

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**Katedra biologických a lékařských věd**

Mgr. Jitka Fučíková

**PŘÍPRAVA PROTINÁDOROVÉ VAKCÍNY PRO IMUNOTERAPII KARCINOMU**  
**OVÁRIA ZA PODMÍNEK SPRÁVNÉ VÝROBNÍ PRAXE**

**Rigorózní práce**

Konzultanti rigorózní práce:

PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Doc. MUDr. Radek Špišek, Ph.D.

Hradec Králové, únor 2009

Prohlašuji, že jsem na této rigorózní práci pracovala samostatně s použitím uvedené literatury.

Mgr. Jitka Fučíková

# OBSAH

<b>1</b>	<b>SEZNAM NEJČASTĚJI UŽÍVANÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>6</b>
2.1	ROLE IMUNITNÍHO SYSTÉMU A AKTIVACE IMUNITNÍ REAKCE .....	7
2.2	BUŇKY PREZENTUJÍCÍ ANTIGEN.....	9
2.3	DENDRITICKÁ BUŇKA .....	10
2.4	MATURACE DENDRITICKÝCH BUNĚK.....	12
2.4.1	<i>Morfologie dendritických buněk.....</i>	<i>13</i>
2.4.2	<i>Migrace dendritických buněk .....</i>	<i>13</i>
2.4.3	<i>Zpracování antigenů.....</i>	<i>14</i>
2.4.4	<i>Kostimulační a adhesivní molekuly.....</i>	<i>14</i>
2.4.5	<i>Produkce cytokinů .....</i>	<i>14</i>
2.5	IMUNOTERAPIE NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ .....	15
2.6	IMUNOTERAPIE NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ DENDRITICKÝMI BUŇKAMI .....	16
2.7	CÍL PRÁCE .....	18
<b>3</b>	<b>MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>19</b>
3.1	MATERIÁL.....	20
3.1.1	<i>Buňky a buněčné kultury .....</i>	<i>20</i>
3.1.2	<i>Chemikálie.....</i>	<i>20</i>
3.1.3	<i>Připravované roztoky .....</i>	<i>20</i>
3.1.4	<i>Dodávané roztoky.....</i>	<i>21</i>
3.1.5	<i>Komerční sady.....</i>	<i>21</i>
3.1.6	<i>Použité monoklonální protilátky.....</i>	<i>21</i>
3.1.7	<i>Použité maturační stimulanty .....</i>	<i>21</i>
3.1.8	<i>Použité cytokiny.....</i>	<i>22</i>
3.1.9	<i>Použité přístroje .....</i>	<i>22</i>
3.1.10	<i>Software.....</i>	<i>22</i>
3.2	METODY .....	23
3.2.1	<i>Příprava dendritických buněk diferencovaných z monocytů.....</i>	<i>23</i>
3.2.2	<i>Stimulace nezralých dendritických buněk.....</i>	<i>24</i>
3.2.3	<i>Průtoková cytometrie .....</i>	<i>25</i>
3.2.4	<i>Test fagocytózy .....</i>	<i>26</i>
3.2.5	<i>Detekce antigen specifických T lymfocytů pomocí tetramerů HLA I. třídy .....</i>	<i>26</i>
3.2.6	<i>Měření intracelulárních cytokinů: stanovení produkce IFN-γ.....</i>	<i>27</i>
3.2.7	<i>Stanovení množství T regulačních lymfocytů metodou intracelulárním značením Foxp3 .....</i>	<i>28</i>
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>30</b>
4.1	MORFOLOGICKÁ CHARAKTERIZACE PŘIPRAVENÝCH DC.....	31
4.2	FENOTYPICKÁ CHARAKTERIZACE PŘIPRAVENÝCH DC .....	33
4.3	FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKA PŘIPRAVENÝCH DC .....	36
4.3.1	<i>Schopnost fagocytózy .....</i>	<i>36</i>
4.3.2	<i>Analýza schopnosti dendritických buněk indukovat antigen specifické T lymfocyty pomocí tetramerů HLA I. třídy.....</i>	<i>38</i>
4.3.3	<i>Detekce produkce IFN-γ antigenně specifickými T lymfocyty .....</i>	<i>40</i>
4.3.4	<i>Zhodnocení schopnosti dendritických buněk, připravených různými protokoly, indukovat vznik regulačních T lymfocytů.....</i>	<i>42</i>
<b>5</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>SOUHRN.....</b>	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>54</b>
<b>9</b>	<b>PŘÍLOHY – PUBLIKACE AUTORKY .....</b>	<b>59</b>

# **1 SEZNAM NEJČASTĚJI UŽÍVANÝCH ZKRATEK**

<b>APC</b>	Antigen presenting cell (buňka prezentující antigen)
<b>CG</b>	Cell Gro (kultivační médium)
<b>DC</b>	Dendritic cell (dendritická buňka)
<b>FBS</b>	Fetal bovine serum (fetální hovězí sérum)
<b>GMP</b>	Good manufacturing practise (správná výrobní praxe)
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>IL-4</b>	Interleukin 4
<b>LPS</b>	Lipopolysacharid
<b>MHC</b>	Major histocompatibility complex (hlavní histokompatibilní systém)
<b>MK</b>	Maturační koktejl – směs cytokinů
<b>MoDC</b>	Monocyte derived DC – DC připravené z monocytů
<b>PAMP</b>	Pathogen-associated molecular patterns – komponenty patogenů
<b>PBMC</b>	Peripheral Blood Mononuclear Cell (periferní mononukleární buňky)
<b>PBS</b>	Phosphate saline buffer
<b>Poly I:C</b>	Polyinosinic-polycytidylic acid sodium salt
<b>rpm</b>	Jednotka rychlosti otáčení při centrifugaci
<b>SÚKL</b>	Státní ústav pro kontrolu léčiv

## **2 ÚVOD**

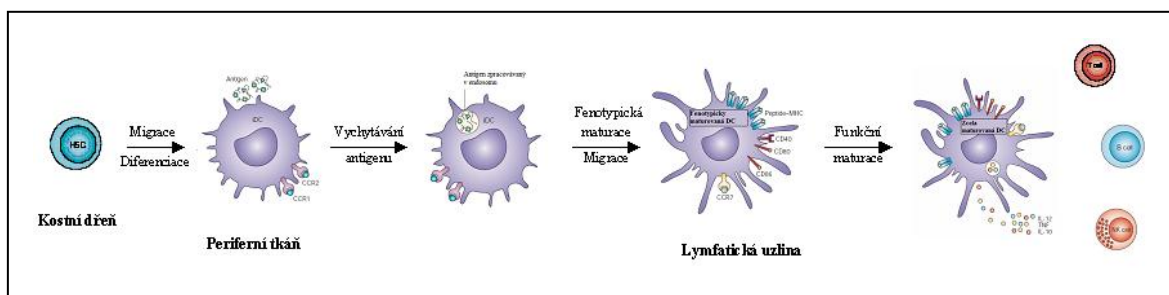
## 2.1 Role imunitního systému a aktivace imunitní reakce

Infekce byly do objevení antimikrobiálních léků nejčastější příčinou úmrtí. Prudký nárůst průměrné délky života po zavedení preventivních očkovacích programů a antiinfekční terapie je spojen s nárůstem incidence nádorových onemocnění. Mnoho výzkumných pracovišť se zabývá otázkou, zda imunitní systém hraje podstatnou roli i v obraně proti nádorově transformovaným buňkám, zda lze proti nádorovým tkáním vyvolat imunitní odpověď a zda indukce protinádorové imunitní reakce vede ke zlepšení prognózy nádorových onemocnění. Protinádorová terapie se v posledních letech dostává do centra zájmu díky několika zásadním objevům v porozumění mechanismům, které kontrolují aktivaci imunitního systému, a také díky pokroku v laboratorních technologiích, který umožňuje manipulaci s buňkami imunitního systému *in vitro*.

Lidský organismus má pro účinnou obranu proti infekcím k dispozici dvě hlavní složky imunitního systému – systém nespecifické (přirozené) imunity a systém imunity specifické (adaptivní). Složky nespecifické imunity, ať již buněčné (makrofágy, NK buňky, granulocyty) nebo humorální (komplement, antimikrobiální peptidy, cytokiny), jsou schopny rychlé detekce přítomnosti patogenu v organismu. Obranná reakce je v případě nespecifické imunity velmi rychlá, uniformní a často vede k úplné eliminaci patogenního agens bez nutnosti zapojení specifické imunity. Nespecifická imunita nemá mechanismy, které by zabezpečily vznik imunologické paměti.

Klíčovým mechanismem pro funkci specifické imunity je vznik antigen specifických receptorů na B a T lymfocytech. Výsledkem náhodného přeskupování genových segmentů u genů pro T a B buněčné receptory je existence obrovského množství receptorů s přesně definovanou specifitou. Daní za tuto velkou zásobárnu antigen specifických lymfocytů je, že lymfocytů pro jeden určitý antigen je velmi malé množství. Frekvence lymfocytů pro určitý antigen se nejčastěji pohybuje kolem  $1-2 \times 10^5$ . Tak malý počet buněk specifických pro antigen je pro časnou obranu proti infekcím nepoužitelný. Po aktivaci specifického lymfocytu musí nejprve dojít ke klonální expanzi a teprve po vytvoření dostatečné populace efektorových buněk dojde k rozvoji primární specifické imunitní reakce. Tento proces většinou trvá 4-7 dní, a po tuto dobu je tedy potřeba, aby obranu zajistila nespecifická imunita. Při opakovaném setkání se stejným patogenem je již situace odlišná. V organismu jsou již vytvořeny paměťové T a B lymfocyty a sekundární imunitní odpověď je mnohem rychlejší.

Kromě toho, že rozvoj primární specifické imunitní odpovědi trvá dlouho, je také důležité zdůraznit, že samotná aktivace antigen specifických T lymfocytů je poměrně složitý proces, který je pod velmi přísnou kontrolou. Je to nezbytné proto, že aktivace nesprávných lymfocytů může mít fatální následky, např. v podobě autoimunitních onemocnění. Pro účinnou aktivaci musí být antigen předkládán v lymfatických uzlinách antigen prezentujícími buňkami. Nejúčinnějším představitelem jsou dendritické buňky, které jediné jsou schopné aktivovat naivní T lymfocyty.<sup>1,2</sup> Plní tedy roli prostředníka mezi systémy nespecifické a specifické imunity, bez kterého nedojde k rozvoji plnohodnotné imunitní reakce.



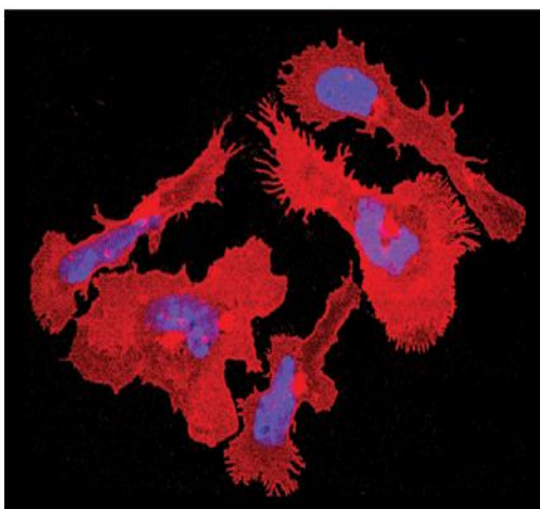
**Obr. 1: Klíčové okamžiky imunologie dendritické buňky:** Diferenciace hematopoetické kmenové buňky (HSC) v nezralou dendritickou buňku (iDC) migrující do periferní tkáň, kde se průběžně setkává s antigeny, které pohlcuje do endosomů a prezentuje pomocí MHC II. třídy. Po pohlcení antigenu dochází k maturaci dendritické buňky, která putuje do lymfatické uzliny a dozrává fenotypicky, zvyšuje se exprese molekul (CD40, CD80 a CD86, molekul MHC II. třídy a CC chemokinového receptoru 7 (CCR7)). V lymfatické uzlině dendritické buňky prezentují komplex MHC II. třídy – peptid na buněčném povrchu a interagují s antigen specifickými lymfocyty, čímž maturují funkčně. Zcela maturované dendritické buňky aktivují T buňky, B buňky a NK buňky a produkují zánětlivé cytokiny např. interleukin 12 (IL-12) a tumor nekrosis faktor (TNF).



## 2.2 Buňky prezentující antigen

Antigen prezentující buňky (APC) spojují funkce specifické a nespecifické imunity.<sup>3</sup> Buňky na svém povrchu exprimují molekuly MHC II. třídy, na kterých prezentují peptidy, jež pochází z pohlčených částic. Takto vzniklé komplexy MHC-peptid jsou rozpoznávané pomocí TCR receptorů na povrchu T lymfocytů. Spolu s dalšími signály (kostimulační signál, cytokinové signály) dostává T lymfocyt impuls k proliferaci a diferenciaci.<sup>1</sup>

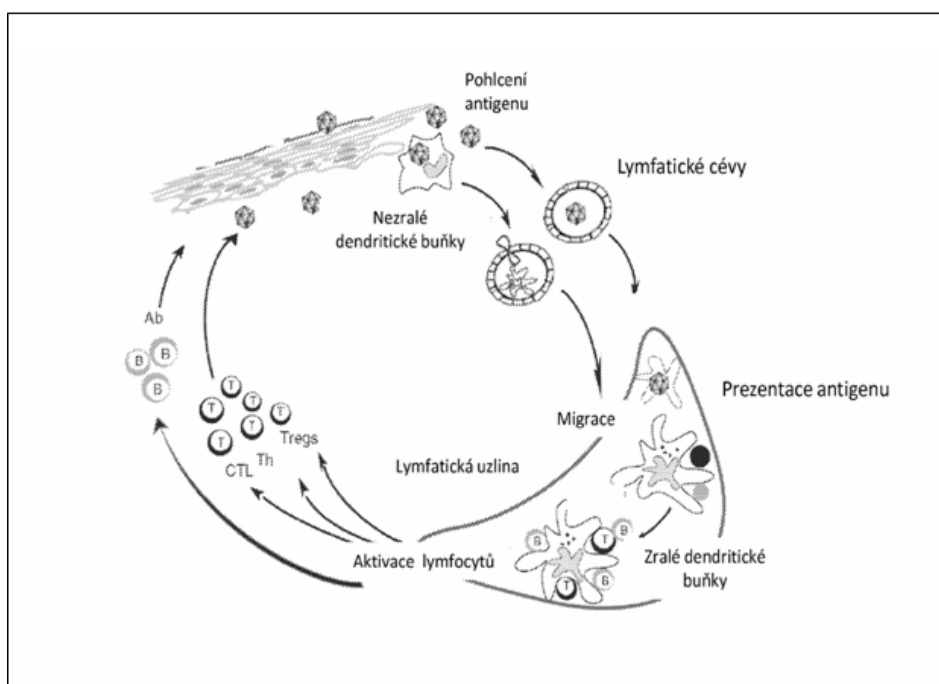
Ve skupině APC jsou různé typy buněk, jež se liší odlišně vyvinutými funkcemi pro pohlcování a prezentaci antigenů. Makrofágy jsou výborně enzymaticky vybaveny pro usmrcování pohlčených patogenů a v místě zánětu efektivně aktivují lymfocyty specifické pro antigen. Jako APC fungují rovněž zralé B buňky a některé další typy buněk, u kterých je po aktivaci indukována exprese MHC II. třídy (endoteliální buňky). Dendritické buňky (DC) mají mezi APC výsadní postavení, jelikož se účastní procesu aktivace naivních lymfocytů.<sup>1</sup>



**Obr. 2:** Typická morfologická charakteristika zralé dendritické buňky: dlouhé dendrity umožňující kontakt s mnoha lymfocyty. Myší slezinné DC (červeně MHC II, fialově jaderná DNA).

## 2.3 Dendritická buňka

Dendritické buňky byly objeveny roku 1973 Ralphem Steinmanem a pojmenovány podle charakteristické morfologie s množstvím výběžků, tzv. dendritů.<sup>4-7</sup> Zásadní zlom ve studiu dendritických buněk nastal v polovině 90.let, kdy byly publikovány protokoly popisující kultivaci dendritických buněk z monocytů nebo kmenových hematopoetických buněk zdravých dárců za přítomnosti GM-CSF (granulocyte-monocyte-colony stimulating factor) a IL-4.<sup>8</sup>

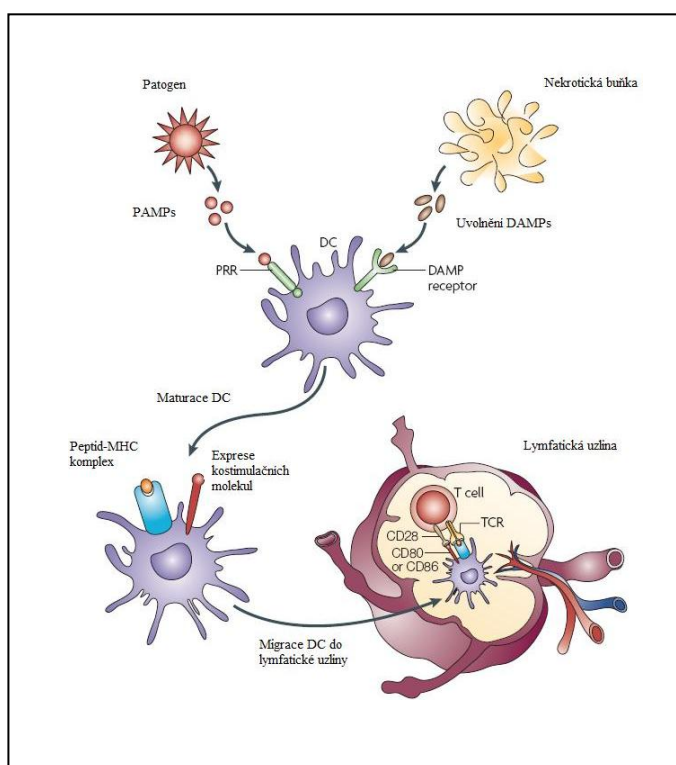


**Obr. 3: Cyklus dendritických buněk v organismu**

(Palucka, K et al., Immunol. Reviews, 2007)

Dendritické buňky se diferencují z kmenových hematopoetických buněk v kostní dřeni.<sup>8,9</sup> Z krevního oběhu vstupují do tkání, kde se vyskytují především v tzv. nezralém stavu. Nezralá dendritická buňka exprimuje na svém povrchu velké množství molekul, které umožňují pohlcování nejrůznějších antigenních částic (viry, bakterie, infikované, nádorové či odumřelé buňky). V tomto nezralém stavu mají na svém povrchu pouze malé množství MHC a kostimulačních molekul, které nedostačuje k zahájení imunitní odpovědi. Antigen specifické lymfocyty se však nacházejí v sekundárních lymfatických orgánech a pro jejich

aktivaci je nutné, aby se dendritická buňka prezentující antigen přesunula z periferie do lymfatických uzlin. Proces, během kterého se z nezralé dendritické buňky stane profesionální antigen prezentující buňka, je nazýván maturace. Tento proces je zahájen poté, co dendritická buňka pomocí specifických receptorů (např. Toll-like receptorů)<sup>10-13</sup> rozpozná hrozící nebezpečí, nejčastěji průnik infekčního agens do organismu. Proces maturace je charakterizován vymizením schopnosti fagocytovat antigeny. Dochází k výraznému zvýšení povrchové exprese MHC molekul I. a II. třídy, kostimulačních a adhezivních molekul. Na povrchu dendritických buněk se objevuje molekula CCR7, která je receptorem pro chemokin MIP-3 $\beta$ , který je produkován v lymfatických uzlinách. Zrající aktivovaná dendritická buňka migruje do lymfatických uzlin, kde účinně předkládá antigeny na svém povrchu T lymfocytům, aktivuje je a zahajuje imunitní reakci. Ta v optimálním případě vede k eliminaci patogenu, který vyvolal aktivaci dendritických buněk.<sup>14,15</sup>



**Obr. 4: Schématické znázornění pohybu maturované dendritické buňky v organismu (Steinman et al., Nature reviews immunology, 2002)**

## 2.4 Maturace dendritických buněk

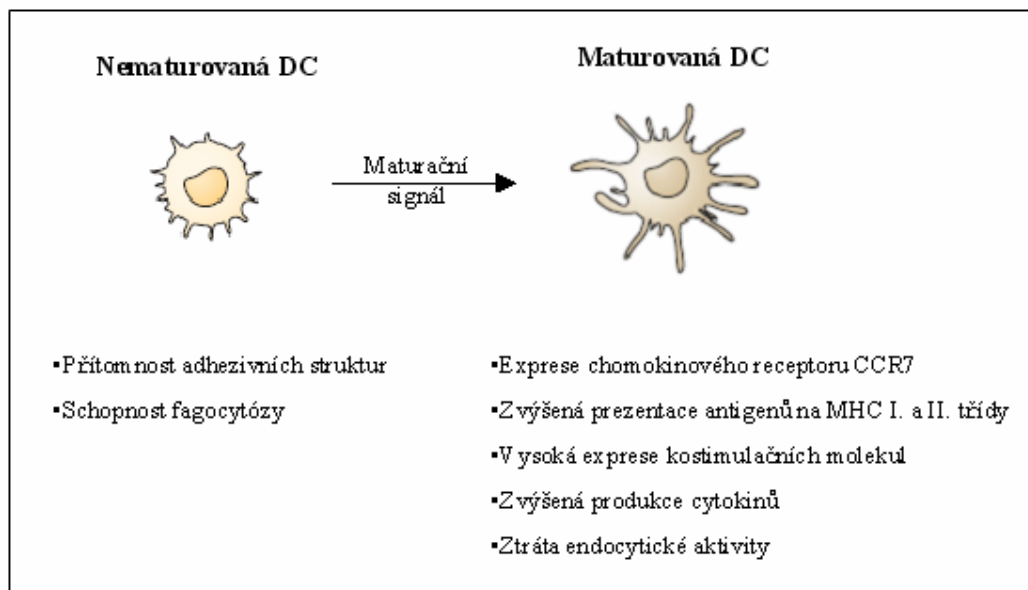
Dendritické buňky existují ve dvou odlišných stavech, nezralém a zralém, přičemž jediné maturované dendritické buňky mají potenciál vyvolat klonální expanzi T lymfocytů, a tím primární imunitní odpověď. Proces maturace tedy představuje kompletní transformaci buněk, jež pohlcují antigeny, na buňky specializované aktivovat T-lymfocyty.<sup>1</sup>

V současné době je známo velké množství maturačních signálů, které lze rozdělit do tří skupin:

- Komponenty patogenů (pathogen-associated molecular patterns – PAMPs)
- Faktory signalizující nebezpečí, které jsou produkovány samotným hostitelem
  - Faktory produkované imunocyty v průběhu zánětu (zánětlivé cytokiny)
  - Faktory produkované nebo zpřístupněné při poškození tkáně
  - Fc části imunoglobulinů (v imunokomplexech) aktivující Fc receptory na DC<sup>16</sup>
- Signály zprostředkované aktivovanými lymfocyty<sup>17-19</sup>

Maturační proces ovlivňuje komplexně vlastnosti dendritických buněk, které tak získávají kompletní výbavu pro účinnou aktivaci naivních T lymfocytů.<sup>20,21</sup> Pro získání schopnosti DC indukovat primární T buněčnou odpověď jsou významné především tyto události asociované s maturací:

- změna morfologie buněk
- produkce cytokinů a změněná exprese chemokinových receptorů
- ztráta endocytické aktivity, změněná prezentace antigenů
- zvýšení exprese kostimulačních molekul CD80, CD83 a CD86
- produkce cytokinů a zánětlivých faktorů



**Obr. 5: Změny provázející maturaci dendritické buňky**

### 2.4.1 Morfologie dendritických buněk

Morfologické změny provázející maturaci zahrnují ztrátu adhezivních struktur, cytoskeletální reorganizaci a umožňují DC získat vyšší pohyblivost důležitou pro migraci mezi tkáněmi. DC během maturace nabývají charakteristického vzhledu buněk s dlouhými jemnými výběžky – dendrity. Formace těchto struktur je asociována s remodelací cytoskeletu.

### 2.4.2 Migrace dendritických buněk

Schopnost migrace DC je řízena pomocí širokého spektra chemokinů a chemokinových receptorů. Zásadní role je připisována expresi chemokinového receptoru CCR7, který je exprimovaný zejména na naivních T buňkách a centrálních paměťových T buňkách. Maturované DC exprimují CCR7 a získávají tak schopnost odpovídat na chemokiny CCL19 a CCL21.<sup>22,23</sup> Opouštějí místo zánětu a jsou přitahovány do lymfatických uzlin.

### **2.4.3 Zpracování antigenů**

Charakteristickým znakem vyžívání DC je ztráta schopnosti pohlcovat antigeny.<sup>24</sup> Podle nejnovějších pozorování však krátce po aktivaci maturačním signálem dochází k přechodnému zvýšení intenzity makropinocytózy, které je spojeno s remodelací aktinových vláken. V souhrnu řečeno, vystavení nezralé DC maturačnímu stimulu vede prvotně k zesílení funkcí pro prezentaci antigenů a následně k jejich rychlému oslabení současně s konečnou transformací DC do zralého stavu.

U zralých a nezralých DC dochází rozdílným způsobem a s rozdílnou intenzitou k formování komplexů MHC-peptid a jejich expresi na buněčném povrchu. Během maturace je více než stonásobně zvýšena prezentace antigenů na MHC I. a II. třídy. U nezralých DC jsou nově syntetizované MHC komplexy II. třídy lokalizovány v endosomálním kompartmentu MIIC (z angl. MHC class II-rich compartments). Po obdržení maturačního signálu se tyto komplexy tvoří s vyšší účinností a dochází k jejich transportu na povrch buňky. Dokud buňka neobdrží maturační signál, nedochází v dostatečné míře k vazbě peptidů na MHC II. třídy.<sup>14</sup>

### **2.4.4 Kostimulační a adhesivní molekuly**

Maturované DC exprimují vysoké množství kostimulačních molekul CD80, CD83 a CD86. Ligandy Toll-like receptorů (TLR) a další PAMPs jsou účinnými stimulatory jejich exprese. Expresi kostimulačních molekul rovněž zesilují prozánětlivé faktory a T buněčné signály.

### **2.4.5 Produkce cytokinů**

Maturací DC je spuštěna produkce mnoha cytokinů, jednak zánětlivých, které primárně fungují jako systémové nebo lokální signalizátory zánětu (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6), a dále cytokinů imunoregulačních (IL-12, IL-18, IFN $\alpha$ , IL-6, IL-10), které ovlivňují T buňky a ve výsledku určují typ T buněčné odpovědi. Cytokin IL-6 působí multifunkčně. Napomáhá diferenciaci B lymfocytů a funguje v indukci akutní protizánětlivé odpovědi. Recentně bylo zjištěno, že rovněž pomáhá T lymfocytům překonat supresivní působení regulačních T buněk<sup>25</sup> a jeho působení na T buňky je in vivo nezbytné pro jejich aktivaci. Maturované DC dále produkují cytokiny (TNF, IL1, IL-2), které mohou přímo ovlivnit klonální expanzi T lymfocytů.<sup>21</sup>

## 2.5 Imunoterapie nádorových onemocnění

Poznání klíčové role dendritických buněk v procesu zahájení imunitní reakce a možnost jejich přípravy ve velkém množství *in vitro* vedly k úvahám o jejich využití v imunoterapii nádorových onemocnění. Aktivace imunitní reakce proti nádorovým buňkám by byla významným přínosem pro terapii nádorů. Hlavní podmínkou úspěšné protinádorové terapie je předpoklad, že imunitní systém umí rozpoznat a zničit nádorové buňky. Rozhodující důkaz o roli imunitního systému v obraně proti nádorům poskytly studie na myších bez funkčních genů pro rekombinace T a B buněčných receptorů RAG1 a RAG2 (RAG  $-/-$ ). Tyto myši nemají T a B lymfocyty, protože nemohou přestavit antigenně specifické receptory. RAG  $-/-$  myši nejenže vyvinou chemicky indukované nádory rychleji a s větší frekvencí než imunokompetentní kontroly, ale také tvoří mnohem více spontánních tumorů, když pokus probíhá po dostatečně dlouhou dobu.

Nádorové buňky exprimují některé antigeny, které se na jiných buněčných typech nevyskytují. Těchto tzv. nádorově specifických, resp. asociovaných antigenů je již popsáno velké množství. Problémem je, že nádorové buňky samy nemohou fungovat jako antigen prezentující buňky, protože neexprimují kostimulační molekuly. Nádorové buňky mají navíc řadu strategií, pomocí nichž jsou schopné uniknout kontrole imunitního systému. Nádorové buňky například často produkují transformující růstový faktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) a interleukin 10, tedy cytokiny, které inhibují imunitní reakci. Dalším únikovým mechanismem jsou časté mutace v genech, které kódují bílkoviny důležité pro prezentaci antigenů v antigen prezentujících buňkách, které vedou k nižší expresi MHC I. třídy na nádorových buňkách. Pro aktivaci protinádorové imunitní odpovědi je nutné, aby byla nádorová buňka pohlcena dendritickou buňkou, a aby byly fragmenty nádorových antigenů následně prezentovány v lymfatických uzlinách zralými dendritickými buňkami. Jak bylo ovšem zmíněno výše, nejúčinnějšími aktivátory jsou struktury pocházející z infekčních agens. Jako endogenní signály, které mohou způsobit aktivaci dendritických buněk při interakci s nádorovou buňkou, byly identifikovány kyselina močová a proteiny teplotního šoku. Jejich aktivační potenciál je ovšem mnohem nižší než aktivační potenciál struktur pocházejících z patogenů. Aktivace imunitní reakce proti nádorům je tedy podstatně složitější než zahájení imunitní reakce proti infekcím.

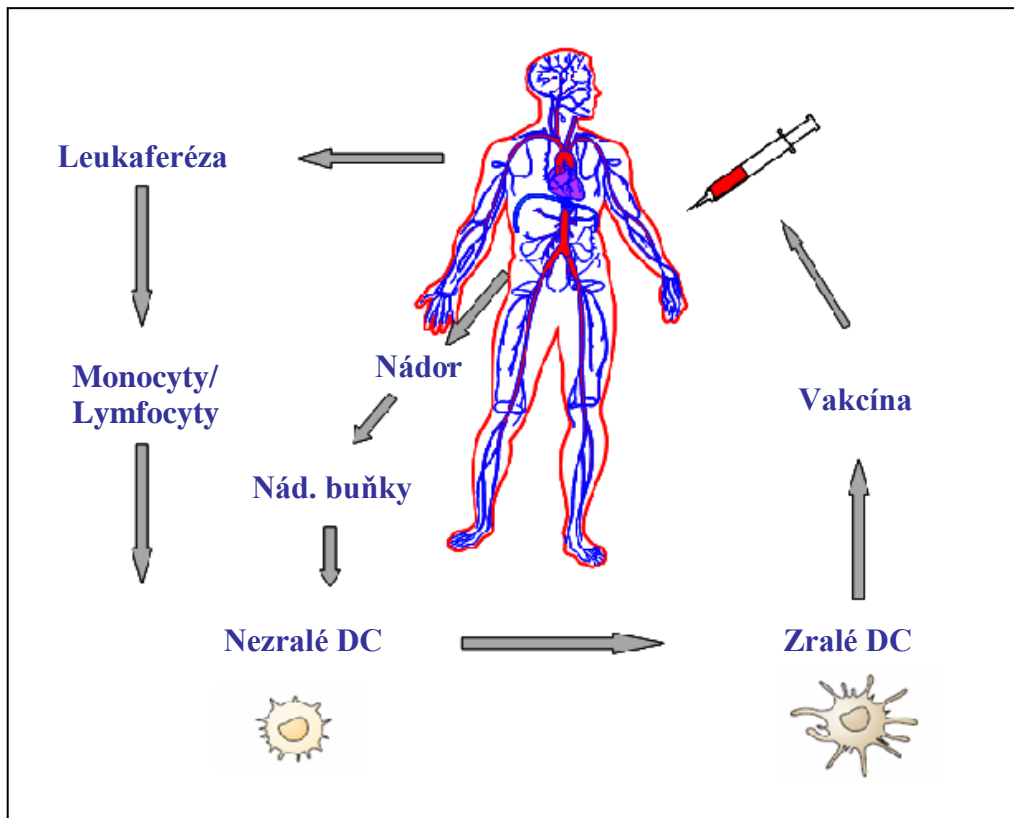
## 2.6 Imunoterapie nádorových onemocnění dendritickými buňkami

Principem imunoterapie nádorových onemocnění dendritickými buňkami je podávání in vitro připravených zralých dendritických buněk, které prezentují nádorové antigeny, jako vakcíny, která by vedla k indukci specifické protinádorové imunitní odpovědi. Současné terapeutické protokoly používané v onkologii (chirurgie, chemoterapie, radioterapie) jsou relativně velmi účinné ve své schopnosti zredukovat množství nádorových buněk. U mnoha typů malignit ovšem zůstává problém perzistence malého množství buněk rezistentních na použité léky. Tento stav se nazývá minimální reziduální nemoc (MRN) a existuje závislost mezi hladinou MRN a prognózou pacienta. Přežívající buňky dají v dalším průběhu choroby vznik nové, terapeuticky již těžko ovlivnitelné nádorové populace. Pacienti ve stadiu MRN by mohli být vhodnými kandidáty pro protinádorovou imunoterapii, protože aktivace specifické protinádorové imunitní reakce by v této fázi mohla vést ke zlepšení prognózy onemocnění.

Po výběru pacientů, kteří jsou zařazeni do studie, je připraveno velké množství nezralých dendritických buněk z monocytů v periferní krvi. Po pěti dnech dojde k diferenciaci monocytů v nezralé dendritické buňky. Další postup závisí na typu nádorového antigenu<sup>26</sup>, který je pro imunoterapii plánován. Při použití mrtvých nádorových buněk jako zdroje celého spektra nádorových antigenů je prvním krokem inkubace dendritických buněk s nádorovými buňkami.<sup>27,28</sup> Po pohlcení nádorových buněk jsou následně dendritické buňky aktivovány účinným stimulem a zralé dendritické buňky, které prezentují nádorové antigeny, jsou poté jako protinádorová vakcína podány zpět pacientovi.<sup>3</sup> Při použití přesně definovaných epitopů nádorových antigenů ve formě krátkých peptidů jsou dendritické buňky, které exprimují velké množství HLA molekul, inkubovány s nádorovým antigenem.

Předmětem intenzivního výzkumu je řada parametrů. Jde především o množství podávaných dendritických buněk a frekvenci a celkovou dobu podávání protinádorové vakcíny.<sup>29-33</sup> Roli v efektivitě podávané vakcíny zřejmě hraje také způsob podání vakcíny. Jako nejlepší se zatím jeví subkutánní nebo intradermální injekce, ale stále je zapotřebí hledat strategie, které zaručí, že se většina injikovaných buněk dostane do lymfatických uzlin. Neméně důležitým problémem je také typ testů, které budou používány pro monitoring efektu terapie.





**Obr. 6: Obecné schéma protinádorové imunoterapie pomocí vakcíny z DC**

## 2.7 Cíl práce

Po řadě laboratorních studií, ve kterých jsme prokázali, že zralé dendritické buňky dokáží indukovat specifickou protinádorovou imunitní odpověď, plánujeme nyní na 2. LF UK a FN Motol zahájení klinické studie u pacientek s karcinomem ovaria. V rámci prostor FN Motol byla vybudována Jednotka buněčné terapie. Jde o první pracoviště v ČR, kde lze připravovat produkty pro protinádorovou imunoterapii, a její uvedení do provozu je důležitým krokem k provedení prvních klinických studií. Mým úkolem bylo optimalizovat podmínky pro výrobu protinádorové vakcíny:

- Definovat optimální kultivační média a maturační signály pro přípravu protinádorové vakcíny založené na dendritických buňkách za podmínek správné výrobní praxe. Tento cíl byl studován v několika krocích, aby byly zhodnoceny všechny parametry, které musí protinádorová vakcína založená na dendritických buňkách splňovat:
- Morfologická, fenotypická a funkční charakterizace připravených dendritických buněk:
  - analýza fenotypu nezralých a zralých dendritických buněk
  - detekce produkce prozánětlivých cytokinů po maturaci dendritických buněk
  - analýza schopnosti dendritických buněk indukovat antigen specifické T lymfocyty pomocí tetramerů HLA I. třídy
  - detekce produkce IFN- $\gamma$  u antigenně specifických T lymfocytů
  - zhodnocení schopnosti dendritických buněk, připravených různými protokoly, indukovat vznik regulačních T lymfocytů (Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>)<sup>34,35</sup>

### **3 MATERIÁL A METODY**

## 3.1 Materiál

### 3.1.1 Buňky a buněčné kultury

Zdrojem dendritických buněk derivovaných z monocytů (MoDC) je tzv. buffy coat od zdravých dárců (buffy coaty jsou frakce nesrážlivé krve po centrifugaci, které obsahují leukocyty a destičky). Tyto buffy coaty nám poskytuje Ústav hematologie a krevní transfúze v Praze. MoDC byly získány kultivací v cytokinovém prostředí IL-4 a GM-CSF.

### 3.1.2 Chemikálie

- Ethanol 96% (MERCK KGaA)
- Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences AB)
- Poly-(2-hydroxyethyl methakrylát) (SIGMA)
- FITC dextran (Exbio)
- Směs HLA-A2 antigenních peptidů z viru Epstein-Barrové (EBV 259), MP influenzy (IFN 58-66), lidského cytomegaloviru (HCMV 495)

### 3.1.3 Připravované roztoky

- 4 % roztok poly-(2-hydroxyethyl methakrylátu)  
1g/25 ml 96% ethanolu
- Barvicí roztok pro průtokovou cytometrii  
50  $\mu$ l/vzorek (PBS pH 7,2 + 1 % FBS + 20x ředěná příslušná mAb)
- Kompletní médium  
RPMI 1600, 10 % FBS, 5 % L-glutamin, 5 % streptomycin + penicilin
- RPMI + AB sérum  
RPMI 1600, 10% AB sérum, 5% L-glutamin, 5% streptomycin + penicilin
- Cell Gro médium  
Cell Gro, 5% L-glutamin, 5% streptomycin + penicilin

### **3.1.4 Dodávané roztoky**

- Fetal bovine serum (FBS) (BIOCHROM AG)
- Kultivační médium RPMI 1640 (CAMBREX BioScience Verviers)
- Phosphate saline buffer (PBS) pH 7,2 (Lékárna FN Motol)
- Cell Gro<sup>®</sup> (Cell Genix)
- 4% roztok paraformaldehydu ve vodě (Lékárna FN Motol)

### **3.1.5 Komerční sady**

- Kit pro intracelulární značení Foxp3 (eBioscience)
- Kit pro intracelulární značení IFN $\gamma$  (eBioscience)

### **3.1.6 Použité monoklonální protilátky**

- Anti-Foxp3 PE (Exbio)
- Anti-IFN $\gamma$  PE (BD), APC (Biolegend)
- CD25 Dy647 (Exbio)
- CD4 FITC (Exbio)
- CD8 APC (Exbio), Alexa700 (Exbio)
- CD80 FITC (Immunotech)
- CD83 PE (Immunotech)
- CD83 FITC (Immunotech)
- CD86 PE-Cy5 (BD)
- CD86 FITC (BD)
- HLA DR PE-A750 (Exbio)
- CD14 PE, PE-Dy 590 (Exbio)
- CD3 PE-Cy7 (Biolegend)
- HLA-A2 tetrametr (Beckman Coulter)

### **3.1.7 Použité maturační stimulanty**

- LPS (SIGMA)
- Poly I:C (SIGMA)
- Maturační koktejl – směs cytokinů - IL-1, IL-6, TNF, PGE2

### **3.1.8 Použité cytokiny**

- GM-CSF (Gentaur)
- IL-2 (PEPROTECH)
- IL-4 (Gentaur)

### **3.1.9 Použité přístroje**

- Digitální fotoaparát (KODAK)
- Inkubátor CO<sub>2</sub> (Jouan)
- Laminární box (Jouan)
- Počítač buněk ( Beckman Coulter)
- Průtokový cytometr BD FACSAria (BD Biosciences)
- Stolní centrifuga (Jouan)
- Světelný mikroskop CKX41 (OLYMPUS)
- Třepačka mikrotitračních destiček TIMIX2 (EDMUND BÜHLER)
- Vodní lázeň (MEMMERT)

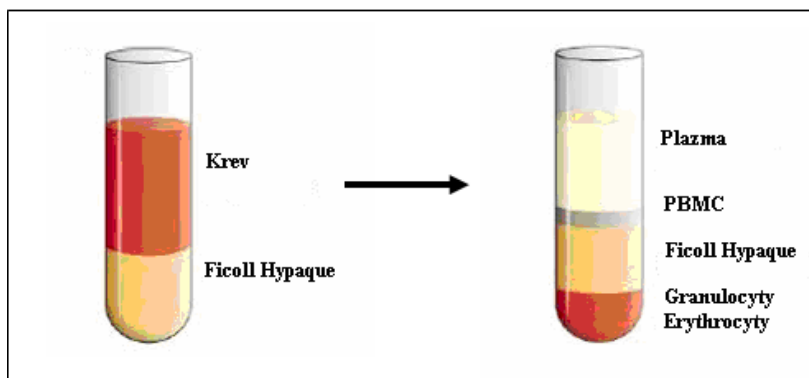
### **3.1.10 Software**

- BD FACSDiva Software (BD)
- FlowJo 8.5.2 (Tree Star Company)

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Příprava dendritických buněk diferencovaných z monocytů

Buňky z buffy coatu byly naředěny PBS v poměru 1:1 a navrstveny na 15 ml Ficoll-Hypaque v 50 ml zkumavce. Buňky byly centrifugovány 30 min, 1800 rpm při laboratorní teplotě. Poté byl sebrán prstenec PBMC lokalizovaný na rozhraní Ficollu a séra zředěného v PBS. Buňky byly přeneseny do 50 ml zkumavky a třikrát promyty PBS při sestupné rychlosti centrifugace 1200 rpm, 1000 rpm, 800 rpm po dobu 10 min, čímž byly odstraněny destičky. Následovaly 2 hod adherence PBMC v kultivačních lahvích ( $70 \times 10^6$  buněk v 20 ml kompletního média v  $75 \text{ cm}^2$ ) při  $37^\circ\text{C}$  a 5%  $\text{CO}_2$ . Po dvouhodinové adherenci byly odstraněny neadherované lymfocyty a adherované monocyty byly kultivovány 5 dní v kompletním médiu obohaceném cytokiny IL-4 (20 ng/ml) a GM-CSF (500 U/ml). Po pětidenní kultivaci monocytů v médiu s cytokiny získáváme nezralé dendritické buňky. Veškeré manipulace s buňkami z buffy coatu a nezralými dendritickými buňkami byly prováděny ve sterilních podmínkách v laminárním boxu, aby bylo zabráněno kontaminaci buněk.



Obr. 7: Schéma přípravy PBMC (periferních mononukleárních buněk) z krve dárců

### 3.2.2 Stimulace nezralých dendritických buněk

24 jamková destička byla potažena 4% roztokem poly(2-hydroxyethyl-methakrylátu), který zabraňuje adhezi buněk na povrch destičky. Dendritické buňky byly kultivovány v koncentraci 0,5 milionu DC/1 ml kompletního média. K takto připraveným DC byly přidány stimulanty v příslušných koncentracích dle tabulky. Buňky se stimulanty byly kokultivovány 24 hodin.

Stimulant	Receptor	Výsledná koncentrace
LPS	TLR-4	0,1 µg/ml
Poly I:C	TLR-3	0,1 µg/ml
Maturační koktejl	Směs cytokinů – IL-1, IL-6, TNF, PGE	0,1 µg/ml

**Tabulka 1: Seznam maturačních stimulantů používaných k maturaci DC**



### **3.2.3 Průtoková cytometrie**

Průtoková cytometrie je metoda, při které se měří a následně analyzují fyzikální a chemické vlastnosti jednotlivých buněk, jenž v roztoku procházejí přes detekční zařízení. Buněčná suspenze se označí pomocí monoklonálních protilátek (mAb) s navázanou fluorescenční molekulou (fluorochromem), poté se vloží do průtokového cytometru, kde je přetlakem stříkána skrz trysku. Tím dojde k vytvoření tenkého proudu suspenze, v němž jsou buňky uspořádány za sebou, tento proud protíná laserový paprsek. Jakákoliv částice v suspenzi způsobí, že se laserové světlo od ní odrazí a rozptýlí. Pokud jsou na buňce navázány molekuly fluorochromů, mohou se laserovým paprskem excitovat a vyzařovat ještě excitované světlo. Tímto způsobem dochází k získávání primárních dat. Nejčastějšími měřeními parametry touto metodou je velikost, tvar, granularita a životnost buněk, povrchové znaky buněk, cytokiny, enzymatická aktivita, membránový potenciál a další. V této práci byla průtoková cytometrie použita k měření zvolených povrchových markerů, stanovení proliferace lymfocytů a měření intracelulárních cytokinů.

#### **Značení buněk**

Po 24 hodinách kultivace bylo  $1 \times 10^6$  buněk přeneseno do FACS zkumavky a centrifugováno (1200 rpm, 10 min, laboratorní teplota). Po odstranění supernatantu byly buňky 30 min inkubovány ve 20  $\mu$ l protilátky. Značení buněk probíhalo při 4°C. Následovala dvě promývání v 200  $\mu$ l PBS. Po centrifugaci (1200 rpm, 10 min, laboratorní teplota) byl odstraněn supernatant a bylo přidáno 200  $\mu$ l 0,5% roztoku paraformaldehydu.

#### **Analýza**

Na průtokovém cytometru BD FACSAria (BD Biosciences) byla hodnocena imunofluorescence přibližně 50 000 buněk. Analýza byla provedena pomocí programu FlowJo 8.5.2

### **3.2.4 Test fagocytózy**

Principem testu je dokázat, že nezralé dendritické buňky jsou schopné fagocytovat částice dextransu, značené fluorescein isothiokyanátem na rozdíl od zralých dendritických buněk, které nejsou schopné pohlcovat antigenní částice. Takto značené částice dextransu jsou následně detekovány pomocí cytofluorometrické analýzy.

Zralé a nezralé dendritické buňky připravené dle výše zmíněného protokolu byly inkubovány 1 hod s částicemi dextransu značeného fluorescein isothiokyanátem  $1\mu\text{l}/0,5 \times 10^6$  buněk. Po hodinové inkubaci buněk byla provedena cytofluorometrická analýza buněk na průtokovém cytometru BD FACSAria. Získané hodnoty byly zaznamenány a analyzovány pomocí programu FlowJo 8.5.2.

### **3.2.5 Detekce antigen specifických T lymfocytů pomocí tetramerů HLA I. třídy**

Principem metody je detekovat T lymfocyty specifické pro určitý epitop pomocí značení HLA tetrameru I. třídy. Detekce antigen specifických T lymfocytů pomocí tetramerů HLA I. třídy se provádí u dárců s haplotypem HLA-A2, protože jen APC s tímto haplotypem jsou schopny prezentovat antigen využívaný v tomto postupu. Typizace haplotypu dárců byla prováděna pomocí průtokové cytometrie s použitím mAb proti HLA-A2.

Pomocí výše uvedeného protokolu byly připraveny zralé dendritické buňky, které byly inkubované 2 hod s chřipkovým influenza MP peptidem, který se váže na HLA-A2. Po 2 hodinové inkubaci byly takto ošetřené dendritické buňky přeneseny do 24 jamkové destičky a kokultivovány s autologními lymfocyty v poměru 1:10. Stimulace lymfocytů probíhala 7 dní. Třetí den kultivace bylo do kultury přidáno IL-2, jehož výsledná koncentrace byla 50 U/ml. Detekce lymfocytů specifických pro influenza MP peptid byla provedena sedmý den, kdy byly k buňkám přidány phycoerythrinem značené HLA-A2 tetramery s navázaným influenza MP peptidem. Na 100  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze bylo přidáno 20  $\mu\text{l}$  tetrametu. HLA-A2 tetramery se naváží na T buněčný receptor lymfocytů specifických pro testovaný peptid. Po 20 min inkubaci při 4°C byly buňky promyty PBS, resuspendovány ve 200  $\mu\text{l}$  PBS a přeneseny do cytometrických zkumavek. Tetramery značené phycoerythrinem byly detekovány pomocí průtokového cytometru BD FACSAria. Získané hodnoty byly zaznamenány a analyzovány pomocí programu FlowJo 8.5.2.

### 3.2.6 Měření intracelulárních cytokinů: stanovení produkce IFN- $\gamma$

Stanovení intracelulární produkce IFN- $\gamma$  se provádí u dárců s haplotypem HLA-A2, protože jen APC s tímto haplotypem jsou schopny prezentovat směs HLA-A2 peptidů Epstein-Barrová (EBV), influenza (IFN), cytomegalovirus (CMV), které byly v tomto pokusu použity. Typizace haplotypu dárců byla prováděna pomocí průtokové cytometrie s použitím mAb proti HLA-A2.

Dendritické buňky od HLA-A2 pozitivního dárce byly derivovány z monocytů způsobem, který je popsán výše. Lymfocytární frakce byla zamrazena. DC byly maturovány TLR ligandy a část nematurovaných DC byla zamrazena. Po 24 hodinové stimulaci byly DC přeneseny do 96U destičky a pulzovány 2 hodiny při 37°C směsí peptidů, která obsahovala HLA-A2 antigenní peptidy z virus Epstein-Barrové (EBV), z MP infekce (IFN), lidského cytomegaloviru (HCMV) o koncentraci 2  $\mu$ M. Po dvou hodinové inkubaci byly buňky přeneseny do V destiček a centrifugovány 5 min 1500 rpm, po centrifugaci byly buňky 3x promyty v RPMI. Po promytí byly buňky resuspendovány v kompletním médiu a spočítány. Rozmražené autologní lymfocyty byly kultivovány s DC v poměru 10:1 v koncentraci 1 milion lymfocytů/ml kompletního média v nepotažené destičce s rovným dnem. Třetí den kultivace byl přidán k lymfocytům cytokin IL-2 ve výsledné koncentraci 50 U/ml. Sedmý den kultivace byla rozmrazena část nestimulovaných autologních DC. Tyto DC byly pulzovány směsí virových peptidů 2 hodiny při 37°C. K lymfocytům v U jamkách byly přidány tyto DC a inkubovány 1 hodinu při 37°C. Po 1 hodině kultivace byl k buňkám přidán brefeldin 1000 (0,1  $\mu$ l/100 $\mu$ l média) a inkubován další 4 hodiny. Po inkubaci byly buňky přeneseny do V destičky. Po centrifugaci 5 minut 1500 rpm byl odstraněn supernatant a bylo přidáno 50  $\mu$ l IC Fixačního pufru, 20 min 4°C. Následně bylo přidáno 150  $\mu$ l Permeabilizačního pufru. Po centrifugaci 5 minut 1500 rpm byl odstraněn supernatant. K takto připraveným buňkám bylo přidáno 50  $\mu$ l značícího roztoku (0,5  $\mu$ l anti-IFN $\gamma$  PE, 1  $\mu$ l anti-CD8, 0,5  $\mu$ l FCS, 48  $\mu$ l PBS). Inkubace 30 minut ve tmě při 4°C. Následně bylo přidáno 150  $\mu$ l Permeabilizačního pufru. Centrifugace probíhala 5 minut 1500 rpm a následovalo odstranění supernatantu. Buňky byly resuspendovány v 200  $\mu$ l PBS a přeneseny do 0,5 ml zkumavek pro průtokovou cytometrii a měřeny na průtokovém cytometru FACS Aria.

### **3.2.7 Stanovení množství T regulačních lymfocytů metodou intracelulárního značení FoxP3**

Tato metoda umožňuje měřit jak povrchové tak intracelulární antigeny. Při této detekci jsou buňky nejprve aktivovány in vitro a barveny na povrchové markery, následně je buněčná membrána fixována paraformaldehydem a buňky jsou permeabilizovány detergentem, který umožní navázání značících intracelulárních protilátek. Metoda byla použita jako komplementární metoda ke stanovení IFN- $\gamma$  produkujících buněk.

Dendritické buňky od HLA-A2 pozitivního dárce byly derivovány z monocytů způsobem, který je popsán výše. Lymfocytární frakce byla zamražena. DC byly maturovány pomocí zmíněných maturačních signálů. Část nematurovaných DC byla zamražena. Po 24 hodinové stimulaci byly DC přeneseny do U destičky a pulzovány 2 hodiny při 37°C směsí peptidů, která obsahovala HLA-A2 antigenní peptidy z virus Epstein-Barrové (EBV), z MP influenzy (IFN), lidského cytomegaloviru (HCMV) každý o koncentraci 2  $\mu$ M. Po dvou hodinové inkubaci byly buňky přeneseny do V destiček a centrifugovány 5 minut 1500 rpm, po centrifugaci byly buňky 3x promyty RPMI. Po promytí byly buňky resuspendovány v kompletním médiu a spočítány. Rozmražené autologní lymfocyty byly kultivovány s DC v poměru 10:1 v koncentraci 1 milion lymfocytů/ml kompletního média v nepotažené destičce s rovným dnem. Třetí den kultivace byl k lymfocytům přidán cytokin IL-2 ve výsledné koncentraci 50 U/ml.

#### **Povrchové značení**

Po sedmi dnech kultivace byly buňky přeneseny do V destičky, centrifugace 5 min 1500 rpm a byl odstraněn supernatant. K peletce buněk bylo přidáno 30  $\mu$ l značícího roztoku (1,5  $\mu$ l CD4 FITC, 1,5  $\mu$ l CD25 Dy647, 0,3  $\mu$ l FCS, 26,7  $\mu$ l PBS). Buňky byly inkubovány 30 min při 4°C. Po inkubaci byly promyty 170  $\mu$ l PBS + 1% FBS. Po centrifugaci 5 minut 1500 rpm byl odstraněn supernatant. Peletka byla resuspendována v 200  $\mu$ l PBS + 1% FBS. Po centrifugaci 5 minut 1500 rpm byl odstraněn supernatant.

## **Intracelulární značení**

Peletka byla resuspendována ve 100  $\mu$ l Fixačním/Permeabilizačním roztoku a buňky byly inkubovány 60 minut ve tmě při 4°C. Po inkubaci bylo k buňkám přidáno 100  $\mu$ l permeabilizačního pufru. Po centrifugaci 5 minut 1500 rpm byl odstraněn supernatant. Buňky byly resuspendovány ve 200  $\mu$ l permeabilizačního pufru.

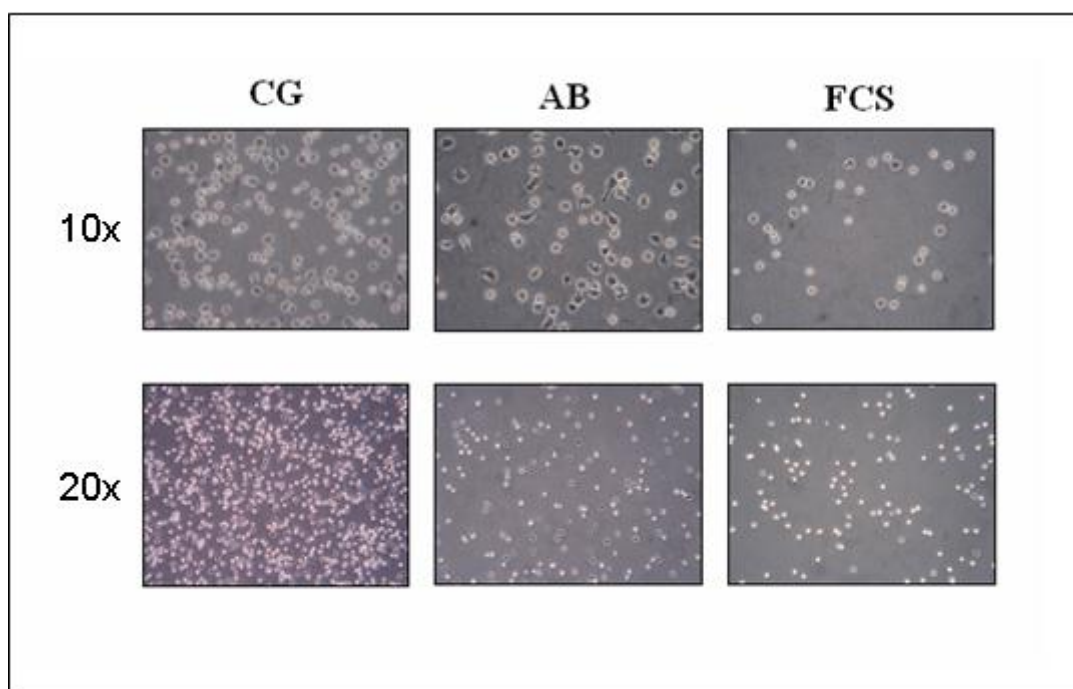
Peletka buněk byla resuspendována ve 20  $\mu$ l permeabilizačního pufru a do každé jamky bylo přidáno 2  $\mu$ l FoxP3 protilátky (30 min, 4°C). Po 30 min inkubaci bylo přidáno 170  $\mu$ l permeabilizačního pufru. Po centrifugaci 5 minut 1500 rpm byl odstraněn supernatant a buňky byly resuspendovány ve 200  $\mu$ l permeabilizačního pufru. Následovala další centrifugace 5 minut 1500 rpm a supernatant byl odstraněn a buňky byly resuspendovány v 200  $\mu$ l PBS a přeneseny do 0,5 ml zkumavek pro průtokovou cytometrii a měřeny na průtokovém cytometru BD FACSAria.

## **4 VÝSLEDKY**

## 4.1 Morfologická charakterizace připravených DC

*Jak je zmíněno v úvodu mé práce, jedním z cílů bylo sledovat morfologii připravených dendritických buněk. Při přípravě buněk za podmínek správné výrobní praxe často čelíme problematice odlišné adherence buněk v jednotlivých kultivačních médiích a jejího vlivu na následnou maturaci DC. Cílem pokusu bylo sledovat vliv kultivačních médií a neošetřeného plastiku na přípravu DC.*

Periferní mononukleární buňky (PBMC) izolované z buffy coatu pomocí gradientové centrifugace byly kultivovány ve třech médiích (Cell Gro, RPMI+FCS, RPMI+AB sérum), u kterých jsme sledovali vliv prostředí na četnost adherence. Po 2 hodinové adherenci monocytů na povrch kultivačních jamek a odstranění neadherovaných lymfocytů promytím, byl sledován charakter a počet adherovaných buněk (obr. 8).

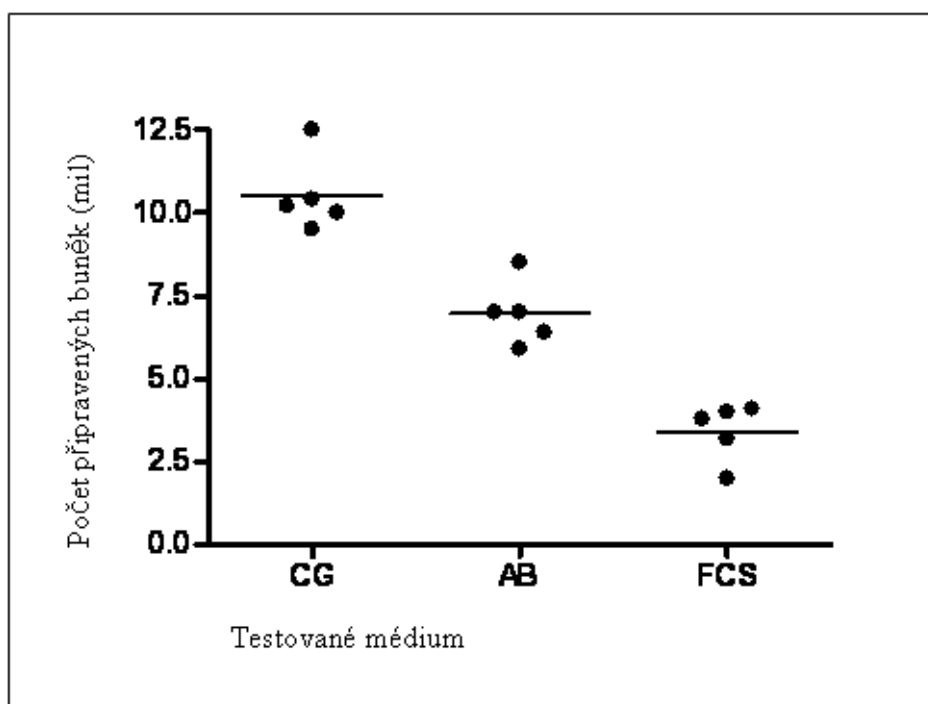


**Obr. 8: Fotografická dokumentace monocytů po 2 hod adherenci na kultivační plastik v prostředí jednotlivých kultivačních médií (CG – Cell Gro, AB – RPMI+5% AB sérum, FCS – RPMI+FCS) při 10x a 20x zvětšení.**

Reprezentativní pokus ukazuje (obr. 8), že největší počet adherovaných monocytů byl získán při kultivaci buněk v médiu Cell Gro. Naopak adherence PBMC v RPMI+10% FCS a v RPMI+5% AB séru vedla k zisku nižšího počtu adherovaných monocytů.

Adherované buňky byly 5 dní kultivovány v médiu (Cell Gro, RPMI+FCS, RPMI+AB sérum) obohaceném cytokiny IL-4 a GM-CSF, což umožnilo odlepení buněk od kultivačního plastiku a diferenciaci monocytů na nezralé dendritické buňky. Nezralé dendritické buňky byly sebrány a spočítány.

Na obrázku 9 jsou uvedeny souhrnné výsledky tohoto pokusu. Z obrázku 9 vyplývá, že v souladu s množstvím buněk při adhezi získáme největší počet nezralých dendritických buněk v kultivačním médiu Cell Gro.



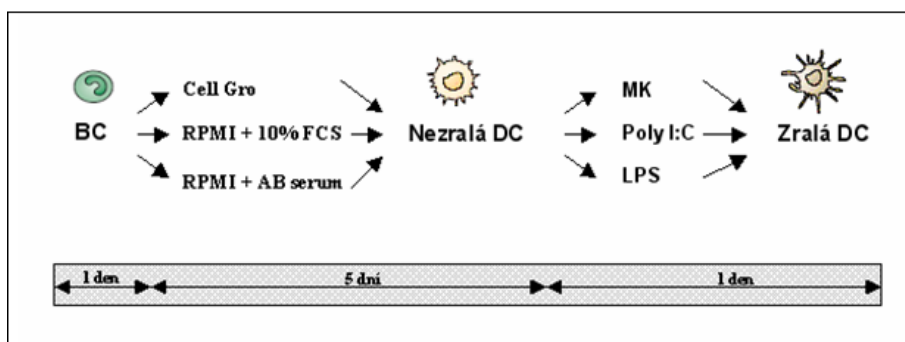
**Obr. 9: Grafické znázornění počtu získaných nezralých dendritických buněk po pětidenní kultivaci v příslušných médiích.**



## 4.2 Fenotypická charakterizace připravených DC

*Dalším cílem naší práce bylo charakterizovat fenotyp nezralých a zralých dendritických buněk získaných kultivací v jednotlivých médiích a maturovaných pomocí porovnávaných maturačních signálů.*

Dendritické buňky získané dle standardního protokolu (viz. materiál a metody) byly kultivovány v porovnávaných kultivačních médiích a maturovány pomocí příslušného maturačního signálu (MK, Poly I:C, LPS). Po 24 hod kultivaci byly získány maturované buňky, jejichž fenotyp byl ověřen pomocí detekce exprese kostimulačních molekul (obr.10).



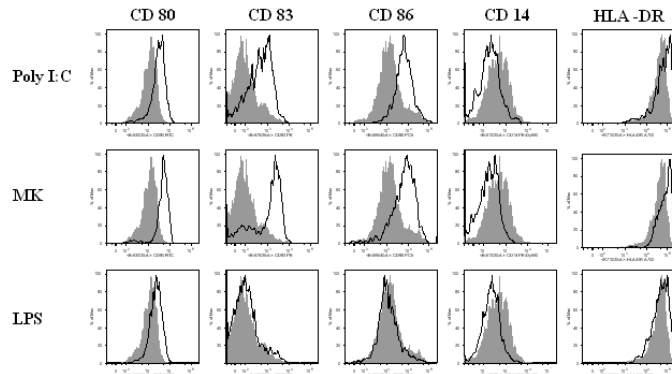
**Obr. 10: Schéma pokusu fenotypické charakterizace připravených DC**

K detekci kostimulačních molekul u maturovaných buněk byly použity protilátky specificky reagující s molekulami CD80, CD83, CD86. K detekci povrchových molekul byly použity protilátky specificky reagující s molekulami CD14 a HLA-DR. Jejich fluorescence byla měřena na průtokovém cytometru BD FACSAria. Získané hodnoty byly zaznamenány a analyzovány pomocí programu FlowJo 8.5.2.

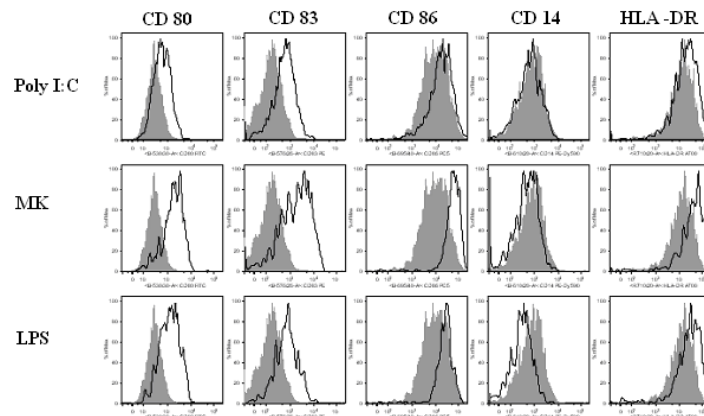
Z obrázku 11 vyplývá, že stimulace nezralých dendritických buněk směsí cytokinů, Poly I:C i LPS indukovala u všech typů získaných DC fenotypické změny spojené s maturací. U všech maturovaných buněk (černý histogram) v testovaných médiích docházelo k výraznému zvýšení exprese kostimulačních molekul CD80, CD83 a CD86 a zároveň docházelo ke snížení exprese povrchové molekuly CD14, jakožto charakteristického povrchového znaku monocytů. Dalším sledovaným parametrem indikujícím fenotypickou maturaci byla molekula HLA-DR. Exprese této molekuly byla také zvýšena na povrchu dendritických buněk po 24 hod maturaci příslušným maturačním signálem.

Pouze u dendritických buněk kultivovaných v Cell Gro a maturovaných pomocí LPS nedocházelo k fenotypické maturaci. Nedocházelo ke zvýšení exprese kostimulačních molekul ani molekuly HLA-DR a zároveň se neměnila hodnota exprese povrchové molekuly CD14.

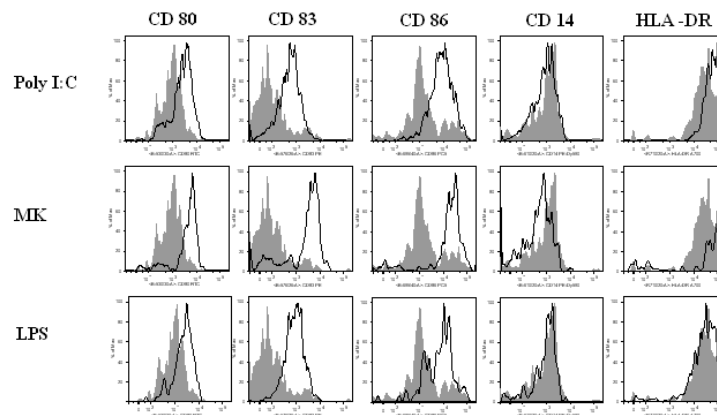
## Cell Gro



## RPMI+AB



## RPMI+FCS

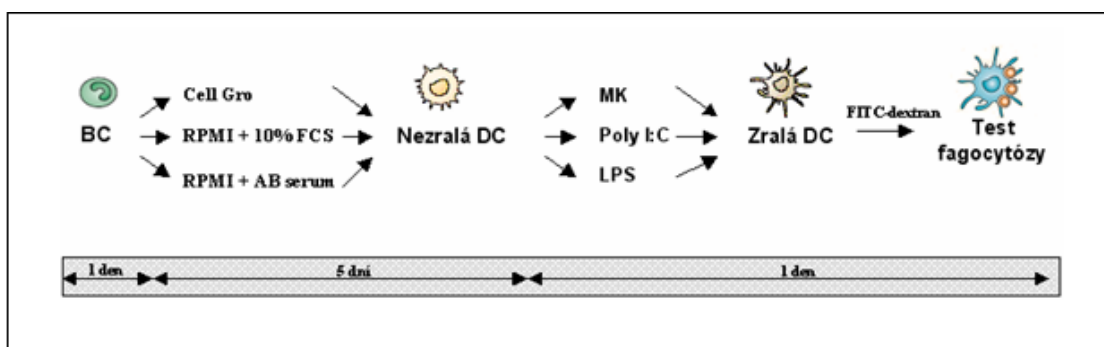


**Obr. 11: Cytofluorometrická analýza exprese kostimulačních molekul a povrchových molekul: CD80, CD83, CD86, CD14 a HLA-DR na povrchu zralých dendritických buněk. Šedě znázorněné histogramy odpovídají fluorescenci buněk kultivovaných v médiu bez maturačního signálu. Černě znázorněné histogramy odpovídají buňkám kultivovaným s příslušným maturačním signálem (Poly I:C, MK, LPS).**

## 4.3 Funkční charakteristika připravených DC

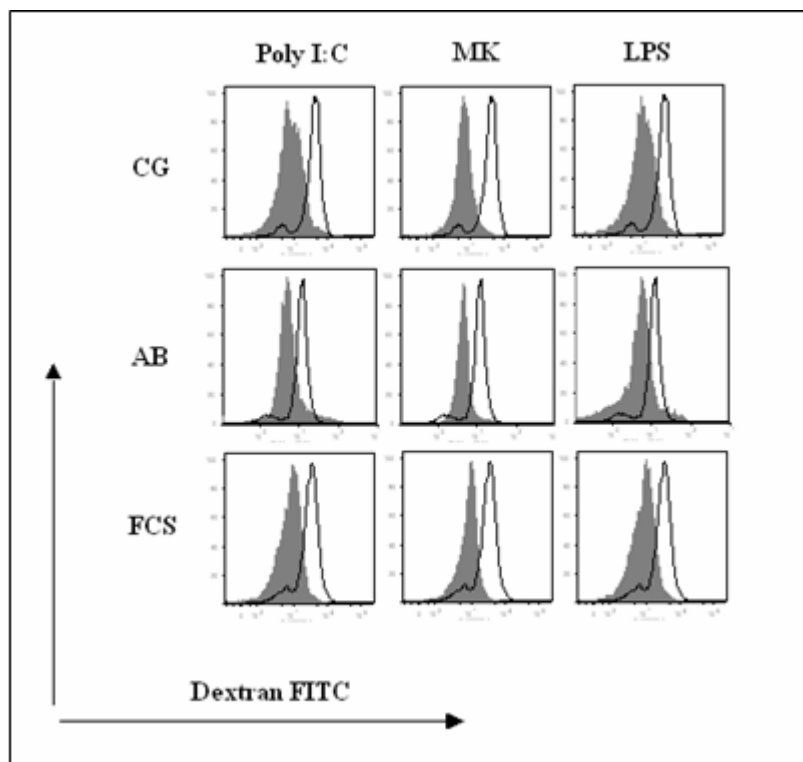
### 4.3.1 Schopnost fagocytózy

Jak je zmíněno v úvodu mé práce, nezralé dendritické buňky jsou schopné fagocytovat antigenní částice. Jednoduchým funkčním testem je test fagocytózy, kdy nezralé DC ochotně pohlcují částice dextranu, značené fluorescein isothiokyanátem. Takto značené částice dextranu fagocytované nezralou dendritickou buňkou jsou následně detekovány pomocí cytofluorometrické analýzy. Naopak zralé DC, které ztratily schopnost fagocytózy nejsou schopné dextranové částice pohltnout.



**Obr.12: Schéma pokusu.** Periferní mononukleární buňky z buffy coatu (BC) byly izolovány pomocí gradientové centrifugace. Po 2 hodinové adherenci na dno kultivační destičky byly separovány monocyty, které se v médiu (Cell Gro, RPMI+10% FCS, RPMI+5% AB serum) obohaceném IL-4 a GM-CSF diferencovaly na nezralé DC. Nezralé DC byly maturovány pomocí maturačních signálů (MK, Poly I:C, LPS). K takto připraveným buňkám byly přidány molekuly dextranu značené fluorescein isothiokyanátem.

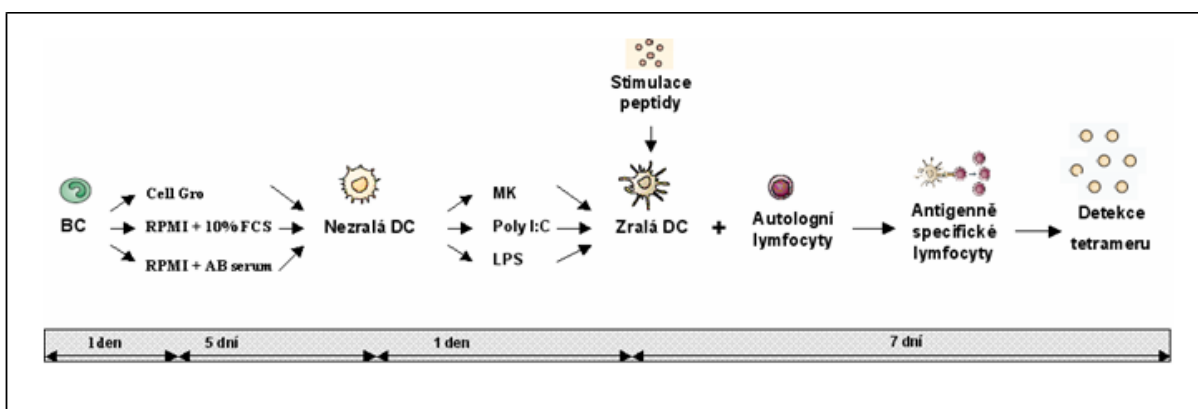
Výsledky pokusu jsou shrnuty na obr. 13. U nezralých dendritických buněk (černý histogram) schopných fagocytovat částice dextranu, značených fluorescein isothiokyanátem, dochází k posunu intenzity fluorescence k pozitivním hodnotám. Naopak u zralých dendritických buněk (šedý histogram), které nejsou schopny pohltnout cizorodé antigenní částice, nedochází ke změně intenzity fluorescence.



**Obr.13: Cytofluorometrická analýza molekuly dextranu značené fluorescein isothiokyanátem.** Šedé histogramy odpovídají fluorescenci zralých dendritických buněk. Černě označené histogramy odpovídají fluorescenci nezralých dendritických buněk. Histogramy znázorněné na obrázku odpovídají buňkám inkubovaným v médiích (CG – Cell Gro, AB – RPMI+5%AB serum, FCS – RPMI+10%FCS) a maturovaných pomocí jednotlivých maturačních signálů (Poly I:C, MK, LPS).

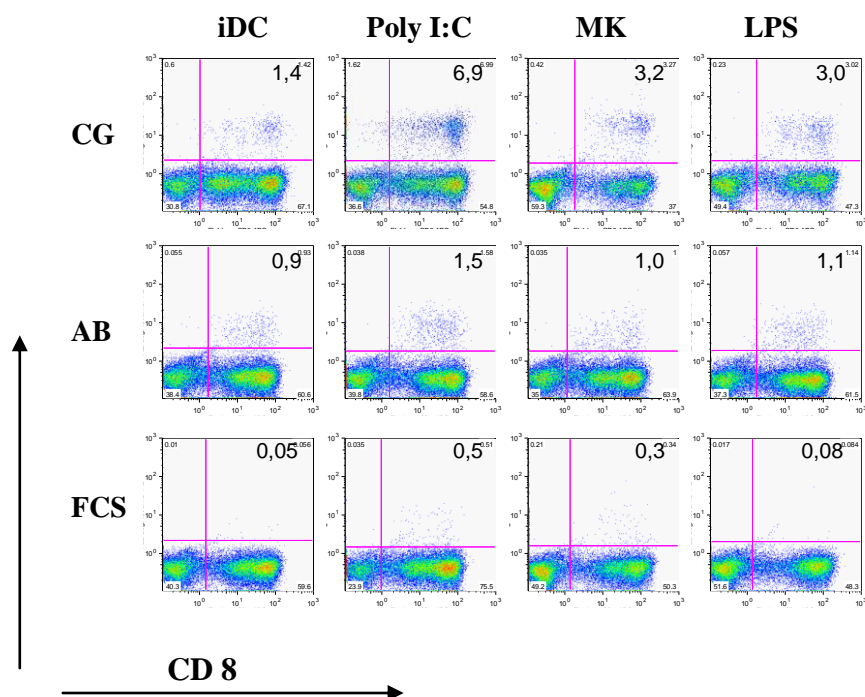
### 4.3.2 Analýza schopnosti dendritických buněk indukovat antigen specifické T lymfocyty pomocí tetramerů HLA I. třídy

Významným úkolem zralých dendritických buněk je indukce antigen specifických T lymfocytů. Jakmile dendritická buňka projde procesem maturace, putuje do lymfatických uzlin, kde prezentuje peptidy na MHC molekulách přítomným naivním T lymfocytům. Tímto způsobem vznikají antigen specifické lymfocyty, které zahajují specifickou imunitní odpověď. Pomocí značení HLA tetramerů I. třídy jsme schopni detekovat populaci T lymfocytů specifických pro určitý epitop.



Obr. 14: Schéma pokusu

Zralé dendritické buňky maturované pomocí porovnávaných maturačních signálů byly 7 dní kultivovány s autologními lymfocyty. Detekce T lymfocytů specifických pro influenza MP peptid byla provedena sedmý den, kdy byl k buňkám přidán HLA-A2 tetramer s navázaným influenza peptidem. HLA-A2 tetramer se váže na T buněčný receptor lymfocytů specifických pro testovaný peptid, kterým byl v našem případě modelově zvolený peptid chřipky. Tento test slouží k detekci frekvence antigen specifických T lymfocytů.



**Obr.15: Analýza specifických T lymfocytů pomocí tetramerů HLA I. třídy.** Buňky byly kultivovány ve třech různých médiích (CG - Cell gro, AB - RPMI+5% AB serum, FCS - RPMI+10%FCS) a maturovány pomocí tří maturačních signálů (Poly I:C, MK a LPS).

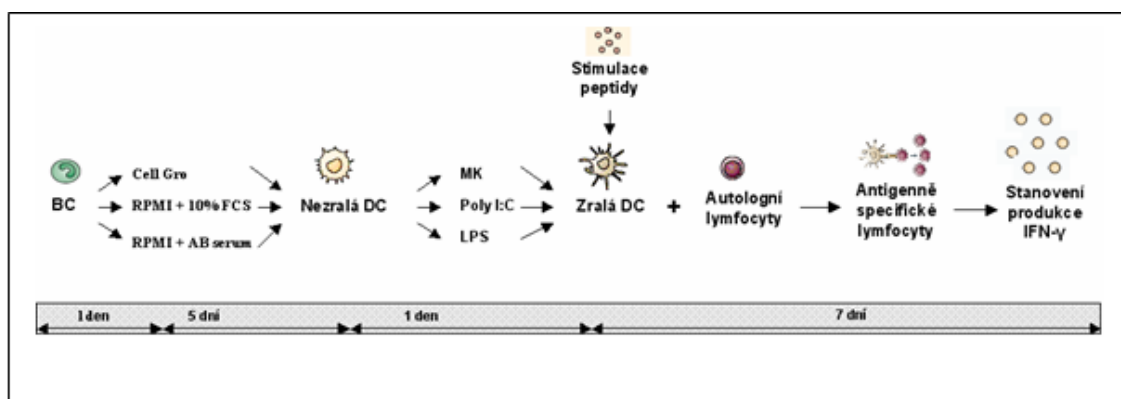
Výsledky na obrázku 15 ukazují, že zejména dendritické buňky aktivované pomocí Poly I:C a kultivované v médiu Cell Gro jsou nejúčinnější v aktivaci specifických influenza T lymfocytů. Naopak dendritické buňky připravené v médiu RPMI+FCS indukovaly nízkou tvorbu antigen specifických T lymfocytů.

### 4.3.3 Detekce produkce IFN- $\gamma$ antigeně specifickými T lymfocyty

Zralé dendritické buňky migrují do lymfatických uzlin, kde spouští imunitní odpověď kontaktem s přítomnými T buňkami, které jsou vybaveny specifickým receptorem pro komplex peptid-MHC na povrchu DC. V první fázi interakce mezi maturovanou DC a T lymfocyty dochází k mnoha krátkým kontaktům, tato fáze trvá max. čtyři hodiny. Ve fázi následující se vytváří stabilní kontakt mezi těmito buňkami. Rozpoznání komplexu MHC-peptid na DC specifickým receptorem na T lymfocytu (TCR) představuje „první signál“. „Druhým signálem“ je interakce mezi kostimulačními molekulami na DC (CD80, CD86) a jejich ligandy na T lymfocytech, bez které nedojde k aktivaci T lymfocytů. Po obdržení souboru signálů přes TCR, CD28, receptor pro IL-12 a další molekuly, se prekurzor  $T_H$  mění na efektorové  $T_{H1}$  buňky. Ty produkují především IFN- $\gamma$  a IL-2 (růstový faktor T buněk), jež stimulují další rozvíjení imunitní reakce (aktivace NK buněk, stimulace dalších T lymfocytů).

V předchozím pokusu jsme se pokusili dokázat, že fenotypicky zralé dendritické buňky jsou schopné indukovat vznik antigen specifických T lymfocytů. Významnou otázkou však zůstává, zda jsou tyto antigeně specifické T lymfocyty funkční. Tento fakt se dá nejnadhěji dokázat detekcí produkce IFN- $\gamma$  u těchto buněk.

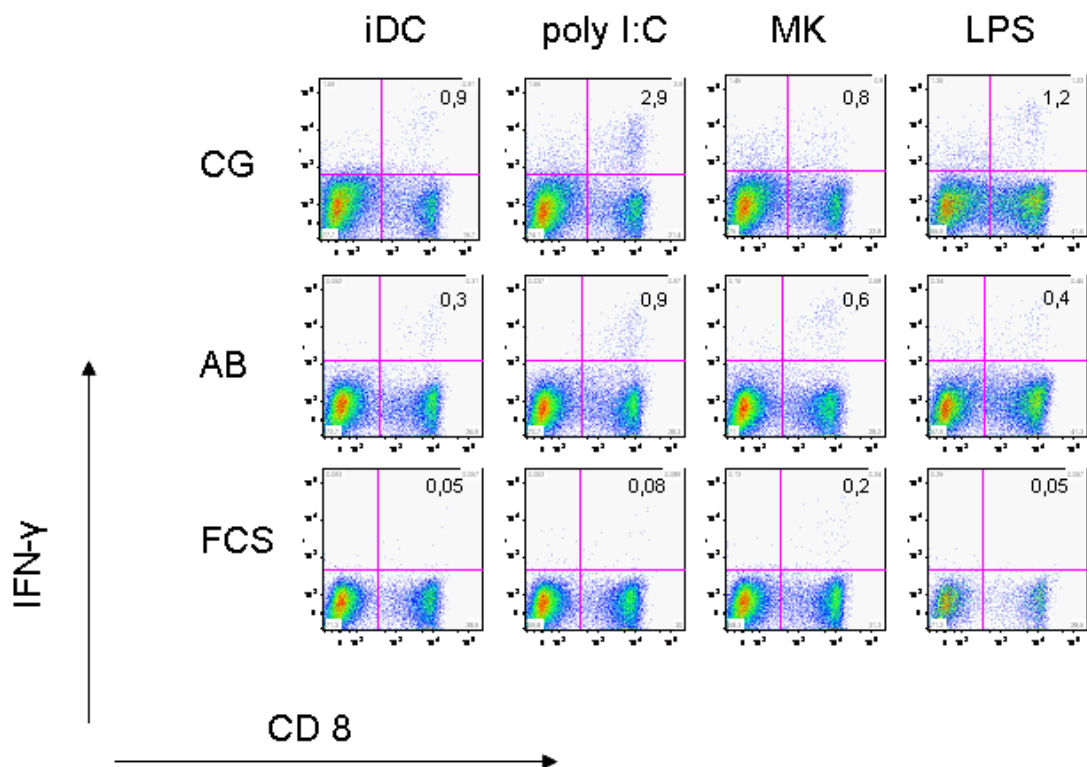
Zralé dendritické buňky byly 7 dní kultivovány s autologními T lymfocyty a následně byla detekována přítomnost IFN- $\gamma$  pomocí intracelulárního značení molekuly protilátkou anti-IFN- $\gamma$ . Molekula IFN- $\gamma$  byla detekována pomocí cytofluorometrické analýzy.



Obr. 16: Schéma pokusu



Z výsledků pokusu na obrázku 17 vyplývá, že dendritické buňky aktivované pomocí Poly I:C a kultivované v médiu Cell Gro indukují největší frekvenci IFN- $\gamma$  produkujících T lymfocytů. Naopak buňky kultivované v médiu RPMI+FCS nejsou schopné indukovat populaci IFN- $\gamma$  produkujících T lymfocytů.

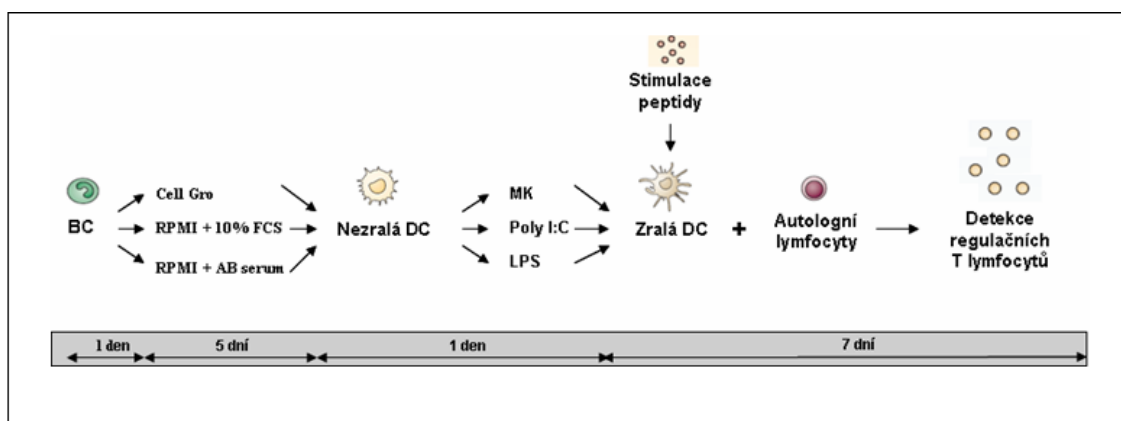


**Obr.17: Detekce produkce IFN- $\gamma$  antigeně specifickými T lymfocyty po stimulaci maturovanými DC.** Příprava DC probíhala ve třech kultivačních médiích (CG – Cell Gro, AB- RPMI+5% AB serum, FCS – RPMI+10%FCS). Maturace proběhla pomocí třech maturačních signálů (Poly I:C, MK, LPS).

#### 4.3.4 Zhodnocení schopnosti dendritických buněk, připravených různými protokoly, indukovat vznik regulačních T lymfocytů

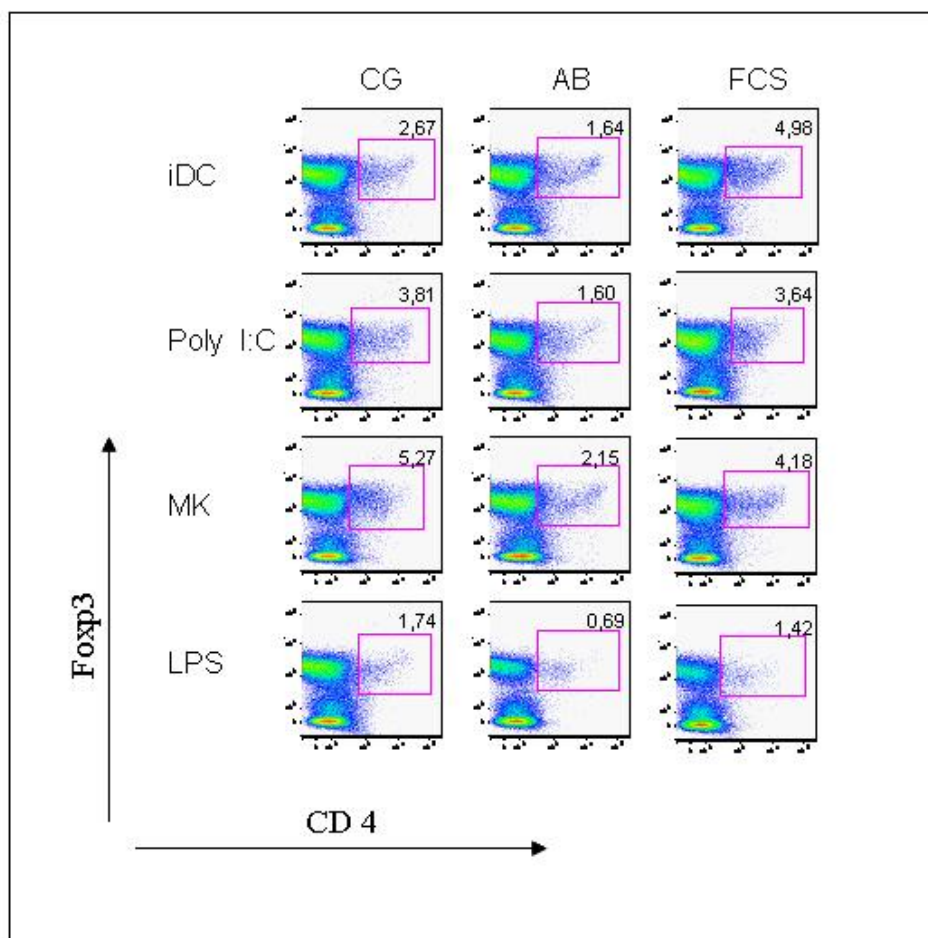
Jako regulační (supresorové) se označují T lymfocyty, které jsou schopny potlačit aktivitu jiných efektorových T lymfocytů. Z obrovského spektra těchto buněk jsou však nejlépe známy tzv. přirozené regulační  $CD4^+$  T lymfocyty (Treg), které se vyznačují expresí transkripčního faktoru FoxP3. Tyto buňky vznikají v thymu a nesou „autoreaktivní“ TCR, ale na rozdíl od jiných autoreaktivních T lymfocytů vlastní tkáň nejen nenapadají, ale naopak potlačují autoimunitní reakce. Mechanizmy jejich působení zahrnují zřejmě jednak produkci tlumivých cytokinů (IL-10, TGF- $\beta$ ), ale hlavně působí na jiné buňky (aktivované lymfocyty, DC) přímým kontaktem. Kromě těchto přirozených Treg, jejichž hlavní úlohou je zjevně zabezpečovat periferní toleranci a bránit vzniku autoimunitních onemocnění, existují ještě tzv. indukované regulační T lymfocyty. Ty vznikají v periferních tkáních při většině antigenně specifických reakcí až již  $T_{H1}$  či  $T_{H2}$  typu a působí zřejmě hlavně prostřednictvím sekretovaných tlumivých cytokinů. Tyto buňky mohou vznikat také po kontaktu T lymfocytů s některými nezralými DC. Indukované Treg pomáhají tlumit imunitní reakce a omezit jejich škodlivé imunopatologické dopady.

Zralé dendritické buňky připravené dle standardního protokolu (materiál a metody) byly stimulované směsí peptidů a kultivovány s autologními lymfocyty 7 dní. Po týdenní kultivaci byly pomocí průtokové cytometrie detekovány lymfocyty  $Foxp3^+ CD4^+ CD25^+$ .



Obr. 18: Schéma protokolu

Na obrázku 19 jsou uvedeny výsledky získané pomocí cytofluorometrické analýzy. Z histogramů vyplývá, že největší populace regulačních T lymfocytů je indukována dendritickými buňkami, které byly aktivovány směsí cytokinů. Dendritické buňky inkubované v Cell Gro a maturované směsí cytokinů indukují až 5% populaci FoxP3 pozitivních lymfocytů. Naopak dendritické buňky aktivované pomocí Poly I:C indukují vznik menších populací regulačních T lymfocytů.



**Obr. 19: Zhodnocení schopnosti dendritických buněk, připravených různými protokoly, indukovat vznik regulačních T lymfocytů.** Na obrázku jsou znázorněné histogramy odpovídající fluorescenci lymfocytů, které byly inkubovány s maturovanými dendritickými buňkami připravenými pomocí standardního protokolu v různých kulturačních médiích. Fialovým obdelníkem je v obrázku označena populace Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> lymfocytů.

## **5 DISKUZE**

Dlouhodobým úkolem výzkumných projektů na našem pracovišti je vývoj protokolu pro přípravu protinádorové vakcíny pro imunoterapii karcinomu ovaria za podmínek správné výrobní praxe.<sup>27,28</sup> Tento protokol je nezbytný pro zahájení klinických studií, které zaručují přípravu vakcíny za podmínek správné výrobní praxe podle požadavků Státního ústavu pro kontrolu léčiv. Pro tento účel je třeba připravit dendritické buňky za podmínek GMP kvality. V rámci tohoto rozsáhlého projektu jsem se ve své práci zaměřila na charakterizaci optimálního maturačního stimulu, který zaručí optimální aktivaci antigen specifických T lymfocytů. Mezi porovnávanými maturačními signály byly dva TLR ligandy, Poly I:C, LPS a směs cytokinů.

Druhým úkolem byla definice optimálního kultivačního média pro přípravu zralých dendritických buněk, neboť právě fenotypicky i funkčně maturovaná dendritická buňka je schopná zahájit imunitní odpověď. Zvolili jsme dvě média použitelná v GMP podmínkách, Cell Gro a RPMI+AB sérum. Médium RPMI+FCS se používá běžně k maturaci dendritických buněk v in vitro pokusech, ale jako sérové médium není vhodné pro použití v GMP podmínkách, v této práci jej uvádím jako kontrolu.<sup>36</sup>

Tento cíl byl studován v několika krocích tak, aby byly zhodnoceny všechny parametry, které musí protinádorová vakcína založená na dendritických buňkách splňovat. Připravené dendritické buňky jsme charakterizovali z morfologického, fenotypického a funkčního hlediska.

Nejprve jsme se zaměřili na morfologickou charakterizaci připravených DC. Po subkutánním podání vakcíny do těla pacienta se pouze 40% dendritických buněk dostává ke svému cíli, k lymfatické uzlině, kde zahajuje buněčný kontakt s naivními T lymfocyty.<sup>8,37,38</sup> Z tohoto důvodu je pro přípravu optimální protinádorové vakcíny třeba získat dostatečný počet zralých dendritických buněk, které tvoří vlastní vakcínu aplikovanou pacientovi. Největší četnost adherence byla zaznamenána u buněk kultivovaných v Cell Gro (obr. 8). Tyto výsledky jsou také v souladu s množstvím nezralých dendritických buněk, které získáme po pětidenní kultivaci adheovaných monocytů v kultivačním médiu (obr. 9). Největší počet nezralých DC byl získán při kultivaci monocytů v médiu Cell Gro. Naopak nejméně nezralých DC bylo získáno po kultivaci monocytů v RPMI+FCS.

Dalším významným úkolem bylo dokázat, že dendritické buňky připravené v jednotlivých médiích a aktivované pomocí porovnávaných maturačních signálů jsou fenotypicky maturované. Jedině maturovaná dendritická buňka exprimující na svém povrchu kostimulační molekuly je schopná komunikovat s naivními T lymfocyty a indukovat imunitní odpověď. K ověření exprese kostimulačních molekul (CD80, CD83 a CD86) a povrchových molekul maturovaných buněk byla použita cytofluorometrická analýza. Výsledky ukazují, že dendritické buňky aktivované směsí cytokinů, LPS i Poly I:C indukují u všech typů DC fenotypické změny spojené s maturací (obr.11). Opakovaně dochází u zralých dendritických buněk ke zvýšení exprese kostimulačních molekul CD80, CD83 a CD86, což je jasný ukazatel maturovaných dendritických buněk. Naopak dochází ke snížení exprese molekuly CD14, povrchového znaku monocytů, což dokazuje, že dochází k přeměně monocytů na dendritické buňky. Zároveň dochází ke zvýšení exprese molekuly HLA-DR, jakožto charakteristického znaku zralých dendritických buněk.

Naopak dendritické buňky kultivované v médiu Cell gro a maturované pomocí LPS neexprimují kostimulační molekuly ani u nich nedochází k posunu exprese povrchové molekuly CD14. Tento jev je dán tím, že v médiu Cell gro není přítomný lipopolysacharid-binding-protein, bez kterého ztrácí LPS schopnost se vázat na dendritické buňky a maturovat je.

Zralá dendritická buňka exprimuje na svém povrchu celou řadu kostimulačních a povrchových molekul. Zároveň produkuje řadu cytokinů a v neposlední řadě ztrácí schopnost fagocytózy. Z tohoto důvodu jsme maturované dendritické buňky podrobily jednoduchému funkčnímu testu. Hodnotili jsme schopnost fagocytózy antigenních částic v kultuře zralých a nezralých buněk. Nezralá dendritická buňka je profesionální antigen prezentující buňka schopná fagocytovat antigenní částice ve svém okolí. Naopak zralá dendritická buňka tuto schopnost ztrácí. Tímto testem jsme dokázali, že dendritické buňky jsou skutečně maturované, protože ztratily schopnost fagocytovat fluorescenčně značené částice dextranu.

Naopak nezralé dendritické buňky, které tuto schopnost neztratily, velice ochotně pohlcovaly částice dextranu, čímž docházelo k posunu intenzity fluorescence k pozitivním hodnotám, jak ukazují výsledky cytofluorometrické analýzy (obr. 13).

Jak již bylo zmíněno v mé práci, dendritické buňky jsou jediné antigen prezentující buňky schopné aktivovat naivní T lymfocyty. Aby byly schopné aktivovat imunitní odpověď musí dendritické buňky projít procesem maturace. V předchozích pokusech jsme dokázali, že námi připravené zralé dendritické buňky jsou fenotypicky maturované. Dalším důležitým úkolem bylo dokázat, že fenotypicky zralé dendritické buňky jsou schopné indukovat vznik antigen specifických T lymfocytů.

K tomuto účelu byl použit HLA-A2 tetramer, který se váže na T buněčné receptory lymfocytů, jež jsou specifické pro testovaný peptid, kterým byl v našem případě modelově zvolený peptid influenza MP. Jak je patrné z obrázku 15, největší frekvence antigeně specifických T lymfocytů byla detekována při použití Poly I:C jako maturačního signálu u dendritických buněk maturovaných v Cell Gro. Takto připravené dendritické buňky byly schopné indukovat největší populaci antigen specifických T lymfocytů. Naopak dendritické buňky kultivované v RPMI+FCS nebyly schopné indukovat antigeně specifickou populaci T lymfocytů.

Během procesu iniciace imunitní odpovědi se v lymfatické uzlině setkává zralá dendritická buňka s naivním T lymfocyt. „Prvním signálem“ v jejich komunikaci je rozpoznání komplexu MHC-peptid na povrchu DC specifickým receptorem na T lymfocytu (TCR). Následuje tzv. „druhý signál“, kterým je interakce mezi kostimulačními molekulami na DC a jejich ligandy na T lymfocytech. Po obdržení celé řady signálů se prekurzová T buňka mění na efektorovou T buňku. Charakteristickým funkčním znakem takové buňky je produkce IFN- $\gamma$ . Proto bylo dalším cílem dokázat, že antigeně specifické T lymfocyty jsou plně funkční a schopné produkovat IFN- $\gamma$ .

K tomuto účelu bylo použito intracelulární značení IFN- $\gamma$  detekované pomocí cytofluorometrické analýzy. Po sedmidenní kultivaci autologních lymfocytů se zralými dendritickými buňkami byla největší frekvence IFN- $\gamma$  produkujících buněk detekována při použití Poly I:C jako maturačního signálu u dendritických buněk maturovaných v Cell Gro. Naopak dendritické buňky kultivované v RPMI+FCS indukovaly velmi nízké procento IFN- $\gamma$  pozitivních T lymfocytů.

Významnou populací T lymfocytů jsou tzv. regulační T lymfocyty. Hlavním úkolem těchto buněk v imunitním systému je zabezpečování periferní tolerance a ochrana jedince před vznikem autoimunitních onemocnění. Zároveň však tato populace T lymfocytů inhibuje vznik imunitní odpovědi, a proto je jejich indukce dendritickými buňkami v protinádorovém protokolu krajně nežádoucí. V celé řadě prací bylo prokázáno, že u nádorových onemocnění s vysokým výskytem regulačních T lymfocytů je špatná prognóza protinádorové léčby.<sup>39,40</sup> Z tohoto důvodu jsme se při vývoji protinádorového protokolu zaměřili na detekci populací regulačních T lymfocytů.

V rámci posledního funkčního testu jsme hodnotili schopnost zralých dendritických buněk indukovat vznik regulačních T lymfocytů. V experimentu bylo zjištěno, že DC aktivované směsí cytokinů indukovaly velkou populaci regulačních T lymfocytů.<sup>41-44</sup> Naopak dendritické buňky aktivované pomocí TLR ligandů, Poly I:C a LPS, indukují srovnatelně menší populaci regulačních T lymfocytů, jak je patrné z obrázku 19.



## **6 ZÁVĚR**

V rámci zahájené klinické imunoterapeutické studie u pacientek s karcinomem ovaria jsem ve své práci charakterizovala optimální podmínky pro výrobu protinádorové vakcíny za podmínek správné výrobní praxe.

Cílem mé práce bylo definovat optimální kultivační média a maturační signály pro přípravu protinádorové vakcíny založené na dendritických buňkách za podmínek správné výrobní praxe.

Největší počet nezralých DC byl získán při kultivaci monocytů v médiu Cell Gro. Kultivace monocytů v RPMI+10% FCS a v RPMI+5% AB séru 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, jak bylo dokázáno pomocí průtokové cytometrie. Dále bylo třeba dokázat, že fenotypicky maturované dendritické buňky jsou zároveň funkční a jsou schopné indukovat specifické T lymfocyty. Dendritické buňky inkubované v médiu Cell Gro a maturované pomocí Poly I:C byly schopné indukovat největší populaci antigen specifických T lymfocytů. V souladu s tímto tvrzením byly DC buňky aktivované Poly I:C účinnější v aktivaci specifických T lymfocytů produkujících IFN- $\gamma$ . Zajímavým zjištěním bylo, že DC aktivované směsí cytokinů indukovaly více regulačních T lymfocytů, které suprimují imunitní reakci.

Z těchto závěrů vyplývá, že pro použití v klinických imunoterapeutických studiích se jako optimální 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.

## **7 SOUHRN**

## **Generation of clinical-grade dendritic cell-based vaccine for immunotherapy of ovarian cancer**

**Introduction:** Dendritic cells (DCs) are the most potent antigen presenting cells. Recent technological advances allow for generation of large numbers of DCs from peripheral blood monocytes. Administration of activated DCs loaded with tumor antigens is thus an attractive approach for immunotherapy of cancer. Prerequisite for the initiation of clinical trials in cancer immunotherapy is the development of protocols for DC-based vaccine generation according to Good Manufacturing Practice (GMP) conditions.

**Aim of the study:** Development of protocol for the generation of clinical grade vaccine based on activated DCs loaded with killed tumor cells for use in the immunotherapy of ovarian cancer.

**Materials and methods:** Immature DCs were generated from peripheral blood monocytes of healthy donors. We tested Cell Gro and RPMI+5% pooled human serum (5% PHS) as clinical grade culture media. Immature DCs were then activated by three distinct stimuli (Poly I:C, LPS and cocktail of proinflammatory cytokines (TNF, IL-1 and IL-6)). Activated DCs were evaluated for their phenotypic and functional characteristics and for their capacity to activate antigen specific and/or regulatory T cells.

**Results:** Culture of monocytes in Cell Gro yielded highest numbers of immature DCs. Stimulation with Poly I:C, LPS and cytokines mixture induced comparable phenotypic maturation. However, only Poly I:C and LPS activated DCs produced proinflammatory cytokines. In accordance with this finding Poly I:C and LPS were more efficient in inducing antigen specific T cells. Interestingly, cytokines activated DCs induced more regulatory T cells. There was no difference between the two tested media in the induction of antigen specific T cells.

**Conclusions:** Generation of immature DCs in serum free Cell Gro media followed by Poly I:C activation is an optimal combination for generation of DCs with high capacity to stimulate antigen specific T cells. DCs activated by cocktail of proinflammatory cytokines induce higher frequencies of regulatory T cells. This protocol was approved for clinical use by the Czech Drug Agency.

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

## **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

## **8 POUŽITÁ LITERATURA**

1. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392:245-252.
2. Steinman RM, Bonifaz L, Fujii S, et al. The innate functions of dendritic cells in peripheral lymphoid tissues. *Adv Exp Med Biol*. 2005;560:83-97.
3. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.
4. Steinman RM. Dendritic cells: versatile controllers of the immune system. *Nat Med*. 2007;13:1155-1159.
5. Steinman RM, Adams JC, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. *J Exp Med*. 1975;141:804-820.
6. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973;137:1142-1162.
7. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med*. 1974;139:380-397.
8. Romani N, Reider D, Heuer M, et al. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods*. 1996;196:137-151.
9. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 1994;179:1109-1118.
10. Janeway CA, Jr., Goodnow CC, Medzhitov R. Danger - pathogen on the premises! Immunological tolerance. *Curr Biol*. 1996;6:519-522.
11. Medzhitov R, Janeway C, Jr. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol*. 2000;8:452-456.
12. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*. 2000;173:89-97.
13. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. How does the immune system distinguish self from nonself? *Semin Immunol*. 2000;12:185-188; discussion 257-344.

14. Inaba K, Turley S, Iyoda T, et al. The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med*. 2000;191:927-936.
15. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*. 2001;106:255-258.
16. Dhodapkar KM, Kaufman JL, Ehlers M, et al. Selective blockade of inhibitory Fcγ receptor enables human dendritic cell maturation with IL-12p70 production and immunity to antibody-coated tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:2910-2915.
17. Josien R, Li HL, Ingulli E, et al. TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo. *J Exp Med*. 2000;191:495-502.
18. Matzinger P. An innate sense of danger. *Semin Immunol*. 1998;10:399-415.
19. Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4<sup>+</sup> T-helper and a T-killer cell. *Nature*. 1998;393:474-478.
20. Granucci F, Vizzardelli C, Pavelka N, et al. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol*. 2001;2:882-888.
21. Granucci F, Vizzardelli C, Virzi E, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P. Transcriptional reprogramming of dendritic cells by differentiation stimuli. *Eur J Immunol*. 2001;31:2539-2546.
22. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;401:708-712.
23. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science*. 1997;277:2005-2007.
24. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med*. 1995;182:389-400.
25. Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science*. 2003;299:1033-1036.
26. Steinman RM, Dhodapkar M. Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future. *Int J Cancer*. 2001;94:459-473.



27. Spisek R, Chevallier P, Morineau N, et al. Induction of leukemia-specific cytotoxic response by cross-presentation of late-apoptotic leukemic blasts by autologous dendritic cells of nonleukemic origin. *Cancer Res.* 2002;62:2861-2868.
28. Tobiasova Z, Pospisilova D, Miller AM, et al. In vitro assessment of dendritic cells pulsed with apoptotic tumor cells as a vaccine for ovarian cancer patients. *Clin Immunol.* 2007;122:18-27.
29. Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, et al. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res.* 2001;61:6451-6458.
30. Brossart P. Dendritic cells in vaccination therapies of malignant diseases. *Transfus Apher Sci.* 2002;27:183-186.
31. Nencioni A, Brossart P. Cellular immunotherapy with dendritic cells in cancer: current status. *Stem Cells.* 2004;22:501-513.
32. Timmerman JM, Czerwinski DK, Davis TA, et al. Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood.* 2002;99:1517-1526.
33. Weng WK, Czerwinski D, Timmerman J, Hsu FJ, Levy R. Clinical outcome of lymphoma patients after idiotype vaccination is correlated with humoral immune response and immunoglobulin G Fc receptor genotype. *J Clin Oncol.* 2004;22:4717-4724.
34. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4:330-336.
35. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, et al. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature.* 2007;445:771-775.
36. Spisek R. Immunoprevention of cancer: time to reconsider timing of vaccination against cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2006;6:1689-1691.
37. Lanzavecchia A, Sallusto F. Lead and follow: the dance of the dendritic cell and T cell. *Nat Immunol.* 2004;5:1201-1202.
38. Lollini PL, Cavallo F, Nanni P, Forni G. Vaccines for tumour prevention. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:204-216.
39. Pardoll DM. Cancer vaccines. *Nat Med.* 1998;4:525-531.
40. Wang X, Yu J, Sreekumar A, et al. Autoantibody signatures in prostate cancer. *N Engl J Med.* 2005;353:1224-1235.

41. Dhodapkar KM, Dhodapkar MV. Recruiting dendritic cells to improve antibody therapy of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:6243-6244.
42. Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:476-483.
43. Sporri R, Reis e Sousa C. Newly activated T cells promote maturation of bystander dendritic cells but not IL-12 production. *J Immunol*. 2003;171:6406-6413.
44. Sporri R, Reis e Sousa C. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4<sup>+</sup> T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol*. 2005;6:163-170.

## **9 PŘÍLOHY – PUBLIKACE AUTORKY**