



# UNIwersytet Medyczny

## IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

**lek. Monika Barbara Mielcarek**

Katedra i Klinika Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej  
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

### **PORÓWNANIE METOD EKSPANSJI KOMÓREK CIK (CYTOKINE- INDUCED KILLER CELLS) W ASPEKCIE IMMUNOTERAPII PO TRANSPLANTACJI HEMATOPOETYCZNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH U DZIECI**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych w zakresie medycyny  
(pediatria – hematologia i onkologia)

Promotor:

**Prof. dr. hab. n. med. Krzysztof Kałwak**

Katedra i Klinika Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej  
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

Recenzenci:

**Prof. dr hab. n. med. Mirosław Markiewicz**

Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

**Dr hab. n. med. Ewa Biń**

Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii Gdańskiego  
Uniwersytetu Medycznego

Wrocław, dnia 12 września 2014

## Życiorys

**Data i miejsce urodzenia:** 10.01.1983 roku, Ostrzeszów

### **Wykształcenie:**

- X 2009 – IX 2014 Wydział Lekarski Kształcenia Podyplomowego – studia doktoranckie  
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
- X 2002 – VI 2008 Wydział Lekarski  
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

### **Przebieg pracy zawodowej:**

- XI 2009 – XI 2014 Klinika Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej  
Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 1 we Wrocławiu, lekarz
- X 2008 – XI 2009 Dolnośląskie Centrum Onkologii we Wrocławiu, lekarz
- VIII 2007 Hospital Universitario “Virgen De La Arrixaca”, Murcia, Hiszpania
- VIII-IX 2005 Università’ Degli Studi Di Perugia, Perugia, Włochy

### **Dorobek naukowy:**

**Prace pełne:** 7; **h-index:** 1; **liczba cytowań:** 8; **IF:** 4,227; **Pkt. MNiSW/KBN:** 77

1. Ussowicz M, Musiał J, Mielcarek M, Tomaszewska A, Nasiłowska-Adamska B, Kałwak K, Gorczyńska E, Mariańska B, Chybicka A. Steroid-sparing effect of extracorporeal photopheresis in the therapy of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant.Proc.* 2013 Vol.45 no.9; s.3375-3380.

2. Siewiera K, Krukowska-Jaros J, Gorczyńska E, Mielcarek M, Nawrot U, Baran E, Reich A, Kałwak K. Ecthyma gangraenosa o etiologii *Fusarium solani* u 8,5-letniego chłopca po allotransplantacji komórek hematopoetycznych szpiku. *Mikol.Lek.* 2013 T.20 nr 1; s.37-45.

3. Sikora M, Wróbel Ł, Mielcarek M, Kałwak K. Application of the rule induction to discover survival factors of patients after bone marrow transplantation. *J.Med.Inform.Technol.* 2013 Vol.22; s.35-53.

4. Kulej D, Mielcarek M, Kałwak K. Ocena skuteczności terapii chelatującej deferyazyrokiem u pacjentów pediatrycznych z hemosyderozą wtórną po allogeniczej transplantacji komórek macierzystych. *Onkol.Pol.* 2012 T.15 nr 1; s.24-29.

5. Kałwak K, Porwolik J, Mielcarek M, Gorczyńska E, Owoc-Lempach J, Ussowicz M, Dyla A, Musiał J, Paździor D, Turkiewicz D, Chybicka A. Higher CD34+ and CD3+ cell doses in the graft promote long-term survival, and have no impact on the incidence of severe acute or chronic graft-versus-host disease after in vivo T cell-depleted unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation in children. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2010 Vol.16 no.10; s.1388-1401.

6. Kałwak K, Porwolik J, Mielcarek M, Rybka B, Ryczan R, Ussowicz M, Gorczyńska E, Owoc-Lempach J, Chybicka A. Cytokiny a choroba "przeszczep przeciwko gospodarzowi" u dzieci poddanych allogeniczej transplantacji komórek hematopoetycznych od dawców niespokrewnionych. *Onkol.Pol.* 2009 T.12 nr 3; s.87-91.

7. Tworowska-Bardzińska U, Kubicka E, Ślęzak R, Mielcarek M, Bednarek-Tupikowska G, Bolanowski M, Milewicz A. Lack of relationship between 174G\_C promoter polymorphism of the IL-6 gene and indices of metabolic syndrome in non-obese healthy subjects. *Endokrynol.Pol.* 2009 T.60 nr 3; s.172-179

### **Doniesienia zjazdowe (41)**

### **Nagrody i wyróżnienia:**

- 2011/2012 Beneficjent Studenckiego Programu Stypendialnego Miasta Wrocław
- 2008 Nagroda Metropolity Wrocławskiego
- 2008 Odznaka Wzorowego Studenta Uniwersytetu Medycznego
- 2007/2008 Stypendium Ministra za osiągnięcia w nauce
- 2000-2002 Stypendium Prezesa Rady Ministrów

## Streszczenie

**Merytoryczne uzasadnienie podjęcia badań:** Pomimo intensywnego leczenia skojarzonego wznowa choroby nowotworowej po transplantacji krwiotwórczych komórek macierzystych (HSCT) pozostaje główną przyczyną niepowodzeń terapeutycznych. Immunoterapia adoptywna z zastosowaniem komórek CIK (*cytokine-induced killer cells*) może okazać się pomocna w kontroli choroby resztkowej po HSCT i może stać się alternatywą dla wlewu limfocytów dawcy (DLI) u pacjentów bez objawów choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD). Modyfikacja protokołu ekspansji komórek CIK może prowadzić do zmiany ich fenotypu, potencjału proliferacyjnego, cytotoksyczności lub alloreaktywności. Sugeruje się możliwość rozdzielenia efektu przeszczep przeciwko nowotworowi od GvHD. Pomimo, że prowadzone są badania nad różnymi protokołami ekspansji komórek CIK, to jak dotąd nie ukazało się żadne doniesienie porównujące wyniki kilku metod hodowli w jednorodnym układzie eksperymentalnym.

**Cel pracy:** 1) Analiza możliwości wzmocnienia potencjału cytotoksycznego przy minimalizacji alloreaktywności komórek CIK poprzez modyfikację protokołu ich hodowli. 2) Analiza fenotypu komórek CIK. 3) Ocena możliwości ekspansji komórek CIK na potrzeby immunoterapii adoptywnej po HSCT z oceną bezpieczeństwa terapii.

**Materiały i metody:** Po izolacji mononuklearów z krwi obwodowej (MNC) 16 dawców krwiotwórczych komórek macierzystych wyprowadzono 54 hodowle limfocytów. Komórki poddano ekspansji *ex vivo* 4 protokołami: 1) IFN $\gamma$ /OKT3/IL-2, 2) IFN $\gamma$ /OKT3/IL-2+IL-12, 3) IFN $\gamma$ /OKT3/IL-2+IL-21, 4) IFN $\gamma$ /Tymoglobulina/IL-2. Hodowlę prowadzono przez 21-28 dni. Badano gęstość komórkową, żywotność, immunofenotyp, efektywność ekspansji, zgodność z wymogami GMP. Wykonano testy cytotoksyczności (z komórkami linii nowotworowej K562 i świeżo wyizolowanymi blastami) oraz alloreaktywności (z komórkami macierzystymi i MNC).

**Wyniki i ich wykorzystanie:** Niezależnie od protokołu ekspansji głównym efektem immunologicznym były limfocyty CD3+CD8+ stanowiące 74-82% komórek, przy czym odsetek komórek CD3+ z receptorem antygenowym TCR $\gamma\delta$  mieścił się w granicach 11-16%, a TCR $\alpha\beta$  71-79%. Żaden z badanych protokołów nie prowadził do ekspansji komórek regulatorowych Treg CD4+CD25+FoxP3+, a ich odsetek ograniczył się do 0,3-2,1%. Zarówno kostymulacja IL-2 i IL-12, jak i IL-2 i IL-21 prowadziła do wzmoczonej proliferacji komórek o fenotypie CD3+CD56+ (odpowiednio 43% i 46%) przy czym ich liczba bezwzględna wzrastała 11-13 tys. razy. Nie korelowało to jednak ze wzrostem potencjału cytotoksycznego tych komórek, a z większą skłonnością do wchodzenia na szlak apoptozy (16-19% komórek vs 6-7% przy monostymulacji). Protokół ekspansji komórek CIK z Tymoglobuliną pozwalał na zwiększenie ich potencjału cytotoksycznego bez eskalacji alloreaktywności (ponad 80% specyficznej lizy komórek linii K562 przy stosunku komórek efektorowych do docelowych równym 40:1). Wiązało się to z wyższą ekspresją receptorów aktywujących, wysoką ekspresją molekuł adhezyjnych, niskim odsetkiem komórek regulatorowych, niskim odsetkiem uznawanych za litycznie nieaktywne komórek CD3+CD33+ oraz niższą ekspresją receptora Fas, co faworyzowało przeżycie komórek. Ekspansja komórek CIK z wykorzystaniem Tymoglobuliny, Imukinu, Proleukiny i medium AIMV wzbogaconego albuminą ludzką była zgodna z GMP i pozwoliła na wyprodukowanie wystarczającej ilości efektorów immunologicznych na potrzeby immunoterapii adoptywnej. Powyższe wyniki pozwoliły na pierwsze na świecie zastosowanie wlewu haploidentycznych komórek CIK aktywowanych Tymoglobuliną u dziecka z progresją ostrej białaczki mieloblastycznej, u którego wykorzystano wszystkie dostępne opcje terapeutyczne. Podczas czteromiesięcznej obserwacji nie zanotowano żadnych niepożądanych objawów terapii. Uzyskano krótkotrwały klirens blastów z poprawą chimeryzmu allogenicznego na obwodzie.

## **Wnioski:**

1. Protokół ekspansji komórek CIK zmodyfikowaną metodą z Tymoglobuliną pozwala na zwiększenie ich potencjału cytotoksycznego w stosunku do linii komórek nowotworowych K562 i świeżo wyizolowanych blastów bez wzrostu alloreaktywności tak stymulowanych komórek (TCR $\gamma\delta$ ) w stosunku do allogenicznych komórek macierzystych szpiku i komórek jednojądrzastych krwi obwodowej.
2. Wzmoczona cytotoksyczność wiąże się z wyższą ekspresją receptorów aktywujących (CD16, CD161, CD314) na komórkach CIK, wysoką ekspresją molekuł adhezyjnych (CD31, CD56), niskim odsetkiem komórek regulatorowych Treg i komórek naiwnych CD4+CD45RA+, niskim odsetkiem uznawanych za litycznie nieaktywne komórek CD3+CD33+ oraz niższą ekspresją receptora Fas, co faworyzuje przeżycie tych komórek.
3. Ekspansja komórek CIK z wykorzystaniem Tymoglobuliny, leków Imukin i Proleukin oraz medium AIMV wzbogaconego albuminą ludzką:
  - a. pozostaje w zgodzie z zasadami GMP i pozwala w warunkach klasy czystości powietrza A na wyprodukowanie wystarczającej ilości efektorów immunologicznych na skalę kliniczną na potrzeby immunoterapii adoptywnej u dzieci z ryzykiem wznowy po allogenicznej transplantacji hematopoetycznych komórek macierzystych;
  - b. nie wiąże się z wystąpieniem istotnych objawów niepożądanych po zastosowaniu terapii in vivo, co pozwala na oszacowanie profilu bezpieczeństwa allogenicznych infuzji CIK co najmniej na poziomie określonym dla standardowego DLI stanowiąc pomost do przeprowadzenia badań klinicznych I fazy.