58,06	2,56	1,93
3.	8,23	4,26	30,22	31,54	3,54	2,46
4.	4,32	5,02	63,00	66,00	2,11	1,85
5.	16,31	17,99	69,72	86,63	11,81	10,77
6.	1,93	2,59	79,00	85,00	0,64	1,45
medián	3,79	3,93	63,55	71,7	2,34	1,89
min-max	1,08-16,31	1,96-17,99	30,22-79,00	31,54-86,63	0,64-11,81	1,21-10,77
p			p ₁ =0,028	p ₂ =0,028		

Tabulka č 3 a: Identifikace a separace hTERT- a MUC1-specifických T lymfocytů.

Procentuální hodnoty aktivovaných IFN- γ ⁺CD4⁺ a IFN- γ ⁺CD8⁺ hTERT- a MUC1-specifických TL ve vstupní, pozitivní a negativní frakci po magnetické separaci (MACS). Měřeno na průtokovém cytometru 24 hod po restimulaci. Uveden medián, minimální, maximální hodnota (%) a statistická významnost obohacení IFN- γ ⁺CD4⁺ (p₁) a IFN- γ ⁺CD8⁺ (p₂) TL v pozitivní frakci oproti frakci vstupní. Data byla vyhodnocena pomocí Wilcoxonova testu. Tabulka a) separace hTERT-specifických TL; tabulka b) separace MUC1-specifických TL.

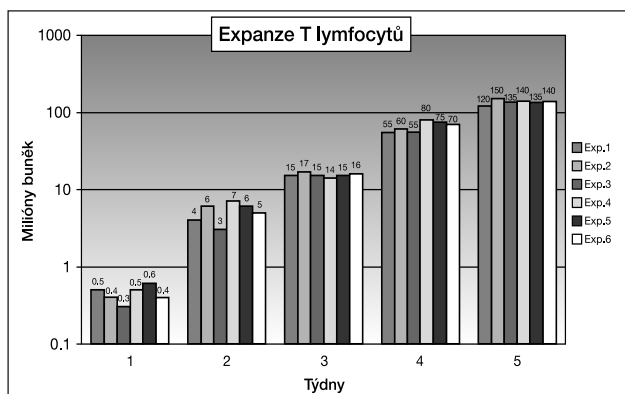
Pokus	Vstup [%]		Pozitivní frakce [%]		Negativní frakce [%]	
	CD4 ⁺ IFN γ ⁺	CD8 ⁺ IFN γ ⁺	CD4 ⁺ IFN γ ⁺	CD8 ⁺ IFN γ ⁺	CD4 ⁺ IFN γ ⁻	CD8 ⁺ IFN γ ⁻
1.	1,46	1,94	35,56	65,63	0,61	1,04
2.	1,43	2,02	36,14	52,38	0,66	1,84
3.	3,1	3,77	43,00	62,56	1,93	2,37
4.	3,55	10,08	71,5	75,98	3,94	2,23
5.	1,62	1,94	54,19	62,93	1,14	1,07
medián	1,62	2,02	43,00	62,93	1,14	1,84
min-max	1,43-3,55	1,94-10,08	35,56-71,5	52,38-75,98	0,61-3,94	1,04-2,37
p			p ₁ =0,043	p ₂ =0,043		

Tabulka č. 3 b

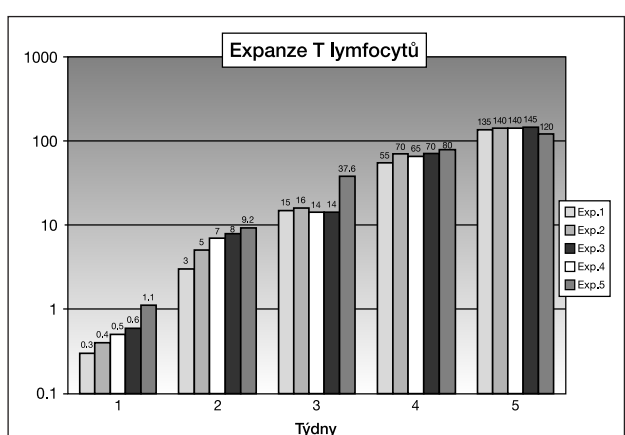
3.3. Expanze hTERT- a MUC1-specifických T lymfocytů *in vitro*

Separované hTERT/MUC1-specifické TL byly u 6/5 experimentů expandovány *in vitro*. Expanze byla prováděna pomocí PHA, IL-2 a alogenních ozářených MNPK zdravých dárců. Obr.č.1 a, b ukazuje expanzi hTERT- a MUC1-specifických TL *in vitro* v čase. Buňky byly počítány 1x týdně po dobu 4 týdnů. Během této doby došlo k expanzi a) pro hTERT-specifické TL z počátečních hodnot 0,30 – 0,60 x10⁶ (medián 0,45 x 10⁶) TL na hodnoty 120,0 – 150,0 x10⁶ (medián 137,5 x 10⁶) TL, b) pro MUC1-specifické TL z počátečních hodnot 0,30 – 1,10 x10⁶ (medián 0,50 x 10⁶) TL na hodnoty 120,0 – 145,0 x10⁶ (medián 140,0 x 10⁶) TL.

Obrázek č. 1 a



Obrázek č. 1 b



Obrázky 1: Expanze hTERT- a MUC1-specifických T lymfocytů *in vitro* v čase.

Graficky jsou zde znázorněny výsledky expanze pro jednotlivé experimenty (odlišeny různým šrafováním). Počty buněk (v milionech) byly zaznamenávány každý týden po dobu 1 měsíce. Obrázek a) expanze hTERT- specifických TL (6 experimentů); obrázek b) expanze MUC1-specifických TL (5 experimentů).

4. Závěr a diskuze

Antigeny hTERT a MUC1 jsou specifické pro HLA-A2 alelu a tedy aktivaci CD8⁺ TL (19, 41, 42). Výsledky ukázaly, že při stimulaci TL DB naloženými hTERT a MUC1 dochází k jejich významné aktivaci oproti nestimulovaným TL nebo TL stimulovaným samotnými DB či DB naloženými HLA-A2 specifickým nestimulujícím referenčním peptidem HIV-1.

Nejsilnější odpověď TL aktivovaných DB naloženými hTERT byla zaznamenána u CD8⁺ TL po restimulaci, což je dáno specificitou peptidu pro HLA-A2 alelu. Stejně tomu tak bylo i v případě MUC1 peptidu. Rovněž došlo k aktivaci CD4⁺ TL po restimulaci DB naloženými hTERT, což ukazuje na možnost zkřížené prezentace antigenu DB CD4⁺ TL. V případě MUC1 peptidu došlo k vyšší aktivaci TL také u CD8⁺ TL po stimulaci. Při srovnání aktivace oběma nonapeptidy hTERT i MUC1 s aktivací nestimulujícím nonapeptidem HIV-1 byly nalezeny statisticky významné rozdíly při stimulaci i restimulaci CD4⁺ i CD8⁺ TL, což dokazuje navození specifické odpovědi nonapeptidy hTERT a MUC1. Srovnání s aktivací samotnými DB ukázalo statistickou významnost pouze po restimulaci, což lze přičítat fyziologické schopnosti DB. Při srovnání stimulační HIV-1 nonapeptidem a samotnými DB nebyly prokázány statisticky významné rozdíly s výjimkou CD8⁺ TL po restimulaci potvrzující schopnost DB navodit aktivaci TL po opakované stimulaci.

Naměřené výsledky jsou v souladu s publikovanými pracemi (23, 45, 46), které rovněž ukázaly možnost identifikace protinádorových TL při využití proteinů jako TAA. Jako TAA byly využity heat shock protein gp96, epitop I₅₄₀ odvozený od hTERT a jiný epitop proteinu MUC1. Proteiny gp96 nebo hTERT byly naloženy do DB získaných ze zdravých HLA-A2 pozitivních dárců. Naloženými DB byly stimulovány autogenní TL, které produkují IFN- γ . Buněčná produkce IFN- γ byla stanovena metodou ELISPOT (23, 46). Nonapeptid odvozený z MUC1 proteinu byl rovněž využit jako TAA u MM. Byl testován *in vitro* na HLA-A2 pozitivních pacientech s MM. DB naložené tímto nádorovým antigenem dokáží úspěšně aktivovat myelom-MUC1-specifické CTL a mohou být využity v protinádorové imunoterapii MM (45).

hTERT a MUC1 byly testovány jako nádorové antigeny v klinických experimentech u různých nádorových onemocnění (28, 38, 39). Vakcína obsahující DB naložené hTERT byla aplikována 6 pacientům s prsním karcinomem a karcinomem prostaty s dosažením 1 smíšené klinické odpovědi (28). Vakcína využívající MUC1 naložené do DB byla aplikována 10 pacientům s karcinomem prsu a vaječníků a 20 pacientům s pokročilým stádiem renálního karcinomu. U vakcinace pacientů s renálním karcinomem bylo dosaženo 1 CR a 2 PR, u 6 pacientů byla pozorována regrese metastáz (38, 39). Bylo prokázáno, že hTERT a MUC1 jsou exprimovány také na některých zdravých tkáních (27, 32, 33, 38, 40), avšak ve vakcinačních studiích

nebyly pozorovány žádné autoimunitní reakce po podání, nebyly rovněž zaznamenány vedlejší účinky či projevy toxicity vyššího stupně (III, IV) (27, 28, 38, 40).

Úspěšná adoptivní T-buněčná imunoterapie byla demonstrována zejména u melanomu a renálního karcinomu.

V této práci ukazujeme, že i u méně imunogenního MM lze pomocí peptidových nádorových antigenů identifikovat populaci potenciálně myelom-specifických TL.

Tato práce byla podpořena projektem MŠMT LC0602.

Literatura

1. Hájek R. Základní algoritmus léčby mnohočetného myelomu. *Transfuzie a hematologie dnes*. 2005; 11: (26-30).
2. Barlogie B, Jagannath S, Vesole DH, Trikot G. Autologous and allogeneic transplants for multiple myeloma. *Semin.Hematol*. 1995; 32: 31-44.
3. Facon T. Frontline treatment in patients not eligible for stem cell transplantation. XIth International Myeloma Workshop, IVth International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia, 25-30 June 2007 – Kos Island, Greece, *The hematology journal*. 2007; (abstr. S 5.5).
4. Cavo M. The role of thalidomide in myeloma patients eligible for high-dose therapy. XIth International Myeloma Workshop, IVth International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia, 25-30 June 2007 – Kos Island, Greece, *The hematology journal*. 2007; (abstr. S 5.2).
5. Jagannath S. The role of Bortezomib in myeloma patients eligible for high-dose therapy. XIth International Myeloma Workshop, IVth International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia, 25-30 June 2007 – Kos Island, Greece, *The hematology journal*. 2007; (abstr. S 5.3).
6. Richardson PG and Anderson KC. Multiple myeloma. *Remedica Publishing*. 2004; 3: 57.
7. Adam Z, Hájek R, Študla V a kol. Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie. Masarykova Univerzita Brno. 1999; 1-260.
8. Hájek R, Büchler T, Musilová R, Křivanová A. Perspektivní léky v léčbě mnohočetného myelomu. *Klinická onkologie*. 2002; suppl.: 38-42.
9. Thumer B, Haendle I, Roder C, et al. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* 1999; 190: 1669-1678.
10. Lam JS, Beldegrun AS, Figlin RA. Advances in immune-based therapies of renal cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2004; 4: 1081-1096.
11. Barlogie B, Jagannath S, Epstein J, et al. Biology and therapy of multiple myeloma in 1996. *Semin Hematol* 1997; 34: 67-72.
12. Yi Q, Österborg A. Idiotype-specific T cells in multiple myeloma: targets for an immunotherapeutic intervention?. *Med.Oncol* 1996; 13: 1-7.
13. Büchler T, Hájek R. Dendritic cell vaccines in the treatment of multiple myeloma. *Med Oncol* 2002; 19: 213-308.
14. Yi Q, Desikan R, Barlogie B, Munshi N. Optimizing dendritic cells-based immunotherapy in multiple myeloma. *Br J Hematol* 2002; 117:297-305.
15. Wen YJ, Min R, Yi Q, et al. Tumor lysate-specific cytotoxic T lymphocytes in multiple myeloma-promising effector cells for immunotherapy. *Blood* 2002; 99: 3280-3285.
16. Hayashi T, Hideshima T, Akiyama M, et al. Ex vivo induction of myeloma-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Blood* 2003; 4: 1435-1442.
17. Reichardt V, Milazzo C, Brossart P, et al. Induction of myeloma specific cytotoxic T cells using dendritic cells transfected with tumor-derived RNA. The 44th Annual Meeting of the American Society of Hematology 2002; (abstr. 3182).
18. Brossart P, Wirths S, Brugger W, Kanz L. Dendritic cells in cancer vaccines. *Exp Hematol*. 2001; 29:1247-1255.
19. Minev B, Hipp J, Zanetti M, et al. Cytotoxic T cell immunity against telomerase reverse transcriptase in humans. *PNAS*. 2000; 97: 4796-4801.
20. Fajkus J. Jak začínají a končí chromozomy, rub a líc buněčné nesmrtnosti. *Živa*. 2002; 6: 245-248.
21. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*. 1997; 33: 787-791.
22. Vonderheide RH, Hahn WC, Schultze JL, Nadler LM. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*. 1999; 10: 673-690.
23. Vonderheide RH, Schultze JL, Anderson KS, et al. Equivalent induction of telomerase-specific cytotoxic T lymphocytes from tumor-bearing patients and healthy individuals. *Cancer Res* 2001; 61: 8366-8370.
24. Vonderheide RH. Telomerase as a universal tumor-associated antigen for cancer immunotherapy. *Oncogene*. 2002; 21: 674-679.
25. Pang JX. Human telomerase reverse transcriptase as a target for tumor immunotherapy. *Ai Zheng*. 2003; 22: 893-895.
26. Arai J, Yasukawa M, Fujita S, et al. Identification of human telomerase reverse transcriptase-derived peptides that induce HLA-A24-restricted antileukemia cytotoxic T-lymphocytes. *Blood*. 2001; 97: 2903-2907.
27. Matthews P, Jones CJ. Clinical implications of telomerase detection. *Histopathology*. 2001; 38: 485-489.
28. Vonderheide RH, Domchek SM, Chen D-Y, et al. Vaccination of Cancer Patients Against Telomerase Induces Functional Antitumor CD8+ T lymphocytes. *Clinical Cancer Research*. 2004; 10: 828-839.
29. Gendler S, Taylor-Papadimitriou J, Burchell J-A, et al. A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem-repeats. *J Biol Chem*. 1988; 263: 12820-12823.
30. Finn OJ, Jerome KR, Henderson RA, et al. MUC1 epithelial tumor-mucin-based immunity and cancer vaccines. *Immunol Rev*. 1995; 145: 61-89.
31. Hinoda Y, Nakagawa N, Yachi A, et al. Recognition of the polypeptide core of mucin by monoclonal antibody MUSE 11 against an adenocarcinoma-associated antigen. *Jpn.J.Cancer Res*. 1990; 81:1206.
32. Brossart P, Wirths S, Brugger W, Kanz L. Dendritic cells in cancer vaccines. *Exp Hematol*. 2001; 29:1247-1255.
33. Takahashi T, Makiguchi Y, Yachi A, et al. Expression of MUC1 on myeloma cells and induction of HLA-unrestricted CTL against MUC1 from a multiple myeloma patient. *Journal of Immunology*. 1994; 153: 2102-2109.
34. Treon SP, Raje N, and Anderson KC. Immunotherapeutic strategies for the treatment of plasma cell malignancies. *Semin. Oncol*. 2000; 27: 598-613.
35. Burton J, Mishina D, Gold DV, et al. Epithelial Mucin-1 (MUC1) expression and MA5 anti-MUC1 monoclonal antibody targeting in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 1999; 5: 3065-3072.
36. Noto H, Takahashi T, Hinoda Y, et al. Cytotoxic T lymphocytes derived from bone marrow mononuclear cells of multiple myeloma patients recognize an underglycosylated form of MUC1 mucin. *Int. Immunol*. 1997; 9: 791-798.
37. Appostopoulos V, Haurum JS, McKenzie IF. MUC1 peptide epitopes associated with five different H-2 class I molecules. *Eur J Immunol*. 1997; 27: 2579-2585.
38. Brossart P, Wirths S, Stuhler G, et al. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood*. 2000; 96: 3102-3108.
39. Wierecky J, Mueller MR, Brossart P, et al. Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients. *Cancer Res*. 2006; 66: 5910-5918.
40. Brugger W, Buhring HJ, Kanz L, et al. Expression of MUC1 epitopes on normal bone marrow: implications for the detection of micro-metastatic tumor cells. *J.Clin.Oncol*. 1999; 17:1535-1544.

původní práce

41. Agrawal B, Reddish MA, Longenecker BM, et al. The anti-MUC1 monoclonal antibody BCP8 can be used to isolate and identify putative major histocompatibility complex class I associated amino acid sequences. *Cancer Res.* 1998; 58: 5151-5156.
42. Gong J, Apostopoulos V, Kufe D, et al. Selection and characterization of MUC1-specific CD8+ T cells from MUC1 transgenic mice immunized with dendritic-carcinoma fusion cells. *Immunology.* 2000; 101: 316-324.
43. Büchler T, Hájek R, Bourková L a kol. Generation of antigen-loaded dendritic cells in a serum-free medium using different cytokine combinations. *Vaccine.* 2003; 21: 877-882.
44. Očadlíková D, Kovářová L, Vidláková P a kol. Identifikace myelom-specifických T-lymfocytů na základě produkce interferonu gama. Edukační sborník XXVIII. Brněnské onkologické dny a XVIII. Konference pro sestry a laboranty 26.-28.května 2004. 2004; 53: 113-116.
45. Beckove H, Witzens M, Choi C, et al. MUC-1-reactive cytotoxic memory T cells in bone marrow of myeloma patients. The 44th Annual Meeting of the American Society of Hematology 2003, Blood. 2003; (abstr. 5227).
46. Yi Q, Qian J, Xie J, et al. Generation of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in multiple myeloma using dendritic cells pulsed with tumor-derived heat shock protein gp96. The 44th Annual Meeting of the American Society of Hematology 2004, Blood. 2004; (abstr. 2451).

Korespondenční adresa:
Mgr. Darina Očadlíková,
Oddělení klinické hematologie – Laboratoř experimentální hematologie
a buněčné imunoterapie, FN Brno
Jihlavská 20, Brno-Bohunice, 625 00
e-mail: jennynka@seznam.cz

Došlo / Submitted: 11. 12. 2007
Přijato / Accepted: 15. 1. 2006

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.
The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs,
products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané
do biomedicínských časopisů.
The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“
for biomedical papers.