

Istnieją coraz liczniejsze dowody potwierdzające ważną rolę układu odpornościowego w powstawaniu i rozwoju nowotworów. Coraz lepsze zrozumienie molekularnych i komórkowych mechanizmów funkcjonowania układu immunologicznego stworzyło podstawy do rozwoju wielu innowacyjnych i obiecujących strategii terapeutycznych, polegających na modulacji nieswoistej i swoistej immunologicznej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Największym osiągnięciem immunoterapii nowotworów ostatniego 20-lecia jest opracowanie technologii oraz wprowadzenie szeregu swoistych przeciwciał monoklonalnych do praktyki klinicznej. Pierwszą cytokiną zarejestrowaną do leczenia nowotworów był interferon α , następnie liczne badania kliniczne nad interleukiną 2 doprowadziły do jej rejestracji w leczeniu raka nerki. Prężnie rozwijającą się gałęzią biernej swoistej immunoterapii jest terapia adoptywna, w której wykorzystuje się autologiczne komórki naciekające guzy lub autologiczne limfocyty izolowane z krwi obwodowej. Nieswoiste immunostymulatory i immunomodulatory nie znalazły trwałego miejsca w rutynowej praktyce klinicznej, jednak zawiesina uśmierconych *Mycobacterium vaccae* okazała się bardziej skuteczna w badaniu III fazy w leczeniu niedrobnokomórkowego raka płuc (gruczolakoraka) w porównaniu z chemioterapią. W licznych badaniach klinicznych analizuje się skuteczność terapeutyczną różnych typów tzw. terapeutycznych szczepionek rakowych, m.in. peptydowych, wirusowych, DNA, szczepionek opartych na białkach szoku cieplnego (HSP) oraz komórkach, w tym genetycznie modyfikowanych komórkach dendrytycznych (DC) czy komórkach guza (GMTV). Wyniki przeprowadzonych badań są nadal niesatysfakcjonujące. Dotychczas w Kanadzie i Rosji zarejestrowano po jednej szczepionce rakowej. Lekiem bliskim zatwierdzenia przez FDA (*Food and Drug Administration*) w USA, oczekiwanego w maju 2010 r., w leczeniu hormonalnego raka stercza jest Sipeleucel-T, składający się z autologicznych DC, inkubowanych *ex vivo* z białkiem fuzyjnym składającym się PAP (*prostatic acid phosphatase* – antygen obecny na komórkach gruczołu krokowego) połączonego z GM-CSF. Bioimmunoterapeutyki, przeznaczone szczególnie dla celów aktywnej immunoterapii nowotworów, stanowią unikalną grupę produktów medycznych. Wykazują one zupełnie inną farmakodynamikę oraz mechanizm działania niż chemioterapeutyki czy tzw. małe cząsteczki (*small molecules*) w niszczeniu komórek nowotworowych. Nadal jed-

Immunoterapia nowotworów i perspektywy jej rozwoju

Immunotherapy of cancer and perspectives of its development

Jacek Mackiewicz^{1,2}, Andrzej Mackiewicz^{1,2,3}

¹Zakład Immunologii Nowotworów, Katedra Biotechnologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

²Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

³BioContract Sp. z o.o.

Wprowadzenie

Główne zadanie układu immunologicznego to obrona organizmu przed patogenami. Zdolność układu odpornościowego do rozpoznania i eliminowania komórek nowotworowych stanowi podstawę immunoterapii nowotworów. Istnieją liczne dowody potwierdzające, jak ważną rolę w zwalczaniu nowotworów odgrywa układ immunologiczny:

- spontaniczna remisja u chorych na niektóre nowotwory;
- obecność swoistych limfocytów T-cytotoksycznych w środowisku guza lub regionalnych węzłach chłonnych;
- obecność nacieków monocytarnych, limfocytarnych czy komórek plazmatycznych w obrębie guza;
- zwiększona zachorowalność na niektóre nowotwory u chorych poddanych immunosupresji;
- udokumentowane remisje choroby po zastosowaniu immunomodulatorów.

Lepsze rozumienie molekularnych i komórkowych mechanizmów kontrolujących układ immunologiczny umożliwiło rozwój wielu innowacyjnych i obiecujących strategii terapeutycznych modulujących odpowiedź immunologiczną. Wydaje się, że w ciągu najbliższych 5–10 lat immunoterapia znajdzie stałe miejsce w leczeniu nowotworów, obok leczenia chirurgicznego, radioterapii i chemioterapii.

Immunologiczna odpowiedź przeciwnowotworowa

Teoria „nadzoru immunologicznego” Thomasa i Burnetta zakłada, że nowo powstałe komórki nowotworowe w organizmie człowieka są pod stałą kontrolą układu obronnego, który je lokalizuje i niszczy. W pewnym momencie komórki nowotworowe mogą jednak wymknąć się spod kontroli układu odpornościowego. W ostatnim dwudziestoleciu odkryto wiele mechanizmów „ucieczki komórek” guza przed niszczącym działaniem układu odpornościowego. Należą do nich:

- obniżenie lub brak ekspresji antygenów zgodności tkankowej klasy I i II – (MHC I i II) [1–3];
- utrata antygenów nowotworowych [4–6];
- nieprawidłowa wewnątrzkomórkowa obróbka antygeny w celu przygotowania go do prezentacji (upośledzenie funkcji proteosomów lub zależnych od ATP białek transportujących peptydy TAP) [7];
- obniżenie lub brak sygnałów kostymulujących, np. cząsteczki B7 czy CD40 na powierzchni komórki nowotworowej;
- upośledzona ekspresja cząsteczek adhezyjnych;
- upośledzona ekspresja receptora Fas i/lub liganda Fas prowadząca do apoptozy limfocytów T-cytotoksycznych (CTL) i/lub komórek naturalnych zabójców (NK) [8–10];

nak agencje regulatorowe aprobują tylko standardowe metody oceny efektywności tych preparatów (przeznaczonych dla chemioterapeutyków), w tym dobór chorych, planowanie protokołów badań klinicznych, cele (*end points*) czy systemy oceny efektywności terapii. W końcu, podobnie jak w przypadku innych rodzajów terapii nowotworów, konieczna jest personalizacja leczenia z wykorzystaniem biomarkerów, których nadal się poszukuje. Obecnie na świecie toczy się burzliwa dyskusja na temat istotnych zmian w zakresie planowania i realizacji badań klinicznych aktywnej immunoterapii. Bez tych zmian można przeoczyć produkty medyczne, które potencjalnie mogą przynieść zysk terapeutyczny chorym.

Słowa kluczowe: immunoterapia, terapeutyczne szczepionki rakowe, przeciwciała monoklonalne, immunoterapia adoptywna, czerniak, rak nerki, rak stercza.

- synteza i wydzielanie czynników immunosupresyjnych, takich jak IL-10, TGF- β , PGE₂, blokujących odpowiedź immunologiczną [11, 12];
- prowadząca do apoptozy limfocytów T ekspresja TRIAL (*TNF related apoptosis inducing ligand*) na komórkach nowotworu [13] oraz
- przewlekła stymulacja swoistych komórek T prowadząca do ich klonalnego wyczerpania (*clonal exhaustion*) lub śmierci (*activation induced cell death* – AICD) [14].

Jeżeli nowotwór ominie układ nadzoru immunologicznego, to może przejść do kolejnej podklinicznej fazy, tzw. fazy równowagi (*equilibrium phase*), w której utrzymuje się i broni przed narastającym naporem układu immunologicznego. Wprawdzie limfocyty i wydzielany przez nie INF- γ wywierają nacisk na komórkę nowotworową, ale jej niestabilność genetyczna oraz liczne mutacje chronią ją przed tym atakiem. Faza równowagi jest procesem długotrwałym i może przebiegać latami. Kolejną fazą jest faza ucieczki (*escape phase*), która może być wynikiem wyczerpania czy zablokowania układu immunologicznego bądź zmniejszonej ekspresji MHC typu I na komórkach nowotworowych lub zmniejszenia ich wrażliwości na INF- γ . W przypadku nowotworów nieimmunogennych faza równowagi nie występuje, a transformowana komórka automatycznie przechodzi do fazy następnej (fazy ucieczki). Jest to faza kliniczna związana z szybkim wzrostem i rozwojem nowotworu [15, 16].

W przypadku nowotworów wywołanych przez wirusy i substancje chemiczne stwierdzono, że antygeny związane z nowotworami są immunogenne i powodują swoistą odpowiedź komórkową i humoralną. Przypuszcza się, że to właśnie komórki cytotoksyczne odgrywają decydującą rolę w tym procesie. Należą do nich: limfocyty cytotoksyczne – CD8+, komórki NK (*natural killers*) oraz część populacji limfocytów T-pomocniczych – CD4+. W odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego biorą udział także granulocyty obojętnochłonne [17] i makrofagi. Na odpowiedź humoralną składają się przeciwciała przeciwko antygenom nowotworowym produkowane przez limfocyty B. Proces prowadzący do lizy komórek nowotworowych w tym mechanizmie może obejmować aktywację układu dopełniacza lub też indukcję cytotoxiczności zależnej od przeciwciał (*antibody dependent cell-mediated cytotoxicity* – ADCC).

Rola różnych subpopulacji pomocniczych limfocytów T (Th) nie została do końca wyjaśniona [18]. Wydzielane przez nie cytokiny mają kierować odpowiedzią przeciwnowotworową w stronę odpowiedzi komórkowej bądź humoralnej. W zależności od profilu wydzielanych cytokin Th dzieli się na dwie grupy: Th1 produkujące IL-2, INF- γ czy IL-12, indukujące odpowiedź typu komórkowego, oraz Th2 wydzielające IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, wzmagające odpowiedź humoralną, a hamujące komórkową [19]. Ponadto, subpopulacja regulatorowych limfocytów T CD4+/CD25^{high}Foxp3 może hamować odpowiedź immunologiczną na drodze parakrynowego wydzielania immunosupresyjnych cytokin, takich jak IL-4 i IL-10.

Wydajna odpowiedź przeciwnowotworowa układu immunologicznego przebiega w dwóch fazach: indukcji i efektorowej, w fazie indukcji dochodzi do wzbudzenia swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej, w fazie efektorowej natomiast do wybiórczej eliminacji komórek nowotworowych. W fazie indukcji sekwencyjnie dochodzi do uruchomienia następujących mechanizmów:

- prezentacji antygenów nowotworowych w kontekście białek MHC (HLA) typu I limfocytom CD8+ lub HLA typu II limfocytom CD4+;
- dostarczenia sygnału kostymulującego limfocytom T, np. połączenie cząsteczek B7.1 (CD80, CD86) z ligandami receptora CD28 na powierzchni limfocytów T [20];
- dostarczenia sygnału proliferacji, którym najczęściej są cytokiny lub czynniki wzrostu, komórkom układu odpornościowego w środowisku, gdzie prezentowany jest antygen nowotworowy [21].

There is increasing evidence supporting the important role of the immune system in growth and progression of cancer. A better understanding of molecular and cellular mechanisms governing the immune system formed the basis for development of a number of innovative and promising cancer therapies modulating non-specific and specific anti-cancer immune responses. In the last 20 years the most impressive achievement in tumour immunotherapy has been the development of technology for production of various specific monoclonal antibodies for human use and their approval for clinical practice. Interferon-alpha was the first approved cytokine for the treatment of cancer. Subsequently many clinical trials evaluating interleukin-2 led to its approval for treatment of kidney cancer. Adoptive immunotherapy is a dynamically developing field of passive specific immunotherapy, where autologous tumour infiltrating or autologous peripheral blood lymphocytes are used. Non-specific immunostimulators and immunomodulators have not found wide approval in routine clinical practice; however, a suspension of heat-killed *Mycobacterium vaccae* seemed to be effective in a phase III study in the treatment of non-small cell lung cancer (adenocarcinoma), when compared to chemotherapy. In a number of clinical trials the efficacy of various types of so-called therapeutic cancer vaccines have been tested. They included peptide vaccines, viruses, DNA, heat-shock protein vaccine and cellular vaccines including genetically modified dendritic cells (DC) or tumour cells (GMTV). So far only in Canada and Russia have cancer vaccines been registered. A drug which is near FDA (Food & Drug Administration) approval in the USA, expected in May 2010, is Sipuleucel-T, which consists of autologous DC, incubated *ex vivo* with a fusion protein consisting of PAP (prostatic acid phosphate) conjugated with GM-CSF. Bioimmunotherapeutics particularly designated for active specific cancer immunotherapy form a unique group of medicinal products of advanced technology. They display completely different pharmacodynamics and mode of action than chemotherapeutic agents or so-called small molecules in destruction of cancer cells. However, regulatory authorities approve only methods adopted from clinical trials of chemical agents for assessment of the effectiveness of these drugs, including design of clinical trials, patient selection, end points and assessment of tumour clinical responses. Finally, similarly to other cancer treatment strategies, personalization of specific active

Indukcja odpowiedzi immunologicznej jest inicjowana przez prezentację antygeny przez komórki dendrytyczne (*dendritic cells* – DC) [22]. Komórki dendrytyczne fagocytują uwalniające antygeny nowotworowe w miejscu ognisk martwicy guza, następnie migrują do najbliższych węzłów chłonnych, przechodząc tzw. proces „dojrzwania”. W węzłach prezentują antygen na swojej powierzchni w kontekście HLA typu I limfocytom T (CD8+) i HLA typu II limfocytom CD4+. Tutaj dochodzi do formowania CTL CD8+ oraz CD4+, jak również przeciwciał skierowanych przeciwko swoistym antygenom nowotworowym.

Do indukcji odpowiedzi humoralnej wymagana jest prezentacja antygeny nowotworowego przez limfocyt B swoistemu limfocytowi T CD4+. Bezpośredni kontakt limfocytów oraz wydzielanie przez komórkę CD4+ cytokin pobudzają limfocyt B do przekształcenia się w komórkę plazmatyczną i wydzielania przez nią przeciwciał.

Faza efektorowa odpowiedzi przeciwnowotworowej może obejmować mechanizmy niszczenia komórki przez:

- swoiste aktywowane limfocyty T CD8+ oraz CD4+;
- aktywowane komórki NK;
- granulocyty i makrofagi naciekające guz;
- swoiste przeciwciała warunkujące aktywację układu dopełniacza lub ADCC;
- zahamowanie neoangiogenezy w guzie poprzez cytokiny, np. INF- γ wydzielany przez aktywowane limfocyty T (CD8+ i CD4+) do mikrośrodowiska guza.

Brak jednego lub kilku wyżej wymienionych składowych umożliwia komórkom nowotworowym ucieczkę spod nadzoru immunologicznego, co wiąże się z progresją nowotworu. Poznane dotychczas mechanizmy faz indukcji i efektorowej odpowiedzi przeciwnowotworowej stanowią podstawę do rozwoju strategii immunoterapii, która ma na celu przywrócenie mechanizmom obronnym zdolności do rozpoznawania i eliminacji komórek nowotworowych [23].

Immunoterapia nowotworów

Immunoterapia nowotworów jest metodą leczenia polegającą na ingerencji w układ odpornościowy człowieka w celu zwiększenia lub modyfikacji mechanizmów obronnych przeciw rozwijającemu się nowotworowi. Immunoterapię można podzielić na bierną i czynną, każda może mieć charakter swoisty lub nieswoisty.

Nieswoista bierna immunoterapia

Nieswoista bierna immunoterapia polega na podawaniu czynników lub aktywowanych komórek efektorowych w celu nieswoistej aktywacji układu immunologicznego wywołującego działanie przeciwnowotworowe. Terapię tę można prowadzić przy wykorzystaniu np. cytokin czy komórek LAK (*lymphokine activated killers*).

Cytokiny to białka niskocząsteczkowe, które odgrywają istotną rolę we wszystkich fazach odpowiedzi immunologicznej, zarówno typu humoralnego, jak i komórkowego. Do wywołania efektu biologicznego konieczne jest połączenie cytokiny ze swoistym receptorem na komórkach docelowych (limfocyty T i B, komórki NK, monocyty/makrofagi i granulocyty). Poszczególne cytokiny mogą wykazywać efekt antagonistyczny, agonistyczny, addytywny lub synergistyczny na te same procesy biologiczne. Znane są takie efekty przeciwnowotworowe cytokin, jak:

- bezpośredni efekt cytotoksyczny (TNF- α),
- modyfikacja migracji limfocytów (TNF, IL-1, INF- γ);
- zwiększenie wrażliwości komórek nowotworowych na efekty cytotoksyczne różnych czynników biologicznych czy chemicznych (INF- γ , TNF- α);
- hamowanie proliferacji komórek nowotworowych (INF- α , INF- γ), oraz
- aktywacja komórek NK (GM-CSF, IL-2, IL-6) [24].

Pierwszą zarejestrowaną do stosowania klinicznego rekombinowaną cytokiną był INF- α . Znalazł on zastosowanie w leczeniu białaczki włochatokomórkowej, T-komórkowego chłoniaka skóry, przewlekłej białaczki szpikowej,

immunotherapy with employment of new biomarkers is necessary. Currently there is intensive discussion regarding the needs of immunotherapy clinical trial design and execution modification. Without these changes we may overlook medicinal products which could bring a therapeutic benefit for patients.

Key words: immunotherapy, therapeutic cancer vaccines, monoclonal antibodies, adoptive immunotherapy, melanoma, renal cancer, prostate cancer.

chłoniaków niezrębnych o małym stopniu złośliwości, szpiczaka mnogiego, czerniaka (w leczeniu uzupełniającym wysokimi dawkami), mięsaka Kaposiego, rozlanego raka nerki i rakowiaka.

Cytokiną zarejestrowaną w USA w leczeniu paliatywnym raka nerki jest IL-2. Badania wykazały jednak, że wysokie dawki IL-2 stymulują limfocyty Treg, które *de facto* hamują odpowiedź immunologiczną [25]. Obecnie toczy się wiele badań klinicznych z zastosowaniem cytokin, m.in. IL-7 [26], IL-12 [27] czy IL-21 [28] w terapii różnych nowotworów.

Inną formą nieswoistej biernej immunoterapii jest zastosowanie komórek LAK. Terapia ta polega na izolacji z krwi chorego komórek jednojądrzastych, ich stymulacji IL-2 *ex vivo* oraz ponownym przetoczeniu z podaniem dużych dawek IL-2 w celu dalszej stymulacji limfocytów. Ten rodzaj terapii zastosował Rosenberg w badaniu klinicznym raka nerki i czerniaka. Okazało się jednak, że efekt terapeutyczny wywołany był przez IL-2, a nie komórki LAK, co było powodem zawieszenia dalszych badań [29, 30].

Swoista bierna immunoterapia

Swoista bierna immunoterapia jest metodą leczenia polegającą na podaniu czynników lub komórek efektorowych swoiście skierowanych przeciwko danej komórce nowotworowej. Jako przykład mogą posłużyć przeciwciała przeciwko antygenom występującym na komórkach nowotworowych, terapie komórkowe wykorzystujące limfocyty naciekające guz (*tumor infiltrating lymphocytes* – TIL), które są izolowane, namnożone i aktywowane, po czym ponownie przetaczane, czy limfocyty krwi obwodowej stymulowane *in vitro* komórkami prezentującymi antygen. Pewne nadzieje pokłada się również w terapii polegającej na modyfikacji autologicznych limfocytów izolowanych z krwi obwodowej (*peripheral blood lymphocytes* – PBLs) [31].

Bierną immunoterapię przy użyciu przeciwciał opisano już 100 lat temu. Jednak dopiero rozwój techniki otrzymywania przeciwciał monoklonalnych (*monoclonal antibodies* – mAb) [32] umożliwił ich szersze zastosowanie w praktyce. Dynamiczny rozwój technik inżynierii genetycznej pozwolił na produkcję mAb humanizowanych i ludzkich – technologia wykorzystująca myszy transgeniczne, Xenomouse® [33] – pozbawionych do minimum działań toksycznych związanych z indukcją reakcji HAMA (*human anti murine antibody*).

Modyfikowane swoiste mAb stosowane w immunoterapii działają poprzez bezpośrednie wiązanie się z antygenem nowotworowym i aktywację ADCC oraz cytotosycywności zależnej od dopełniacza (*complement dependent cytotoxicity* – CDC). Mogą one także blokować receptory na komórkach nowotworowych, np. dla czynników wzrostu. Przeciwciała połączone z radioizotopem, lekiem cytostatycznym, enzymami, cytokinami lub toksynami bezpośrednio zabijają komórki, które zostaną nimi opłaszczane [34]. W ostatnich latach zarejestrowano wiele przeciwciał monoklonalnych w leczeniu chorób nowotworowych (tab. 1).

W trakcie badań klinicznych są m.in. przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko następującym receptorom: CD20 – veltuzumab [35], ocrelizumab [36] oraz ofatumumab [37]; CD22 – epratuzumab [38]; CD23 – lumiliksimumab [39]; CD74 – milatuzumab [40]; integryna α_v – intetumumab [41]; integryna $\alpha_5\beta_1$ – volociksimab [42].

Inną strategią swoistej biernej immunoterapii jest wykorzystanie komórek TIL, które po wyizolowaniu od chorego inkubowane są *ex vivo* w obecności IL-2, po czym przetaczane chorym z jednoczesnym podaniem IL-2. Celem takiej strategii jest zwiększenie liczby reaktywnych limfocytów T i wzbudzenie długotrwałej odporności przy minimalnej autoagresji [43].

Na początku lat 90. XX w. przeprowadzono badanie kliniczne, do którego zakwalifikowano 86 chorych na przerzutowego czerniaka, którym podano komórki TIL i IL-2 w wysokiej dawce. U 34% badanych zaobserwowano odpowiedź kliniczną [44].

Tabela 1. Przeciwciała monoklonalne zarejestrowane przez FDA do leczenia nowotworów
Table 1. Monoclonal antibodies approved by FDA in the treatment of cancer

mAb	Cel	Izotyp	Wskazanie
rituksymab	CD20	chimeryczne IgG1	CD20(+) niezłośliwe chłoniaki grudekowe; niezłośliwe chłoniaki rozlane z dużych komórek; przewlekła białaczka limfocytowa
90Y ibritumomab tiuksetan	CD20	mysie IgG1 znakowane izotopem	CD20(+) niezłośliwe chłoniaki grudekowe
131I tositumomab	CD20	mysie IgG1 znakowane izotopem	CD20(+) niezłośliwe chłoniaki grudekowe
alemtuzumab	CD53	humanizowane IgG1	przewlekła białaczka limfatyczna
gemtuzumab ozogamycyna	CD33	rekombinowane humanizowane IgG4 – połączone kalicheamycyną	ostra białaczka szpikowa
trastuzumab	HER2/neu	humanizowane IgG1	HER2(+) rak piersi; rak żołądka
cetuksymab	EGFR	chimeryczne IgG1	EGFR(+) rak jelita grubego; rak płaskonabłonkowy w obrębie głowy i szyi
panitumumab	EGFR	ludzkie IgG2	EGFR(+) rak jelita grubego
bewacyzumab	VEGF	humanizowane IgG1	rak jelita grubego; rak piersi; niedrobnokomórkowy rak płuc; rak nerki

W celu zwiększenia skuteczności terapii adoptywnej, przed infuzją komórek TIL stosowano chemioterapię i/lub radioterapię całego ciała, aby uzyskać limfodeplecję (eliminacja supresorowych limfocytów T), a następnie podawano IL-2. Chociaż skuteczność tej strategii w leczeniu białaczki okazała się ograniczona [45, 46], pewną aktywność wykazano w terapii czerniaka [47]. Chorym na zaawansowanego czerniaka podano limfodeplecyjną dawkę cyklofosfamid z fludarabiną, a następnie przetoczono komórki TIL wraz z IL-2 w wysokiej dawce. U 51% leczonych (35 chorych) zaobserwowano obiektywną odpowiedź kliniczną na terapię [48]. Bardzo wysoki odsetek odpowiedzi (na poziomie 70%) stwierdzono również u chorych poddanych radioterapii całego ciała dawką 1200 cGy (w 3 dawkach podzielonych) przed infuzją komórek TIL [49].

Badania kliniczne, w których testowano limfocyty krwi obwodowej stymulowane cytokinami, nie przyniosły zamierzonego rezultatu z powodu zbyt małej liczby antygenowo swoistych limfocytów. W celu zwiększenia liczby antygenowo swoistych limfocytów można stymulować je *in vitro* z komórkami dendrytycznymi „karmionymi” danym antygenem. W badaniu I fazy chorym na zaawansowanego czerniaka podawano limfocyty T CD8+ wyizolowane z krwi obwodowej i inkubowane *ex vivo* z dojrzałymi autologicznymi DC „karmionymi” antygenem czerniakowym Melan-A. U 3 z 11 chorych zaobserwowano obiektywne odpowiedzi kliniczne [50].

Dowiedziano, że zastosowanie limfocytów CD4+ zamiast limfocytów CD8+ może okazać się bardziej skuteczne w terapii adoptywnej [51]. Zaobserwowano remisję u chorego na przerzutowego czerniaka, który otrzymał autologiczne limfocyty T CD4+ swoiste dla antygeny czerniaka NY-ESO-1 [52].

Morgan i wsp. [31] izolowali limfocyty z krwi obwodowej, które następnie *ex vivo* modyfikowali genami kodującymi TCR swoiste dla wielu antygenów związanych z nowotwo-

rem (MART-1, gp100, NY-ESO-1 lub p53). Wykazali, że modyfikowane PBLs rozpoznają wyżej wymienione antygeny nowotworowe w kontekście HLA-A2, obecne na komórkach czerniaka, raka płuc i raka piersi. Połączenie się TCR z peptydami nowotworowymi wiązało się z wydzielaniem dużej ilości INF- γ . Autologiczne PBLs modyfikowane genem anty-MART-1 TCR podano 31 chorym. U 4 badanych zaobserwowano regresję guzów.

Nieswoista czynna immunoterapia

Nieswoista czynna immunoterapia jest metodą leczenia polegającą na pobudzaniu układu odpornościowego, zwłaszcza odpowiedzi komórkowej, antygenami, które nie występują w komórkach nowotworowych. Historycznie stosowano drobnoustroje, ich fragmenty, enzymy oraz hormony. Ostatnio, wykorzystując technologię inżynierii genetycznej oraz coraz lepsze zrozumienie mechanizmów immunologicznych towarzyszących nowotworom, skonstruowano mAb modulujące odpowiedź immunologiczną.

Do substancji stymulujących procesy odpornościowe należą nieswoiste immunostymulatory i immunomodulatory. Przykładowe immunostymulatory to:

- całe mikroorganizmy (żywe BCG – *Bacillus Calmette-Guérin*, zabite *Corynebacterium parvum*, *M. vaccae*),
- elementy ściany komórkowej (BCG, *Nocardia*),
- glikoproteiny mikroorganizmów pochodzące od *Klebsielli*,
- składniki syntetyczne, np. endotoksyny (lipopolisacharydy).

Do immunomodulatorów zalicza się m.in.:

- wyciągi z grasicy (TPI, THF, TFX),
- syntetyczne hormony grasicy (tymozyna α -1, tymopoetyna),
- tuftsynę,
- enkefaliny i endorfiny,
- wyciągi z limfocytów (czynnik przenoszenia, immunogeny RNA).

Niektóre z ww. substancji wstrzyknięte bezpośrednio do guza powodowały miejscową reakcję zapalną, związaną

z naciekiem komórek prezentujących antygen (*antigen presenting cell* – APC), neutrofilii oraz limfocytów T i B. Często obserwowano regresję nastrzykniętych guzów, jednak nie udawało się wzbudzić swoistej, ogólnoustrojowej odpowiedzi przeciwnowotworowej [53].

Dotychczas jeszcze żadna metoda nieswoistej czynnej immunoterapii nie znalazła trwałego miejsca w rutynowej praktyce klinicznej. Początkowe zachęcające wyniki badań na zwierzętach oraz pojedyncze korzystne efekty u ludzi w ostrej białaczce limfoblastycznej [54] nie znalazły potwierdzenia w kolejnych badaniach klinicznych, zwłaszcza prospektywnych i z randomizacją [55]. Długoletnie badania kliniczne obejmujące duże, liczące ponad tysiąc osób grupy chorych na raka jelita grubego, którzy byli leczeni przy użyciu BCG, zakończyły się niepowodzeniem [56–58]. Zawieszona termicznie zabitych *M. vaccae* (SRL172) w badaniu III fazy okazała się jednak bardziej skuteczna u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuc (gruczolakorak) w porównaniu z chemioterapią. Zaobserwowano dłuższe przeżycia u chorych otrzymujących SRL172 o ponad 100 dni [59]. Skuteczność *M. vaccae* oceniano również w badaniach u chorych na czerniaka [60], raka stercza [61] oraz raka nerki [62].

Do nieswoistej czynnej immunoterapii zalicza się również przeciwciała monoklonalne wykorzystywane w celu modulacji czynności układu odpornościowego. Część cząsteczka CTLA-4, która ulega nadekspresji na aktywowanych limfocytach T i limfocytach T-supresorowych, hamuje dalszą aktywację swoistych limfocytów T CD4+ i CD8+ poprzez interakcję z komórkami DC lub bezpośrednio w wyniku kontaktu limfocytów supresorowych z efektorowymi. Przeciwciała anty-CTLA4 poprzez blokowanie interakcji CTLA-4 z CD80/86 wyłącza ten mechanizm supresji immunologicznej i umożliwia ciągłe, niepohamowane stymulowanie limfocytów T przez komórki DC [63]. Dwa ludzkie przeciwciała monoklonalne IgG przeciwko CTLA-4 – ipilimumab oraz tremelimumab – były testowane w wielu badaniach klinicznych u chorych na różne nowotwory. Największe nadzieje wobec obu preparatów pokłada się w leczeniu chorych na czerniaka. Na ostatnim spotkaniu ASCO 2009 prezentowano wyniki trzech badań II fazy, w których chorzy otrzymywali ipilimumab w kolejnym rzucie leczenia zaawansowanego czerniaka. Wykazano, że dla dawki 10 mg/dobę odsetek 12-miesięcznych przeżyć wynosił 47,2–50,8%, 18-miesięcznych przeżyć 34,5–39,4%, a 24-miesięcznych przeżyć 24,2–32,8% [64]. Mediana przeżycia u tych chorych wahała się od 10,2 do 19,3 miesiąca, a u niektórych chorych obserwowano przeżycia trwające 37,5 miesiąca [64]. Dodatkowo w subpopulacji chorych otrzymujących ipilimumab w pierwszej linii leczenia zaawansowanego czerniaka 24-miesięczne przeżycia uzyskano u 56,6% [64]. Z uwagi na specyfikę działania leku w wielu przypadkach obserwowano późne wystąpienie odpowiedzi na leczenie (po 12 tyg. od rozpoczęcia terapii), czasami również po zaobserwowaniu wcześniejszych objawów progresji choroby [65], co otwiera dyskusję nad modyfikacją kryteriów oceny odpowiedzi na leczenie w przypadku tej grupy leków [66]. Najczęściej występujące działania niepożądane związane są prawdopodobnie z nadmierną aktywacją układu immunologicznego i dotyczą zmian skórnych, biegunki i odczynów hepatotoksycznych.

Obecnie w toku są dwa badania III fazy z randomizacją, w jednym chory na przerzutowego czerniaka otrzymują

DTIC z ipilimumabem lub bez niego (pierwszy rzut leczenia), w drugim sam ipilimumab lub skojarzony ze szczepionką peptydową (drugi rzut leczenia) [67].

Przeciwciałem monoklonalnym skierowanym również przeciwko CTLA-4 jest tremelimumab. W badaniu III fazy 643 chorych otrzymywało tremelimumab w monoterapii lub DTIC/TMZ w pierwszej linii leczenia. Po przeanalizowaniu wstępnych wyników badanie zostało przerwane, gdyż nie wykazano wyższości tremelimumabu nad standardową chemioterapią (OS 11,8 vs 10,7) [68].

Swoista czynna immunoterapia

Swoista czynna immunoterapia jest metodą leczenia polegającą na pobudzeniu odporności na antygeny swoiste dla danego typu nowotworu.

Do swoistej czynnej immunoterapii zalicza się immunizację przy użyciu tzw. terapeutycznych szczepionek nowotworowych. Obejmują one:

- szczepionki niekomórkowe – peptydowe, HSP (*heat shock protein* – szczepionki na bazie białek szoku cieplnego), szczepionki DNA oraz wirusowe (tab. 2.);
- szczepionki komórkowe – niemodyfikowane i modyfikowane genetycznie oraz komórki DC „karmione” antygenami nowotworowymi.

Lecznicze szczepionki komórkowe

Już w 1894 r. nowojorski chirurg William Colley pierwszy podjął próbę zastosowania tzw. szczepionki rakowej (*cancer vaccine*). Chorym na mięsaka podał toksyny bakteryjne i zaobserwował remisję choroby [81].

Szczepionki rakowe I generacji składały się z naświetlonych, autologicznych lub alogenicznych komórek nowotworowych, lizatów komórkowych lub naturalnych powierzchniowych antygenów nowotworowych, takich jak gangliozydy GD-2 i GM-2. W skład szczepionki wchodziły również różnego rodzaju adiuwanty. Wstrzykiwane komórki lub antygeny ulegają fagocytozie i degradacji przez komórki jednojądrzaste, które następnie są prezentowane limfocytom T i B w kontekście antygenów MHC klasy I i II. Druga generacja to tzw. szczepionki genetycznie modyfikowane (GMTV). Wykorzystują one komórki nowotworowe (autologiczne, alogeniczne lub mieszane) lub DC modyfikowane genami kodującymi antygeny nowotworowe, czynniki immunostymulujące, w tym cytokiny. Ich zadaniem jest dostarczenie i prawidłowa prezentacja antygenów nowotworowych wraz z odpowiednim sygnałem kostymulującym w celu aktywacji swoistych mechanizmów przeciwnowotworowych. Strategia immunizacji niemodyfikowanymi genetycznie autologicznymi DC polega na ich preinkubacji z antygenami nowotworowymi *ex vivo*, a następnie podaniu ich chorym. Ten rodzaj immunoterapii uruchamia antygenowo swoistą odpowiedź komórkową.

Szczepionki komórkowe niemodyfikowane genetycznie

Szczepionki oparte na całych komórkach nowotworowych i czynnikach drażniących (adiuwantach) były jedną z podstawowych i najwcześniej stosowanych strategii swoistej immunoterapii nowotworów. Berd i wsp. [82] oceniali efekty immunizacji 40 chorych na zaawansowanego czer-

Tabela 2. Wybrane badania kliniczne niekomórkowych szczepionek u chorych na nowotwory
Table 2. Selected clinical non-cellular based vaccines studies in cancer patients

Rodzaj szczepionki	Szczepionka	Choroba	Faza badania	Liczba chorych	Odpowiedź kliniczna [%]	Całkowite przeżycie [miesiące]	Piśmiennictwo
peptydowa	personalizowana	przerzutowy hormonoporny rak stercza	I/II	58	24	OS = 17	69
	peptyd TERT (telomerase reverse transcriptase)	zaawansowany NDRP	II	22	0 (SD = 36)	OS = 30,6	70
	wielopeptydowa	przerzutowy NDRP	II	63	3,2	OS = 17,3	71
	personalizowana	zaawansowane glejaki (G3 i G4)	I/II	58	24	OS = 20,7	72
	wielopeptydowa	czerniak adiuwantowo	II	60	nie dotyczy	nie osiągnięto	73
	peptyd EGFRVIII	glejak wielopostaciowy	II	21	nie dotyczy	nie osiągnięto	74
HSP (heat shock protein) białka szoku cieplnego	OncoPhage® autologiczna HSP96	rak nerki adiuwantowo	III	728	nie dotyczy	brak różnic w RFS (recurrence free survival) pomiędzy grupą badaną a kontrolną	75
	OncoPhage® autologiczna HSP96+GM-SCF+INF-α	przerzutowy czerniak	II	38	0 (SD = 61)	?	76
	OncoPhage® autologiczna HSP96	rak jelita grubego po metastazektomii	?	29	nie dotyczy	2-letnie OS u 89% (lepsze rokowanie) vs 64% (gorsze rokowanie)	77
szczepionki wirusowe	modyfikowany <i>vaccinia Ankara</i> – wirus syntetyzujący glikoproteinę 5T4 + IL-2	przerzutowy rak nerki	II	25	0 (SD = 48%)	nie osiągnięto	78
	<i>folwpox</i> wirus syntetyzujący glikoproteinę 100	przerzutowy czerniak	?	46	15	nie dotyczy	79
szczepionka DNA	DNA kodujące antygeny MELAN-A/MART-1	przerzutowy czerniak	I	19	0	nie dotyczy	80

niaka szczepionką składającą się z napromienionych autologicznych komórek czerniaka zmieszanych z BCG. Obiektywne odpowiedzi kliniczne obserwowano u 5 chorych, natomiast mediana przeżycia wynosiła 10 miesięcy. Kolejnym krokiem było wykorzystanie ustalonych linii komórkowych (szczepionki alogeniczne), które prezentują antygeny charakterystyczne dla danego nowotworu. Ich immunogenność zwiększona jest przez różnice między aloantygenukami komórek szczepionki i pacjenta. Szczepionki alogeniczne wyparty szczepionki autologiczne ze względu na częste problemy z uzyskaniem odpowiedniej liczby komórek. Szczepionkę składającą się z trzech alogenicznych ustalonych linii czerniaka (CanVaxin) oraz BCG jako adiuwantu opracowali Morton i wsp. [83]. Badaniem II fazy objęto 157 chorych na zaawansowanego czerniaka. Obiektywne odpowiedzi kliniczne uzyskano u 15–20% chorych [84]. Wyniki badań III fazy z randomizacją leczonych CanVaxin

nie wykazały jednak wydłużenia przeżyć chorych w porównaniu z grupą kontrolną, która otrzymywała tylko BCG [85].

W 2005 r. opublikowano wyniki wielośrodkowego badania III fazy oceniającego skuteczność autologicznej szczepionki OncoVAX (Intratel) u chorych na raka jelita grubego w II i III stopniu zaawansowania klinicznego (wg Duke'a). Zaobserwowano wydłużenie okresu wolnego od choroby (zmniejszenie ryzyka wystąpienia wznowy o 57,1%) oraz wydłużenie mediany całkowitych przeżyć u chorych w II stopniu zaawansowania klinicznego. W niedalekiej przyszłości planowane jest badanie III fazy u chorych na raka jelita grubego w II stopniu zaawansowania klinicznego [86]. Skuteczność autologicznej szczepionki Rationale®, składającej się z lizatów komórkowych, potwierdzono w badaniu III fazy u chorych na nieprzerzutowego raka nerki (III stopień zaawansowania klinicznego) po nefrektomii [87].

Alogeniczna szczepionka Melacine, składająca się z lizatów komórkowych dwóch linii czerniaka w połączeniu z adiuwantem Detox®, okazała się nieskuteczna w badaniu III fazy u chorych na czerniaka. Analiza retrospektywna wykazała jednak, że chorzy leczeni Melacine wykazujący ekspresję przynajmniej dwóch z pięciu antygenów HLA obecnych na powierzchni komórek szczepionki mieli dłuższy czas wolny od choroby oraz wydłużoną medianę OS [88–90].

Genetycznie modyfikowane szczepionki komórkowe

Szybki rozwój inżynierii genetycznej i systemów transferu genów oraz większa wiedza o immunologii nowotworów spowodowały dynamiczny rozwój rakowych komórkowych szczepionek genetycznie modyfikowanych (*genetically modified tumour vaccines* – GMTV). Podstawę szczepionki stanowią całe komórki nowotworowe, które można modyfikować genami kodującymi:

- cytokiny immunostymulujące (IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, INF- γ , TNF);
- cząsteczki kostymulujące (CD80, CD86);
- cząsteczki adhezyjne;
- antygeny zgodności tkankowej (MHC).

Celem modyfikacji genetycznej komórek nowotworowych jest zwiększenie ich immunogenności, np. poprzez modyfikację ich fenotypu (zwiększenie ekspresji MHC I i II) czy aktywowanie mechanizmów efektorowych układu odpornościowego poprzez dostarczanie sygnałów kostymulujących.

Pod koniec 2006 r. Nemunaitis i wsp. [91] opublikowali wyniki badania II fazy alogenicznej szczepionki modyfikowanej genem TNF- β 2. W badaniu wzięto udział 75 chorych na niedrobnokomórkowego raka płuc w II, III i IV stopniu zaawansowania klinicznego. Spośród 61 chorych w IIIB i IV stopniu zaawansowania klinicznego, u 15% obserwowano częściową odpowiedź kliniczną (PR). Szacowane prawdopodobieństwo czasu przeżycia 12 i 24 miesięcy wynosiło odpowiednio 68 i 52% [91].

Genetycznie modyfikowaną szczepionką rakową jest także GVAX, składający się z alogenicznych komórek raka stercza, do których wprowadzono gen GM-CSF. Szczepionkę GVAX oceniano u chorych na hormonoopornego raka stercza w dwóch badaniach III fazy:

- VITAL-1 (GVAX w porównaniu z docetakselem i prednizonem),
- VITAL-2 (GVAX plus docetaksel vs docetaksel plus prednizon), które zawieszono pod koniec 2008 r. [92, 93].

Szczepionki na bazie komórek dendrytycznych

Wieloletnie badania nad DC wykazały, że są one najbardziej wydajnymi APC [94]. Komórki dendrytyczne spełniają zasadniczą rolę w indukcji odpowiedzi immunologicznej. Jako jedyne z APC są zdolne do indukowania odpowiedzi pierwotnej naiwnych limfocytów T. Wykorzystanie DC do prezentacji antygenów umożliwiło wywołanie odpowiedzi immunologicznej na słabo immunogennych antygenach nowotworowych i przełamanie tolerancji immunologicznej.

Ludzkie DC uzyskuje się poprzez oczyszczanie niedojrzałych DC z krwi [95] i różnicowanie *ex vivo* w obecności

IL-4 i GM-CSF progenitorowych komórek mieloidalnych (CD34+) lub monocytów (CD14+) [96]. Uzyskane niedojrzałe DC mogą zostać „nakarmione” lizatami komórek nowotworowych [97] lub syntetycznymi peptydami [98], modyfikowane genami kodującymi antygeny nowotworowe albo kompletnym RNA komórki nowotworowej [99]. Do immunizacji wykorzystuje się również hybrydy DC z komórkami nowotworowymi [100].

Thurner i wsp. [101] w badaniu klinicznym immunizowali autologicznymi DC wcześniej inkubowanymi z peptydem MAGE-3 prezentowanym przez HLA-A1 11 chorych na zaawansowanego czerniaka. U 6 chorych doszło do regresji zmian nowotworowych w skórze, węzłach chłonnych, płucach i wątrobie. W jednym z niewielu badań III fazy z randomizacją Schadendorf i wsp. [102] chorym na czerniaka z przerzutami podawali autologiczne DC „karmione” peptydami prezentowanymi w kontekście antygenów zgodności tkankowej HLA klasy I i II. Wstępna analiza nie wykazała jednak wyższości szczepionki nad dakarbazyną (ramię kontrolne) i badanie przerwano. Wzięto w nim udział tylko 53 chorych w ramieniu badanym i 55 w grupie kontrolnej, a szczepionkę podawano w zależności od liczby posiadanych komórek DC, z reguły tylko od 2 do kilku razy. Późniejsze analizy wykazały jednakże, że immunizowani chorzy o haplocybie HLA-A2+/HLA-B44⁻ żyli dłużej niż leczeni dakarbazyną [102]. W innym badaniu I/II fazy chorych na zaawansowanego raka stercza immunizowano autologicznymi DC inkubowanymi z PSA (*prostate specific antigen*) oraz PSCA (*prostate stem cell antigen*) [103]. Antygen błonowy PSCA jest obecny w ponad 85% raków stercza i wiąże się z gorszym rokowaniem [104]. W badaniu wzięto udział 12 chorych (6 chorych – SD, 1 chory – CR) [103]. W badaniu II fazy u chorych na zaawansowanego raka nerki oceniano skuteczność złożonej strategii immunoterapeutycznej polegającej na dowęzłowym podawaniu autologicznych, „nakarmionych” lizatami uzyskanymi z guza DC wraz z ciągłym, systemowym podawaniem IL-2 i IFN- α . W grupie 13 pacjentów badacze zaobserwowali 6 obiektywnych odpowiedzi klinicznych, niezależnie od lokalizacji ognisk przerzutowych, w tym 2 odpowiedzi całkowite trwające 11 i > 17 miesięcy [106].

Komórki dendrytyczne „karmione” peptydami mają jednak pewne ograniczenia:

- krótki czas prezentacji antygenów, zależny od czasu półtrwania kompleksu składającego się z MHC oraz peptydu,
- zastosowanie danego peptydu jest ograniczone tylko do chorych z odpowiednim haplotypem MHC [107].

Do DC mogą być też wprowadzone geny kodujące antygeny nowotworowe, czynniki immunostymulujące czy cytokiny. Uważa się, że strategia genetycznie modyfikowanych DC może być bardziej wydajna i uniwersalna. W badaniu I/II fazy chorych na czerniaka immunizowano autologicznymi DC transdukowanymi mRNA pochodzącym z guza, co pozwala prezentować limfocytom poza wspólnymi antygenami czerniakowymi szeroki zakres unikalnych antygenów nowotworowych charakterystycznych dla danego chorego oraz antygenów dotychczas nieznanymi. W badaniu tym wykazano, że szczepionka jest całkowicie bezpieczna, a w większości przypadków uzyskano odpowiedź limfocy-

tów T *in vivo* przeciwko antygenom nowotworowym kodowanym przez mRNA, pochodzącym z guza [108].

Szczepionką czekającą na rejestrację przez FDA jest Sipuleucel-T, składający się z autologicznych DC inkubowanych *ex vivo* z białkiem fuzyjnym składającym się z PAP (*prostatic acid phosphatase* – antygen obecny na komórkach gruczołu krokowego) połączonym z GM-CSF. Sipuleucel-T poddano ocenie w badaniu III fazy (IMPACT), którego wyniki były prezentowane ostatnio podczas konferencji AUA 2009 (*American Urological Association*) w USA. Do tego badania włączono 512 chorych na bezobjawowego hRGGK, których przydzielono do dwóch grup badawczych. Stosunek chorych otrzymujących Sipuleucel-T do placebo wyniósł 2 : 1. Trzyletnie przeżycia zaobserwowano u 31,7% chorych leczonych Sipuleucel-T oraz u 23% mężczyzn otrzymujących placebo. Mediana całkowitych przeżyć wynosiła 25,8 miesiący u chorych immunizowanych i 21,7 u mężczyzn z grupy kontrolnej [109]. Zintegrowane wyniki dwóch badań fazy III Sipuleucel-T zestawili ostatnio Higano i wsp. [110].

Obecnie toczy się wiele badań klinicznych z wykorzystaniem DC w leczeniu takich nowotworów, jak: rak trzustki [111], rak jajnika [112], rak płaskonabłonkowy głowy i szyi [113], *glioblastoma* [114], czerniak [115] czy nowotwory hematologiczne [116].

Próbowano podsumowywać w formie megaanaliz wyniki zakończonych badań klinicznych z użyciem szczepionek DC, aby je wykorzystać w dalszym rozwoju tej technologii [103, 117]. Engel-Noerregaard i wsp. [103] poddali analizie wyniki 38 badań klinicznych, które objęły 626 chorych na czerniaka. W tej grupie odnotowano 9% obiektywnych odpowiedzi klinicznych (CR + PR), w tym u 20 chorych (3%) odpowiedzi całkowite (CR) i u 37 (6%) odpowiedzi częściowe (PR). Odsetek odpowiedzi klinicznych (CR + PR + SD) wyniósł 30%, w tym stabilizacja choroby (SD) stwierdzono u 133 (21%) chorych. Odpowiedzi kliniczne istotnie korelowały z peptydem użytego antygeny, adiuwantem (IL-2, KLH, *tetanus toxin*, HB_sAg) i indukcją antygenowo-swoistych limfocytów T. Powyższej korelacji nie stwierdzono jednak, gdy analizowano tylko obiektywne odpowiedzi kliniczne. W analizie zaobserwowano nieistotne trendy związku między obiektywnymi odpowiedziami klinicznymi i zastosowaniem niedojrzałych DC, użyciem adiuwantu oraz użyciem autologicznych preparatów antygenowych. Z kolei Robson i wsp. [117] na podstawie doświadczeń zgromadzonych w badaniach klinicznych z użyciem różnych strategii immunizacji DC w różnych typach nowotworów koncentrują się na różnorodności technologii oraz próbie wskazania dróg dla dalszego ich rozwoju. Postulują modyfikację i unifikację procesów pozyskiwania DC, ich dojrzewania czy „karmienia” antygenami, analizując rolę adiuwantów czy strategię przetwarzania ucieczki immunologicznej komórek nowotworowych.

Skojarzenie aktywnej immunoterapii z innymi metodami leczenia

Badania przedkliniczne oraz wczesne badania kliniczne wskazują na potencjał skojarzenia aktywnej immunoterapii z innymi metodami leczenia, uważanymi zarówno za kon-

wencjonalne, jak i wciąż doświadczalne [118, 119]. Niektóre chemioterapeutyki, którym dotychczas przypisywano wyłącznie efekt immunosupresyjny dzięki hamowaniu proliferacji dzielących się komórek immunologicznych w szpiku kostnym oraz obwodowych tkankach limfatycznych, wykazują działania immunomodulujące czy wręcz immunostymulujące na drodze wielu różnych mechanizmów. Od dawna znany jest fakt, że premedykacja cyklofosfamidem podwyższa wydajność adoptywnego transferu antygenowo swoistych limfocytów T [120]. Po raz pierwszy wzmocnienie odpowiedzi immunologicznej i klinicznej przez leki cytotoksyczne (cyklofosfamid) u chorych leczonych szczepionką rakową zaobserwowali Berd i wsp. [121]. Innym ważnym odkryciem było wykazanie, że małe dawki cyklofosfamidu zmniejszają liczbę oraz funkcje regulatorowych CD4+CD25+ limfocytów T (Tregs) poprzez obniżenie ekspresji markerów funkcjonalnych FOXP3 oraz indukowanego przez glikokortykoidy białka związanego z receptorem TNF (GITR). Wpływ cyklofosfamidu na Tregs przekładać się może na wzmocnienie odpowiedzi humoralnej (produkcji przeciwciał) oraz przetrwanie komórek pamięci T. Innym chemioterapeutykiem, który może wzmacniać efekt terapeutyczny szczepionek rakowych, jest gemcytabina, która indukuje apoptozę komórek nowotworowych *in vivo*, dzięki czemu wzmacnia prezentację krzyżową (*cross-presentation*) antygenów nowotworowych limfocytom T CD8+ [122]. Gemcytabina redukuje również liczbę komórek supresorowych pochodzenia szpikowego.

Skojarzone podanie DC z paklitakselem i deksametazonem, pomimo efektów immunosupresyjnych, indukowało odpowiedź przeciwnowotworową [123]. Powyższe skojarzenie indukowało również istotną odpowiedź kliniczną. Połączenie szczepionki komórkowej modyfikowanej GM-CSF z docetakselem indukowało odrzucenie guza (rak płuca) i wydłużenie przeżycia zwierząt laboratoryjnych [124]. W badaniu klinicznym, w którym do immunizacji chorych na raka stercza przy użyciu rekombinowanego wirusa *Vaccinia* niosącego gen PSA dodano docetaksel, stwierdzono również wydłużenie czasu wolnego od progresji choroby [125].

5-fluorouracyl (5-FU) uczulał komórki raka piersi i jelita grubego na CEA swoiste CTL. Ponadto 5-FU w połączeniu z gemcytabiną i oksaliplatyną wzmacniał działanie peptydowo swoistych CTL po stymulacji peptydami [126]. 5-aza-2'-deoksycytidyna (DAC) przywraca często traconą ekspresję HLA klasy I przez komórki nowotworowe, a testowana w skojarzeniu z IL-12 wykazywała synergistyczny efekt przeciwnowotworowy w modelu mysiej białaczki [127]. Wykazano również, immunizacja swoistymi antygenami nowotworowymi może uwalniać komórki nowotworowe na chemioterapię [128].

Istnieje coraz więcej danych wskazujących na synergistyczny efekt łączenia terapeutycznych przeciwciał monoklonalnych z chemioterapeutykami czy terapeutycznymi szczepionkami rakowymi. Przykłady obejmują kojarzenie transtuzumabu z paklitakselem [129], ipilimumabu z komórkową szczepionką raka stercza modyfikowaną GM-CSF [130], z GVAX w czerniaku i raku jajnika [131] czy ipilimumabu skojarzonego z IL-2 [132].

Biomarkery

Ogólnie akceptowany jest fakt, że nie istnieje terapia przeciwnowotworowa, która byłaby skuteczna u wszystkich chorych. Istnieje jednak coraz więcej danych wskazujących, że różne metody leczenia, w tym immunoterapia, mogą przynieść zysk terapeutyczny wybranej grupie chorych. W związku z tym poszukuje się strategii, które mogłyby pomóc zidentyfikować chorych, którzy zareagują na dany lek. Jedną z tych strategii obejmuje tzw. biomarkery.

Wyróżnia się dwa podstawowe typy biomarkerów:

- czynniki patologiczno-kliniczne (*tumor/host-related factors*) związane z biologią/patologią nowotworu i prognozą, np. w czerniaku związek grubości zmiany pierwotnej (wg skali Breslowa) czy obecności owrzodzenia zmiany pierwotnej z przebiegiem klinicznym;
- właściwe biomarkery wskazujące na odpowiedź na leczenie swoiste/celowane, np. obecność receptorów hormonalnych w tkankach raka piersi lub stercza czy obecność HER2 w tkance raka piersi [133].

Obecnie intensywnie poszukuje się biomarkerów immunologicznych, które miałyby wartość predykcyjną dla różnych strategii immunoterapii [134]. Liczne doniesienia wskazują, że molekularne typowanie HLA chorego może pomóc w określeniu efektywnej formy leczenia [135]. Częstotki HLA wiążą i prezentują antygeny nowotworowe limfocytom T. Polimorfizm genów kodujących białka HLA klasy I różnicuje zdolność wiązania swoistego antygeny, a poszczególne haplotypy HLA wykazują zróżnicowaną zdolność jego prezentacji. Skuteczność immunoterapii chorych mających odmienne haplotypy HLA może się różnić. Marincola i wsp. [136] wykazali związek pomiędzy haplotypem HLA a odpowiedzią na terapię IL-2. Allel A11 występował częściej u pacjentów odpowiadających na leczenie niż w całej grupie chorych na czerniaka. Allele HLA-DR3 i HLA-DR4 predysponowały do obniżonej tolerancji na IL-2 [137]. Z kolei Scheibenbogen i wsp. [138] zauważyli częstsze występowanie alleli Cw7 i A1 u pacjentów odpowiadających na terapię IL-2. Tę samą korelację wykazano też dla allelu HLA-DQ1. Ekspresja HLA-DQ1 była niezależnie związana z wydłużeniem czasu życia chorych [139]. Stwierdzono również bardzo istotne wydłużenie ($p < 0,0002$) przeżycia chorych immunizowanych szczepionką zawierającą lizaty 3 linii komórkowych czerniaka, którzy wykazywali ponad 2 z 5 alleli HLA identycznych z obecnymi na komórkach szczepionki [140]. Zależność pomiędzy haplotypem HLA chorego a odpowiedzią na leczenie wykazano także w przypadku innych nowotworów [141].

Piśmiennictwo

1. Restifo NP, Kawakami Y, Marincola F, Shamamian P, Taggarse A, Esquivel F, Rosenberg SA. Molecular mechanisms used by tumors to escape immune recognition: immunogenotherapy and the cell biology of major histocompatibility complex class I. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1993; 14: 182-90.
2. Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Ruiz-Cabello F, Stern PL. Natural history of HLA expression during tumor development. *Immunol Today* 1993; 14: 491-9.
3. Ward PL, Koeppen H, Hurteau T, Rowley DA, Schreiber H. Major histocompatibility complex class I and unique antigen expression by murine tumors that escaped from CD8+ T-cell-dependent surveillance. *Cancer Res* 1990; 50: 3851-8.
4. Kurth I, Horsten U, Pflanz S, Dahmen H, Küster A, Grötzinger J, Heinrich PC, Müller-Newen G. Activation of the signal transducer glycoprotein 130 by both IL-6 and IL-11 requires two distinct binding epitopes. *J Immunol* 1999; 162: 1480-7.
5. Uyyttenhove C, Maryanski J, Boon T. Escape of mouse mastocytoma P815 after nearly complete rejection is due to antigen-loss variants rather than immunosuppression. *J Exp Med* 1983; 157: 1040-52.
6. Ward PL, Koeppen H, Hurteau T, Schreiber H. Tumor antigens defined by cloned immunological probes are highly polymorphic and are not detected in autologous normal cells. *J Exp Med* 1989; 170: 217-32.
7. Seliger B, Harders C, Lohmann S, Momburg F, Urlinger S, Tampé R, Huber C. Down-regulation of the MHC class I antigen-processing machinery after oncogenic transformation of murine fibroblasts. *Eur J Immunol* 1998; 28: 122-33.
8. Strand S, Hofmann WJ, Hug H, et al. Lymphocyte apoptosis induced by CD 95 (APO-1/CD95) ligand-expressing tumor cells – a mechanism of immune evasion. *Nature Med* 1996; 2: 1361-6.
9. Hahne M, Rimoldi D, Schröter M, et al. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 1996; 274: 1363-6.
10. Walker P, Saas P, Dietrich PY. Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back. *J Immunol* 1997; 158: 4521-4.
11. Boon T, Gajewski TF, Coulie PG. From defined human tumor antigens of effective immunization? *Immunol Today* 1995; 16: 334-6.
12. Schmidt-Wolf G, Schmidt-Wolf IG. Cytokines and gene therapy. *Immunol Today* 1995; 16: 173-5.
13. Baker AB, Philips JH, Figer CG, Lanier LL. Killer cell inhibitory receptors for MHC class I molecules regulate lysis of melanoma cells mediated by NK cells, gamma delta T cells and antigen specific CTL. *J Immunol* 1998; 160: 5239-45.
14. Overwijk WW, Restifo N. Creating therapeutic cancer vaccines: notes from the battlefield. *Trends Immunol* 2001; 22: 5-7.
15. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoevasion: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3: 991-8.
16. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoevasion. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 836-48.
17. Cavallo F, Giovarelli M, Gulino A, Vacca A, Stoppacciaro A, Modesti A, Forni G. Role of the neutrophils and CD4+ T lymphocytes in the primary and memory response to nonimmunogenic murine mammary adenocarcinoma made immunogenic by IL-2 gene. *J Immunol* 1992; 149: 3627-35.
18. Nishimura T, Iwakabe K, Sekimoto M, et al. Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. *J Exp Med* 1999; 190: 617-27.
19. Swain SL. CD4 T cell development and cytokine polarization: an overview. *J Leukoc Biol* 1995; 57: 795-8.
20. Janeway CA, Jr, Bottomly K. Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* 1994; 76: 275-85.
21. Pardoll DM. Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 399-415.
22. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-52.
23. Nanda NK, Sercarz EE. Induction of anti-self-immunity to cure cancer. *Cell* 1995; 82: 13-7.
24. Khawli LA, Hu P, Epstein AL. Cytokine, chemokine, and costimulatory fusion proteins for the immunotherapy of solid tumors. *Handb Exp Pharmacol* 2008; 181: 291-328. Review.
25. Ahmadzadeh M, Rosenberg SA. IL-2 administration increases CD4+ CD25(hi) Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients. *Blood* 2006; 107: 2409-14.
26. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=interleukin&pg=1>
27. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=interleukin&pg=2>
28. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=interleukin&pg=3>
29. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, et al. Observation on the systemic administration of autologous lymphokine-activated-killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 1985; 313: 1485-92.

30. Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, et al. Prospective randomized trial of high-dose interleukin 2 alone or in conjugation with lymphokine-activated-killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 622-32.
31. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 2006; 314: 126-9.
32. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495-7.
33. Green LL. Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 1999; 231: 11-23.
34. Borhaei H, Smith MR, Campbell KS. Immunotherapy of cancer. *Eur J Pharmacol* 2009; 625: 41-54.
35. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=veltuzumab>
36. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=ocrelizumab>
37. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=ofatumumab>
38. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=epratuzumab>
39. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=lumiliximab>
40. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=milatuzumab>
41. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=intetumumab>
42. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=volociximab>
43. Straten P, Becker JC. Adoptive cell transfer in the treatment of metastatic melanoma. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 2743-5.
44. Rosenberg SA, Yannelli JR, Yang JC, et al. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1159-66.
45. Curti BD, Ochoa AC, Powers GC, et al. Phase I trial of anti-CD3-stimulated CD4+ T cells, infusional interleukin-2, and cyclophosphamide in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2752-60.
46. Schultze JL, Anderson KC, Gilleece MH, Gribben JG, Nadler LM. A pilot study of combined immunotherapy with autologous adoptive tumour-specific T-cell transfer, vaccination with CD40-activated malignant B cells and interleukin 2. *Br J Haematol* 2001; 113: 455-60.
47. Oble DA, Loewe R, Yu P, Mihm MC Jr. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. *Cancer Immun* 2009; 9: 3.
48. Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, et al. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2346-57.
49. Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 299-308.
50. Mackensen A, Meidenbauer N, Vogl S, Laumer M, Berger J, Andreesen R. Phase I study of adoptive T-cell therapy using antigen specific CD8+ T cells for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5060-9.
51. Perez-Diez A, Joncker NT, Choi K, Chan WF, Anderson CC, Lantz O, Matzinger P. CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. *Blood* 2007; 109: 5346-54.
52. Hunder NW, Wallen H, Cao J, et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N Engl J Med* 2008; 358: 2698-703.
53. Hersh EM, Taylor CW. Immunotherapy by active immunization: use of nonspecific stimulants and immunomodulators. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Biologic therapy of cancer*. Philadelphia, JB Lippincott CO, 1991; 612-26.
54. Mathé G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Schneider M, Cattani A, Schlumberger JR, Hayat M, De Vassal F. Active immunotherapy for acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1969; 1: 697-9.
55. Jones SE, Grozea PN, Miller TP, et al. Chemotherapy with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone alone or with levamisole or with levamisole plus BCG for malignant lymphoma: a Southwest Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 1985; 3: 1318-24.
56. Panettiére FJ, Goodman PJ, Costanzi JJ, et al. Adjuvant therapy in large bowel adenocarcinoma: long-term results of a Southwest Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 1988; 6: 947-54.
57. Wolmark N, Fisher B, Rockette H, et al. Postoperative adjuvant chemotherapy or BCG for colon cancer: results from NSABP protocol C-01. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 30-6.
58. Smith RE, Colangelo L, Wieand HS, Begovic M, Wolmark N. Randomized trial of adjuvant therapy in colon carcinoma: 10-year results of NSABP protocol C-01. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1128-32.
59. Stanford JL, Stanford CA, O'Brien M, Grange JM. Successful immunotherapy with *Mycobacterium vaccae* in the treatment of adenocarcinoma of the lung. *Eur J Cancer* 2008; 44: 224-7.
60. Maraveyas A, Baban B, Kennard D, et al. Possible improved survival of patients with stage IV AJCC melanoma receiving SRL172 immunotherapy: correlation with induction of increased levels of intracellular interleukin-2 in peripheral blood leucocytes. *Ann Oncol* 1999; 10: 817-24.
61. Hrouda D, Baban B, Dunsmuir WD, Kirby RS, Dalgleish AG. Immunotherapy of advanced prostate cancer: a phase I/II trial using *Mycobacterium vaccae* (SRL172). *Br J Urol* 1998; 82: 568-73.
62. Patel PM, Sims S, O'Donnell DO, et al. An evaluation of a preparation of *Mycobacterium vaccae* (SRL172) as an immunotherapeutic agent in renal cancer. *Eur J Cancer* 2008; 44: 216-23.
63. Mackiewicz J, Kwinta Ł. New targeted therapies in the treatment of patients with metastatic melanoma. *Współcz Onkol* 2010; 14: 15-22.
64. O'Day S, Weber J, Lebbe M. Effect of ipilimumab treated on 18-month survival: update of patient (pts) with advanced melanoma treated with 10 mg/kg ipilimumab in three phase II clinical trials. *J Clin Oncol* 2009; 27: Abstr 9033.
65. Hamid O, Urba WJ, et al. Kinetics of response to ipilimumab (MDX-010) in patients with stage III/IV melanoma. *J Clin Oncol* 2007; 25: (suppl; abstr 8525).
66. Wolchok JD, Hoos A, O'Day S, et al. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 7412-20.
67. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=ipilimumab>
68. Ribas A, Hauschild A, Kefford R, et al. Phase III, open-label, randomized, comparative study of tremelimumab (CP-675,206) and chemotherapy (temozolomide [TMZ] or dacarbazine [DTIC]) in patients with advanced melanoma. 2008 ASCO Annual proceedings Part 1. *J Clin Oncol* 2008; 26: Abstr LBA9011.
69. Noguchi M, Mine T, Yamada A, et al. Combination therapy of personalized peptide vaccination and low-dose estramustine phosphate for metastatic hormone refractory prostate cancer patients: an analysis of prognostic factors in the treatment. *Oncol Res* 2007; 16: 341-9.
70. Bolonaki I, Kotsakis A, Papadimitraki E, et al. Vaccination of patients with advanced non-small-cell lung cancer with an optimized cryptic human telomerase reverse transcriptase peptide. *J Clin Oncol* 2007; 25: 2727-34.
71. Barve M, Bender J, Senzer N, et al. Induction of immune response and clinical efficacy in a phase II trial of IDM-2101, a 10-epitope cytotoxic T lymphocyte vaccine, in metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4418-25.
72. Yajima N, Yamanaka R, Mine T, et al. Immunologic evaluation of personalized peptide vaccination for patients with advanced malignant glioma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5900-11.
73. Hamid O, Solomon JC, Scotland R, Garcia M, Sian S, Ye W, Groshen SL, Weber JS. Alum with interleukin-12 augments immunity to a melanoma peptide vaccine: correlation with time to relapse in patients with resected high-risk disease. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 215-22.
74. Sampson JH, Archer GE, Bigner DD, Davis T, Friedman HS, Keler T, et al. Effect of EGFRvIII-targeted vaccine (CDX-110) on immune response and TTP when given with simultaneous standard and continuous temozolomide in patients with GBM. Abstract of Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2011.
75. Wood C, Srivastava P, Bukowski R, et al.; C-100-12 RCC Study Group. An adjuvant autologous therapeutic vaccine (HSPPC-96; vitespen) versus observation alone for patients at high risk of recurrence after nephrectomy for renal cell carcinoma: a multicentre, open-label, randomised phase III trial. *Lancet* 2008; 372: 145-54.

76. Pilla L, Patuzzo R, Rivoltini L, et al. A phase II trial of vaccination with autologous, tumor-derived heat-shock protein peptide complexes Gp96, in combination with GM-CSF and interferon- α in metastatic melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 958-68.
77. Mazzaferro V, Coppa J, Carrabba MG, et al. Vaccination with autologous tumor-derived heat-shock protein gp96 after liver resection for metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3235-45.
78. Kaufman HL, Taback B, Sherman W, et al. Phase II trial of Modified Vaccinia Ankara (MVA) virus expressing 5T4 and high dose Interleukin-2 (IL-2) in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Transl Med* 2009; 7: 2.
79. Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, et al. Recombinant fowlpox viruses encoding the anchor-modified gp100 melanoma antigen can generate antitumor immune responses in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2973-80.
80. Weber J, Boswell W, Smith J, et al. Phase I trial of intranodal injection of a Melan-A/MART-1 DNA plasmid vaccine in patients with stage IV melanoma. *J Immunother* 2008; 31: 215-23.
81. Coley WB. The treatment of inoperable malignant tumour with the toxins of erysipelas and Bacillus prodigiosus. *Trans Am Surg Assoc* 1894; 12: 183-96.
82. Berd D, Maguire HC Jr, McCue P, Mastrangelo MJ. Treatment of metastatic melanoma with an autologous tumor-cell vaccine. Clinical and immunologic results in 64 patients. *J Clin Oncol* 1990; 8: 1858-67.
83. Morton DL, Foshag LJ, Hoon DS, et al. Prolongation of survival in metastatic melanoma after active specific immunotherapy with a new polyvalent melanoma vaccine. *Ann Surg* 1992; 216: 463-82.
84. Chan AD, Morton DL. Active immunotherapy with allogeneic tumor cell vaccines. Present status. *Semin Oncol* 1998; 25: 611-22.
85. Morton DL, Mozzillo N, Thompson JF, et al. An international, randomized, phase III trial of bacillus Calmette-Guerin (BCG) plus allogeneic melanoma vaccine (MCV) or placebo after complete resection of melanoma metastatic or regional or distant sites. *J Clin Oncol* 2007; 25: Abstr 8508.
86. Uyl-de Groot CA, Vermorken JB, Hanna MG Jr, Verboom P, Groot MT, Bonsel GJ, Meijer CJ, Pinedo HM. Immunotherapy with autologous tumor cell-BCG vaccine in patients with colon cancer: a prospective study of medicinal and economic benefits. *Vaccine* 2005; 23: 2379-87.
87. Bringing therapeutic cancer vaccines and immunotherapies through development to licensure: 2007 February 8-9. Final program available at <https://cms.palladianpartners.com/cms/1156354418/home.htm#>; videocast available at <http://videocast.nih.gov/>. Bethesda, MD; 2007.
88. Mitchell MS, Harel W, Groshen S. Association of HLA phenotype with response to active specific immunotherapy of melanoma. *J Clin Oncol* 1992; 10: 1158-64.
89. Sosman JA, Unger JM, Liu PY, et al.; Southwest Oncology Group. Adjuvant immunotherapy of resected, intermediate-thickness, node-negative melanoma with an allogeneic tumor vaccine: impact of HLA class I antigen expression on outcome. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2067-75.
90. Sondak V, Sosman J, Unger JM, et al. Significant impact of HLA class I allele expression on outcome in melanoma patients treated with an allogeneic melanoma cell lysate vaccine. Final analysis of SWOG-9035. *J Clin Oncol* 2004; 22: 7501.
91. Neumanitis J, Dillman RO, Schwarzenberger PO, et al. Phase II study of belagenpumatucel-L, a transforming growth factor beta-2 antisense gene-modified allogeneic tumor cell vaccine in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4721-30.
92. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00133224?term=vital-2&rank=1>
93. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00089856?term=vital-1&rank=2>
94. Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997; 90: 3245-87.
95. Fong L, Engleman EG. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 245-73.
96. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994; 179: 1109-18.
97. Nair SK, Snyder D, Rouse BT, Gilboa E. Regression of tumors in mice vaccinated with professional antigen-presenting cells pulsed with tumor extracts. *Int J Cancer* 1997; 70: 706-15.
98. Gitlitz BJ, Belldegrun AS, Zisman A, et al. A pilot trial of tumor lysate-loaded dendritic cells for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *J Immunother* 2003; 26: 412-9.
99. Ashley DM, Faiola B, Nair S, Hale LP, Bigner DD, Gilboa E. Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with tumor extracts or tumor RNA induce antitumor immunity against central nervous system tumors. *J Exp Med* 1997; 186: 1177-82.
100. Avigan D, Vasir B, Gong J, et al. Fusion cell vaccination of patients with metastatic breast and renal cancer induces immunological and clinical responses. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4699-708.
101. Thurner B, Haendle I, Röder C, et al. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* 1999; 190: 1669-78.
102. Schadendorf D, Ugurel S, Schuler-Thurner B, et al.; DC study group of the DeCOG. Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG. *Ann Oncol* 2006; 17: 563-70.
103. Engel-Noerregaard L, Hansen TH, Andersen MH, Straten PT, Svane IM. Review of clinical studies on dendritic cell-based vaccination of patients with malignant melanoma: assessment of correlation between clinical response and vaccine parameters. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58: 1-14.
104. Thomas-Kaskel AK, Zeiser R, Jochim R, Robbel C, Schultze-Seemann W, Waller CF, Veelken H. Vaccination of advanced prostate cancer patients with PSCA and PSA peptide-loaded dendritic cells induces DTH responses that correlate with superior overall survival. *Int J Cancer* 2006; 119: 2428-34.
105. Han KR, Seligson DB, Liu X, et al. Prostate stem cell antigen expression is associated with Gleason score, seminal invasion and capsular invasion in prostate cancer. *J Urol* 2004; 171: 1117-21.
106. Ernstoff MS, Crocenzi TS, Seigne JD, et al. Developing a rational tumor vaccine therapy for renal cell carcinoma: immune yin and yang. *Clin Cancer Res* 2007; 13 (2 Pt 2): 733s-740s.
107. Amoscato AA, Prenovitz DA, Lotze MT. Rapid extracellular degradation of synthetic class I peptides by human dendritic cells. *J Immunol* 1998; 161: 4023-32.
108. Kyte JA, Mu L, Aamdal S, et al. Phase I/II trial of melanoma therapy with dendritic cells transfected with autologous tumor m-RNA. *Cancer Gene Ther* 2006; 13: 905-18.
109. Schellhammer PF, Higano C, Berger ER, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-center, phase III trial of sipuleucel-T in men with metastatic, androgen independent prostatic adenocarcinoma (AIPC). AUA 2009 American Urological Association, 104th Annual Scientific Meeting; Abstr 9.
110. Higano CS, Schellhammer PF, Small EJ, Burch PA, Nemunaitis J, Yuh L, Provost N, Frohlich MW. Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer. *Cancer* 2009; 115: 3670-9.
111. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00868114?term=dendritic+cell+vaccine&rank=2>
112. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00492947?term=dendritic+cell+vaccine&rank=23>
113. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00492947?term=dendritic+cell+vaccine&rank=12>
114. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00576537?term=dendritic+cell+vaccine&rank=6>
115. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00683670?term=dendritic+cell+vaccine&rank=10>
116. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00492947?term=dendritic+cell+vaccine&rank=13>

117. Robson NC, Hoves S, Maraskovsky E, Schnurr M. Presentation of tumor antigens by dendritic cells and challenges faced. *Curr Opin Immunol* 2010; 22: 137-44.
118. Andersen MH, Sorensen RB, Schrama D, Svane IM, Becker JC, Thor Straten P. Cancer Treatment: the combination of vaccination with other therapies. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57: 1735-43.
119. Baxevanis CN, Perez SA, Papamichail M. Combinatorial treatments including vaccines, chemotherapy and monoclonal antibodies for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58: 317-24.
120. Glaser M. Regulation of specific cell-mediated cytotoxic response against SV40-induced tumor associated antigens by depletion of suppressor T cells with cyclophosphamide in Mice. *J Exp Med* 1979; 149: 774-9.
121. Berd D, Maguire HC Jr, Mastrangelo MJ. Induction of cell-mediated immunity to autologous melanoma cells and regression of metastases after treatment with a melanoma cell vaccine preceded by cyclophosphamide. *Cancer Res* 1986; 46: 2572-7.
122. Nowak AK, Lake RA, Marzo AL, Scott B, Heath WR, Collins EJ, Frelinger JA, Robinson BW. Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells. *J Immunol* 2003; 170: 4905-13.
123. Yu B, Kusmartsev S, Cheng F, Paolini M, Nefiedova Y, Sotomayor E, Garilovich D. Effective combination of chemotherapy and dendritic cell administration for the treatment of advanced-stage experimental breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 285-94.
124. Chu Y, Wang LX, Yang G, et al. Efficacy of GM-CSF-producing tumor vaccine after docetaxel chemotherapy in mice bearing established Lewis lung carcinoma. *J Immunother* 2006; 29: 367-80.
125. Arlen PM, Gulley JL, Perker C, et al. A randomized phase II study of concurrent docetaxel plus vaccine versus vaccine alone in metastatic androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1260-9.
126. Correale P, Del Vecchio MT, Di Genova G, et al. Chemotherapeutic drugs may be used to enhance killing efficacy of human tumor antigen peptide specific CTLs. *J Immunother* 2008; 31: 132-47.
127. Nastala CL, Edington HD, McKinney TG, et al. Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with INF-gamma production. *J Immunol* 1994; 153: 1697-706.
128. Antonia SJ, Mirza N, Fricke I, et al. Combination of p53 cancer vaccine with chemotherapy in patients with extensive stage small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 878-87.
129. Taylor C, Hershman D, Shah N, et al. Augmented HER-2 specific immunity during treatment with trastuzumab and chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 5133-43.
130. Gerritsen W, van den Eertwegh AJ, de Gruijl T, et al. A dose-escalation trial of GM-CSF-gene transduced allogeneic prostate cancer cellular immunotherapy in combination with a fully human anti-CTLA antibody (MDX-010, ipilimumab) in patients with metastatic hormone refractory prostate cancer (mHRPC). *J Clin Oncol* 2006; 24 (Suppl 20): 2500.
131. Hodi FS, Butler M, Oble DA, et al. Immunologic and clinical effects on antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 3005-10.
132. Maker AV, Phan GQ, Attia P, et al. Tumor regression and autoimmunity in patients treated with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and interleukin 2: a phase I/II study. *Ann Surg Oncol* 2005; 12: 1005-16.
133. Gutman S, Kessler. The Food and Drug Administration perspective on cancer biomarker development. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 565-71.
134. Marshall JA, Forster TH, Purdie DM, et al. Immunological characteristics correlating with clinical response to immunotherapy in patients with advanced metastatic melanoma. *Immunol Cell Biol* 2006; 84: 295-302.
135. Browning M, Dunnion D. HLA and cancer: implications for cancer immunotherapy and vaccination. *Eur J Immunogenet* 1997; 24: 293-312.
136. Marincola FM, Venzon D, White D, et al. HLA association with response and toxicity in melanoma patients treated with interleukin 2-based immunotherapy. *Cancer Res* 1992; 52: 6561-6.
137. Marincola FM, Shamamian P, Rivoltini L, et al. HLA associations in the antitumor response against malignant melanoma. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1995; 18: 242-52.
138. Scheibenbogen C, Keilholz U, Mytilineos J, Suci S, Manasterski M, Hunstein W. HLA class I alleles and responsiveness of melanoma to immunotherapy with interferon-alpha (IFN-alpha) and interleukin-2 (IL-2). *Melanoma Res* 1994; 4: 191-4.
139. Rubin JT, Day R, Duquesnoy R, Simonis B, Adams S, Lee J, Lotze MT. HLA-DQ1 is associated with clinical response and survival of patients with melanoma who are treated with interleukin-2. *Ther Immunol* 1995; 2: 1-6.
140. Cortes J, Fayad L, Kantarjian H, O'Brien S, Lee MS, Talpaz M. Association of HLA phenotype and response to interferon alpha in patients with chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 1998; 12: 455-62.
141. Franzke A, Buer J, Probst-Kepper M, Lindig C, Framzle M, Schrader AJ, Ganser A, Atzpodien J. HLA phenotype and cytokine-induced tumor control in advanced renal cell cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 2001; 16: 401-9.

Adres do korespondencji

dr n. med. **Jacek Mackiewicz**
Zakład Immunologii Nowotworów
Katedra Biotechnologii Medycznej
Wielkopolskie Centrum Onkologii
ul. Garbary 15
61-866 Poznań
e-mail: jmackiewicz@biocontract.com