

## **Příprava protinádorové vakcíny pro imunoterapii karcinomu ovária za podmínek správné výrobní praxe**

**Úvod:** Dendritické buňky (DC) jsou jediné antigen prezentující buňky schopné aktivovat naivní T-lymfocyty. Aby byly schopné aktivovat imunitní odpověď musí DC projít procesem maturace. Nové techniky umožňují přípravu DC z monocytů, a je tedy možné připravovat protokoly protinádorové imunoterapie založené na DC. Principem je podání velkého množství DC, které prezentují nádorové antigeny a následná aktivace specifické imunitní reakce proti nádorové tkáni. Pro zahájení klinických studií je nezbytný vývoj protokolů, které zaručují přípravu vakcíny za podmínek Správné výrobní praxe podle požadavků Státního ústavu pro kontrolu léčiv.

**Cíl:** Vývoj protokolu pro přípravu DC pro imunoterapii karcinomu ovária za podmínek Správné výrobní praxe. Definice optimálního maturačního stimulu, který zaručí nejlepší aktivaci antigen specifických T lymfocytů.

**Materiál a metody:** Z monocytů periferní krve zdravých dárců byly připraveny nezralé DC. Testovali jsme tři různá média, připadající v úvahu pro klinické použití, Cell Gro, RPMI s 10% fetálního jehněčího séra a RPMI s 5% lidského AB séra. V dalším kroku byly DC aktivovány třemi různými maturačními stimuly (směsí cytokinů, Poly I:C a lipopolysacharidem (LPS)). Po 24h byl vyhodnocen aktivační stav DC z hlediska fenotypu a produkce cytokinů. V poslední fázi jsme testovali schopnost zralých DC aktivovat antigen specifické T lymfocyty a regulační T lymfocyty.

**Výsledky:** Největší počet nezralých DC byl získán při kultivaci monocytů v médiu Cell Gro. Kultivace monocytů v RPMI+10% FCS a v RPMI+5% AB séra vedla k zisku nezralých DC v menším množství. Stimulace směsí cytokinů, Poly I:C i LPS indukovala u všech typů DC fenotypické změny spojené s maturací. V souladu s tím byly DC buňky aktivované Poly I:C a LPS účinnější v aktivaci specifických T lymfocytů. Zajímavým zjištěním je, že DC aktivované směsí cytokinů indukovaly více regulačních T lymfocytů, které suprimují imunitní reakci. Ve schopnosti indukovat antigen specifické T lymfocyty nebyl rozdíl mezi testovanými médii.

**Závěr:** Pro použití v klinických imunoterapeutických studiích se jako neoptimálnější protokol jeví příprava DC v bezsérovém médiu Cell Gro a aktivace DC pomocí Poly I:C. Směs cytokinů, používaná v dosavadních studiích vede k neúplné aktivaci DC a vyšší indukci nežádoucích regulačních T lymfocytů. Tento protokol byl schválen SÚKL pro použití v klinické studii.

**Podpora:** VZ MSM 002 162 0812, GAČR 310/08/0838