

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

Mgr. Jana Fučíková

**TERAPEUTICKÝ POSTUP POUŽÍVAJÍCÍ DNA VAKCINACI K LÉČBĚ
AKUTNÍ PROMYELOCYTÁRNÍ LEUKEMIE - MYŠÍ MODEL**

Rigorózní práce


Vedoucí rigorózní práce: Doc. RNDr. Vladimír Semecký

Školitel specialista: Dr. Marika Pla

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Vladimír Semecký

listopad 2006

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


Mgr. Jana Fučíková

Za zasvěcení do problematiky, odbornou pomoc a především všechen věnovaný čas děkuji Dr. Marice Pla.

Obsah:

1.	SEZNAM NEJČASTĚJI UŽÍVANÝCH ZKRATEK	6
2.	ÚVOD	8
2.1.	PROTINÁDOROVÁ IMUNITA	9
2.1.1.	Nádorové antigeny	9
2.1.2.	Mechanismy protinádorové imunity	11
2.2.	GENOVÁ TERAPIE NÁDORŮ	12
2.2.1.	Imunologický přístup	13
2.2.1.1.	Zlepšení antigen prezentující funkce nádorových buněk.....	13
2.2.1.2.	Buněčné vakcíny	15
2.2.1.3.	Genové vakcíny.....	15
2.2.2.	Molekulární přístup.....	16
2.2.2.1.	Tumor supresorové geny.....	16
2.2.2.2.	Antionkogeny.....	17
2.2.2.3.	Sebevražedné geny.....	17
2.2.2.4.	Další molekulární přístupy.....	18
2.3.	GENOVÁ VAKCÍNA	19
2.3.1.	Genová protinádorová vakcína	19
2.3.2.	Vektory.....	20
2.3.2.1.	Polynukleotidové vektory	20
2.3.2.2.	Virové vektory	21
2.4.	EXPERIMENTÁLNÍ MODEL.....	23
2.4.1.	Akutní myeloidní leukemie.....	23
2.4.2.	Akutní promyelocytární leukémie	26
2.4.3.	Transgenní model.....	28
2.4.4.	Transplantační model.....	30
2.5.	CÍL PRÁCE	31
3.	MATERIÁL A METODY	33
3.1.	MATERIÁL	34
3.1.1.	Myši	34
3.1.2.	Protilátky.....	34
3.1.3.	Vakcína	35
3.1.4.	APL buňky	35

3.2.	METODY.....	35
3.2.1.	DNA vakcinační protokol	35
3.2.2.	Buněčný vakcinační protokol.....	35
3.2.3.	Aplikace ATRA	36
3.2.4.	Hodnocení buněčné odpovědi	36
3.2.5.	Sledování přežití myší.....	36
3.2.6.	ELISA	36
4.	VÝSLEDKY	38
4.1.	IMUNITNÍ ODPOVĚĎ VYVOLANÁ APL BUŇKAMI.....	39
4.2.	POUŽITÍ DNA VAKCÍNY K PREVENCI APL	42
4.3.	APLIKACE NA MODELU KLINICKÉ SITUACE-ZABRÁNĚNÍ RELAPSU	44
4.4.	STUDIUM MECHANISMŮ DNA VAKCINACE.....	51
5.	DISKUSE.....	54
5.1.	PŘÍPRAVA EXPERIMENTÁLNÍHO MODELU	55
5.2.	ÚLOHA IMUNITNÍHO SYSTÉMU V LÉČBĚ APL	56
5.3.	IMUNITNÍ ODPOVĚĎ VYVOLANÁ APL BUŇKAMI.....	57
5.4.	POUŽITÍ DNA VAKCÍNY U EXPERIMENTÁLNÍHO MODELU	58
5.5.	MECHANISMY PŮSOBNÍ VAKCÍNY	59
6.	ZÁVĚR	62
7.	POUŽITÁ LITERATURA	64

1. SEZNAM NEJČASTĚJI UŽÍVANÝCH ZKRATEK

TSA	Tumor Specific Antigen	antigen specifický pro nádory
TAA	Tumor Associated Antigen	antigen asociovaný s nádory
MHC	Major Histocompatibility Complex	Hlavní histokompatibilní systém
AML		akutní myeloidní leukemie
APL		akutní promyelocytární leukemie
PML	Promyelocytic Leukemia gene	gen PML
RAR α		gen pro α receptor pro kyselinu retinovou
FrC		tetanový fragment C
Jedinec FVB/N		myš kmene FVB/N
Jedinec B6C3H		myš kmene C57Bl/6XC3H
Jedinec B6		myš kmene C57Bl/6
ATRA	all-trans retinoic acid	kyselina all-trans retinová

2. ÚVOD

2.1. PROTINÁDOROVÁ IMUNITA

K maligní transformaci buňky může dojít mnoha způsoby, například následkem poruchy mechanismů regulace buněčného dělení nebo poruchy regulace „sociálního chování“ buněk. Takové poruchy jsou většinou vyvolané mutacemi v takzvaných onkogenech nebo antionkogenech. Tyto geny v nemutované podobě kódují buněčné proteiny, například proteinkinázy (signalizační proteiny), transkripční faktory nebo proteiny důležité pro buněčnou adhezivitu nebo apoptozu. Mutantní formy těchto proteinů mohou mít například abnormálně zvýšenou (produkty onkogenů) nebo sníženou (produkty antionkogenů) aktivitu. Změna aktivity může vést k nekontrolovatelnému buněčnému dělení a k úniku takto vzniklých buněk z dané tkáňové lokalizace, jejich diseminaci do jiných tkání, ve kterých se pak agresivně množí.

Vzhledem k tomu, že nádorové buňky se více nebo méně liší od normálních buněk, ze kterých vznikly, imunitní systém by je teoreticky měl rozpoznat a odstranit. Odlišnost od normálních buněk je však v některých případech tak malá, že jsou imunitním systémem ignorovány. Nádorové buňky také používají mechanismy, které jim umožňují paralyzovat některé mechanismy imunitního systému.

2.1.1. Nádorové antigeny

Základním předpokladem reakce imunitního systému s nádorovými buňkami je existence nádorově specifických povrchových antigenů, které umožňují imunitnímu systému jejich rozpoznání. Záslouhou mnohaletého výzkumu byly identifikovány dvě kategorie nádorových antigenů:

- (i) antigeny specifické pro nádory
- (ii) antigeny asociované s nádory

K antigenům specifickým pro nádory (TSA) se řadí proteiny, které se na normálních buňkách nevyskytují. Jsou to například komplexy MHC molekul s abnormálními fragmenty buněčných proteinů (produkty mutovaných genů, respektive produkty abnormálního štěpení normálních

proteinů v nádorové buňce). Takové TSA jsou typické pro chemicky (například methylcholantrenem) indukované nádory a pro některé leukemie asociované s chromozomálními translokacemi, které produkují specificky abnormální (fúzní) protein (například protein Bcr/Abl nebo PML/RAR α). U nádorů vyvolaných onkogenními viry to mohou být komplexy MHC molekul s fragmenty proteinů pocházejících z těchto virů, jako např. polyoma virus SV40 nebo EBV. TSA mohou být též abnormální formy glykoproteinů. Glykosilace, zejména sialylace povrchových proteinů je u mnohých nádorových buněk odlišná od buněk normálních. K TSA se řadí též idiotypy přítomné na myelomech (odvozených od B lymfocytů) a lymfomech (odvozených od T lymfocytů). Tyto druhy nádorových buněk mají na povrchu klonotypické B nebo T receptory, jejichž vazebná místa představují unikátní antigenní struktury.

TAA nejsou výlučně specifické pro nádorové buňky, ale nacházejí se i na některých normálních buňkách. Odlišnost spočívá v kvantitě exprese nebo v abnormální časové či tkáňové expresi. Velmi často jsou TAA využívány jako pomocné diagnostické znaky. Mezi TAA patří například onkofetální proteiny přítomné v normálních embryonálních buňkách. V postnatálním období mizí a jsou přítomny pouze v některých nádorových buňkách. Patří sem α -fetoprotein sekretovaný hepatomy a karcinoembryonální antigeny produkované buňkami karcinomu tlustého střeva. Mezi TAA patří též melanomové antigeny (např. *MAGE-1*, *Melan-A*), které jsou silně exprimovány na melanomových buňkách, v menším množství na normálních melanocytech nebo jiných buňkách (např. testikulární tkáň). Antigen *HER2/neu* je dalším příkladem TAA. Jde o receptor růstového faktoru epiteliálních buněk, který je v malém množství přítomen na normálních epiteliálních buňkách. Je však silně exprimován na buňkách některých karcinomů mléčné žlázy. Podobně adhezivní molekula epiteliálních buněk *EPCAM*, další příklad TAA, je silně exprimována na metastázích karcinomů. Diferenciační antigeny leukemických buněk jsou přítomny na normálních buňkách vývojové řady leukocytů v těch diferenciačních stádiích, z nichž jsou leukemické buňky odvozeny. Nejznámější je povrchový antigen akutních lymfoblastických leukemií *CALLA (CD10)*, typický antigen pre B buněk.

2.1.2. Mechanismy protinádorové imunity

Vzhledem k tomu, že maligní buňka pochází z buňky normální, sdílí s ní většinu povrchových antigenů, ke kterým byla během života jedince vyvolána imunologická tolerance.

Klasickým pojmem nádorové imunity je takzvaný imunitní dozor na základě kterého jsou nádorově transformované buňky běžně vznikající ve tkáních eliminovány imunitním systémem, zejména T lymfocyty. Podle této hypotézy klinicky pozorovatelné nádory vznikají únikem velmi malého počtu buněk imunitnímu dozoru. Tato hypotéza se ukázala jako v zásadě nesprávná, protože incidence spontánních nádorů je u jedinců s poruchami funkce T lymfocytů prakticky normální. Je však možné, že na imunitním dozoru se u takových nádorů podílejí hlavně NK buňky nebo jiné složky antigenně nespecifických obranných mechanismů. U imunodeficitních jedinců (pacientů nebo experimentálních modelů) však bývá velmi výrazně zvýšeno riziko nádorů vyvolaných virem. To naznačuje, že antigenně specifické imunitní mechanismy kontrolují tento druh nádoru, resp. spíše primární virová onemocnění, která se mohou v některých buňkách podílet na nádorových přeměnách.

Existují dva základní mechanismy, kterými se organismus brání cizím antigenům. První (humorální) zahrnuje protilátky, které jsou sekretovány B buňkami po aktivaci jejich membránových receptorů (BCR) navázáním antigenu. Protilátky jsou solubilní proteiny, cirkulující v krvi a po setkání s antigenem jsou schopny se s ním specificky vázat. Druhý mechanismus je reprezentován T buňkami. T buňky rozeznávají komplexy MHC molekul s antigenními peptidy a mohou zprostředkovat různé imunitní odpovědi včetně cytotoxické. V případě, že nádorové antigeny jsou intracelulární [37], peptidy pocházející z těchto antigenů jsou prezentovány pomocí MHC molekul na buněčném povrchu nádorových buněk. V tomto případě T buňkami zprostředkovaná odpověď je výraznější než odpověď humorální [38].

Do imunitní odpovědi proti nádorovým buňkám mohou být zapojeny v zásadě všechny hlavní imunitní mechanismy: nespecifické (neutrofilní granulocyty, aktivované makrofágy, NK buňky) i antigenně specifické (protilátky aktivující komplement nebo zprostředkují reakci ADCC, Th1, Th2 a Tc buňky). Imunitní odpověď však není dostačující k odstranění všech

nádorových buněk. Navíc nádorové buňky disponují různými mechanismy, kterými se mohou imunitě vyhnout. Většina mechanismů úniku je analogická s únikovými mechanismy infekčních mikroorganismů. Nejdůležitější z nich jsou shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1: Nejdůležitější mechanismy úniku imunitnímu dozoru.

1. Nádorové buňky podléhají značné variabilitě; možnost vzniku mutantních forem, které ztratily nádorový antigen.
2. Snížená hustota exprese antigenů vede k tomu, že jsou buňky imunitním systémem ignorovány.
3. Sialylace povrchu nádorových buněk vede k zamaskování některých epitopů antigenů.
4. Nádorové buňky nefungují jako profesionální APC, protože jim chybí kostimulační molekuly (CD80, CD86). Prekurzory T _c nebo T _h , které na jejich povrchu rozeznávají nádorový antigen, jsou proto utlumeny místo aktivovány.
5. Některé protinádorové látky mají paradoxně stimulační účinek růstu nádoru (mechanismus není dobře znám).
6. Některé nádory produkují faktory inaktivující T lymfocyty.
7. Některé nádorové buňky exprimují na svém povrchu FasL. Pomocí této molekuly pak mohou indukovat v protinádorových T lymfocytech apoptozu.
8. Faktory produkované některými nádory přímo inhibují funkce nebo životnost dendritických buněk. Patří mezi ně oxid dusnatý, který indukuje apoptozu dendritických buněk, dále IL-10 a TGF- β inhibující jejich zrání, nebo vaskulární endotheliální růstový faktor (VEGF), který působí inhibičně na prekurzory dendritických buněk.

2.2. GENOVÁ TERAPIE NÁDORŮ

Genová terapie používá přenos genetického materiálu do pacientových buněk a jejím cílem je dodat geny s léčebnými účinky. Tuto metodu lze využít jak pro léčbu geneticky podmíněných chorob, tak pro léčbu infekčních onemocnění.

Intenzivní výzkumy v oblasti genové terapie začaly zhruba před patnácti lety a během následujících let byla provedena řada klinických studií. Z nich se 70% týkalo genové terapie nádorových onemocnění. Vzhledem ke komplexnímu charakteru tohoto onemocnění se k léčbě nabízí více strategií (Obr.1). V nejjednodušší podobě jde o nahrazení genu (který je poškozen nebo úplně chybí) genem novým. Zavedení nového genu pak vede k obnovení správné funkce buňky. Vložené geny mohou také zvýšit obranyschopnost organismu. Této

strategie využívá imunologický přístup. Některé geny mohou naopak po zavedení do nádorové buňky způsobit její zánik, jak je tomu v případě léčby pomocí molekulárního přístupu.

2.2.1. Imunologický přístup

Imunologický přístup představuje léčebné postupy, založené na indukci nebo zvýšení protinádorové imunity. Má své místo především v léčbě tzv. minimální reziduální nemoci, tj. po zásadní redukci nádoru základní léčbou (chirurgické odstranění, chemoterapie, radioterapie). Využívá přitom především buněčnou složku přirozené imunity. V protinádorové terapii se role imunitního systému a imunoterapie stala předmětem zkoumání v posledních padesáti letech. Většina z těchto postupů je zatím ve fázi klinických pokusů.

2.2.1.1. Zlepšení antigen prezentující funkce nádorových buněk

Jedním z nejvíce zkoumaných způsobů jak dosáhnout zlepšení antigen prezentující funkce nádorových buněk je zavedení genů pro imunostimulační molekuly (např. CD80 nebo CD86) nebo pro cytokiny (např. IL-12). Tento typ vakcín patří k prvním experimentálním protinádorovým vakcínám [32]. Geneticky modifikovaná nádorová buňka je „dovybavená“ a nese nejen svůj vlastní (první) signál – peptidy pocházející z TSA nebo TAA navázané na MHC molekuly – ale i uměle zavedený druhý signál, případně i další signály. Tak se z nádorové buňky stane velice funkční antigen prezentující buňka.

Výzkumy se zaměřily např. na vnesení genu pro IL-12. Tento cytokin vyvolává imunitní odpověď aktivací mnoha složek, především cytotoxických lymfocytů (Tc) a NK buněk. Bylo např. pozorováno úplné odhojení adenokarcinomu u krysu po zavedení genu pro IL-12 [1].

Imunologický přístup

Zlepšení antigenní prezentující funkce nádorových buněk
zavedení genů pro imunostimulační molekuly
např. geny pro cytokiny

Genové vakcíny
přímá vakcinace genem
kódujícím antigen

Buněčné vakcíny
ex vivo manipulace
antigen prezentujících buněk

Molekulární přístup

Sebevražděné geny
konverze prodrug na cytotoxickou
látku pomocí enzymu

Tumor supresorové geny
indukce apoptózy a
zastavení buněčného cyklu
např. p53 gen

Antionkogeny

Antisense
oligonukleotidy
cílíová struktura je mRNA

Antigene
oligonukleotidy
cílíová struktura je DNA

Obr. 1: Dva hlavní přístupy genové terapie nádorů

Geneticky modifikované buňky lze ozářit, aby se nemohly dělit a in vitro kultivovat s T lymfocyty pacienta. Kultivací se stimulují nádorově specifické T buněčné klony, které po vpravení do organismu napadají původní nádorové buňky [1].

2.2.1.2. Buněčné vakcíny

Dalším ze způsobů léčby je manipulace antigen prezentujících buněk (APC). Nejčastěji se pro vnesení genu používají dendritické buňky, které jsou známy jako nejučinnější APC. Geny jsou vneseny nejčastěji pomocí transfekce polynukleotidu nebo virové transdukce. Dendritické buňky je možno též fúzovat s buňkami nádorovými. Zajímavým příkladem je vnesení známého TAA, α -fetoproteinu přítomného v hepatomu nebo karcinomu tlustého střeva. Tyto dendritické buňky s vneseným α -fetoproteinem (buněčné vakcíny) jsou schopné vyvolat silnou imunitní odpověď [52]. Nevýhodou buněčných vakcín je potřeba buňky pacientovi odebrat, kultivovat je a po příslušné úpravě vrátit zpět do organismu.

2.2.1.3. Genové vakcíny

Posílení imunitní reakce může být také dosaženo vakcinací genem kódujícím daný antigen. Jestliže je gen vpraven pomocí subkutánní nebo intramuskulární injekce, vstupuje DNA v daném místě do buněk (fibroblastů nebo myocytů), které pak mohou produkovat antigen. Antigen prezentující buňky tento antigen zachytí a migrují s ním do lymfatických orgánů, kde je vyvolána imunitní reakce [43]. Právě tato genová vakcinace byla použita při terapii akutní promyelocytární leukémie v experimentálním modelu popsaném v této rigorózní práci.

2.2.2. Molekulární přístup

Tento přístup se většinou používá v kombinaci se základní léčbou, především chemoterapií. Hlavní roli ve vzniku nádorového onemocnění hrají onkogeny (růst stimuluující) a tumor supresorové (růst tlumící) geny. V léčbě molekulárním přístupem jsou užívány buď tumor supresorové geny nebo antionkogeny, tj. oligonukleotidy, které se vážou na onkogeny a následně je inhibují. Cílem je vyvolat v nádorové buňce zastavení buněčného cyklu nebo dokonce její apoptosu. Dalším molekulárním přístupem je použití sebevražedných genů.

2.2.2.1. Tumor supresorové geny

Jde o geny indukující zastavení buněčného cyklu a apoptosu maligních buněk. Hlavním zástupcem této skupiny je gen p53. Protein p53 zasahuje do biologických procesů různých faktorů, které regulují buněčný růst a diferenciaci, jako například Bcl-2, kaspázy a podobně [46].

Mutace genu p53 byla nalezena ve více než 40% testovaných nádorů [16]. Přestože nemutovaný p53 gen (wt p53) patří do rodiny tumor supresorových genů, některé jeho mutantní formy fungují jako onkogeny [31]. Proto úspěšná transfekce wt p53 do nádorových buněk může mít terapeutický účinek. Bylo prokázáno, že p53 gen vyvolává apoptosu a zastavení buněčného cyklu v buněčných kulturách [44, 45]. Podobně in vivo v experimentálních modelech zavedení p53 vedlo k regresi nádoru [13].

p53 gen byl použit i v klinických studiích. Přenos p53 pomocí adenoviru přímo do nádoru pacienta s rakovinou plic vedlo u 64% pacientů ke stabilizaci nemoci a u dvou z dvaceti osmi pacientů došlo dokonce k více než 50% redukci plicního nádoru [48]. Kombinace této genové terapie s chemoterapií (cisplatina) nebo ozářením vedla ještě k daleko lepším terapeutickým výsledkům. V případě kombinace p53 genové léčby a ozáření došlo dokonce u 63% pacientů k úplnému vymizení plicního nádoru [49].

2.2.2.2. Antionkogeny

Tento přístup používá oligonukleotidy (segmenty molekul nukleových kyselin) obsahující nukleotidy komplementární ke genu, který je třeba inhibovat. Potlačení onkogenů pomocí těchto oligonukleotidů lze zamezit zhoubnému množení buňky. Aktivita onkogenu může být ovlivněna na úrovni RNA (antisense oligonukleotidy) nebo DNA (antigene oligonukleotidy).

Antisense oligonukleotidy se vážou na mRNA pomocí Watson-Crickova párování bazí a inhibují tak translační fázi syntézy peptidového řetězce. Jedním z nejvíce studovaných onkogenů je gen pro Bcl-2. Bcl-2 inhibuje apoptosu a jeho zvýšená exprese způsobuje též rezistenci vůči radioterapii a chemoterapii. Exprese genu pro Bcl-2 byla in vitro výrazně snížena po přidání komplementárního antisense oligonukleotidu G3139. Intravenózní infuze tohoto oligonukleotidu u pacientů se solidními nádory však neměla výrazný léčebný efekt. Je zajímavé podotknout, že u pacientů s leukemií bylo dosaženo nadějných výsledků, když byl tento antisense oligonukleotid použit v kombinaci s radioterapií nebo chemoterapií (karboplatinou) [35].

Antigene oligonukleotidy se vážou na DNA přes vodíkové můstky a tvoří tak nefunkční triplex. V tomto případě je genová exprese blokována ve fázi transkripce. Na rozdíl od antisense oligonukleotidů mají antigene oligonukleotidy menší počet cílových struktur v dané buňce, pouze dvě v případě DNA oproti stovkám až tisícům molekul mRNA. Současné použití více než jednoho antigeny oligonukleotidu může vést k synergnímu efektu. Studie [14] ukázala, že použití c-myc a HER/neu antigeny nukleotidů mělo vyšší (80%) účinek na inhibici růstu nádorových buněk vaječníku v porovnání s účinkem získaným při použití pouze jednoho z nich (60%).

2.2.2.3. Sebevražedné geny

Po vnesení sebevražedného genu do nádorových buněk vytváří tento gen produkt, nejčastěji

enzym, který má schopnost přeměnit netoxickou látku (prodrug) na látku vysoce toxickou. Přeměna podaného léku (prodrug) proběhne v místě setkání s enzymem, tj. v nádorové buňce a výsledkem je usmrcení této buňky. Jedním z nejvíce probádaných systémů sebevražděného gen/prodrug je systém herpes simplex virus thymidinkináza (HSV-tk)/gancyklovir(GCV).

Účinek sebevražděných genů je posílen tím, že cytotoxické metabolity někdy zasáhnou i okolní nádorové buňky, do nichž nebyl tento gen zabudován. Tyto metabolity se do okolních nádorových buněk dostanou pomocí gap junctions (cylindrické struktury v buněčné membráně, spojující cytoplasmu sousedících buněk) nebo pomocí apoptických tělísek (která jsou fagocytována okolními buňkami) [50]. Stejným mechanismem může však dojít i k poškození zdravých tkání. Takové poškození bylo pozorováno u krys při léčbě jaterního karcinomu systémem HSV-tk/GCV [7].

2.2.2.4. Další molekulární přístupy

Růst nádorové tkáně je spojen s angiogenezí, zajišťující její výživu. Zásahem do tohoto procesu je možné docílit terapeutických výsledků. Anti-angiogenní terapie nejčastěji zahrnuje inhibici angiogenních faktorů (VEGF-vascular endothelial growth factor, angiopoetin) nebo použití angiogenních inhibitorů (angiostatin, endostatin, IL-12 a p53). U myši bylo prokázáno zpomalení růstu hepatocelulárního karcinomu, které korelovalo s procentem buněk exprimujících gen pro angiostatin [23]. Hlavní výhodou tohoto léčebného postupu je snadná přístupnost buněk cévního endotelu a možnost aplikace u různých typů nádorů.

Další možná léčba se týká snížení toxicity (vyvolání myelosuprese) látek užívaných při chemoterapii. Toho lze dosáhnout zavedením genu pro mnohonásobnou lékovou rezistenci (gen MDR-1) do hematopoetických kmenových buněk. Tento gen kóduje glykoprotein P, buněčný membránový transportér důležitý pro vylučování většiny hydrofilních i amfifilních látek z buňky. Přítomnost tohoto transportéru sníží toxicitu běžně používaných cytostatik.

2.3. GENOVÁ VAKCÍNA

Od genové vakcíny se očekává vyvolání specifických imunitních reakcí (Tc buněk, protilátek atd.). Její schopnost navodit celulární i humorální odpověď může být užita proti nádorům, ale i při léčení infekčního onemocnění, alergie nebo autoimunitních chorob. Genové vakcíny mají oproti jiným typům vakcín následující výhody: není třeba časově a finančně náročná příprava antigenu, stačí pouze připravit gen, který daný antigen kóduje. U všech genových vakcín je však nutné najít způsob, jak vhodně vpravit potřebné množství specifického genu přímo do organismu. Navíc je třeba brát v úvahu :

1. výběr vhodného antigenního podnětu schopného vyvolat imunitní reakci
2. trvání a rozsah expozice antigenu imunitnímu systému příjemce, tzn. určit dávku a schema podávání a určit vhodný vektor
3. použití adjuvantních složek

2.3.1. Genová protinádorová vakcína

Nejjednodušším přístupem je podat pacientovi přímo rekombinantní vektor kodující nádorový antigen (transgen). Záměrem je vyvolat expresi transgenu v buňkách pacienta, tj. syntézu antigenu a eventuelně i dalších kostimulačních faktorů. To by teoreticky mělo vyvolat specifickou imunitní reakci podobnou silné imunitní odpovědi při napadení organismu běžnými virovými nebo bakteriálními antigeny.

U protinádorových vakcín hraje důležitou roli, zda produkt daného transgenu bude buňkami sekretován, exprimován na buněčném povrchu nebo zda bude mít intracelulární charakter. Např. vakcína od které se očekává převážně humorální odpověď je použitelná pro antigeny exprimované na povrchu nádorových buněk (např. Her2/neu/erbB2). Protilátky mají totiž schopnost rozpoznat antigeny v jejich nativní formě. Oproti tomu vakcíny namířené proti intracelulárním antigenům (jako např. PML-RAR α) by měly navíc vyvolat silnou buněčnou imunitní odpověď založenou na Tc lymfocytech.

Ke konstrukci genových vakcín se využívá rekombinantní DNA technologie. Genová vakcína je vlastně chimerický gen který obsahuje některé z uvedených sekvencí:

(i) sekvenci kodující imunogenní část nádorového antigenu, (ii) sekvenci pocházející z imunogenní varianty nádorového antigenu (iii) sekvence nádorového antigenu navázaného na sekvenci silně imunogenního peptidu, pocházejícího z jiného proteinu nebo (iv) sekvence nádorového antigenu navázaného na sekvenci ligandu specifického pro daný receptor zvyšující prezentaci v APC [18]. Je důležité připomenout že vektor má potenciálně též schopnost vyvolat imunitní odpověď ve vakcinovaném jedinci. [10].

2.3.2. Vektory

Existují dva odlišné přístupy ke vpravení transgenů do buněk. První představují metody fyzikální a chemické, kdy dochází k přenosu genů bez použití vektoru. Mezi hojně používané fyzikální postupy patří mikroinjekce, elektroporace (zvýšení prostupnosti membrány elektrickými impulsy) a tzv. biobalistika, založená na vstřelování DNA pomocí tzv. genové pistole. Druhým přístupem je použití vektorů, tj. polynukleotidů do kterých je začleněn gen naší volby. Převážná většina klinických studií, které proběhly nebo probíhají je založena na virových vektorech. Hlavním kritériem při jejich výběru je bezpečnost.

2.3.2.1. Polynukleotidové vektory

Od první zprávy o polynukleotidové vakcíně [55] bylo již publikováno mnoho prací, které prokázaly účinnost plasmidové DNA, mRNA nebo virové DNA/RNA kodující cílový antigen. Pokusy probíhaly na zvířecích modelech a polynukleotidové injekce byly aplikovány intramuskulárně, intradermálně, subkutánně nebo na sliznice (nosní, gastrointestinální, vaginální) [18]. Bezpečnost polynukleotidových vakcín byla prokázána několika klinickými studiemi [9,30]. Účinnost může být dále zvýšena enkapsulací polynukleotidu nebo jeho konjugací s řadou biokompatibilních polymerů. Relativní jednoduchost konstrukce

polynukleotidových vakcín přispěla velkou měrou k jejich užití jako vektorů v preklinických i klinických studiích a to především tam, kde bylo třeba použít antigen pozměněný genovou manipulací za účelem zesílení imunitní reakce proti nádoru.

2.3.2.2. Virové vektory

Oslabené živé virové vakcíny jsou účinné u infekčních onemocnění, příkladem mohou být neštovice nebo obrna. Hlavním principem je, že tyto vakcíny napodobují skutečnou virovou infekci. Přijmutí viru a exprese genu buňkami pacienta stimuluje vrozenou i získanou imunitní odpověď včetně antigen specifických protilátek a buněčné Tc reakce. Tyto vlastnosti dělají z rekombinantních virů vysoce atraktivní genové vektory pro protinádorové vakcíny. Řada z nich již prošla klinickými studiemi.

Hlavním kritériem pro výběr virového vektoru je jeho minimální intrinsic patogenita, tzn. že vektor nevyvolává onemocnění a není přenosný na jiné jedince. Toho je většinou dosaženo použitím defektního viru, který v příjemci není schopen replikace. Účinnost vakcíny je u zdravých jedinců podpořena silnou imunitní reakcí na virus. Pacienti v pokročilém stadiu nádorového onemocnění však takové reakce schopni nejsou. K nejčastěji používaným virovým vektorům patří viry neštovic (kmen kravských a drůbežích neštovic), adenoviry, adeno-asociované viry a chřipkové viry [20, 56].

Vaccinia virus (virus kravských neštovic užívaný ve vakcínách proti neštovicím) je považován za poměrně bezpečný a byl jedním z prvních virů použitých jako vektor pro protinádorové vakcíny. Od rutinní vakcinace proti neštovicím bylo ve většině vyspělých zemí upuštěno mezi lety 1970-1980, především protože onemocnění bylo eradikováno. V roce 2003 vakcínu obdrželo velké množství pracovníků ve zdravotnictví a v armádě USA. Vyskytly se a byly dokumentovány případy patogenity viru, včetně přenosu infekce z osoby na osobu [47]. Uvedený příklad ukazuje na nebezpečnost virových vakcín, považovaných za nepatogenní.

Kromě bezpečnosti je u virových vektorů používaných pro genové vakcíny důležité brát v úvahu některá další kritéria. Virus by měl v organismu infikovat ty buňky, které zaručí imunitní reakci (např. antigen prezentující buňky). Pokud virus nemá vrozenou schopnost infikovat tyto buňky, lze toho někdy dosáhnout vhodným výběrem dávky, způsobu a schematu podání. V jiných případech je možné vhodně vektor orientovat úpravou rekombinantního viru.

Též by měla být brána v úvahu možnost preexistence protilátek a aktivace T buněk, včetně reaktivace získané imunitní odpovědi proti vektoru. To může být problém nejčastěji u vektorů založených na virech běžných lidských infekcí (např. wt adenovirus serotyp 5), ale také u virů, které vyvolávají silnou primární imunitní odpověď, protože efektivní protinádorová vakcína většinou vyžaduje opakované podávání [20, 56]. V případě, že imunitní odpověď je natolik silná, že zabrání infekci buněk vektorem, nebo předčasně eliminuje buňky rychle exprimující virové antigeny, je účinnost vakcíny značně snížena. Pomocí vhodně zvolené dávky a schematu aplikace se někdy lze těmto problémům vyhnout.

Časový průběh a trvání exprese transgenů hostitelskými buňkami má vliv na sílu a charakter imunitní odpovědi na virový antigen. Ačkoliv se v současnosti zdá, že nejvýhodnější pro vyvolání protinádorové imunity je silná exprese antigenu, pro konečný závěr je třeba více experimentálních dat.

V současné době se zvažuje zavedení protinádorových vakcín do praxe hlavně u těch nádorů, které mají dobře definované nádorové antigeny a u kterých byly získány geny, které takové antigeny kódují. Mezi nimi jsou na prvních místech nádory virového původu, protože produkty virových onkogenů, jimž se říká virové onkoproteiny, jsou podrobně prozkoumány a snadno zasažitelnými terči imunitních reakcí. Jedny z nejpozitivnějších výsledků vyšly například z klinických pokusů s vakcínou používající virové částice HPV typu 16 (lidský papiloma virus typu 16) [25]. HPV 16 je virus asociovaný s výskytem rakoviny děložního krčku u žen.

2.4. EXPERIMENTÁLNÍ MODEL

Během mého pobytu ve Francii jsem při přípravě diplomové práce měla příležitost se seznámit s projektem který v této době probíhal v hostující laboratoři. Šlo o použití experimentálního modelu akutní promyelocytární leukemie pro vypracování inovačního terapeutického postupu využívajícího genové vakcíny.

2.4.1. Akutní myeloidní leukemie

Akutní myeloidní leukemie (AML) je nemoc, která vzniká maligní transformací kmenové hematopoetické buňky. Ta se diferencuje v myeloidní nebo myelomonocytární blasty, méně často blasty erytroidní nebo megakaryocytární. Pro buňky akutní leukemie je typická zástava diferenciaci na úrovni blastů. Proliferace blastů se vymyká fyziologické autoregulaci a jejich akumulace pak potlačí fyziologickou krvetvorbu a způsobí anemii, granulocytopenii a trombocytopenii. Vývoj choroby je většinou velmi rychlý. Klinické příznaky AML jsou nespecifické a jsou obvykle způsobeny nedostatečnou fyziologickou krvetvorbou. Patří mezi ně: malátnost a únava, bledost kůže (anemie), zvýšená četnost infekcí. Typické jsou zaněty v oblasti horních cest dýchacích, stomatitidy a angíny nereagující na antibiotika neboť je defektní nespecifická imunita (granulocytopenie). Časté jsou též projevy hemorrahgické diatezy, petechie a ekchymozy (trombocytopenie).

AML představuje přibližně 2-4% všech maligních tumorů. Incidence je 2 až 3/100 000 obyvatel Incidence se zvyšuje ve vyšším věku, ve skupině nad 65 let je incidence 15-17/100 000 obyvatel.

Etiologie AML není zcela jasná. Menší část případů souvisí s genetickou predispozicí nebo s expozicí účinku kancerogenů. K nejnebezpečnějším kancerogenům patří například alkylační cytostatika, organická rozpouštědla typu benzenu či toluenu a ionizační záření. Leukemie které vznikly pod vlivem uvedených kancerogenů se obvykle vyvíjejí cestou

myelodysplastického syndromu. Mívají typické chromozomální změny, například delecii části chromozomu 5 a 7 a nebo anomálii dlouhého raménka chromozomu 11. I u akutních myeloidních leukemií vzniklých bez kontaktu se známými kancerogeny jsou ve většině případů prokazatelné chromozomální změny. Obvyklé jsou vyrovnané translokace úseků obsahujících geny pro transkripční faktory. S tím je spojena deregulace vývoje kmenové krvetvorné buňky a vznik jednotlivých dále definovaných (tabulka 2) buněčných typů akutních leukemií. Cytogenetické vyšetření je důležité nejen pro upřesnění diagnózy, ale i pro stanovení prognózy. Vzhledem k tomu, že cytogenetické změny úzce souvisí s biologickým průběhem nemoci, jsou výsledky cytogenetického vyšetření brány v úvahu při rozhodování o míře agresivity léčby.

Diagnostiku akutní leukemie je možno stanovit už na základě vyšetření diferenciálního krevního obrazu. Pro diagnostiku akutní leukemie mluví přítomnost blastů v diferenciálním krevním obraze dosahující > 5% celkového počtu jaderných buněk. Dále jsou přítomny nečetné vyzrálé granulocyty. U AML nejsou přítomna vývojová stadia granulocytů. Samotný počet leukocytů v periferní krvi není diagnostický. Obvykle bývá zvýšený, může však být i normální či dokonce snížený. V myelogramu lze diagnózu akutní leukemie potvrdit nálezem > 30% blastů nebo součtem blastů a promyelocytů > 50%. K definitivnímu stanovení diagnózy AML je nutné vyšetření kostní dřeně. Typ leukemie lze upřesnit pomocí speciálních cytochemických barvení.

Přes přibývající množství identifikujících genetických a molekulárních znaků je stále používaná klasifikace [2, 53], založená především na morfologickém hodocení myelogramu a diferenciálního krevního obrazu. Tato vyšetření se doplňují speciálním cytochemickým barvením myelogramu a nátěru periferní krve. Tato klasifikace definuje typy M0 až M7 (tabulka 2).

Tab.2: Morfologická klasifikace akutních myeloidních leukemií dle FAB klasifikace a jejich asociace se specifickými chromozomálními a dalšími znaky. Převzato z Benett et al.[2]

FAB subtyp	Morfologie	Cytogenetika	Další znaky
M0	nediferencované blasty	t(3; 21) (q26; q22)	myeloidní imunofenotyp
M1	nediferencované myeloblasty		
M2	diferencované myeloblasty	t(8; 21) (q22; q22)	Auerovy tyčky
M3	hypergranulární promyelocyty	t(15; 17) (q22; q11-12)	Auerovy tyčky
M3 variant	mikrogranulární promyelocyty	t(5; 17) (q22; q11-12)	abnormální eosinofilie
M4	myelomonocytární		
M4 eozin.	myelomonocytární s eozinofilií	t/inv. (16) (p13; q22)	
M5a	monoblasty		
M5b	promonocytární-monocytární	t(9; 11) (p21-22; q23)	a jiné translokace (11; q23)
M6	erytroblasty		exprese glykoforinu A
M7	megakaryoblasty		destičkový a megakaryocytární imunofenotyp

Léčba AML má dvě hlavní fáze:

Indukční fáze. Jejím cílem je navodit (indukovat) kompletní remisi nemoci, to znamená zmenšit leukemickou populaci až pod hranici morfologického stanovení a dosáhnout regenerace fyziologické krvetvorby a normalizace krevního obrazu.

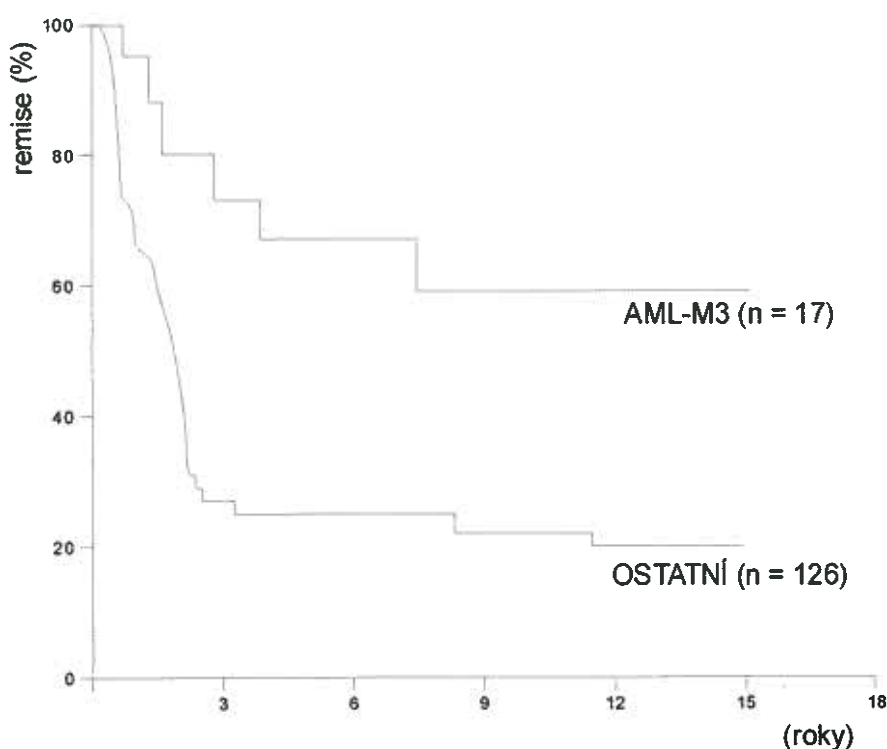
Postremisní fáze. Jejím cílem je zničení zbytkové (residuální) nemoci a snaha o vyléčení. Do této postremisní léčby lze zařadit několik odlišných postupů. Obecně je lze nazvat "konsolidační léčba", což je intenzivní chemoterapie, případně vysokodávkovaná chemoterapie s autologní nebo alogenní transplantací kostní dřeně nebo kmenových krvetvorných buněk získaných z periferní krve a někdy málo toxická dlouhodobá udržovací chemoterapie.

2.4.2. Akutní promyelocytární leukémie

Akutní promyelocytární leukemie (APL) se řadí mezi AML (AML-M3). Jde o poměrně vzácný typ leukemie, incidence v Evropě je 1/100 000 obyvatel. Například v roce 2000 zemřelo 35 000 evropských obyvatel na tuto nemoc. Důležitým diagnostickým znakem je pro APL charakteristická chromozomální změna - translokace t(15,17), která je přítomna téměř u všech případech APL a u jiných případech malignit se nevyskytuje.

APL je charakteristická též dramatickým začátkem. Její buňky uvolňují aktivátory koagulace, proto je tento typ leukemie spojen s rychlým rozvojem konzumpční koagulopatie a diseminovanou intravaskulární koagulací. Často již v průběhu stanovení diagnózy může dojít ke smrtelnému krvácení. Typickým pacientem s APL je obvykle osoba mladší než u ostatních AML, s mnoha hematomy a silným krvácením v důsledku spotřeby koagulačních faktorů a trombocytů. Tyto změny mohou být někdy dokonce zhoršeny a urychleny léčbou. Jestliže se však krvácení podaří zamezit a pacient přežije první kritickou fázi, mají pacienti s APL lepší dlouhodobou prognosu než pacienti s jinými subtypy AML (Obr. 2).

Zvláštností APL je též její léčitelnost farmakologickými dávkami retinoidů. Huang et al. [22] zjistili, že podávání retinoidů (all-trans retinoic acid-ATRA) má u APL pacientů schopnost indukovat v maligních buňkách obnovení diferenciačního procesu a vede k remisi. Bylo prokázáno [12] že translokace t(15,17) je výsledkem transpozice genu kódujícího α receptor pro kyselinu retinovou (RAR α) pocházejícího z chromozomu 15 na chromosom 17 do místa, kde se nachází gen kodující PML (jaderný fosfoprotein, transkripční faktor). Tato transpozice vede k vytvoření fuzního genu PML-RAR α jeho transkripční produkt byl identifikován [12]. Transpozicí vyvolaná změna ve struktuře RAR α je zřejmě zodpovědná za zástavu diferenciace



Obr.2: Porovnání délky remise u pacientů s AML-M3 a u pacientů s jinými subtypy AML.

Uvedené výsledky se týkají pacientů z nemocnice St.Bartholomew's Hospital, Velká Británie. Převzato z Henderson et al. [19].

a následný vývoj leukemie. Exprese PML-RAR α myeloidních prekursorch způsobuje zvýšenou citlivost na kyselinu all-trans retinovou. Výzkumy [8] prokázaly, že úplné remise u APL lze dosáhnout pomocí samotné kyseliny all-trans retinové (ATRA) nebo v kombinaci s chemoterapií. ATRA působí jako induktor diferenciacce buněk a navíc zlepšuje akutní koagulopatii u 90% pacientů s APL [8]. Má schopnost interagovat s hemostatickým systémem, například zvyšuje množství mRNA kodující receptor pro trombin a tudíž i jeho syntézu a expresi na povrchu endotheliálních buněk [21]. Retinoidy jsou známy jako adjuvantia, orientující T lymfocytární odpověď směrem k Th2 lymfocytům. Podporují tedy především humorální odpověď [24].

V současnosti se k léčbě APL používá ATRA nebo ATRA v kombinaci s chemoterapií, arsenem (As₂O₃) nebo transplantací kostní dřeně. I přes významné prodloužení doby přežití pomocí uvedené léčby vzácně dojde k úplnému vyléčení což zdůvodňuje snahu o hledání nových komplementárních přístupů. Jednou z možností je stimulace imunitního systému pacientů v remisi.

2.4.3. Transgenní model

V laboratoři J.M. Bishopa [5] byly za účelem vypracování experimentálního modelu pro studium APL připraveny transgenní myši exprimující PML-RAR α onkogen. K přípravě těchto transgenních myší byla připravena genová konstrukce, která je tvořena fragmentem cDNA kodujícím lidský PML-RAR α [40]. Tento fragment cDNA je pod kontrolou promotoru pocházejícího z genu kodujícího lidský MRP8 [26], zajišťujícího tkánově specifickou expresi (myeloidní buňky) daného transgenu. K přípravě transgenních myší byly použity myši pocházející z inbredního kmene FVB/N a bylo získáno devět transgenních linií. Studium exprese ukázalo, že PML-RAR α je exprimován v granulocytech u osmi z devíti studovaných linií. Z detailních studií je vidět, že u mladých jedinců z těchto osmi linií blokuje PML-RAR α maturaci neutrofilů. Autoři nazvali tento stav jako preleukemický. U šesti linií byl následně sledován výskyt APL a incidence APL u těchto transgenních myší byla 10 až 40%

studovaných jedinců. Leukemické myši měly zvýšenou krvácivost, několik z nich bylo dokonce spontánně hemorrahagických. U některých byly nalezeny fibrinové tromby v plicních cévách. V periferní krvi byla pozorována anemie a trombocytopenie bez zvýšení počtu leukocytů. Hemorrahagická diateza v přítomnosti normálního nebo dokonce sníženého počtu lymfocytů je typická též pro lidskou APL. Leukemické myši mají lymfadenopatii a hepatosplenomegalii a morfologicky mají jejich leukemické buňky promyelocytární charakter. Podobně jako u lidské APL se myši leukemické buňky silně barví sudanskou černí B, která indikuje přítomnost myeloperoxidázy v primárních granulích buněk v promyelocytární/granulocytární linii. Autoři [5] jasně prokázali, že transgenní myši vyvinuly APL.

V laboratoři J.M. Grisolana [17] byl za stejným účelem vypracován obdobný myší model exprimující transgen PML-RAR α . Grisolano et al. použili genovou konstrukci, která je tvořena fragmentem cDNA kódujícím PML-RAR α . Tento fragment byl dán pod kontrolu genových sekvencí, zajišťujících specifickou expresi hCG. Gen hCG kóduje enzym (cathepsin G) obsažený výlučně v azurofilních granulích promyelocytů. Tím bylo dosaženo toho, že PML-RAR α je exprimován pouze v myeloidních buňkách. Bylo vytvořeno osm stabilních linií, obsahujících různé počty kopií PML-RAR α transgenů. Studium exprese ukázalo, že PML-RAR α je exprimován (měřitelné hodnoty) u šesti z osmi linií. Z dalších studií je vidět, že podobně jako u modelu vytvořeného v laboratoři J.M. Bishopa, měly myši z těchto šesti linií zvýšené počty promyelocytů ve slezině. Zhruba 15-20% jedinců vyvinulo po delším období latence (6-18 měsíců) APL, leukemické myši měly hepatosplenomegalii a zvýšené množství promyelocytů ve slezině, kostní dřeni a periferní krvi. U těchto myši nebyla pozorována intravaskulární koagulace a hemorrahagická diateza, typická pro lidskou APL. Důvodem může být, že myši byly zabity již při prvních klinických příznacích. Koagulační faktory nebyly měřeny.

Analýza exprese transgenů u pacientů s t(15;17) ukázala, že prakticky ve všech případech je exprimován transgen PML-RAR α a u 70-80% pacientů se vyskytuje též detekovatelné

množství RAR α -PML mRNA [41]. V laboratoři J.M. Grisolana [42] byly obdobným způsobem jako myši transgenní pro PML-RAR α připraveny též myši exprimující transgen vzniklý reciprokou fúzí - RAR α -PML pod kontrolou sekvence hCG (specifická exprese v myeloidních buňkách). U těchto zvířat nejsou přítomny změny ve vývoji myeloidních buněk. Pokud jsou však v myeloidních buňkách exprimovány oba transgeny, je pravděpodobnost vzniku APL vyšší. U jedinců s oběma transgeny vyvinulo APL 57% myší. Linie myší transgeních pro PML-RAR α i linie transgení pro RAR α -PML byly udržovány křížením těchto F1 transgenních zvířat s B6C3H linií. Linie exprimující oba transgeny pak vznikla křížením jedné PML-RAR α linie se dvěma RAR α -PML liniemi. Zvířata byla křížena, dokud nevzniklo alespoň 25 jedinců od každého genotypu (wt, RAR α -PML, PML-RAR α , RAR α -PML/PML-RAR α).

2.4.4. Transplantační model

Leukemické buňky pocházející z transgenních myší z laboratoře J.M. Bishopa byly dále transplantovány do syngenních (FVB/N) jedinců s cílem prokázat maligní charakter myeloidní leukemie. K transplantaci byly použity buňky izolované z kostní dřeně nebo slezin leukemických dárců a byly aplikovány intravenózně. Tři až pět týdnů po transplantaci vyvinulo leukemii 100% příjemců [5]. Klinický a patologický charakter této leukemie byl velmi podobný charakteru nemoci dárců a morfologické a cytometrické analýzy leukemických buněk byly identické s výsledky analýzy buněk dárců. Tento transplantační model byl použit pařížské laboratoři.

Též u leukemických buněk pocházejících z dvojitě transgenních myší (PML-RAR α X RAR α -PML) bylo prokázáno, že po přenosu do syngenních jedinců (B6C3H) vyvolají APL [42]. K transplantaci byly použity splenocyty leukemických myší a byly aplikovány intraperitoneálně. Příjemci onemocněli do 45-100 dní a vyvinuli APL podle výše uvedených kritérií. Tento model použila washingtonská laboratoř, jejíž výsledky dále srovnávám s výsledky z Paříže.

Bylo nutné též prokázat, že myší APL je citlivá, podobně jako lidská APL na léčbu ATRA. In vitro pokusy v obou případech ukázaly [5, 17], že leukemické buňky pocházející z transgenních myší jsou citlivé (dochází k diferenciaci) na ATRA. Při pokusech in vivo [5] byly syngenním myším (FVB/N) transplantovány leukemické buňky. Myši byly rozděleny do dvou skupin, jedné skupině bylo podáno placebo, druhá skupina byla léčena ATRA. 28 dní po transplantaci leukemických buněk byl mezi skupinami viditelný rozdíl. U usmrcených myší ze skupiny která dostala placebo bylo nalezeno vysoké procento leukemických buněk ve slezině a kostní dřeni. Zbývající jedinci z této skupiny poté do několika dnů zemřeli. Naproti tomu u usmrcených myší léčených ATRA nebyly 28. den nalezeny leukemické buňky a ostatní jedinci z této skupiny přežili až 7 měsíců.

Uvedené výsledky prokázaly, že oba experimentální modely APL se v hlavních rysech shodují s lidskou APL. Modely jsou velice užitečné pro molekulární studie APL patogeneze a pro preklinické studie účinku ATRA i jiných inovačních terapií.

2.5. CÍL PRÁCE

V posledním roce studia se mi naskytla příležitost pobytu v pařížské laboratoři (Immunogénétique de la souris, Institut Universitaire d'Hématologie, Université Paris VII-Denis Diderot, Hopital Saint-Louis - Dr. Marika Pla) za účelem vypracování diplomové práce. Vzhledem k tomu že šlo pouze o šestiměsíční pobyt, byl mi svěřen krátkodobý úkol. V laboratoři současně probíhal dlouhodobý projekt týkající se léčby akutní promyelocytární leukemie pomocí DNA vakcíny, který mě zaujal. Měla jsem možnost alespoň po dobu několika měsíců pozorovat jeho vývoj a s laboratoří jsem poté zůstala v kontaktu, proto jsem velmi uvítala možnost vypracovat na toto téma rigorozní práci.

Cílem projektu bylo:

- zjistit, zda je možné stimulovat imunitní reakci u myšího modelu APL pomocí DNA vakcíny
- najít způsob jak zabránit relapsu onemocnění – tj. vytvořit model klinické situace a zjistit, zda by podání DNA kódující protein PML-RAR α (vakcíny) mohlo sloužit k podání pacientům v remisi
- pokusit se popsat mechanismy stimulace imunity vakcínou
- vzhledem k tomu, že vědecká skupina z Washington University School of Medicine publikovala článek který si kladl podobné cíle, rozhodla jsem se výsledky pařížské a washingtonské laboratoře srovnat

3. MATERIÁL A METODY

3.1. MATERIÁL

3.1.1. Myši

Myši kmene FVB/N byly chovány ve zvířetníku hostující laboratoře (Immunogénétique de la souris, Institut Universitaire d'Hématologie, Université Paris VII-Denis Diderot, Hôpital Saint-Louis, Paris). Ve většině pokusů byli použiti samci i samičky ve věku 6-8 týdnů.

3.1.2. Protilátky

Použité při detekci anti-PML/RAR α protilátek metodou ELISA :

K detekci myších protilátek metodou ELISA byl použit jako antigen purifikovaný rekombinantní GST-RAR α protein, který byl připraven v hostující laboratoři.

Jako sekundární protilátka byla použita kozí protilátka reagující s myším IgG a s lehkými řetězci κ a λ značená peroxydázou.

Jako pozitivní kontrola sloužila myší monoklonální protilátka (9 α F) specificky reagující s RAR α .

K detekci CD4 a CD8 T-lymfocytů pomocí cytofluorometrické analýzy byly používány specifické monoklonální protilátky anti-CD4 (G1.4.5.) a anti-CD8 (H35) značené fluorescein isothiokyanátem (FITC) (PharMingen).

3.1.3. Vakcína

K vakcinaci byly použity cDNA, jejichž schemata jsou uvedena v tabulce 3 v části výsledky. V tabulce jsou též uvedena schemata vakcín použitých ve washingtonské laboratoři.

3.1.4. APL buňky

Zmražené APL buňky pocházely z transgenního modelu J.M. Bishopa.

3.2. METODY

3.2.1. DNA vakcinační protokol

Principiálně byly používány 2 vakcinační modely. V pařížské laboratoři byly APL buňky (10^4) ve většině případů i.v. aplikovány před vakcinací. DNA vakcína pak byla podána i.m., poprvé 7 dní po aplikaci APL buněk a dále ještě dvakrát ve dvacetidenních intervalech. Odběry krve byly provedeny vždy 7 dní po DNA vakcinaci. Při každé DNA aplikaci bylo aplikováno 50 μ g DNA do quadricepsu.

Ve washingtonské laboratoři byla DNA vakcinace podána i.p., před aplikací APL buněk (10^6).

3.2.2. Buněčný vakcinační protokol

APL buňky byly ozářeny (25 Gy) a byly použity jako celulární terapie. 10^7 buněk bylo i.v. aplikováno do syngenních FVB/N jedinců ve dvacetidenních intervalech ve třech cyklech, počínaje dnem -60. Den 0 jen den, ve kterém byly i.v. aplikovány neozářené (10^4) leukemické (APL) buňky.

3.2.3. Aplikace ATRA

ATRA (kyselina all-trans retinová) byla podána v podobě kapslí, které byly s.c. implantovány na hřbet myši. Tyto kapsle postupně uvolňují látku po 21 dní v množství 5mg/kg/den. Implantace kapslí myším probíhala v celkové anestezii, netrvala déle než 5 minut.

3.2.4. Hodnocení buněčné odpovědi

Množství CD4 a CD8 buněk bylo detekováno v periferní krvi pomocí průtokové cytometrie. 30 μ l krve bylo 30 minut inkubováno s 1 μ g specifické anti-CD4 nebo anti-CD8 protilátky značené FITC. K lýzi červených krvinek byl použit lyzovací pufr (Invitrogen). Imunofluorescence přibližně 5000 buněk byla hodnocena na průtokovém cytometru FACScan (Becton Dickinson). Analýza byla provedena pomocí programu Cell Quest.

Cytokiny byly měřeny pomocí Th1/Th2 specifického kitu (PharMingen) podle protokolu doporučeného výrobcem.

3.2.5. Sledování přežití myši

Myši byly sledovány denně (včetně víkendů) a úmrtí byla zaznamenávána. Mrtvé myši byly analyzovány, slezina vyjmuta a změřena. Do pokusu byly zahrnuty pouze myši, které měly splenomegalii (byla u nich prokázána APL).

3.2.6. ELISA

Do jamek speciální plotny pro ELISA test (Maxisorp, NUNC) bylo přeneseno 50 μ l GST-RAR α proteinu. Plotna byla překryta folií a ponechána nejméně 18h při 4°C. Po inkubaci byly jamky 2x promyty pufrům a po 2 hodiny saturovány roztokem pufru a želatiny při 37°C. Po odstranění tohoto roztoku byly jamky opět promyty pufrům a následovala inkubace s 50 μ l

myšího séra nebo pozitivní kontroly (protilátka 9 α F). Po inkubaci byly jamky opět dvakrát promyty puřrem. Po jeho odstranění bylo do jamek přidáno 50 μ l kozí protilátky značené peroxydázou a ponecháno 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly jamky dvakrát promyty puřrem. Po jeho odstranění bylo do každé jamky přidáno 100 μ l substrátu. Přibližně po 5ti minutách se roztok v jamkách začal barvit. Po dosažení žádané intenzity zbarvení (asi 60 minut) byla reakce zastavena přidáním 50 μ l blokujícího roztoku. Optická denzita (O.D.) byla měřena na automatickém spektrofotometru (Dynex) při 490nm.

4. VÝSLEDKY

Během vypracování diplomové práce v pařížské laboratoři (Immunogénétique de la souris, Institut Universitaire d'Hématologie, Université Paris VII-Denis Diderot, Hopital Saint-Louis - Dr. Marika Pla) jsem měla možnost pozorovat vývoj dlouhodobého projektu, který se týkal terapeutického postupu používajícího DNA vakcínu k léčbě APL. Většina pokusů které uvedu probíhala nebo byla vyhodnocována v době mého pobytu a později byla publikována [39]. Během psaní této práce vyšel na podobné téma další článek publikovaný vědeckou skupinou z Washington University School of Medicine [41]. Autoři se zabývali stejnými otázkami. Vzhledem k tomu, že se navíc oba články týkají stejného onemocnění (akutní promyelocytární leukémie), rozhodla jsem se popsat v experimentální části výsledky pařížské i washingtonské skupiny. Experimentální část je rozdělena do čtyř částí:

- A. Imunitní odpověď vyvolaná APL buňkami
- B. Použití DNA vakcíny k prevenci APL
- C. Aplikace na modelu klinické situace-prevence relapsu
- D. Studium mechanismů DNA vakcinace

4.1. IMUNITNÍ ODPOVĚĎ VYVOLANÁ APL BUŇKAMI

Exprimují APL buňky na svém povrchu MHC molekuly?

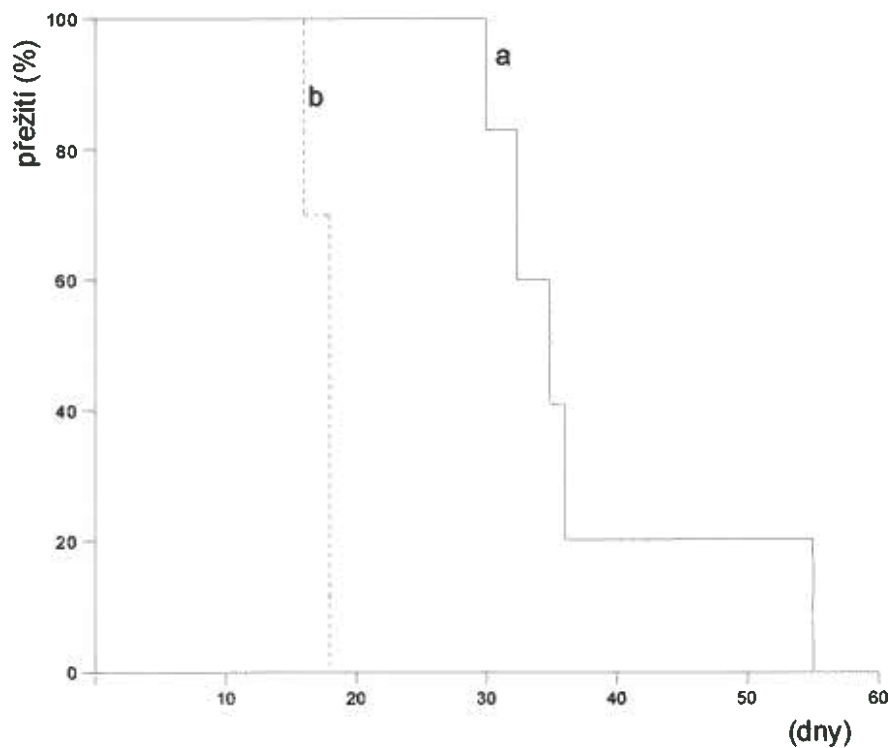
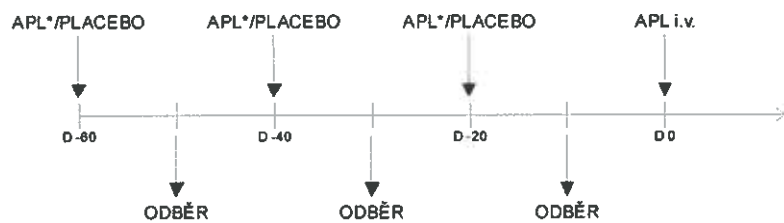
Autoři z washingtonské laboratoře se nejprve snažili odpovědět na tuto otázku, protože Zheng et al. [57] uvedli, že exprese PML-RAR α je u některých buněk spojena se sníženou expresí MHC I molekul v důsledku inhibice TAP transportérů a/nebo proteinů LMP. Ve washingtonské laboratoři byly pro pokusy použity APL buňky z myši B6C3H u kterých se vyskytují MHC I molekuly H-2^b a H-2^k, proto byly buňky testovány pomocí průtokové cytometrie na přítomnost K^b a K^k MHC I molekul. Jejich pokusy ukázaly, že všechny vzorky APL buněk exprimovaly MHC I molekuly a 27 z 28mi vzorků exprimovalo také MHC II molekuly.

Jsou APL buňky schopny vyvolat alogenní odpověď?

Autoři z washingtonské laboratoře navázali na předchozí zjištění. APL buňky s MHC molekulami by v alogenním příjemci měly vyvolat imunitní odpověď a být eliminovány. Za tímto účelem rozmražené APL buňky z myši B6C3H (H-2^bxH-2^k) byly aplikovány semialogenním myším B6 (H-2^b) a syngenním B6C3H myším. Předpokladem bylo, že jestliže H-2^k antigeny budou exprimovány na povrchu APL buněk, tyto buňky pak budou imunitním systémem alogenního příjemce eliminovány a nedojde k vývinu leukemického onemocnění. Všichni syngenní (B6C3H) příjemci zemřeli do 100 dní po aplikaci APL buněk. Naproti tomu semialogenní příjemci přežívali čtyři měsíce a byli negativní při PCR zkoušce na minimální reziduální nemoc v periferní krvi (detekce přítomnosti mRNA kodující PML-RAR α). Žádný jedinec neonemocněl ani po opakované aplikaci APL buněk. APL u myši B6 nebyla prokázána ani v periferní krvi a histopatologickým vyšetřením jater a sleziny.

Je možné vyvolat imunitní odpověď oslabenými APL buňkami?

V pařížské laboratoři nejprve ověřili, zda je možné myši vakcinovat oslabenými (ozářenými) APL buňkami. Očekávanou reakcí by měla být stimulace imunitního systému a myši by měly přežít déle po následné aplikaci letální dávky APL buněk. Skupině experimentálních myši bylo třikrát i.p. aplikováno 10⁷ ozářených APL buněk (Obr. 3, horní část). Kontrolní skupina myši tyto buňky nedostala. Všem myším byl 10 dní po každém podání ozářených buněk proveden odběr krve. Po i.v. implantaci leukemických buněk (D 0) byla sledována doba přežití (Obr. 3, dolní část). Všechny myši z kontrolní skupiny zemřely mezi 16.-18. dnem po implantaci letální dávky APL buněk. Myši imunizované ozářenými buňkami přežívaly výrazně déle a zemřely mezi 30. a 55. dnem. Aplikace ozářených APL buněk působila tedy jako vakcinace.



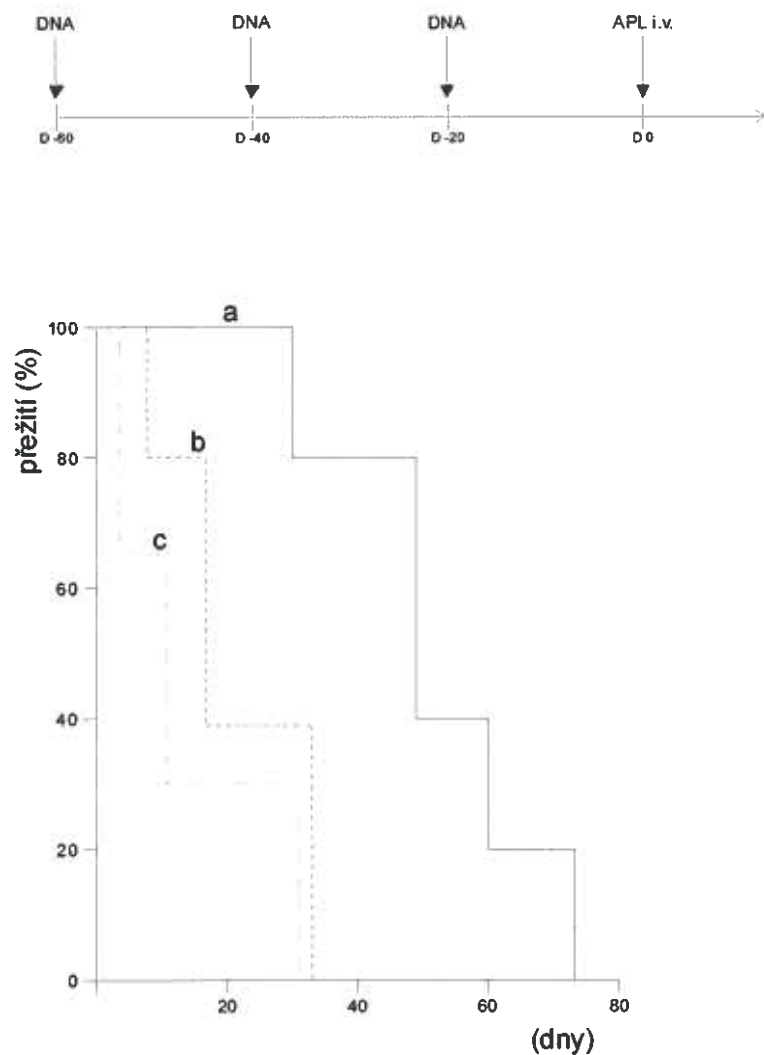
Obr. 3: Vakcinace ozářenými APL buňkami vede k prodloužení přežití leukemických (APL) myší.

Jak je uvedeno v protokolu (horní část), myším ($n=7$; křivka a) bylo třikrát i.p. aplikováno 10^7 ozářených leukemických (APL*) buněk. Kontrolní skupině ($n=4$; křivka b) nebyly ozářené buňky aplikovány. Oběma skupinám bylo i.v. implantováno (D 0) 10^7 neozářených leukemických (APL) buněk. Sledovala se doba přežití (dny).

4.2. POUŽITÍ DNA VAKCÍNY K PREVENCI APL

Cílem pokusu provedeného v pařížské laboratoři bylo zjistit, zda vakcinace pomocí DNA obsahující fragment kódující PML-RAR α může zabránit vývoji leukémie po aplikaci letální dávky APL buněk. Za tímto účelem byl myším aplikován ve dvacetidenních intervalech i.m. DNA fragment (Obr. 4, horní část). Pokusné myši byly rozděleny do tří skupin. Skupině (a) byl aplikován fragment PML-RAR α -FrC, skupině (b) fragment PML-RAR α a třetí skupina (c; kontrolní skupina) obdržela jen prázdný vektor. Těmto vakcinovaným myším byla aplikována (D 0) letální dávka APL buněk a byla sledována doba přežití (Obr. 4, dolní část). Jak je vidět z obrázku 4, kontrolní skupina a skupina myši které byl aplikován fragment PML-RAR α uhynula mezi 31. – 33. dnem. Myši kterým byl aplikován PML-RAR α -FrC přežily signifikantně déle (až 75 dní).

Autoři z washingtonské laboratoře se snažili odpovědět na stejnou otázku. Pokusné myši rozdělili do šesti skupin a k vakcinaci použili PML-RAR α , RAR α -PML, fragment PML a RAR α , fus-RAR α a prázdný vektor (Tab. 3, konstrukce). Myším byla čtyřikrát opakovaně v týdenních intervalech podána i.m. injekce DNA (Obr. 5, horní část). Za další týden (D 0) bylo myším i.p. podáno 10^6 APL buněk a byla sledována doba přežití (Obr. 5, dolní část). Myši které dostaly fragment kódující část RAR α (e), fus-RAR α (d) nebo RAR α -PML (f) přeživaly do 50.-75. dne. Podle očekávání ani vakcinace prázdným vektorem (a) nevyvolala imunitní ochranu proti APL. Naproti tomu myši imunizované fragmentem PML-RAR α (b) nebo jeho částí kódující PML (c) byly proti APL relativně chráněny a přeživaly až do 125. dne.



Obr. 4: Vakcinace fragmentem PML-RAR α -FrC vede k signifikantnímu prodloužení přežití leukemických (APL) myší.

Myši byly rozděleny do tří experimentálních skupin a byla jim i.m. aplikována (D -60, D -40, D -20) DNA. První skupině (n=5, křivka a) byl aplikován fragment PML-RAR α -FrC, druhé skupině (n=5, křivka b) fragment PML-RAR α a třetí skupině (n=3, křivka c) byl aplikován prázdný vektor. Všem myším bylo i.v. implantováno (D 0) 10^7 leukemických APL buněk. Sledovala se doba přežití (dny).

Tab. 3: Konstrukce cDNA použitých pro vakcinaci.

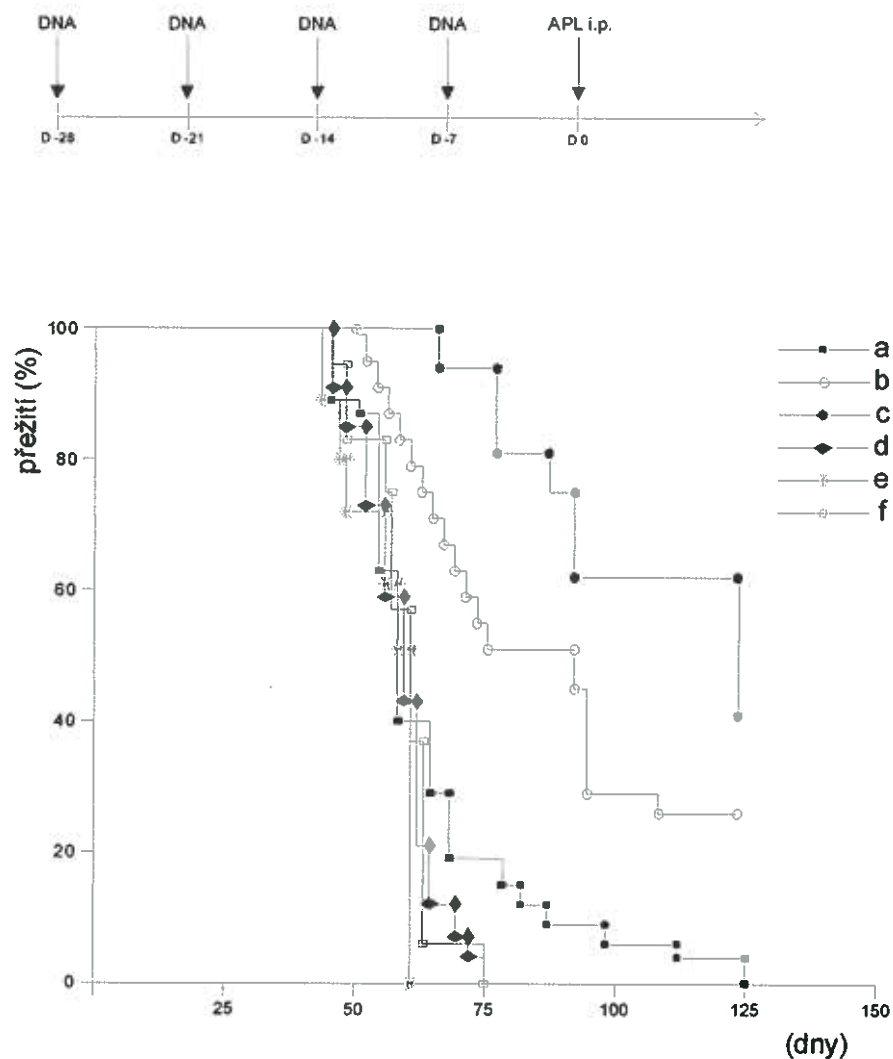
	popis konstrukce	článek
PML-RAR α -FrC	cDNA (105 párů bazí) kódující okolí fúze PML-RAR α (35AK) bylo klonováno společně se segmentem DNA kódujícím fragment C (vysoce imunogenní polypeptid, součást tetanového toxinu)	[39]
PML-RAR α	cDNA kódující PML, exony 1-6 a RAR α , exony 3-9 a jejich spojení	[39], [41]
PML	cDNA kódující PML, exony 1-6	[41]
fus-RAR α	cDNA kódující úsek RAR α a 9AK z části PML	[41]
RAR α	cDNA kódující RAR α , exony 3-9	[41]
RAR α -PML	cDNA kódující RAR α , exony 3-9 a PML, exony 1-6 a jejich spojení	[41]

[39] Padua et al., 2003

[41] Pollock et al., 2005

4.3. APLIKACE NA MODELU KLINICKÉ SITUACE-ZABRÁNĚNÍ RELAPSU

V předchozí části byly popsány pokusy, kdy autoři článků [39, 41] používali DNA vakcinaci k prevenci vzniku leukémie. Jak bylo uvedeno v úvodu, běžná a velice účinná léčba APL je ATRA. Jejím podáváním je možné dosáhnout u pacienta remise, u části pacientů však dochází k relapsu onemocnění. V pařížské laboratoři se zaměřili právě na tuto klinickou situaci a vypracovali experimentální model umožňující otestovat, zda by mohla DNA vakcinace relapsu zabránit.

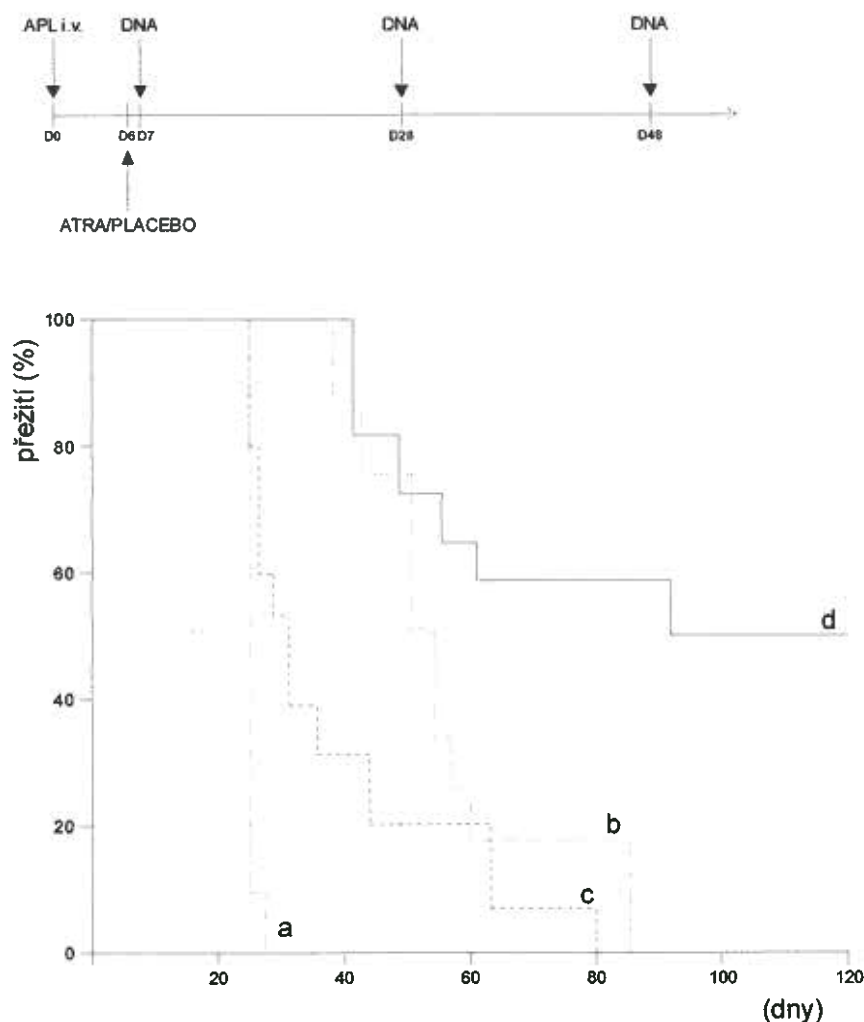


Obr. 5: Vakcinace DNA fragmentem PML-RAR α a jeho částí PML prodlužuje dobu přežití leukemických (APL) myší. Převzato z Pollock et al.[41].

Myši byly rozděleny do šesti skupin a byla jim i.m. aplikována DNA (D -28, D -21, D -14, D -7). Jednotlivým skupinám byl aplikován prázdný vektor (a), fragment PML-RAR α (b), PML (c), fus-RAR α (d), RAR α (e) a RAR α -PML (f). Všem myším bylo i.p. implantováno (D 0) 10^6 leukemických (APL) buněk. Dále se sledovala doba přežití (dny).

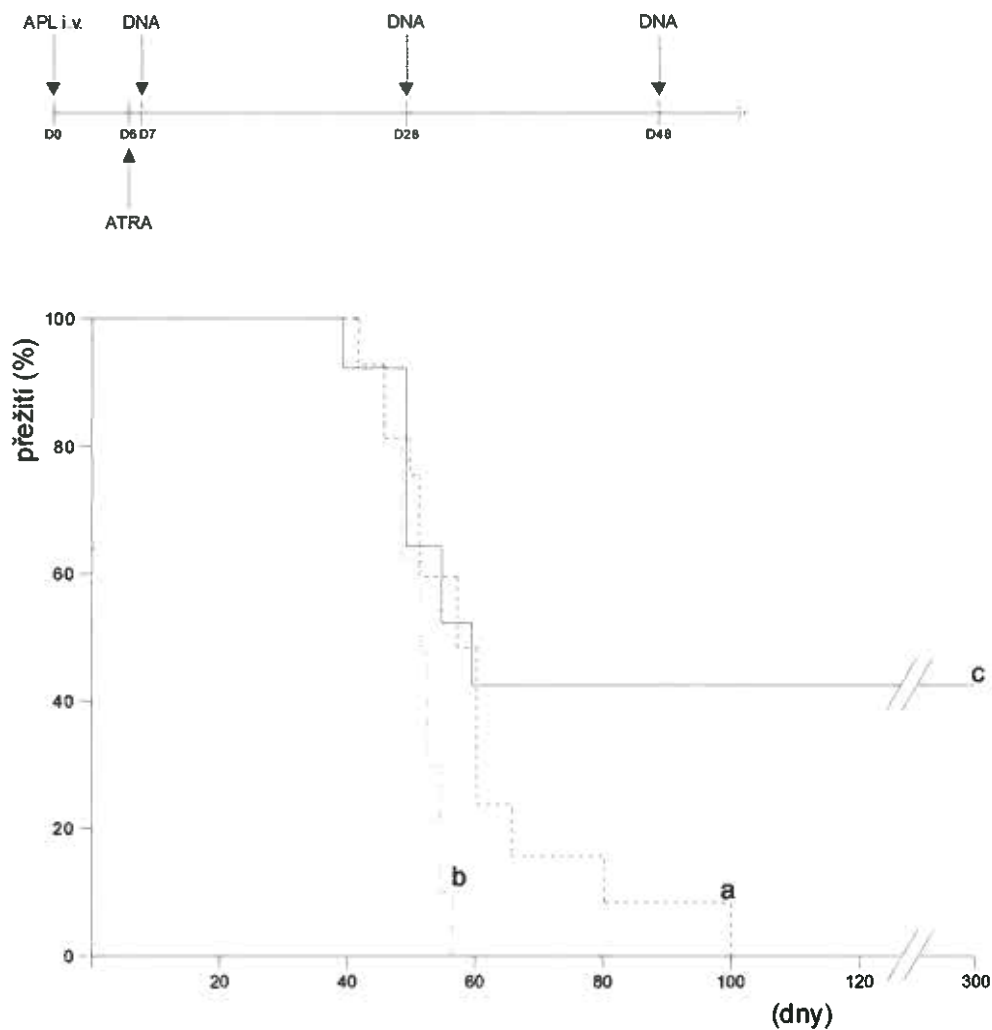
Myším byla aplikována letální dávka leukemických buněk (D 0) a pátý den se provedl odběr a zjistil počátek onemocnění na základě sníženého počtu krevních destiček. Nemocným myším se pak aplikovaly kapsle s ATRA nebo kapsle s placebem (Obr. 6, horní část). Myši byly rozděleny do čtyř skupin a následující den se jim i.m. podala DNA vakcinace a tato vakcinace se pak ještě dvakrát opakovala ve dvacetidenních intervalech. Kontrolní skupině (křivka a) byly aplikovány pouze kapsle s placebem a žádná vakcinace. Skupině b (křivka b), která byla též kontrolní, byly aplikovány pouze kapsle s ATRA. Experimentální skupině c (křivka c), byly aplikovány kapsle s placebem a fragment PML-RAR α -FrC, experimentální skupina d (křivka d) dostala kombinovanou léčbu ATRA a fragmentem PML-RAR α -FrC. Podle očekávání podání ATRA signifikantně prodloužilo přežití myši (žily o 65 dní déle než myši které dostaly pouze placebo). U skupiny myši, která obdržela jen DNA nedošlo k signifikantnímu prodloužení přežití. Kombinovaná léčba ATRA a DNA přežití myši výrazně prodloužila. Zatímco myši léčené pouze ATRA žily do 85. dne, myši léčené kombinovanou léčbou přežívaly déle než 120 dní.

V dalším pokusu autoři porovnávali účinek prázdného vektoru a fragmentu PML-RAR α -FrC. Podobně jako v předcházejícím protokolu byla myším aplikována (D 0) letální dávka APL. Všem nemocným myším se pak aplikovala kapsle s ATRA a byly rozděleny do tří skupin (Obr. 7, horní část). Experimentální skupinám (c) a (b) byla následující den i.m. podána vakcína s PML-RAR α -FrC (skupina c) nebo prázdným vektorem (skupina b). Vakcinace se opakovala třikrát ve dvacetidenních intervalech. Kontrolní skupina (a) žádnou vakcínu neobdržela. Stejně jako v předchozích pokusech se sledovala doba přežití (Obr. 7, dolní část). Myši které dostaly ATRA a prázdný vektor uhynuly do 60. dne, naproti tomu jako v předcházejících pokusech podání kombinované léčby vedlo k signifikantnímu prodloužení přežití (některé myši přežívaly déle než 300 dní).



Obr. 6: Kombinovaná léčba ATRA a PML-RAR α -FrC významně prodlužuje přežití leukemických (APL) myší.

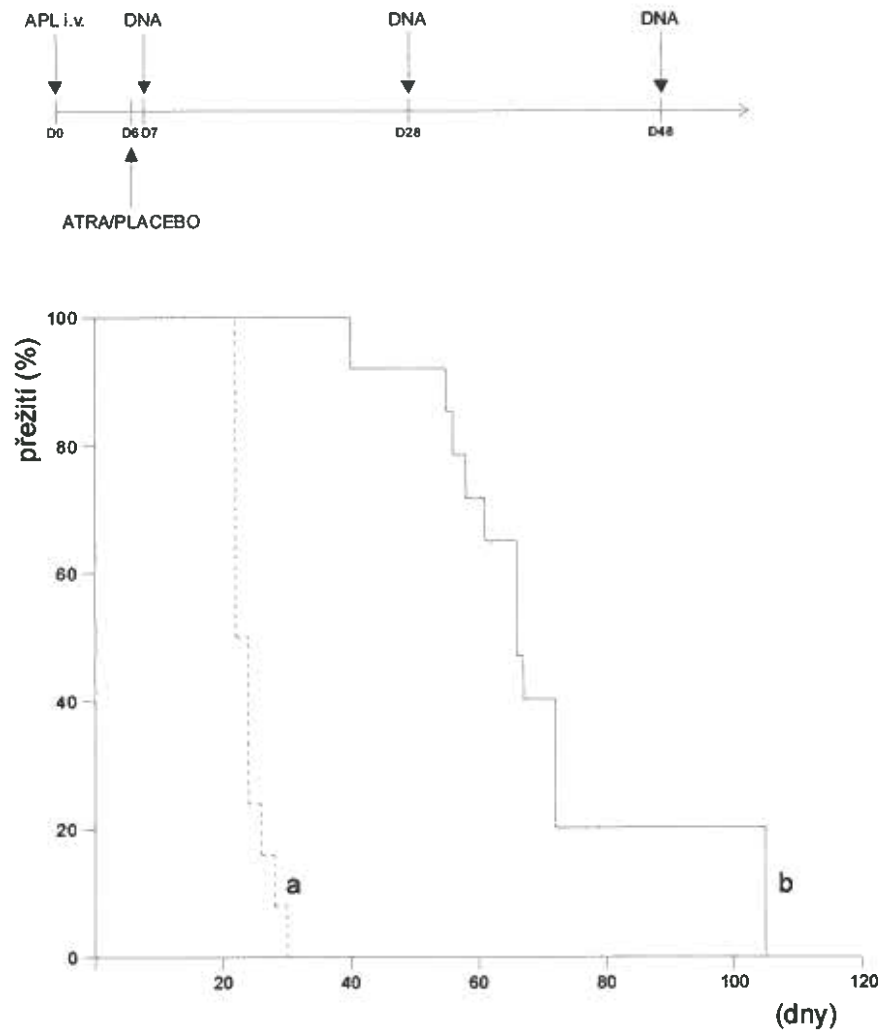
Všem myším bylo implantováno 10^7 leukemických (APL) buněk a byly rozděleny do čtyř experimentálních skupin. První skupině (n=12, křivka a) byly s.c. zavedeny (D 6) kapsle s placebem, druhé skupině (n=12, křivka b) byly s.c. zavedeny (D 6) kapsle s ATRA. Myši ze třetí skupiny (n=11, křivka c) obdržely (D 6) kapsle s placebem a opakovanou (D 7, D 28, D 48) i.m. injekci PML-RAR α -FrC. Čtvrtá skupina (n=12, křivka d) obdržela kombinovanou terapii ATRA (D 6) a PML-RAR α -FrC (D 7, D 28, D 48). Dále se sledovala doba přežití (dny).



Obr.7: Podání kombinované léčby ATRA a PML-RAR α -FrC vede k významnému prodloužení přežití v porovnání s léčbou samotnou ATRA.

Jak je uvedeno v protokolu (horní část), myším bylo implantováno (D 0) 10^4 APL buněk a všem pak byly aplikovány (D 6) kapsle s ATRA. První skupina (křivka a, n=12) byla léčena pouze ATRA, druhé skupině (křivka b, n=10) byl ještě třikrát aplikován (D 7, D 28, D 48) prázdný vektor a třetí skupině (křivka c, n=11) byl třikrát aplikován (D 7, D 28, D 48) fragment PML-RAR α -FrC. Sledovala se doba přežití (dny).

Dále si autoři položili otázku o účinnosti přítomnosti fragmentu FrC v DNA vakcíně (Obr. 8). Myším byla jako v předcházejících pokusech aplikována (D 0) letální dávka APL a jedné skupině byla aplikována kapsle s placebem (a), druhé skupině kapsle s ATRA (b). Pak byla oběma skupinám podávána vakcína PML-RAR α , v tomto pokusu bez fragmentu FrC. Myši ze skupiny která dostala placebo zemřely podle očekávání do 28. dne. Myši které obdržely ATRA+PML-RAR α přežily 100 dní. Tato experimentální skupina přežila jen o 20 dní déle než skupina (Obr. 6) která dostala jen ATRA.

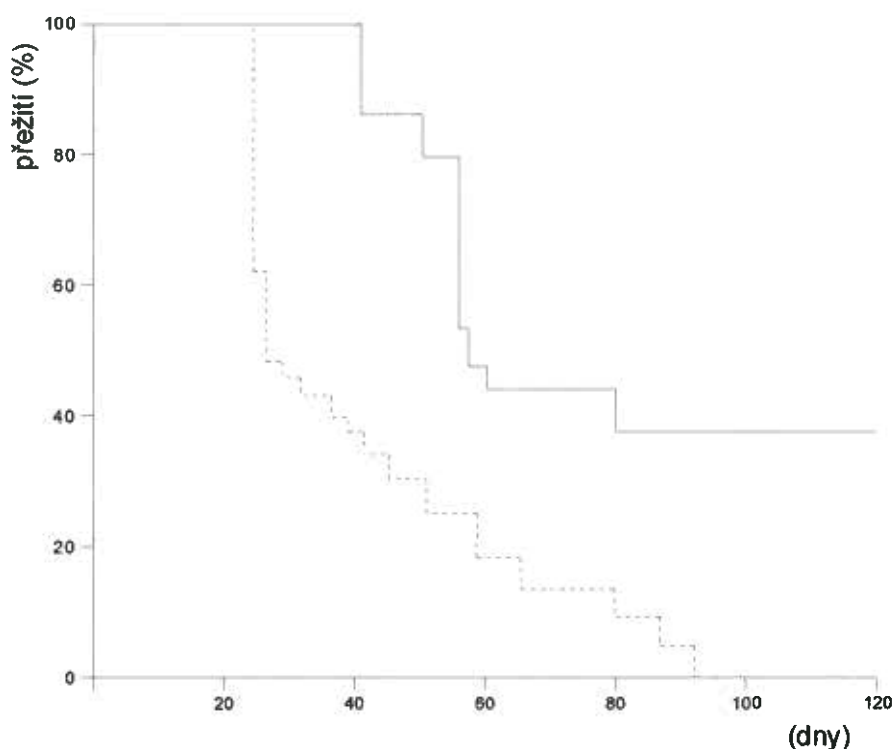


Obr. 8: Podání vakcíny bez fragmentu FrC snižuje její účinnost.

Myším bylo implantováno (D 0) 10^4 leukemických (APL) buněk a byly rozděleny do dvou skupin. První skupině (n=12, křivka a) byly aplikovány (D 6) kapsle s placebem. Druhé skupině (n=12, křivka b) byly aplikovány (D 6) kapsle s ATRA. Obě skupiny třikrát opakovaně obdržely (D 7, D 28, D 48) fragment PML-RAR α . Studovala se doba přežití (dny).

4.4. STUDIUM MECHANISMŮ DNA VAKCINACE

Jak bylo uvedeno v předcházející kapitole, jak v pařížské laboratoři (při použití protokolu, který se blíží klinické situaci) tak ve washingtonské laboratoři (při testu preventivního působení vakcíny na vznik APL) došlo při použití DNA vakcíny k signifikantnímu přežití leukemických myší. Autoři v obou laboratořích se snažili vysvětlit mechanismus který se podílí na přežití myší. V pařížské laboratoři si položili otázku, která z imunitních složek (humorální nebo buněčná) se na tomto mechanismu podílí. Za účelem zjištění produkce protilátek byla metodou ELISA měřena produkce protilátek u 47 myší léčených pouze placebem, pouze ATRA, PML-RAR α -FrC, nebo kombinací PML-RAR α -FrC+ATRA.



Obr. 9: Myši produkující protilátky přežívaly výrazně déle.

Kumulativní křivky přežití myší produkujících protilátky (plná čára, n=19) a myší bez produkce protilátek (přerušovaná čára, n=28). Produkce protilátek byla měřena metodou ELISA.

Na obrázku 9 je vidět, že myši které produkovaly protilátky přežívaly výrazně déle.

Dále v pařížské laboratoři zkoumali podíl buněčné složky na mechanismu přežití. Byl sledován počet CD4 a CD8 T lymfocytů v periferní krvi myší, kterým byla podána ATRA terapie nebo kombinovaná terapie. Pro účely vyhodnocení pokusu byly myši zpětně rozděleny jako NR (bez imunitní odpovědi, přežily maximálně do 60. dne), PR (s částečnou odpovědí, přežily 60-120 dní) nebo CR (v kompletní remisi, přežily déle než 120 dní). U myší CR a PR byly relativně vyšší počty CD4 a CD8 lymfocytů v porovnání s NR skupinou. Průměrné počty CD4 a CD8 lymfocytů u NR myší byly podobné počtu lymfocytů u zdravých neléčených myší.

Vzhledem k tomu, že buněčná odpověď souvisí s hladinami cytokinů, byl též proveden test na produkci cytokinů. Splenocyty nejdéle přežívajících leukemických myší léčených ATRA+ PML-RAR α -FrC byly kultivovány po dobu 48 hodin s APL buňkami. Jako kontrola sloužily splenocyty zdravých myší kterým byla podána pouze ATRA. U myší léčených ATRA+ PML-RAR α -FrC vzrostla po kultivaci až šestinásobně hladina IFN γ . U ostatních sledovaných cytokinů (IL-2, IL-4, IL-5, TNF α) nebyly pozorovány výrazné změny.

Zcela jiný (spíše teoretický) přístup uplatnili ve washingtonské laboratoři. Jak již bylo zmíněno, v důsledku translokace vzniká u APL neoprotein PML-RAR α . Tento neoprotein by mohl být prezentován na MHC I molekulách ve formě peptidů a působit jako antigen. Ve washingtonské laboratoři syntetizovali deset dekaeptidů, které by mohly z proteinu v oblasti fúze vzniknout a měřili jejich vazbu na MHC I molekuly v in vitro modelu. Zjišťovali jejich schopnost stabilizovat MHC I molekuly na povrchu buněk RMA-S. Tyto buňky exprimují H-2^b MHC molekuly, ale chybí jim TAP transportéry a je u nich nefunkční vazba peptidů na MHC v endoplasmatickém retikulu. Proto nemají jejich MHC molekuly stabilní konformaci. Jestliže jsou buňky RMA-S inkubovány s peptidy, které se váží na H-2^b MHC molekuly, je jejich exprese stabilizovaná a lze je pozorovat pomocí imunofluorescenční techniky. Žádný

z deseti zkoušených peptidů expresi molekul H-2^b nestabilizoval, tedy se pravděpodobně na tento typ molekuly MHC I neváže.

V dalším pokusu chtěli autoři zjistit, zda splenocyty z leukemických myší vakcinovaných PML-RAR α proliferují v odpovědi na dekamerní peptidy používané k vazebným pokusům. Splenocyty proliferovaly v přítomnosti PMA a ionomycinu (pozitivní kontrola). Neproliferovaly v přítomnosti imunologicky kompatibilních splenocytů (negativní kontrola), ale ani v přítomnosti splenocytů prekulturnovaných s peptidy.

5. DISKUSE

5.1. PŘÍPRAVA EXPERIMENTÁLNÍHO MODELU

APL se řadí mezi poměrně vzácné typy leukemií, její incidence v Evropě je 1/100 000 obyvatel. Charakteristickým diagnostickým znakem je chromosomální změna - translokace t(15;17), která je přítomná téměř u 100% případů APL [28]. Tento fakt přivedl několik laboratoří na myšlenku připravit experimentální myší model. Za tímto účelem byla konstrukce cDNA kódující PML-RAR α injekčně vpravena do oplozených vajíček a byl tak vytvořen transgenní model. Nezávisle na sobě vznikly 2 myší modely v laboratoři J.L. Grisolana a v laboratoři J.M. Bishopa. Tyto transgenní modely jsou vhodné pro studium APL, ale jsou obtížně použitelné pro studium klinických situací, protože jen určité procento jedinců s transgenem vyvine leukemii. Zdá se že translokace je pouze jednou z podmínek pro vznik APL a je pravděpodobné, že k jejímu vzniku přispívají další faktory. Bylo proto nutné vytvořit jiný model, vhodnější pro studium terapie. Jednou z možností bylo vytvoření transplantačního modelu.

Jak je uvedeno v úvodu této práce, při tvorbě transplantačního modelu se aplikuje daný počet leukemických buněk a u 100% jedinců, kteří tuto dávku obdrží se vyvine do tří až čtrnácti týdnů APL [5, 17]. Transplantační model pařížské laboratoře vychází z transgenního modelu J.M. Bishopa [5]. Tyto transgenní myši exprimují pouze transgen PML-RAR α a APL se vyvinulo u 10-40% jedinců. Po přenosu jejich leukemických buněk do syngenních FVB/N myši vyvinulo leukemii 100% příjemců. Buňky byly izolovány z kostní dřeně a slezin a byly aplikovány intravenózně. Tento experimentální model se v hlavních rysech shoduje s lidskou APL.

Transplantační model washingtonské laboratoře vychází z transgenního modelu J.L. Grisolana [17, 42]. Křížením transgenních linií exprimujících PML-RAR α a RAR α -PML byly získány myši transgenní pro oba geny. Z takto získaných myši vyvinulo APL 57% jedinců. Po přenosu jejich leukemických buněk do syngenních B6C3H myši vyvinuly tyto myši APL.

Leukemické buňky byly v tomto případě aplikovány i.p. a pocházely ze slezin leukemických myší. Téměř u všech pacientů s t(15;17) dochází k expresi PML-RAR α a 70-80% [29] exprimuje též detekovatelné hladiny RAR α -PML. Z těchto pozorování plyne, že přítomnost RAR α -PML není podmínkou ke vzniku APL, působí ale zřejmě jako faktor ovlivňující období latence a pravděpodobnost vzniku APL. Z tohoto hlediska se myší model použitý ve washingtonské laboratoři lépe napodobuje lidskou APL.

Skutečnost že APL vyvinulo u obou transplantačních modelů 100% příjemců ukazuje, že imunitní odpověď organismu na APL buňky je nízká. V pařížské laboratoři byli například sledováni šestitýdenní jedinci, kterým byla podána dávka 10² APL buněk. Všichni vyvinuli APL do pěti až šesti měsíců, jejich organismus tedy nebyl schopen eliminovat ani 100 APL buněk. Důvodem může být nízká schopnost antigenu vyvolat imunitní reakci, nepřístupnost nádorových buněk, nebo únik buněk imunitnímu dozoru.

APL je u lidí léčitelná farmakologickými dávkami ATRA, její podávání vede k remisi onemocnění. Proto bylo nutné též prokázat, že i myší APL je na ATRA citlivá. In vitro pokusy v obou laboratořích [5, 17] ukázaly, že leukemické buňky pocházející z transgenních myší jsou citlivé na ATRA. V laboratoři J.M. Bishopa [5] i v pařížské laboratoři bylo totéž prokázáno na transplantačním modelu in vivo. Stejně jako u pacientů s APL vede podání ATRA u myší k remisi onemocnění, ale u významného množství jedinců dochází k relapsu.

5.2. ÚLOHA IMUNITNÍHO SYSTÉMU V LÉČBĚ APL

Cílem práce pařížské laboratoře bylo najít způsob, jak relapsu zabránit. Snahou bylo zjistit, zda by podání DNA kodující protein PML-RAR α (vakcína) mohla vyvolat u pacientů s APL v remisi stimulaci jejich imunitního systému a zabránit tak eventuálnímu relapsu.

Velké množství studií již zkoumalo schopnost imunitního systému detekovat a eliminovat maligní buňky [3]. Pozorování T lymfocytů obklopujících či pronikajících do solidních nádorů

prokázalo, že T lymfocyty rozeznávají nádorové buňky. Není však jisté, zda T lymfocyty mohou nádorové buňky zabíjet. Schopnost T lymfocytů detekovat a eliminovat leukemické buňky byla prokázána klinickými reakcemi na lymfocytární infuze podané pacientům po alogenní transplantaci kostní dřeně. Infuze může napomoci k „odhojení“ leukémie. [36]. Dále u některých leukemií existují T lymfocyty specifické pro dané leukemické klony, schopné eliminovat leukemické buňky in vitro [33]. I přes tyto schopnosti imunitního systému nemá většina pacientů s APL dostatečně silnou imunitní odpověď proti leukemickým buňkám. Důvody nebyly objasněny, ale mohou zahrnovat nepřístupnost nádorových buněk, nedostatečnou stimulaci imunitního systému nádorovými antigeny a únik buněk imunitnímu dozoru [34].

5.3. IMUNITNÍ ODPOVĚĎ VYVOLANÁ APL BUŇKAMI

T-buněčná imunitní odpověď vzniká v důsledku rozpoznání přítomnosti cizorodých MHC I nebo MHC II molekul nebo v důsledku rozpoznání přítomnosti peptidů, které jsou těmito molekulami prezentovány. Jedním z cílů práce obou laboratoří jejichž práce jsem srovnávala bylo zjistit, zda mohou být APL buňky rozpoznány a eliminovány. Protože předchozí studie [57] uvedla, že exprese PML-RAR α je u některých buněk spojena se sníženou expresí MHC I molekul v důsledku inhibice TAP transportérů a/nebo proteinů LMP, bylo testem provedeným ve washingtonské laboratoři pomocí průtokové cytometrie nejprve prokázáno očekávané množství HLA molekul na povrchu APL buněk. Tento závěr byl již dříve potvrzen více studiemi [6, 27]. Výsledek testu ukazuje, že APL buňky by měly být v organismu rozpoznány, což je základní předpoklad pro vyvolání imunitní reakce. Dalším testem bylo ve washingtonské laboratoři ověřeno, že APL buňky jsou v alogenním příjemci eliminovány, pravděpodobně tedy exprimují MHC molekuly in vivo.

5.4. POUŽITÍ DNA VAKCÍNY U EXPERIMENTÁLNÍHO MODELU

DNA imunizace proti tumor specifickým antigenům může vést k detekci nádorových buněk imunitním systémem a k jejich eliminaci [51]. PML-RAR α i RAR α -PML proteiny pravděpodobně obsahují tumor specifické antigeny. V obou laboratořích byly zkoumány jako potenciální vakcíny cDNA kodující celý protein PML-RAR α nebo jeho části. Za tímto účelem byl vytvořen plasmidový vektor obsahující danou cDNA. Ve washingtonské laboratoři byla exprese všech cDNA v použitém vektoru (virový plasmid) navíc ověřena jejich transfekcí do buněk a následně metodou western blot s použitím anti-PML a anti-RAR α protilátek. V obou laboratořích došli k závěru, že preventivní vakcinace plasmidem PML-RAR α vyvolává imunizaci a prodloužení doby přežití. V pařížské laboratoři bylo dosaženo signifikantních výsledků jen s konstrukcí PML-RAR α (kodující 35 AK v oblasti fúze) spojenou s FrC. Plasmid kodující celý gen (full length PML-RAR α) vyvolal imunizaci pouze v pokusu washingtonské laboratoře. Může to být způsobeno rozdíly v použitých myších kmenech nebo APL buňkách a způsobech aplikace APL buněk (i.v. versus i.p.).

Zajímavým výsledkem je, že ve washingtonské laboratoři bylo stejně efektivní imunitní ochrany dosaženo při vakcinaci PML-RAR α a při vakcinaci částí PML. V obou studiích byly nádorové buňky získány z transgenních myší exprimujících lidský PML-RAR α gen. Lidský a myší úsek PML jsou na úrovni aminokyselin shodné jen ze 67% (zatímco úseky RAR α z 99%) a proto imunogenita vakcinace PML-RAR α může být dána též xenospecifickou reakcí na rozdíly v PML části proteinu. Pro upřesnění, z celkového množství 34 AK použitých ve fragmentu PML-RAR α je 8 ze 17 AK v části PML odlišných od lidské PML. Všech 17 AK v RAR α části je shodných. Je možné, že imunizace lidským PML-RAR α DNA u lidí by nemusela být tak úspěšná jako u myšího modelu. Vzniká tak otázka, která část PML-RAR α vyvolává imunologickou reakci a působí jako antigen .

Nejvýraznějším rozdílem v experimentálních postupech obou laboratoří je, že v pařížské laboratoři byly buňky aplikovány nejen jiným způsobem (i.v. versus i.p.), ale především podle jiného experimentálního schématu. APL buňky byly v Paříži aplikovány před DNA vakcinací. Ta byla vybrané skupině myši podána až poté, když všichni jedinci prokazatelně vyvinuli APL. Současně s vakcinací byla jedné skupině myši podána též ATRA, která je v klinické situaci pacientům podávána jako běžná léčba. Výsledky ukázaly, že kombinovaná léčba ATRA+PML-RAR α -FrC významně prodlužuje přežití myši v porovnání se skupinou myši léčenou pouze ATRA bez vakcíny. To dává naději na vznik nového terapeutického postupu - v současnosti je tato vakcína v první fázi klinického zkoušení.

5.5. MECHANISMY PŮSOBNÍ VAKCÍNY

Protože v důsledku translokace t(15;17) vzniká fúzní protein PML-RAR α , který by mohl být zdrojem potenciálních tumor specifických antigenů, zkoumalo vazbu a prezentaci peptidů z oblasti fúze již několik studií. V jedné z úvodních studií bylo zjištěno, že in vitro lze připravit klon CD4 T lymfocytů, které rozeznávají buňky prezentující na svém povrchu peptid složený z 25 AK z oblasti fúze PML-RAR α [15]. Následující studie však prokázaly, že tento peptid nestimuluje u lymfocytů, pocházejících z pacientů s APL v remisi, imunitní odpověď. Klonované T lymfocyty stejných pacientů navíc nereagovaly ani na buňky prezentující antigeny pocházející z tohoto peptidu [11].

Ve washingtonské laboratoři byly při studiu mechanismů DNA vakcinace syntetizovány překrývající se dekapeptidy, které by teoreticky mohly vzniknout v oblasti fúze. Výsledky vazebných testů washingtonské laboratoře (stabilizace MHC I molekul na buňkách RMA-S) ukázaly, že peptidy z oblasti fúze se na MHC I molekuly nevážou. Vzhledem k tomu, že na MHC I molekuly se vážou téměř výhradně peptidy o délce 8-10 AK, zdá se nepravděpodobné, že by spojení PML-RAR α kódovalo peptidy, které by byly v myším organismu imunogenní. Přesto existuje možnost, že nepatrně odlišný (jinak dlouhý) peptid by se mohl na MHC I molekuly vázat. K tomuto výsledku došlo i předcházející studie, ve kterých byla pozorována

žádná nebo nízká afinita těchto peptidů k MHC molekulám [4, 15]. Potenciální antigeny způsobující eliminaci APL buněk imunitním systémem se pravděpodobně nenachází v oblasti fúze.

Výsledky pařížské i washingtonské laboratoře nicméně nasvědčují existenci alternativních antigenů prezentovaných na povrchu APL buněk, protože jasně ukazují na roli adaptivní složky imunitního systému v eliminaci těchto buněk. V pařížské laboratoři byl zkoumán podíl buněčné i humorální složky na mechanismu přežití po aplikaci APL buněk a podání vakcíny nebo kombinované léčby. Již v předešlých studiích bylo prokázáno, že samotná ATRA kooperuje s T i B buňkami za účelem eliminace nádorových buněk [54], proto byl sledován počet CD4 a CD8 T lymfocytů v periferní krvi myši, které byly léčeny ATRA nebo kombinovanou terapií. Výsledky uvedených testů poukazují na to, že důležitou roli v PML-RAR α -FrC vakcinačním modelu (při vzniku imunitní paměti) hraje CD4 T lymfocytární odpověď.

IFN γ je mediátorem pro CD4 i CD8 T lymfocyty, jeho zvýšené hladiny odpovídají zvýšení počtu těchto buněk [54]. Přestože výrazná cytotoxická odpověď nebyla pozorována, role CD8 T lymfocytů ve vakcinačním modelu nemůže být úplně vyloučena.

Produkce protilátek byla v pařížské laboratoři zkoumána na modelu klinické situace u myši, kterým byla podána vakcína nebo kombinovaná terapie. Myši přežívaly výrazně déle pouze když dostávaly vakcínu současně s ATRA. Jako marker označující myši s imunitní reakcí a delší dobou přežití byla identifikována (pomocí western blot) protilátka anti-RAR α , která je indukována i u myši léčených pouze ATRA bez vakcinace. Není tedy jisté, jestli je tato protilátka výsledkem imunitní reakce vyvolané DNA vakcínou nebo slouží pouze jako marker imunitní odpovědi. Také je možné, že ATRA podporuje vznik nebo prezentaci zcela jiných tumor specifických antigenů, které by se mohly stát vhodnějšími cíly pro léčbu DNA vakcinací.

V uvedených pokusech bylo prokázáno, že APL buňky jsou rozpoznány adaptivní složkou imunitního systému v allogením i syngenním prostředí. Obdobné pokusy na modelu chronické myeloidní leukémie ukázaly, že imunitní odpověď může být stimulována na základě rozpoznání antigenů pocházejících z fúzního proteinu (BCR-ABL) nebo specifického antigenu exprimovaného na buňkách chronické myeloidní leukémie (proteinasa 3) [34]. Identifikace APL antigenů zůstává vzhledem k výše uvedeným výsledkům a slabé vazbě peptidů pocházejících z fúzního proteinu na HLA molekuly stále nevyřešeným úkolem.

6. ZÁVĚR

Výsledky obou prací ukazují na výhody stimulace imunitního systému během léčby leukémie, protože adaptivní složka imunity se prokazatelně (s vakcinací i bez ní) podílí na eliminaci nádorových buněk in vivo. Model u kterého byla studována klinická situace splňuje základní požadavky na jeho použitelnost: tumor je syngenní, léčba byla podána až po jeho transplantaci. Výsledky ukazují synergii mezi vakcinací a konvenční terapií ATRA, což odráží klinickou situaci ve které by vakcína mohla být použita. Dosud zkoušené DNA vakcíny byly v klinických studiích obecně dobře tolerovány a potřeba nových terapeutických postupů v léčbě leukémie je vysoká, proto vakcína vyvinutá v pařížské laboratoři nedávno vstoupila do prvních stadií klinických zkoušek.

APL by se mohla stát prvním druhem leukémie léčené DNA vakcinací. Přestože nejde o příliš běžný typ leukémie, zavedení nového léčebného principu by mohlo odstartovat novou řadu klinických úspěchů v léčbě nádorových onemocnění.

7. POUŽITÁ LITERATURA

1. Barajas, M., Mazzolini, G., Genove, G., Bilbao, R., Narvazia, I., Schmitz, V., et al.: Gene therapy of orthotopic hepatocellular carcinoma in rats using adenovirus coding for interleukin 12. *Hepatology* 33: 52-61, 2001.
2. Benett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T. et al.: Proposed revised criteria of the classification of acute myeloid leukaemia. *Ann. Intern. Med.*, 103: 626-629, 1985.
3. Blattman, J. N., Greenberg, P.D.: Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science* 305: 200-5, 2004.
4. Bocchia, M., Wentworth, P.A., Southwood, S., Sidney, J., McGraw, K., Scheinberg, D.A. et al.: Specific binding of leukemia oncogene fusion protein peptides to HLA class I molecules. *Blood* 85: 2680-4, 1995.
5. Brown, D., Kogan, S., Lagasse, E., Wissman, I., Alcalay, M., Pelicci, P.G., et al.: A PML-RAR α transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 2551-2556, 1997.
6. Bruno S., Ghiotto, F., Fais, F., Fagioli, M., Luzi, L., Pelicci, P.G. et al.: The PML gene is not involved in the regulation of MHC class I expression in human cell lines. *Blood* 101: 3514-3519, 2003.
7. Bustos, M., Sangro, B., Alzuguren, P., Gil, A.G., Ruiz, J., Beraza, N. et al.: Liver damage using suicide genes. A model for oval cell activation. *Am. J. Pathol.* 157: 549-559, 2000.
8. Castaigne, S., Chomienne, C., Daniel, M.T., et al.: All-trans retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia. Clinical results. *Blood*, 76: 1704, 1990.

9. Conry, R.M., Curiel, D.T., Strong, T.V., et al.: Safety and immunogenicity of a DNA vaccine encoding carcinoembryonic antigen and hepatitis B surface antigen in colorectal carcinoma patients. *Clin. Cancer Res.* 8: 2782-2787, 2002.
10. Curiel, D.T., Douglas, J.T.: *Cancer Gene Therapy*. Totowa, Humana Press, 2005.
11. Dermine, S., Bertazzoli, C., Marchesi, E., Ravagnani, F., Blaser, K., Corneo, G.M., et al.: Lack of T-cell mediated recognition of the fusion region of the pml/RAR α hybrid protein by lymphocytes of acute promyelocytic leukemia patients. *Clin Cancer Res* 2: 593-600, 1996.
12. de The H., Lavau, D., Marchio, A., et al.: The PML-RAR α fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 66: 675-684, 1991.
13. Dolivet, G., Merlin, J.L., Berberi-Heyob, M., Ramacci, C., Erbacher, P., Parache, R.M. et al.: In vivo growth inhibitory effect of interactive wild-type p53 gene transfer in human head and neck carcinoma xenografts using glucosylated polyethylenimine nonviral vector. *Cancer Gene Ther.* 9: 708-714, 2002.
14. Fei, R., Shaoyang, L.: Combination antigen therapy targeting c-myc and c-erbB(2) in the ovarian cancer COC(1) cell line. *Gynecol. Oncol.* 85: 40-44, 2002.
15. Gambacorti-Passerini, C., Grignani, F., Arienti, F., Pandolfi, P.P., Pelicci, P.G., Parmiani, G. Human CD4 lymphocytes specifically recognize a peptide representing the fusion region of the hybrid protein pml-RAR α present in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 81(5): 1369-1375, 1993.

16. Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M., Harris, C.C.: Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 54: 4855-4878, 1994.
17. Grisolano J.L., Wesselschmidt, R.L., Pelicci, P.G., Timothy, J.L.: Altered Myeloid Development and Acute Leukemia in Transgenic Mice Expressing PML-RAR α under control of Cathepsin G regulatory sequences. *Blood*, 89: 376-387, 1997.
18. Haupt, K., Roggendorf, M., Mann, K.: The potential of DNA vaccination against tumor-associated antigens for antitumor therapy. *Exp. Biol. Med.* 227: 227-237, 2002.
19. Henderson, E.S., Lister, T.A., Greaves, M.F.: *Leukemia*, 6th ed. Philadelphia [etc.], W.B. Saunders Company. A Division of Harcourt Brace and Company, 1996.
20. Hodge, J.W., Grosenback, D.W., Schlom, J.: Vector based delivery of tumor-associated antigens and T-cell co-stimulatory molecules in the induction of immune responses and anti-tumor immunity. *Cancer Detect. Prev.* 26: 275-291.
21. Horie, S., Kisaki, K., Ishii, H., Kazama, M.: Retinoic acid stimulates expression of thrombomodulin, a cell surface anticoagulant glycoprotein, on human endothelial cells: Differences between up-regulation of thrombomodulin by retinoic acid and cAMP. *Biochem. J.*, 281: 149-154, 1992.
22. Huang, M.E., Yu-Chen, Y., Su-Rong, C., et al.: Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 72: 567, 1988.
23. Ishikawa, H., Nakao, K., Matsumoto, K., Ichikawa, T., Hamasaki, K., Nakata, K.: Antiangiogenic gene therapy for hepatocellular carcinoma using angiostatin gene. *Hepatology* 37: 696-704, 2003.

24. Iwata, M., Eshima, Y., Kagechika, H.: Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. *Int. Immunol.* 15(8): 1017-1025, 2003.
25. Koutsky, L.A., Ault, K.A., Wheeler, C.M., et al.: Proof of principle Study Investigators. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N. Engl. J. Med.* 347: 1645-1651, 2002.
26. Lagasse, E., Weissman, I.L.: bcl-2 inhibits apoptosis of neutrophils but not their engulfment by macrophages. *J Exp. Med.* 179: 1047-1052, 1994.
27. Larghero, J., Zassadowski, F., Rousselot, P., Padua, R.A., Degos, L., Chomienne, C.: Alteration of the PML proto-oncogene in leukemic cells does not abrogate expression of MHC class I antigens. *Leukemia* 13: 1295-6, 1999.
28. Larson, R.A., Konko, K., Vardiman, J.W., et al.: Evidence for 15;17 translocation in every patient with acute promyelocytic leukemia. *Am. J Med.* 76: 827, 1984.
29. Li, Y.P., Anderesen, J., Zelent, A., Rao, S., Paietta, E., Tallman, M.S., et al.: RAR alpha1/RAR alpha2-PML mRNA expression in acute promyelocytic leukemia cells: a molecular and laboratory-clinical correlative study. *Blood* 90: 306-312, 1997.
30. MacGregor, R.R., Boyer, J.D., Ugen, K.E., et al.: First human trial of a DNA based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. *J. Inf. Dis.* 178: 92-100, 1998.
31. Marshall, C.J.: Tumor suppressor genes. *Cell* 89: 124-133, 1991.

32. Mocelin, S., Rossi, C. R., Lise, M., Marincola, F.M.: Adjuvant immunotherapy for solid tumors: from promise to clinical application. *Cancer Immunol. Immunother.* 51: 583-595, 2002.
33. Molldrem, J.J., Clave, E., Jiang, Y.Z., Mavroudis, D., Raptis, A., Hensel, N.: Cytotoxic T lymphocytes specific for a nonpolymorphic proteinase 3 peptide preferentially inhibit chronic myeloid leukemia colony-forming units. *Blood* 90: 2529-34, 1997.
34. Molldrem J.J., Lee P.P., Wang C., Felio, K., Kantarjian, H.M., Champlin, R.E., et al.: Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat Med* 6: 2000, 1018-23.
35. Morris, M. J., Tong, W.P., Cordon-Cardo, C., Drobnjak, M., Kelly, W.K., Slovin, S.F. et al.: Phase I trial of BCL-2 antisense oligonucleotide (G3139) administered by continuous intravenous infusion in patients with advanced cancer. *Clin. Cancer res.* 8: 679-683, 2002.
36. Nagler, A., Ackerstein, A., Or, R., Naparstek, E., Slavin, S.: Adoptive immunotherapy with haploidentical allogeneic peripheral blood lymphocytes following autologous bone marrow transplantation. *Exp. Hematol.* 28: 1225-31, 2000.
37. Oettgen, H.F., Old, L.J. The history of cancer immunotherapy. In DeVita, V.T., Hellmann, S., Rosenberg, S.A. (Eds.), *Biological Therapy of Cancer: Principles and Practice*. JB Lppincott Co., Philadelphia, PA, 1991, 87-119.
38. Ostrand-Rosenberg, S., Gunther, V.S., Armstrong, T.A., Pulaski, B.A., Pipeling, M.R., Clements, V.K., Lamouse-Smith, N. Immunologic targets for the gene therapy of cancer. In Lattime, E.C., Gerson, S.L. (Eds.), *Gene therapy of Cancer*. Academy press, San Diego, C.A., 1999, 33-48.

39. Padua, R.A., Larghero, J., Robin, M., le Pogam, C., Schlagetr, M.H., Muszlak, S. et al.: PML-RARA-targeted DNA vaccine induces protective immunity in a mouse model of leukemia. *Nat. Med.* 9: 1413-7, 2003.
40. Pandolfi, P.P., Alcalay, M., Fagioali, M., Zangrilli, D., Mencarelli, A., Diverio, D.: Genomic variability and alternative splicing generate multiple PML/RAR alpha transcripts that encode aberrant PML proteins and PML/RAR alpha isoforms in acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J.* 11(4): 1397-1407, 1992.
41. Pollock, J.L., Lane, A.A., Schrimpf, K., Ley, T.J.: Murine acute promyelocytic leukemia cells can be recognized and cleared in vivo by adaptive immune mechanisms. *Haematologica* 90(8), 1042-9, 2005.
42. Pollock, J.L., Westervelt, P., Kurichety, A.K., Pelicci, P.G., Grisolano, J.L., Ley, T.J.: A bcr-3 isoform of RAR α -PML potentiates the development of PML-RAR α -driven acute promyelocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 15103-8, 1999.
43. Ribas, A., Butterfield, L.H., Economou, J.S.: Genetic immunotherapy for cancer. *Oncologist* 5: 87-98, 2000.
44. Roy, I., Holle, L., Song, W., Holle, E., Wagner, T., Yu, X.: Efficient translocation and apoptosis induction by adenovirus encoded VP22-p53 fusion protein in human tumor cells in vitro. *Anticancer Res.* 22: 3185-3189, 2002.
45. Sauter, E.R., Takemoto, R., Litwin, S., Herlyn, M.: p53 alone or in combination with antisense cyclin D1 induces apoptosis and reduces tumor size in human melanoma. *Cancer Gene Ther.* 9: 807-812, 2001.

46. Shen, Y., White, E.: p53-dependent apoptosis pathways. *Adv. Cancer Res.* 82: 55-84, 2001.
47. Smallpox vaccine adverse events among civilians-United States, March 4-10. *MMWR, Morb. Mortal. Wkly. rep.* 52: 201-203, 2003.
48. Swisher, S.G., Roth, J.A., Komaki, R., Gu, J., Lee, J.J, Hicks, M. et al.: Induction of p53-regulated genes and tumor regression in lung cancer patients after intratumoral delivery of adenoviral p53 (INGN 201) and radiation therapy. *Clin. Cancer Res.* 9: 93-101, 2003.
49. Swisher, S.G., Roth, J.A., Nemunaitis, J., Lawrence, D.D., Kemp, B.L., Carrasco, C.H. et al.: Adenovirus mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 91: 763-771, 1999.
50. Tanaka, T., Yamasaki, H. Mesnil, M.: Induction of a bystander effect in HeLa cells by using a bigenic vector carrying viral thymidine kinase and connexin 32 genes. *Mol. Carcinog.* 30: 176-180, 2001.
51. Tuting, T., Gambotto, A., DeLeo, A., Lotze M.T., Robbins P.D., Storkus, W.J.: Induction of tumor antigen-specific immunity using plasmid DNA immunization in mice. *Cancer Gene Ther* 6: 73-80, 1999.
52. Vollmer Jr., C.M., Eilber, F.C., Butterfield, L.H., Ribas, A., Dissette, V.B., Koh, A., et al.: Alpha-fetoprotein-specific genetic immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 59: 3064-3067, 1999.
53. von Schilling, C., Duyster, J., Herrmann, F.: Fortschritte im Verstandnis der Leukamieentscheidung. *Internist*, 37: 971-981, 1996.

54. Westervelt P., Pollock, J.L., Oldfather K.M., Walter M.J., Ma M.K., Williams, A., et al.: Adaptive immunity cooperates with liposomal all-trans-retinoic acid (ATRA) to facilitate long-term molecular remissions in mice with acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9468-9473, 2002.
55. Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., et al.: Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247: 1465-1468, 1990
56. Xiao, W., Chirmulem, N., Schnell, M.A., Tazelaar, J., Hughes, J.V., Wilson, J.M.: Route of administration determines induction of T-cell-dependent humoral responses to adeno-associated virus vectors. *Mol. Ther.* 1: 323-329, 2000.
57. Zheng, P., Guo, Y., Niu, Q., Levy, D.E., Dyck, J.A., Lu, S., et al.: Proto-oncogene PML controls genes devoted to MHC class I antigen presentation. *Nature* 396: 373-376, 1998.

Acute promyelocytic leukemia is not curable, patients usually survive no longer than 10 years. The introduction of this work describes different therapeutic strategies against cancer that can increase survival. The potential efficacy of one of these strategies was studied in a laboratory of Institut Universitaire d'Hématologie, Université Paris VII-Denis Diderot, Hôpital Saint-Louis. A DNA based vaccine was used to boost immune response in an animal model. This vaccine was developed by fusing the human promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor- α (PML-RAR α) oncogene to tetanus fragment C (FrC) sequences. It was shown that a DNA vaccine specifically targeted to an oncoprotein can have a significant effect on survival. The results of this work were compared to another similar study; they both suggest that therapeutic vaccines could be used in acute promyelocytic leukemia treatment. However, relevant tumor specific antigens have not been identified yet.