

# IDENTIFIKACE NÁDOROVĚ-SPECIFICKÝCH T LYMFOCYTŮ NA ZÁKLADĚ PRODUKCE INTERFERONU GAMA U MNOHOČETNÉHO MYELOMU

## IDENTIFICATION OF TUMOR-SPECIFIC T CELLS BASED ON INTERFERON GAMMA PRODUCTION IN MULTIPLE MYELOMA

OČADLÍKOVÁ D.<sup>1</sup>, KOVÁŘOVÁ L.<sup>1</sup>, PENKA M.<sup>1</sup>, ŽALOUDEK J.<sup>4</sup>, BÜCHLER T.<sup>1,2</sup>, HÁJEK R.<sup>1,2,4</sup>, MICHÁLEK J.<sup>1,3,4</sup>

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

2 INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO

3 I.DĚTSKÁ INTERNÍ KLINIKA, FN BRNO

4 UNIVERZITNÍ ONKOLOGICKÉ CENTRUM MASARYKOVY UNIVERZITY V BRNĚ

**Souhrn:** *Východiska:* Mnohočetný myelom je nádorové onemocnění, které je charakterizováno zhoubnou klonální proliferací plazmatických buněk. Incidence jsou 4 nemocní na 100 000 obyvatel. Medián dlouhodobého přežití je 4-5 let. Vedle standardní léčby vysokodávkovanou chemoterapií se rovněž začíná uplatňovat imunoterapie. *Typ studie a soubor:* V in vitro studii byla na souboru zdravých dárců testována možnost aktivace, separace a expanze myelom-specifických T lymfocytů. *Metody a výsledky:* Myelomové buňky linie ARH 77 byly po ozáření přidány k alogenním mononukleárním buňkám periferní krve, které obsahují antigen-prezentující buňky a T lymfocyty. Postupně došlo k aktivaci myelom-specifických T lymfocytů charakterizované produkcí interferonu gama, které byly separovány pomocí imunomagnetických kuliček a expandovány in vitro až do hodnot  $400 \times 10^6$  T lymfocytů během 4 týdnů. *Závěry:* Tato práce ukazuje možnost identifikace a separace protinádorových T-lymfocytů, které je možno expandovat in vitro na množství využitelné v klinické praxi.

**Klíčová slova:** Mnohočetný myelom, imunoterapie, interferon gama, T lymfocyt

**Summary:** *Backgrounds:* Multiple myeloma is a hematological disease caused by clonal proliferation of a malignant plasma cell clone. Its incidence is 4 in 100 000. Median survival is 4-5 years. Besides standard therapy including high-dose chemotherapy new approaches such as immunotherapy are taking place. *Design and subjects:* Identification of myeloma-specific T cells from healthy blood donors has been tested in an in vitro study based on T cell activation, separation and expansion. *Methods and results:* Myeloma cell line ARH 77 has been irradiated and used as apoptotic bodies to stimulate allogeneic mononuclear cells from peripheral blood. Activated myeloma-specific T cells produce interferon gamma, can be captured by immunomagnetic beads and further expanded in vitro up to  $400 \times 10^6$  T cells within 4 weeks. *Conclusion:* This study demonstrates feasibility of identification and separation of tumor-specific T cells that can be expanded in vitro to numbers used in clinical application.

**Key words:** Multiple myeloma, immunotherapy, interferon gamma, T cell

### 1. ÚVOD

Mnohočetný myelom (MM) je nádorové onemocnění, které je charakterizováno zhoubnou klonální proliferací plazmatických buněk. Incidence tohoto onemocnění činí přibližně 4 nemocní na 100 000 obyvatel. Zaujímá 10% z hematologických malignit a 1% ze všech nádorových onemocnění. Neefektivnost standardní chemoterapie při léčbě onemocnění vedla k zavedení vysokodávkované chemoterapie (1, 2). Tato léčebná strategie dosahuje vysokého procenta léčebných odpovědí (80-90%) s maximálním podílem kompletních remisí v rozmezí 30-40%. Parametry dlouhodobého přežití jsou lepší než při použití standardní léčby: medián 3 roky pro dobu do relapsu onemocnění a medián 4-5 let pro celkové dlouhodobé přežití (2, 3). Výsledky randomizované studie potvrdily přínos vysokodávkované léčby oproti standardní chemoterapii pro nemocné s MM (4). Přestože je zařazení autologní transplantace do léčebné strategie pacientů s MM výrazným přínosem, relaps onemocnění je zpravidla neodvratný. I přes dosažení kompletní remise zůstává v organismu pacienta zbytková nádorová populace.

MM je považován za nevléčitelné onemocnění (5, 6), a proto jsou hledány nové cesty, jak zlepšit prognózu pacientů s MM. Jednu z nich představuje protinádorová imunoterapie, která zaznamenala značný úspěch u melanomu a renálního karcinomu, které jsou považovány za více imunogenní. V posledních desetiletí byly podány experimentální důkazy o možnostech

navození imunitní reaktivity i vůči méně imunogenním nádorům včetně MM (7, 8, 9). Imunitní systém může být aktivován specifickými nádorovými antigeny. V případě MM se nabízí využití monoklonálního imunoglobulinu, který je produkován nádorovým klonem plazmatických buněk. Tento tzv. idiotypický protein (Id-protein) může být izolován z plazmy pacientů s MM a použit jako specifický nádorový antigen ke stimulaci cytotoxických T lymfocytů (CTL) schopných lyzovat autologní myelomové buňky in vitro (10, 11). Aktivace T lymfocytů byla prokázána jak in vitro, tak in vivo. Id-protein je však málo imunogenní, a proto vakcíny připravené z Id-proteinu dosáhly jen velmi limitovaných úspěchů (12, 13, 14).

Dalšími příčinami neuspokojivých výsledků imunoterapie u MM jsou mnohočetné defekty imunitního systému pacientů s MM, které zahrnují defekty dendritických buněk (DB) a jejich schopnosti aktivovat T lymfocyty (15, 16), malou imunogenost myelomových buněk (17), defekty imunitního systému pacientů s MM (18) a funkční změny T lymfocytů, NK buněk a B lymfocytů (17).

Ve druhé polovině 90. let bylo s výhodou využito DB naložených nádorovými antigeny, které mají schopnost aktivace protinádorově specifických CTL (19, 20). V současné době jsou tímto způsobem testovány různé druhy potenciálních nádorových antigenů. Bylo prokázáno, že myelomové buňky, u nichž byla navozena apoptóza ozářením a byly využity jako nádorové antigeny a naloženy do DB, indukují odpověď myelom-

specifických CTL in vitro (21). Po opakované stimulaci T lymfocytů apoptickými tělisky nádorových buněk naložených do DB dochází k jejich aktivaci, kterou lze standardně měřit pomocí produkce interferonu gama (IFN- $\gamma$ ) (23, 24, 25). Cílem této studie byla identifikace specifických protinádorových T lymfocytů, které lze separovat a expandovat in vitro.

## 2. MATERIÁL A METODY

### 2.1. Buněčné kultury a příprava antigenů

Mononukleární buňky (MN) byly izolovány z nesrážlivé periferní krve 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 kompletním médiu (KM) obsahujícím X-VIVO 15 (50mg/l gentamycin, 2mM L-glutamin, 25mg/ml hepes pufr: BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) s tepelně inaktivovaným 10% lidským AB-sérem (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) při 37 °C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub> a 4,5% O<sub>2</sub>. Buněčnost kultury byla nastavena na 1,0x10<sup>6</sup> buněk/ml KM. Jako zdroj nádorových buněk byla využita myelomová buněčná linie ARH 77 (dar, který byl laskavě poskytnut profesorem B. Barlogiem, University of Arkansas, USA, 1995). Nádorový antigen byl připraven ozářením myelomových buněk dávkou 60Gy. 1.den byl přidán antigen - myelomové buňky (MB) linie ARH 77 ozářené dávkou 60 Gy v poměru MN:MB = 20:1, 8.den byly opět přidány MB v poměru MN:MB = 2:1.

### 2.2. Značení pomocí IFN- $\gamma$ a magnetická separace

Aktivované T lymfocyty produkující IFN- $\gamma$  byly 9. den zhodnoceny pomocí Secretion Assay Cell Enrichment And Detection Kit (MACS Reagens, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Německo) podle pokynů výrobce (23).

Magnetická separace byla prováděna týž den na koloně umístěné v magnetickém poli přístroje Vario MACS (MACS Reagents, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Německo). Pozitivní frakce byla získána dvojitou separací pro zvýšení čistoty.

### 2.3. Průtoková cytometrie:

T lymfocyty (1x10<sup>6</sup>) z pozitivní a negativní frakce po MACS-separaci 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- $\gamma$  phycoerythrinem (PE) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Německo). T lymfocyty byly analyzovány na průtokovém cytometru Cyto-mics™ FC 500 (Beckman Coulter, Miami, Florida, USA).

### 2.4. Expanze T lymfocytů in vitro

IFN- $\gamma$  pozitivní T lymfocyty byly expandovány in vitro v KM obohaceném 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 5 $\mu$ g/ml KM. Po celou dobu expanze byla udržována buněčnost kultury 1-3 x 10<sup>6</sup> T lymfocytů/ml KM. KM včetně IL-2 bylo vyměňováno 2x týdně a 1x týdně byly současně přidávány alogenní MN periferní krve ozářené dávkou 30Gy.

## 3. VÝSLEDKY A DISKUSE

Bylo provedeno celkem 8 experimentů zahrnujících stimulaci, restimulaci, separaci a expanzi myelom-specifických T lymfocytů. MN izolované z periferní krve zdravých dárců obsahující antigen-prezentující buňky a T lymfocyty byly v den 1 stimulovány ozářeními MB v poměru 20:1 (T lymfocyt:MB). V den 7 byla provedena restimulace ozářeními MB v poměru 2:1 (T lymfocyt:MB). Při těchto poměrech byla produkce IFN- $\gamma$  maximální, jak jsme zjistili v předchozích experimentech (25). 24 hod po restimulaci byla provedena identifikace protinádorových myelom-specifických T lymfocytů na průto-

**Tab. 1: Identifikace a separace myelom-specifických T lymfocytů.** Procentuální hodnoty aktivovaných IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> a IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> myelom-specifických T lymfocytů 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- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (p<sub>1</sub>) a IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (p<sub>2</sub>) T lymfocytů v pozitivní frakci oproti frakci vstupní. Data byla vyhodnocena pomocí Wilcoxonova testu.

Číslo experimentu	Vstupní frakce		Pozitivní frakce		Negativní frakce	
	CD4 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup>
1.	4,38	3,26	61,94	51,47	2,22	1,71
2.	4,58	1,14	17,25	64,85	2,77	0,93
3.	2,18	1,60	15,14	3,90	1,34	0,34
4.	2,99	1,99	82,98	72,08	2,06	1,46
5.	2,35	1,16	59,70	74,26	1,73	0,96
6.	3,68	3,40	68,69	84,59	2,50	2,12
7.	1,97	1,83	33,61	88,75	1,41	1,36
8.	2,67	2,12	37,47	83,99	1,40	1,16
medián [%]	2,83	1,91	48,59	73,17	1,90	1,26
minimum [%]	1,97	1,14	15,14	3,90	1,34	0,34
maximum [%]	4,58	3,40	82,98	88,75	2,77	2,12
p			p <sub>1</sub> = 0,012	p <sub>2</sub> = 0,012		

kovému cytometru. Aktivované IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T lymfocyty byly měřeny ve vstupní frakci před magnetickou separací. Procentuální zastoupení aktivovaných T lymfocytů (CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup>) ve vstupní frakci bylo 1,97–4,58 % (medián 2,83%) pro CD4<sup>+</sup> a 1,14–3,40 % (medián 2,63%) pro CD8<sup>+</sup> viz Tab. 1. Restimulované aktivované myelom-specifické T lymfocyty byly magneticky separovány na přístroji Vario MACS. Separace IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> frakce byla provedena dvakrát pro zvýšení čistoty. Došlo k obohacení aktivovaných T lymfocytů v pozitivní frakci na 15,14–82,98 % (medián 48,59%) pro CD4<sup>+</sup> a 3,90–88,75 % (medián 73,17%) pro CD8<sup>+</sup> oproti frakci negativní: 1,34–2,77 % (medián 1,90%) pro CD4<sup>+</sup> a 0,34–2,12 % (medián 1,59%) pro CD8<sup>+</sup> viz Tab. 1 a Obr. 1.

Separované myelom-specifické T lymfocyty byly u 5 pokusů expandovány in vitro. Expanze byla prováděna pomocí PHA, IL-2 a alogenních ozářených MN periferní krve zdravých dárců, viz metodická část. Obr. 2 ukazuje expanzi protinádorových T lymfocytů in vitro v čase. Buňky byly počítány každý týden a jejich množství zaznamenáváno po dobu 4 týdnů. Během 4 týdnů došlo k expanzi z počátečních hodnot 0,5–0,6 x 10<sup>6</sup> T lymfocytů na hodnoty 150–420x10<sup>6</sup> (medián 160x10<sup>6</sup>) T lymfocytů.

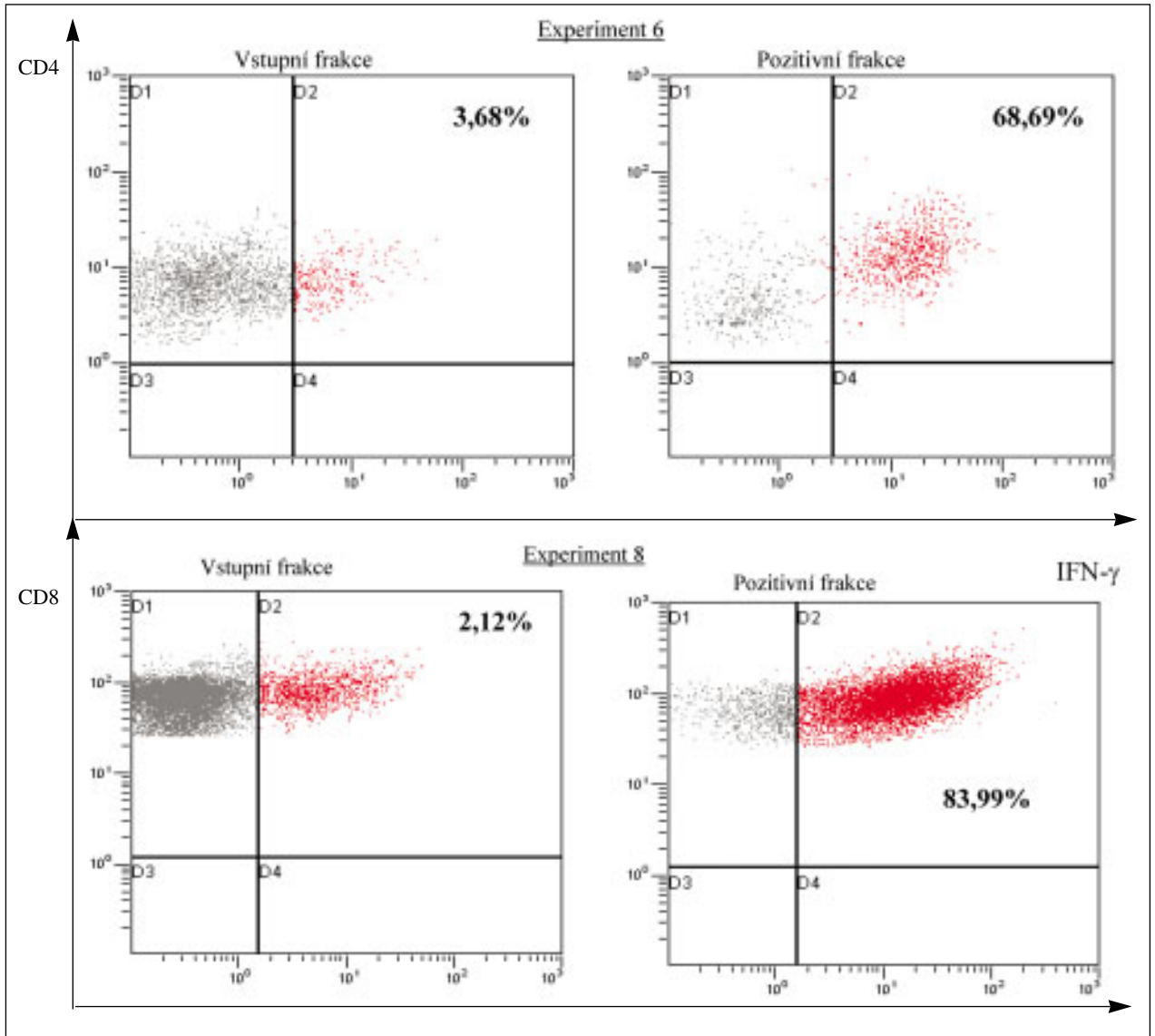
Naměřené výsledky jsou v souladu s publikovanými pracemi (23, 24), které rovněž ukázaly možnost identifikace a následné expanze protinádorových T lymfocytů. Úspěšná adoptivní T-buněčná imunoterapie byla demonstrována u některých nádorových onemocnění, zejména u melanomu. V tomto sdělení ukazujeme, že i u MM, který je považován za málo imunogenní, lze identifikovat populaci potenciálně myelom-specifických T lymfocytů a expandovat je do klinicky aplikovatelného množství.

Existují i další metody identifikace antigen-specifických T lymfocytů, například využití komplexu tetramer nebo příprava lymfocytárních linií či klonů (24). Nicméně tyto metody jsou limitovány. V případě komplexů tetramer je významným omezením vazba na určitý hlavní histokompatibilitní antigen (MHC) I. třídy a nutná znalost nádorového antigenu/peptidu. Tetrametry neumožňují izolaci CD4<sup>+</sup> T lymfocytů, které zřejmě sehrávají významnou roli při eliminaci nádorových buněk. V případě protinádorových linií či klonů T lymfocytů je zpravidla hlavním omezením limitovaný repertoár antigenních struktur, které jsou těmito buňkami rozpoznávány a eliminovány (24).

Na rozdíl od výše uvedených postupů má identifikace protinádorových T lymfocytů na základě produkce IFN- $\gamma$  výhody, kte-

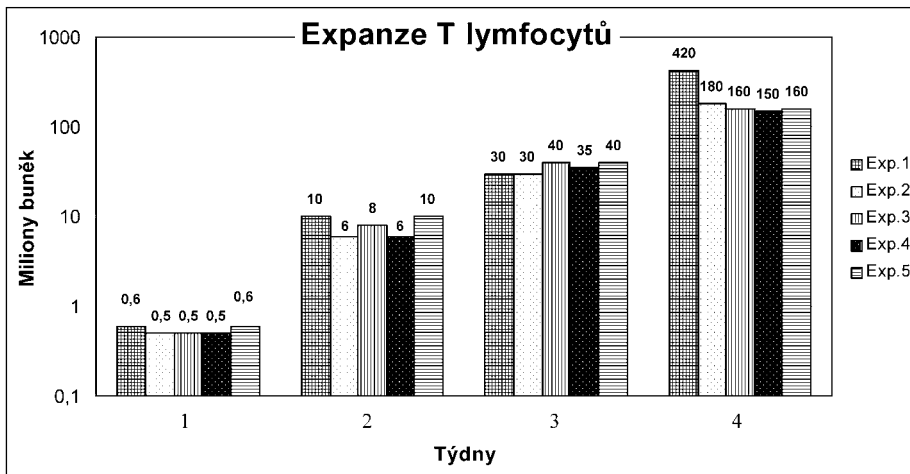
**Obrázek 1: Identifikace a separace myelom-specifických T lymfocytů na průtokovém cytometru.**

Měření aktivovaných T lymfocytů pomocí produkce IFN- $\gamma$  u CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů 24 hod po restimulaci. T lymfocyty byly separovány v magnetickém poli na přístroji Vario MACS. Červenou barvou je znázorněno procento aktivovaných CD4<sup>+</sup>, resp. CD8<sup>+</sup> T lymfocytů ve vstupní frakci před separací a obohacení v pozitivní frakci po separaci.



**Obrázek 2: Expanze protinádorových T lymfocytů in vitro v čase.**

Graficky jsou zde znázorněny výsledky jednotlivých experimentů (odlišeny různým šrafováním). Počty buněk (v milionech) byly zaznamenávány každý týden po dobu 4 týdnů.



ré spočívají především v možnosti izolace jak CD4 tak CD8 T lymfocytů bez nutné znalosti tumor-asociovaných antigenů a bez omezení v MHC (24, 25). Tento přístup rovněž umožňuje studovat individuální tumor-asociované antigeny v podobě proteinů či peptidů a může napomoci nalezení optimální stimulace protinádorových T lymfocytů pro daného jedince.

Na modelu in vitro se nám podařilo identifikovat a separovat potenciálně myelom-specifické T lymfocyty a expandovat je na hodnoty použitelné klinicky. Dalším předmětem zkoumání bude měření specifické cytotoxicity vůči nádorové populaci myelomových buněk.

#### 4. ZÁVĚR

V této studii jsme prokázali, že myelomové buňky indukují odpověď myelom-specifických T lymfocytů in vitro. Po opakované stimulaci T lymfocytů apoptotickými tělísky nádorových buněk dochází k jejich aktivaci, kterou lze standard-

ně měřit pomocí produkce IFN- $\gamma$ . Takto získané T lymfocyty lze dále expandovat in vitro na hodnoty použitelné v klinické praxi.

*Tato práce byla částečně podpořena grantem IGA MZ 7475-3.*

#### Literatura

1. Hájek R., Adam Z., Vášová I. A Král Z. Evolution of myeloma treatment from melphalan monotherapy to bone marrow transplantation. *Acta Medica Austriaca* 1996, 23, No.3: 85-91
2. Hájek R., Vášová I., Adam Z., Mayer J. New approaches to management of multiple myeloma. *Acta medica Austriaca* 1996, 23: 91-8
3. Barlogie B., Jagannath S., Vesole D.H., Trikot G. Autologous and allogeneic transplants for multiple myeloma. *Semin.Hematol.* 1995, 32: 31-44
4. Attal M., Haroussean J.L., Stoppa A.M. et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *N.Engl.J.Med.* 1996, 335: 91-7
5. Adam Z., Vorlíček J., Králová E. et al. Therapy of multiple myeloma. Press:Opsula. Haematologica, Masaryk University Brno 1993: 1-220
6. Adam Z., Hájek R., Mayer J. et al. Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie. Masarykova univerzita, 1999
7. Yi Q., Österborg A. Idiotype-specific T cells in multiple myeloma: targets for an immunotherapeutic intervention?. *Med.Oncol.* 1996, 13: 1-7
8. Greipp P.R., Witzig T. Biology and treatment of myeloma. *Curr.Opin.Oncol.* 1996, 8: 20-7
9. Barlogie B., Jagannath S., Epstein J. et al. Biology and therapy of multiple myeloma in 1996. *Semin.Hematol.* 1997, 34: 67-72
10. Kwak L.W., Thielemans K., Massaia M. Idiotype vaccination as therapy for multiple myeloma. *Semin.Hematol.* 1999, 36: 34-37
11. Musilová R., Táborská E., Bourková L. et al. Příprava a využití antitumorového antigenu z patologického imunoglobulinu pro pacienty s mnohočetným myelomem. *Transfúze a hematologie dnes* 2002, 3(8): 91-95
12. Kwak L.W. et al. Induction of immune response in patients with B-cell lymphoma against the surface-immunoglobulin idiotype expressed by their tumor. *N.Engl.J.Med.* 1992,327: 1209-1215
13. Österborg A., Yi Q., Henriksson L. et al. Idiotype immunization combined with GM-CSF in myeloma patients induced type I, MHC restricted, CD4- and CD8-specific T-cell responses. *Blood* 1998, 91(7): 2458-66
14. Massaia M., Borriero P., Battaglio S. et al Idiotype vaccination in human myeloma: generation of tumor-specific immune response after high-dose chemotherapy. *Blood* 1999, 94 (2): 673-83
15. Raje N., Gong J., Chauhan D. et al. Bone marrow and peripheral blood dendritic cells from patients with multiple myeloma are phenotypically and functionally normal despite the detection of Kaposi's sarcoma herpesvirus gene sequences. *Blood* 1999, 93(5): 2411-9
16. Brown R.D., Pope B., Murray A. et al. Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor-beta1 and interleukin-10. *Blood* 2001, 98(10): 2992-8
17. Cook G., Campbell J.D.M. Immune regulation in multiple myeloma: the host-tumor conflict. *Blood Reviews* 1999, 13: 151-162
18. Yi Q. Immunoregulatory mechanisms and immunotherapy. In *Myeloma* (Mehta J. and Singhal S., eds), Martin Dunitz, London 2002: 81-97
19. Hájek R., Butch A.W. Dendritic cell biology and the application of dendritic cells to immunotherapy of multiple myeloma. *Med.Oncol.* 2000, 17: 2-15
20. Büchler T. and Hájek R. Dendritic cell vaccines in the treatment of multiple myeloma. *Med.Oncol.* 2002, 19(4): 213-8
21. Hayashi T., Hideshima T., Akiyama M. et al. Ex vivo induction of multiple myeloma-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 2003, 102: 1435-1442
22. Büchler T., Hájek R., Bourková L. et al. Generation of antigen-loaded dendritic cells in a serum-free medium using different cytokine combinations. *Vaccine* 2003, 21: 877-882
23. Brosterhus H., Brings S., Leyendeckers H. et al. Enrichment and detection of live antigen-specific CD4(+) and CD8(+) T cells based on cytokine secretion. *Eur J Immunol.* 1999,29(12): 4053-9
24. Becker C., Pohl H., Frankenberger B. et al. Adoptive tumor therapy with T lymphocytes enriched through an IFN-gamma capture assay. *Nat Med.* 2001, 7(10): 1159-62
25. Očadlíková D., Kovářová L., Vidláková P. et al. 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, 53: 113-116