

# Terapia komórkowa w GUMed

Terapie komórkowe to stosunkowo nowy dział medycyny, który w nowoczesnej historii rozpoczęły przeszczepy szpiku. Jednak leczenie przy pomocy innych komórek to dopiero XXI wiek. W Europie uznanie faktu, że komórki to leki, nastąpiło w 2007 roku, kiedy Unia Europejska wprowadziła definicję produktów terapii zaawansowanej, czyli komórek o standardzie leku.

Jednym z kandydatów do miana produktu terapii zaawansowanej są limfocyty T regulatorowe CD4+CD25+ (Treg). Jest to szczególna populacja w układzie odpornościowym człowieka. Chociaż ich odsetek to mniej niż 1% leukocytów krwi obwodowej, to regulują one całą odpowiedź odpornościową. W dużym skrócie limfocyty Treg działają w ten sposób, że wywierają silny efekt hamujący, gdy układ odpornościowy zaczyna niszczyć własne tkanki, natomiast nie przeszkadzają w walce z infekcjami. Ta wybiórcza inhibicja reakcji autoagresyjnych powoduje, że immunosupresyjne limfocyty Treg określane są czasami przez analogię jako „inteligentne sterydy”. Zmniejszona ilość limfocytów Treg w organizmie jest wiązana z niepowodzeniem przeszczepów oraz zachorowaniami na choroby alergiczne i autoimmunologiczne.

W 2016 r. wiedza o limfocytach Treg jest niesłychanie bogata i przekrojowa. Fakt, że dziś mówimy o ich zastosowaniu medycznym jest przykładem szybkiego postępu, biorąc pod uwagę, że populacja została odkryta u zwierząt zaledwie 20 lat temu (odkrywcą jest Shimon Sakaguchi). Część tej wiedzy powstała także w Gdańsku dzięki pracy naukowców i lekarzy naszej *Alma Mater*.

Moja przygoda z limfocytami Tregs rozpoczęła się bardzo przypadkowo. Jednym ze spostrzeżeń w trakcie realizacji mojej pracy doktorskiej w zespole prof. A. Myślińskiego i prof. J. Myślińskiej było opisanie prostej i logicznej korela-

cji między słabą odpowiedzią na szczepienia a silnym endogennym hamowaniem odpowiedzi odpornościowej u osób starszych. Wykazaliśmy, że za to hamowanie odpowiedzialne są limfocyty o fenotypie CD4+CD25+, które akumuluje się wraz z wiekiem. W literaturze pojawiły się wtedy dopiero pierwsze doniesienia o tym, że są to właśnie limfocyty Treg u ludzi (lata 1999-2001). O ich działaniu wtedy nie było wiadomo zbyt wiele, stąd dopiero kontynuując nasze badania wykazaliśmy, że zasadnicze znaczenie dla działania limfocytów Treg ma bezpośredni kontakt z innymi komórkami. Paradoksalnie naszym najważniejszym odkryciem tamtego okresu był opis niezwykle niebezpiecznego zachowania limfocytów Tregs: hamowania przez nie aktywności komórek NK w bezpośrednim kontakcie tych dwóch populacji. To doniesienie zostało wkrótce opisane przez wiele innych zespołów jako przyczyna rozsiewu procesu nowotworowego, w którym limfocyty Treg w guzie nie pozwalają komórkom NK niszczyć komórek nowotworowych. Wiele lat później opracowano lek ipilimumab, który wyłącza tę szkodliwą aktywność limfocytów Tregs.

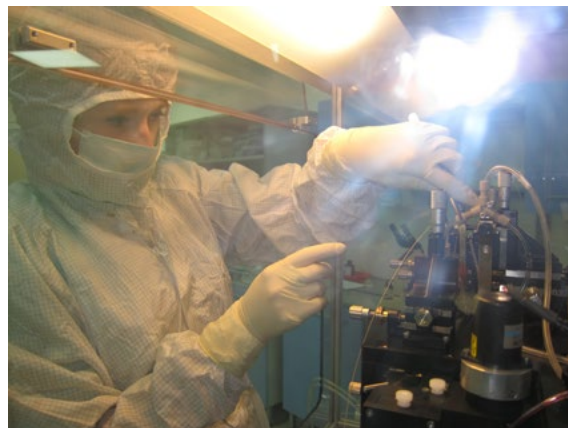
Wracając do badań w GUMed, równocześnie z badaniami podstawowymi nad limfocytami Tregs miałem przyjemność prowadzić prace nad tymi komórkami po przeszczepie szpiku we współpracy z Katedrą i Kliniką Hematologii prof. A. Hellmanna. Wykazaliśmy, że pacjenci, którzy otrzymują materiał przeszczepowy ubogi w limfocyty Tregs częściej rozwijają tzw. chorobę przeszczep przeciw gospodarzowi – powikłanie immunologiczne odpowiedzialne za dużą część zgonów po przeszczepie. W chorobie tej przeszczepiony układ odpornościowy zaczyna traktować tkanki biorcy jako obce i niszczy je, o ile nie zostanie w porę zatrzymany przez hamujące ten proces limfocyty Tregs. W tamtym okresie rozpoczynały się dopiero badania wielu zespołów (wliczając w to nasze prace), które udowodniły, że choroba przeszczep przeciw gospodarzowi jest modelowym schorzeniem dla wielu chorób autoimmunologicznych, w których zmniejszona liczba immunosupresyjnych limfocytów Tregs nie jest w stanie zatrzymać autoagresywnych limfocytów efektorowych niszczących własne tkanki. Dzisiaj wiadomo, że podobny defekt komórek Tregs jest odpowiedzialny za niszczenie wysp trzustkowych w cukrzycy typu 1. W stwardnieniu rozsianym w ten sposób niszczone są osłonki nerwów, w reumatoidalnym zapaleniu stawów chrząstki stawowe, dlatego dochodzi do odrzucania przeszczepów narządów litych, do ciężkiej postaci astmy i innych schorzeń alergicznych, a nawet do szybkiej progresji we wrodzonych dystrofiach mięśniowych. W tamtym okresie miałem jednak do dyspozycji jedynie wyniki swoich prac w przeszczepie szpiku, w szczepieniach i kilka wykonanych własnych prac podstawowych. Mimo tego skromnego zasobu wiedzy rozpoczęliśmy prace, aby w powyższych chorobach wykorzystać sztuczne zwiększenie poziomu komórek Tregs poprzez ich namnożenie *in vitro* i podanie zwrotne pacjentowi. W ten ▶▶



Ryc. 1. W naszym pierwszym laboratorium w TAZD (rok 2007): prof. Piotr Trzonkowski i mgr Anita Dobyszek przy pracy

► sposób można byłoby wyhamować autoreaktywne limfocyty i doprowadzić do zatrzymania procesu autoagresji. Już wtedy, w roku 2003, dysponowaliśmy gotowym do wdrożenia sposobem zastosowania tych komórek. Niestety moje aplikacje grantowe w tamtym okresie nie spotkały się z dużym zainteresowaniem. Dlatego, kontynuując mimo wszystko ten wątek, nawiązałem kontakt z prof. Kathryn Wood, która kieruje Laboratorium Regulacji Immunologicznej Uniwersytetu w Oksfordzie. W grupie pracowałem w latach 2004–2006, rozwijając nieco inną metodę supresji opartą o przeciwciała monoklonalne w przeszczepach nerki, ale przy okazji pracowałem też nad swoją ideą zastosowania komórek regulatorowych w terapii. Dzięki badaniom z okresu doktoratu, a także pojawiającym się wtedy nowym modelom zwierzęcym stosowanym w badaniach Tregs po powrocie do Polski bardzo szybko zaprojektowaliśmy gotowy do klinicznego zastosowania system izolacji komórek Tregs i ich namnażania *in vitro* do postaci bezpiecznego preparatu gotowego do podania pacjentowi (byłem zresztą pierwszym ochotnikiem, na którym przetestowałem preparat nawet dwukrotnie, aby wyeliminować efekt uczulenia). Pomogło mi wtedy na pewno dobre środowisko pracy stworzone przez prof. Myśliwskiego oraz nowe laboratorium o podwyższonym standardzie czystości użyte przez prof. J. Bigdę. Spełnienie wszystkich wymagań bezpieczeństwa, aby doprowadzić do przeszczepu zajęło nam już wtedy około roku. Wreszcie w 2008 r., we współpracy z prof. A. Hellmannem i dr hab. M. Bieniaszewską z Kliniki Hematologii i Transplantologii GUMed, komórki regulatorowe namnożone sztucznie w laboratorium Zakładu Immunologii Klinicznej i Transplantologii po raz pierwszy na świecie zostały zastosowane u pacjenta. Uzyskanie efektu klinicznego po podaniu tych komórek choremu na przewlekłą chorobę przeszczep przeciw gospodarzowi było ogromnym sukcesem całego zespołu zaangażowanego w program.

Kolejnym krokiem milowym tej terapii była współpraca z dr hab. N. Marek-Trzonkowską, obecnie moją żoną. Dzięki naszym eksperymentom przeprowadzonym w tamtym czasie pozyskiwanie i namnażanie limfocytów stało się znacznie prostsze i szybsze do zastosowania w klinice. Udoskonalliliśmy technikę, którą można było szybko, bezpiecznie i relatywnie tanio oferować pacjentom. Jak zwykle w nauce, dzięki zbiegowi okoliczności rozpoczęliśmy też niezwykle ważne badania w cukrzycy. Natalia prowadziła w tamtym czasie w zespole prof. Myśliwskiej, prof. Raczyńskiej i prof. Myśliwiec prace dotyczące cukrzycy typu 1. Bardzo szybko doszliśmy do wniosku, że limfocyty Tregs mają bardzo duże znaczenie dla rozwoju tej choroby. Ze względu na wprowadzone w tamtym okresie uregulowania prawne na poziomie Unii Europejskiej, preparat musieliśmy zacząć traktować jako produkt terapii zaawansowanej. W związku z tym musieliśmy stworzyć od początku gotowe *dossier* badanego leku z wymaganymi badaniami bezpieczeństwa i toksyczności, co zajęło nam kolejny rok. Bardzo duże znaczenie miały także prace związane z regulacjami prawnymi dotyczącymi tej terapii, w których ogromną pracę włożyły prof. Myśliwiec i prof.

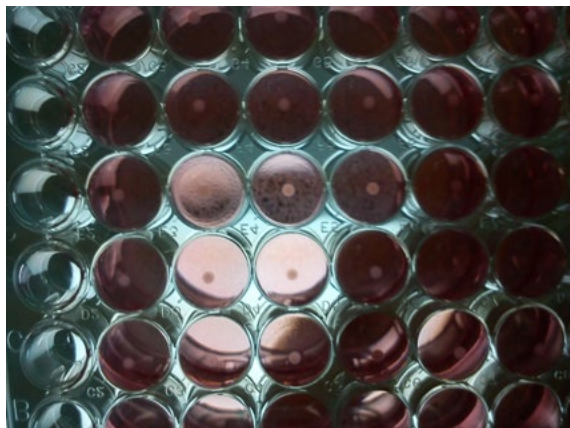


Ryc. 2. Dr hab. Natalia Marek-Trzonkowska podczas przygotowywania do pracy sortera komórek

Balcerska. W 2010 r. we współpracy z prof. Myśliwiec stworzyliśmy badanie kliniczne i zaczęliśmy stosować tę terapię eksperymentalnie w cukrzycy typu 1 u dzieci w Klinice Pediatrii Diabetologii i Endokrynologii. Z praktycznego punktu widzenia było to niezwykle ważne badanie w procesie przenoszenia wiedzy podstawowej do kliniki człowieka. Przeprowadzone przez nas niekomercyjne badanie kliniczne udowodniło bezpieczeństwo i skuteczność preparatu. Preparat podano do dzisiaj kilkudziesięciu pacjentom, uzyskując znaczącą redukcję dawki przyjmowanej insuliny u dużej części z nich, a u kilku nawet insulinoniezależność, trwającą nawet kilka lat. Z punktu widzenia patomechanizmu choroby jest to przełom, ponieważ w cukrzycy typu 1 nie ma obecnie leków pozwalających na zatrzymanie procesu chorobowego, a jedyna terapia to podawanie insuliny, której nie produkuje trzustka zniszczona przez proces autoagresji. Terapia na pewno wymaga udoskonaleń, ale cieszy fakt, że nasze założenia badawcze potwierdziły się i będą mogły służyć pacjentom. Ważność tych badań polegała jednak nie tylko na osiągniętych wynikach, ale także na fakcie, że bez udziału środków komercyjnych stworzyliśmy od podstaw i przetestowaliśmy w środowisku akademickim preparat, który następnie opatentowaliśmy i dzięki temu możemy dalej prowadzić działania rejestracyjne. Jest to tym ważniejsze, że program w całości został przeprowadzony



Ryc. 3. Sorter komórek daje możliwość podglądu i kontroli jego pracy – monitor po lewej to widoczny w lampie stroboskopowej strumień zawierający krew pacjenta, z którego wylapywane są limfocyty Tregs; monitor po prawej pokazuje rozbłyski kropelek zawierających pojedyncze sortowane komórki (jasny punkt po lewej to sortowane limfocyty Tregs), szybkość sortu rzędu kilkunastu tysięcy komórek na sekundę powoduje, że świecenie kropelek jest bardzo jasne



Ryc. 4. W wyniku sortu otrzymuje się niewielką ilość limfocytów Tregs. Na zdjęciu w powiększeniu płytka hodowlana zawierająca komórki w trzecim dniu hodowli. Białe kłaczkowate dołki to limfocyty Tregs. Szczególnie u dzieci hodowla często rozpoczyna się od pojedynczego dołka zawierającego kilkadziesiąt tysięcy komórek, a kończy na cieplarce pełnej płytek zawierających setki milionów limfocytów Tregs gotowych do terapii

w Polsce, a nawet dzisiaj ze względu na zaawansowanie technologiczne procedury, wprowadzeniem tego typu terapii zajmuje się zaledwie kilkanaście ośrodków na świecie. Trzeba też pamiętać, że badań niekomercyjnych w Polsce prowadzi się bardzo mało ze względu na ich koszty, natomiast ich wartość intelektualna jest szczególnie doceniana w naukowej części procesu rejestracji.

Nasze prace docenił świat nauki i medycyny. Pierwsze wyniki opublikowaliśmy *cum laude* w bardzo dobrych piśmie branżowych, np. *Diabetes Care, Blood, Clinical Immunology, Annals of Surgery*. Zostaliśmy uhonorowani wieloma nagrodami krajowymi i zagranicznymi, m.in.: Nagrodą the Transplantation Society 2009, Nagrodą International Society of Pediatric and Adolescent Diabetes 2012, Nagrodą Złoty Skalpel 2012, Nagrodą Wydziału V Polskiej Akademii Nauk 2013. Wyniki pokazywaliśmy, jako zaproszeni prelegenci, na najlepszych kongresach diabetologicznych i immunologicznych, m.in.: w USA, Wielkiej Brytanii, Turcji, Niemczech, Hiszpanii, Portugalii, Austrii, Chinach, Australii i Francji. Kilka lat temu, działające w ramach COST stowarzy-



Ryc. 5. W Klinice podczas podawania preparatu limfocytów Tregs; na zdjęciu od prawej: prof. M. Myśliwiec, dr I. Derkowska i pielęgniarka mgr L. Szumacher-Sharma z Katedry i Kliniki Pediatrii Diabetologii i Endokrynologii

zenie Action to Focus and Accelerate Cell-Based Tolerogenic Therapies, skupiające naukowców z kilkunastu krajów pracujących z terapiami komórkowymi wybrało mnie na koordynatora grupy roboczej T regulatory cells in the clinic.

W ramach programu STRATEGMED prowadzimy obecnie badania drugiej fazy w cukrzycy typu 1 w kolejnym protokole klinicznym, a we współpracy z dr. K. Chwojnickim, prof. W. Nyką i prof. B. Karaszewskim z Kliniki Neurologii Dorosłych oraz prof. E. Szurowską z Zakładu Radiologii rozpoczęliśmy też testy w stwardnieniu rozsianym. Jeśli wszystko potoczy się tak jak planujemy, to preparat limfocytów Tregs będzie pierwszym polskim lekiem oryginalnym zarejestrowanym centralnie w Europejskiej Agencji Leków. Posiadane laboratorium rozwojowe jest jednak zbyt małe, aby skutecznie prowadzić wymagane do tego badania. Potrzebne są także fundusze, które sfinansują prace rejestracyjne. Dlatego Uczelnia próbuje rozbudować istniejącą bazę laboratoryjną oraz zachęcić stronę biznesową, zakładając spółkę typu *spin-off*. Mamy nadzieję, że oznacza to dalszy rozwój naszej terapii.

prof. Piotr Trzonkowski,  
kierownik Zakładu Immunologii  
Klinicznej i Transplantologii

## Poznaj swoją specjalizację

Projekt *Poznaj swoją specjalizację* organizowany przez SCOME IFMSA Oddział Gdańsk odbył się 15 kwietnia br. w sali wykładowej Collegium Biomedicum. Studenci mieli okazję dowiedzieć się m.in. jak wygląda codzienna praca oraz dyżury, czy jest możliwość rozwoju i co robić, by dostać się na specjalizację.

Gośćmi byli: chirurg onkologiczny **dr Kamil Drucis** z Katedry i Kliniki Chirurgii Onkologicznej GUMed, geriatra i internista **dr Adam Hajduk** z Kliniki Chorób Wewnętrznych, Chorób Tkanki Łącznej i Geriatrii GUMed oraz neonatolog **lek. Małgorzata Mrozińska** z Oddziału Neonatologii Szpitala Specjalistycznego św. Wojciecha w Gdańsku-Zaspie.



Nagrody dla uczestników ufundował Blokfit, największe Centrum Boulderingu w Polsce oraz dr Gadżet.

Iga Gołębiowska, koordynator lokalny projektu *Poznaj swoją specjalizację*