Współczesna Onkologia (2002) vol. 6; 10 (637–642)

Genetycznie modyfikowane komórki dendrytyczne w terapii nowotworów

Genetically modified dendritic cells as a cancer treatment strategy

Piotr J. Wysocki, Piotr Grabarczyk, Małgorzata Mackiewicz-Wysocka, Dariusz W. Kowalczyk, Andrzej Mackiewicz

Zakład Immunologii Nowotworów Akademii Medycznej, Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

Komórki dendrytyczne (DC), najefektywniejsze z komórek prezentujących antygen, zostały odkryte ponad 30 lat temu. Ich rola, polegająca na aktywacji antygenowo-swoistej odpowiedzi immunologicznej, w której pośredniczą limfocyty CD4+ i CD8+, jest kluczowa w procesie indukcji odpowiedzi przeciwnowotworowej. Z tego powodu immunizacja chorych na nowotwory przy zastosowaniu DC prezentujących antygeny nowotworowe była uważana za bardzo obiecującą strategię terapeutyczną. Do tej pory na świecie przeprowadzono wiele badań klinicznych, mających na celu ocenę skuteczności i bezpieczeństwa stosowania szczepionek nowotworowych opartych na karmionych antygenami DC. Niestety, „karmienie" DC określonymi peptydami ma kilka ograniczeń: (i) krótki okres półtrwania kompleksów MHC-peptyd, (ii) konieczność dobierania odpowiednich peptydów dla określonych haplotypów MHC u różnych pacjentów, (iii) wyłączna prezentacja przez DC tylko określonych epitopów anytgenowych.

Możliwości genetycznej modyfikacji DC umożliwiły stworzenie nowych strategii terapeutycznych dla chorych na nowotwory. W różnych modelach zwierzęcych, DC modyfikowane genami kodującymi antygeny nowotworowe lub czynniki immunostymulujące indukowały efektywną odpowiedź przeciwnowotworową. Ostatnio, na podstawie obiecujących badań na modelach zwierzęcych, rozpoczęto pierwszą próbę kliniczną immunizacji chorych z rakiem stercza przy zastosowaniu genetycznie modyfikowanych DC.

Słowa kluczowe: komórki dendrytyczne, modyfikacja genetyczna, szczepionka nowotworowa, cytokiny, antygeny nowotworowe.

Komórki dendrytyczne (ang. *Dendritic Cells* – DCs) zostały odkryte ponad 30 lat temu. W wyniku intensywnych badań wykazano, że są one najbardziej efektywną grupą komórek prezentujących antygen (APC) [1]. DC, niezbędne do powstania antygenowo-swoistej odpowiedzi komórkowej wydają się być idealnym narzędziem dla celów immunoterapii chorób nowotworowych [2, 3]. DC inkubowane w obecności syntetycznych peptydów antygenów nowotworowych, takich jak MART-1/Melan-A, CEA, tyrozynaza, PSMA, czy gp100, indukowały powstanie efektywnej, antygenowo-swoistej odpowiedzi immunologicznej. Aktualnie na świecie prowadzi się wiele badań klinicznych, mających na celu ocenę skuteczności immunoterapii z zastosowaniem *karmionych* antygenem DC [4, 5]. W niektórych przypadkach opisuje się odpowiedzi kliniczne objawiające się całkowitą lub częściową regresją zmian nowotworowych [6, 7]. DC *karmione* peptydami mają jednak pewne ograniczenia: (i) czas prezentacji antygenu jest ograniczony czasem półtrwania kompleksu utworzonego przez cząsteczkę MHC oraz peptyd, (ii) zastosowanie określonego peptydu jest ograniczone tylko do chorych z odpowiednim haplotypem MHC [8]. Z tych powodów uważa się, że genetyczna modyfikacja komórek DC może być korzystniejszą strategią w celu skonstruowania wydajnej i uniwersalnej szczepionki nowotworowej.

BIOLOGIA KOMÓREK DENDRYTYCZNYCH

Efektywna prezentacja antygenu przez komórki APC jest kluczowym elementem w tworzeniu antygenowo-swoistej odpowiedzi immunologicznej, tzn. w aktywacji dziewiczych, swoistych dla określonych antygenów nowotworowych limfocytów T pomocniczych (Th) oraz cytotoksycznych (Tc) [9].

Najbardziej wydajnymi komórkami APC są DC [1, 11]. Stanowią one ok. 0,3 proc. wszystkich krwinek białych, a zlokalizowane są w obrębie śledziony, węzłów chłonnych, w układzie krwionośnym oraz w tkankach obwodowych. Oprócz DC, również limfocyty B oraz ma-

Dendritic cells (DCs), the most potent APCs have been discovered almost 30 years ago. Due to priming of antigen-specific immune responses mediated by CD4+ and CD8+ lymphocytes, DCs are crucial for the induction of adaptive immunity against cancer. Therefore, vaccination of cancer patients with DCs presenting tumor associated antigens (TAAs) have been believed to be a promising anti-cancer strategy. Until now multiple clinical trials have been carried out in order to evaluate the safety and efficacy of cancer vaccines based on antigen-pulsed DCs. However, pulsing of DCs with particular peptides has several disadvantages: (i) short-time duration of antigen-MHC complexes, (ii) requirement for matching of defined peptides with MHC complexes and (iii) exclusive presentation of single antigen epitopes. Application of gene transfer technologies in the field of DCs-based vaccines made possible the development of novel, anti-cancer immunization strategies. In several animal models, DCs modified with genes encoding TAA or immunostimulatory proteins have been shown to be effective in induction of anti-tumor immune responses. Based on these encouraging results, a first clinical trial of vaccination of prostate cancer patients with gene modified DCs has been recently initiated.

Key words: dendritic cell, genetic modification, cancer vaccine, cytokine, TAAs.

krofagi mają zdolność prezentacji antygenów limfocytom Th, ale ich efektywność jest dużo niższa w porównaniu z komórkami DC [9]. Zagęszczenie molekuł MHC oraz kompleksów MHC-peptyd na powierzchni DC jest od 10 do 100 razy większe w porównaniu do innych komórek APC [10].

Rezydujące w tkankach obwodowych DC mają cechy komórek niedojrzałych i spełniają rolę wartowników. Niedojrzałe DC charakteryzują się nasilonymi procesami fagocytozy i makropinocytozy, dzięki którym są w stanie pochłaniać znajdujące się w ich pobliżu komórkowe elementy apoptotyczne, martwicze oraz drobnoustroje i rozpuszczalne białka. Niedojrzałe DC charakteryzują się niskim poziomem ekspresji powierzchniowych cząsteczek kostymulujących oraz produkcji czynników immunostymulujących (cytokin). Dojrzewanie DC może zostać wywołane przez wiele czynników, które stanowią tzw. *sygnał zagrożenia*. Takimi czynnikami są m.in. lipopolisacharyd (LPS), elementy apoptotyczne, białka szoku termicznego (HSP) lub aktywowane limfocyty T posiadające na swojej powierzchni cząsteczkę CD40L [12, 13]. W trakcie dojrzewania DC tracą na swojej powierzchni receptory odpowiadające na chemokiny zapalne, a zyskują receptor chemokinowy CCR7, dzięki któremu mogą reagować na chemokiny produkowane we wtórnych narządach limfatycznych (MIP-3β i 6Ckine) [14]. W konsekwencji dojrzewające DC migrują w kierunku stref T-zależnych w obrębie wtórnych narządów limfatycznych. W trakcie procesu dojrzewania, komórki DC zwiększają na swojej powierzchni liczbę kompleksów MHCI i MHCII, cząstek adhezyjnych i kostymulujących (CD40, CD54, CD80, CD86) oraz zwiększają produkcję cytokin, m.in. IL-4, IL-6, IL-12, IFNγ. W trakcie dojrzewania dochodzi również do reorganizacji cytoszkieletu DC, w wyniku czego wytwarzane są charakterystyczne wypustki cytoplazmatyczne [10].

Markerem dojrzałości ludzkich DC jest cząsteczka CD83. W przypadku mysich komórek DC do tej pory nie scharakteryzowano podobnego, unikalnego markera dojrzałości. W momencie kontaktu dojrzewających DC z aktywowanymi komórkami T dochodzi do interakcji CD40-CD40L, w wyniku czego DC uzyskują maksymalny poziom ekspresji cząsteczek adhezyjnych, kostymulujących oraz cytokin. Dojrzałe, aktywowane DC są w stanie dostarczyć wszystkie 3 sygnały kostymulujące wymagane dla aktywacji dziewiczych limfocytów T. Tymi sygnałami są: (i) prezentacja antygenu przez kompleksy MHCI i II na powierzchni DC, (ii) interakcja pomiędzy cząsteczkami kostymulującymi a odpowiednimi receptorami na limfocytach T, (iii) parakrynowa produkcja cytokin stymulujących limfocyty. Jedna DC jest w stanie aktywować 100–3 000 dziewiczych komórek T [1]. DC nie tylko biorą udział w indukcji nabytej, antygenowo-swoistej odpowiedzi immunologicznej, ale również wykazano ich udział w aktywacji komórek NK i NKT stanowiących kluczowe elementy odpowiedzi wrodzonej [15, 16].

TERAPIA NOWOTWORÓW Z WYKORZYSTANIEM GENETYCZNIE MODYFIKOWANYCH DC

Komórki nowotworowe wykorzystują różne mechanizmy w celu uniknięcia eliminacji przez układ immunologiczny, które związane są one zarówno z fenotypem komórek nowotworowych, jak i z zaburzeniami odporności. Brak *sygnału niebezpieczeństwa* w początkowej fazie wzrostu nowotworu uniemożliwia zaangażowanie DC i w konsekwencji indukcję przez nie antygenowo-swoistej odpowiedzi komórkowej w narządach limfatycznych. Dziewicze limfocyty, rozpoznające na powierzchni komórek nowotworowych odpowiednie antygeny, jeżeli nie uzyskają wymaganych 3 sygnałów

kostymulujących ulegają anergii [12, 13]. Z kolei uprzednio aktywowane przez komórki DC antygenowo-swoiste limfocyty rozpoznając na powierzchni komórek nowotworowych odpowiednie antygeny mogą je efektywnie zniszczyć, nie ulegając przy tym anergii. Wykorzystanie DC w celu indukcji odpowiedzi immunologicznej stanowi więc bardzo obiecującą strategię immunoterapii nowotworów.

Modyfikacja DC genami kodującymi antygeny nowotworowe

Wprowadzenie do DC genu kodującego cały antygen nowotworowy pozwala na ominięcie ograniczeń związanych z *karmieniem* DC określonym peptydem. Ekspresja wprowadzonych genów jest długotrwała, a identyczna konstrukcja genetyczna może być wprowadzona do DC uzyskanych od różnych chorych (nie ma konieczności dobierania określonych haplotypów MHC). Yang S i wsp. analizowali funkcje DC w przetwarzaniu i prezentacji epitopów uzyskanych z antygenu gp100 [17]. *Karmili* oni DC trzema zdefiniowanymi peptydami lub transdukowali wirusem krowianki zawierającym cały gen gp100. Komórki CTL aktywowane przez *karmione* DC efektywnie niszczyły tylko MHC-zgodne, transformowane wirusem EBV limfocyty B, które zostały opłaszczone tym samym peptydem. I przeciwnie, komórki CTL aktywowane komórkami DC wykazującymi ekspresję całego genu gp100 niszczyły zarówno autologiczne limfocyty B, opłaszczone jakimkolwiek z badanych peptydów, jak i allogeniczne, dobrane pod kątem MHC komórki czerniakowe gp100+.

Ekspresja zarówno cząsteczek MHC klasy I, jak i II oraz prezentacja endogennych i egzogennych antygenów w kontekście tych cząsteczek umożliwia DC stymulowanie limfocytów CD4+ i CD8+. W badaniach Perez-Diez i wsp. autologiczne DC, uzyskane od chorych na czerniaka złośliwego oraz od zdrowych dawców, transdukowane adenowirusem zawierającym gen MART-1 aktywowały *in vitro* zarówno limfocyty CD4+, jak i CD8+. Kilkakrotnie stymulowane limfocyty CD4+ i CD8+ wykazywały ekspresję IFNγ [18]. Wydzielanie IFNγ przez komórki T wskazuje na to, że DC wykazujące ekspresję genów kodujących antygeny nowotworowe, mogą indukować efektywną odpowiedź komórkową typu Th1. DC modyfikowane liposomami zawierającymi gen kodujący antygen gp100 indukowały silną odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciwko autologicznym komórkom nowotworowym, wykazującym ekspresję tego antygenu. Odpowiedź ta, zależna zarówno od komórek CD4+, jak i CD8+ była bardziej efektywna niż immunizacja myszy *nagim* plazmidem z genem dla gp100 [17]. Efektywna protekcja zwierząt uzyskiwana przez zastosowanie DC wykazujących ekspresję antygenów nowotworowych zależy od limfocytów CD4+ i CD8+ zarówno w fazie indukcji, jak i w fazie efektorowej. W badaniu Metharom i wsp. zastosowanie DC transdukowanych genem mTRP-2 (antygen nowotworowy mysich komórek czerniakowych B16) było w stanie wyleczyć 4 z 7 myszy z guzami [19]. W innym badaniu, immunizacja myszy DC transdukowanymi adenowirusem niosącym gen kodujący modelowy antygen – beta-galaktozydazę β-gal) były w stanie spowodować odrzut implantowanych guzów wykazujących ekspresję β-gal. Myszy, które dożylnie otrzymały komórki raka jelita grubego transdukowane β-gal w ciągu kilku dni rozwijały przerzuty w obrębie płuc. W przypadku myszy preimmunizowanych DC wykazującymi ekspresję DC/β-gal w ogóle nie dochodziło do rozwoju przerzutów. Lecznicze zastosowanie modyfikowanych DC pozwoliło również na znaczne wydłużenie życia myszy z rozwiniętymi przerzutami płucnymi. Odpowiedź immunologiczna indukowana DC/β-gal była w pełni efektywna jeszcze 300–400 dni po immunizacji [20]. W celu zwiększenia efektywności immunizacji zwierząt przy zastosowaniu genetycznie modyfikowanych DC Kaplan i wsp. badali działanie kombinacji dwóch linii DC, wykazujących ekspresję genów gp100 i TRP u myszy z guzami czerniakowymi. Badana kombinacja znacznie silniej hamowała wzrost komórek nowotworowych niż pojedyncze linie.

Nie we wszystkich nowotworach komórki wchodzące w skład guzów wykazują ekspresję zdefiniowanych antygenów nowotworowych, często komórki te produkują zmutowane formy antygenów. W powyższych sytuacjach komórki nowotworowe mogą unikać antygenowo-swoistej odpowiedzi immunologicznej indukowanej DC transdukowanymi genem kodującym dany antygen. Modyfikacja DC całym materiałem genetycznym otrzymanym z komórek nowotworowych pozwala im prezentować limfocytom wszystkie, nawet wcześniej niescharakteryzowane antygeny nowotworowe oraz stymulować poliklonalne antygenowo-swoiste limfocyty T [21–23]. DC transdukowane RNA uzyskanym z komórek nowotworowych wykazujących ekspresję modelowego antygenu – OVA efektywnie aktywowały limfocyty cytotoksyczne *in vivo* oraz umożliwiały myszom odrzucenie implantowanych komórek nowotworowych modyfikowanych genem OVA [24]. Immunizacja myszy DC modyfikowanymi RNA uzyskanymi z wysoce złośliwych komórek mysiego czerniaka B16/F10 powodowała odrzucenie komórek czerniakowych implantowanych do CUN [25]. Efektywność tej strategii była porównywalna z zastosowaniem komórek B16/F10 produkujących GM-CSF. Zhang i wsp. immunizowali myszy wykorzystując tylko 4 x 10^4 DC modyfikowanych RNA uzyskanym z komórek nowotworowych i wykazali: (i) aktywność swoistych dla nowo-

tworu komórek CTL, (ii) silny efekt protekcyjny, (iii) zmniejszenie ilości przerzutów w obrębie płuc, (iv) wydłużone przeżycia w przypadku nowotworów wywodzących się z komórek B16 i 3LL [26]. Heiser i wsp. opublikowali ostatnio wyniki I fazy badań nad zastosowaniem DC modyfikowanych mRNA kodującym swoisty antygen sterczowy (PSA) u chorych z przerzutami raka stercza [27]. Wielokrotnie powtarzane immunizacje oraz eskalacja dawki DC (do 5 x 10^7) spowolniły dynamikę wzrostu poziomu PSA w surowicy u 6 na 7 chorych, a w 3 przypadkach doprowadziły do czasowego zniknięcia z krwiobiegu komórek nowotworowych.

Komórki dendrytyczne modyfikowane genami kodującymi czynniki immunostymulujące

Wzbudzenie przez DC odpowiedzi immunologicznej, w której pośredniczą limfocyty T jest nie tylko zależne od prezentacji odpowiednich antygenów na ich powierzchni, ale również od dwóch pozostałych sygnałów – cząsteczki kostymulujące (CD40, ICAM, B7.1, B7.2) oraz cytokiny (IL-12, IL-2, IL-10, TNF-α, IL-1β and IL-6). Do tej pory przeprowadzono wiele badań mających na celu ocenę skuteczności przeciwnowotworowej DC modyfikowanych genami kodującymi czynniki immunostymulujące. Komórki DC transdukowane genem dla IL-12 wydajnie indukowały antygenowo-swoistą odpowiedź przeciwnowotworową [28–30]. W mysim modelu raka jelita grubego doguzowe podanie komórek DC/IL-12 hamowało wzrost guzów podskórnych. Efekt ten był związany ze wzmożonym naciekaniem guzów przez komórki T CD4+ i CD8+ oraz z polaryzacją odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th1/Tc1 [28]. W innym badaniu, w przypadku trzech słabo immunogennych nowotworów, doguzowe podanie komórek DC/IL-12 powodowało całkowitą regresję rozwiniętych guzów. Odpowiedź immunologiczna również w tym przypadku była zależna od komórek T CD4+ wykazujących ekspresję IFNγ [29]. Podobnie w mysim modelu neuroblastomy, doguzowe podanie DC modyfikowanych genem kodującym IL-12 powodowało całkowite zniknięcie guzów w ciągu 3 tyg. Efekt ten był tym razem związany ze zmniejszoną apoptozą komórek naciekających guz [30]. Modyfikacja niedojrzałych DC genem kodującym GM-CSF nie ma wpływu na ich zdolności immunostymulacyjne (analiza immunofenotypu, stymulacja limfocytów T *in vitro*). Komórki te jednak w momencie zastosowania *in vivo* efektywnie migrują do węzłów chłonnych oraz indukują silniejszą odpowiedź immunologiczną, skierowaną przeciwko różnym badanym antygenom w porównaniu do komórek niemodyfikowanych [31]. DC transdukowane genem dla IL-7 w porównaniu do komórek niemodyfikowanych, w autologicznej mieszanej hodowli limfocytów zwiększają proliferację komórek T 2-krotnie, a w mieszanej hodowli allogenicznej 2,7-krotnie [32]. Miller i wsp. badali efekt doguzowego podania DC modyfikowanych genem kodującym IL-7 [33]. W dwóch mysich modelach raków płuc wykazali, że immunizacja adenowirusem kodującym IL-7, jak i DC/IL-7 indukowała bardzo silną odpowiedź przeciwnowotworową. Wszystkie myszy, które odrzuciły guzy po podaniu komórek DC/IL-7 odrzucały również komórki nowotworowe przy ich powtórnym podaniu. Natomiast w przypadku myszy immunizowanych adenowirusem kodującym IL-7, tylko 20–25 proc. zwierząt, które pierwotnie odrzuciły guzy odrzucało je po ponownym podaniu komórek nowotworowych.

Zastosowanie DC wykazujących jednocześnie ekspresję genów kodujących antygeny nowotworowe oraz cytokiny indukuje silną i długotrwałą odpowiedź przeciwnowotworową. Nakamura i wsp., stosując DC transdukowane adenowirusem kodującym GM-CSF oraz antygen gp70, wykazali, że ich efekt jest znacznie silniejszy niż w przypadku zastosowania DC modyfikownych tylko genem dla gp70. Produkcja GM-CSF przez transdukowane komórki zwiększała ekspresję receptora CCR7, w wyniku czego komórki te wydajniej migrowały w kierunku wtórnych narządów limfatycznych. Ludzkie DC produkujące jednocześnie IL-2 oraz antygen MUC-1 efektywnie stymulują proliferację autologicznych limfocytów w hodowli mieszanej [34]. Tuting i wsp. zmodyfikowali ludzkie DC poprzez wprowadzenie do nich genów kodujących antygeny czerniakowe (Mage-1, Mage-3, MART-1/Melan A, pMel-17/gp100, tyrozynaza). Komórki te kotransdukowane następnie genami kodującymi IL-12 lub IFNα bardzo silnie aktywowały antygenowo-swoiste limfocyty cytotoksyczne oraz polaryzowały odpowiedź immunologiczną w kierunku Th1 [35].

Kikuchi i wsp. analizowali efekt przeciwnowotworowy DC modyfikowanych genami kodującymi czynniki immunostymulujące [36]. Mysie DC zmodyfikowali genem kodującym cząsteczkę CD40L. Cząsteczka ta znajduje się zazwyczaj na powierzchni komórek T CD4+ i łączy się z molekułą CD40 na DC. Kilka ostatnich doniesień sugeruje, że DC nie może w pełni aktywować limfocytów cytotoksycznych, dopóki nie zostanie uprzednio aktywowana w wyniku interakcji CD40-CD40L [37–39]. Pobudzenie receptora CD40 powoduje zwiększenie w DC ekspresji kompleksów MHC klasy I i II, cząsteczek kostymulujących oraz cytokin i chemokin, np. IL-12, MIP-1α [40–42].

Doguzowe podanie DC modyfikowanych genem dla CD40L w przypadku mysich modeli czerniaka (B16) oraz raka jelita grubego (CT26) silniej hamowało wzrost guzów i istotniej wydłużało czas przeżycia zwierząt w porównaniu do komórek niemodyfikowanych. Dodatkowo splenocyty uzyskane od zwierząt poddanych terapii z zasto-

sowaniem DC/CD40L u zdrowych myszy wywoływały efektywną, antygenowo-swoistą odpowiedź przeciwnowotworową [36].

PODSUMOWANIE

Genetycznie modyfikowane DC efektywnie indukują antygenowo-swoistą odpowiedź immunologiczną zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Relatywnie proste metody uzyskiwania DC i stale udoskonalane metody transferu genów umożliwiają szybką i wydajną modyfikację DC zarówno pochodzenia szpikowego, jak i obwodowego. Pomimo faktu, że już kilku chorych zostało poddanych immunizacji z zastosowaniem genetycznie modyfikowanych DC [27] wciąż mamy do czynienia z obawami związanymi z bezpieczeństwem tej strategii. Podanie DC modyfikowanych całkowitym materiałem genetycznym (DNA, RNA) uzyskanym z komórek nowotworowych może wywoływać również niepożądane reakcje autoimmunologiczne. Ludewig i wsp. wykazali u myszy transgenicznych, że immunizacja z zastosowaniem DC modyfikowanych genem kodującym antygen występujący nie tylko w komórkach nowotworowych, ale i w określonych narządach (kardiomiocyty, komórki wysp trzustki) powoduje odrzucenie guzów. Okazało się jednak, że proces ten był związany ze śmiertelnymi reakcjami autoimmunologicznymi (zapalenie mięśnia sercowego, kardiomiopatia rozstrzeniowa, zapalenie tętnic, cukrzyca) [43].

Liczne obawy związane są również z zastosowaniem wirusowych systemów transferu genów. Wektory lentiwirusowe wydają się być najlepszym narzędziem dla celów genetycznej modyfikacji prekursorów DC. Jednakże to, że są one oparte na rekombinowanym śmiercionośnym wirusie, wprawdzie w pełni bezpiecznym, zmusza naukowców do dalszych badań z zakresu bezpieczeństwa, zanim zostanie on wykorzystany w praktyce klinicznej.

Genetycznie modyfikowane DC stanowią bardzo obiecującą strategię terapii nowotworów. Nadal jednak konieczne są prace nad odkrywaniem i definiowaniem nowych antygenów nowotworowych oraz dalsze badania nad mechanizmami immunologicznymi, towarzyszącymi procesowi wzrostu nowotworu. Są to kluczowe elementy dla konstruowania nowych generacji, bezpiecznych i uniwersalnych szczepionek nowotworowych opartych na DC.

PIŚMIENNICTWO

1. Banchereau J, Steinman RM. *Dendritic cells and the control of immunity.* Nature 1998; 392: 245-52.
2. Cohen PJ, Cohen PA, Rosenberg SA, Katz SI, Mule JJ. *Murine epidermal Langerhans cells and splenic dendritic cells prestent tumor-associated antigens to primed T cells.* Eur J Immunol 1994; 24: 315-9.
3. Schuler G, Steinman RM. *Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors.* J Exp Med 1997; 186: 1183-7.
4. Murphy G, Tjoa B, Rahde H, Kenny G, Boynton A. *Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A2*0201-specific peptides form prostate-specific membrene antigen.* Prostate 1996; 29: 371-80.
5. Lodge PA, Jones LA, Bader RA, Murphy GP, Salgaller ML. *Dendritic cell--based immunotherapy of prostate cancer: immune monitoring of phase II clinical trial.* Cancer Res 2000; 60: 829-33.
6. Hsu FJ, Benike C, Fagoni F, et al. *Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells.* Nat Med 1996; 2: 52-8.
7. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, et al. *Vaccination of melnoma patients with peptide- or tumor-lysate-pulsed dendritic cells.* Nat Med 1998; 4: 328-32.
8. Amoscato AA, Prenovitz DA, Lotze MT. *Rapid extracellular degradation of synthetic class I peptides by human dendritic cells.* J Immunol 1998; 21: 149-57.
9. Croft M. *Activation of naive, memory and effector T cells.* Curr Opin Immunol 1994; 6: 431-7.
10. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. *Immunobiology of dendritic cells.* Annu Rev Immunol 2000; 18: 767-811.
11. Hart DN. *Dendritic cells: unique leukocyte populatons which control the primary immune response.* Blood 1997; 90: 3245-87.
12. Matzinger P. *Tolerance, danger and the extended family.* Annu Rev Immunol 1994; 12: 991-1045.
13. Galluci S, Matzinger P. *Danger signals: SOS to the immune system.* Curr Opin Immunol 2001; 13: 114-9.
14. Dieu MC, Vanvervliet A, Vicari JM, et al. *Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites.* J Exp Med 1998; 188: 373-86.
15. Fernandez NC, Lozier A, Flament C, et al. *Dendritic cells directly trigger NK cell functions: Cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo.* Nat Med 1999; 5: 405-11.
16. Kitamura H, Iwakabe K, Yahata T, et al. *The Natural Killer T (NKT) Cell Ligand -Galactosylceramide Demonstrates Its Immunopotentiating Effect by Inducing Interleukin (IL)-12 Production by Dendritic Cells and IL-12 Receptor Expression on NKT Cells.* J Exp Med 1999; 189: 1121-8.
17. Yang S, Vervaert CE, Burch JJR. *Murine dendritic cells transfected with human ge100 elicit both antigen-specific CD8 (+) and CD4 (+) T-cell resopnses and are more effective than DNA vaccines at generating anti-tumor immunity.* Intl J Cancer 1999; 83: 532-40.
18. Perez-Diez A, Butterfield LH, Li L, et al. *Generation of CD8+ and CD4+ T-cell response to dendritic cells genetically engineered to express the MART-1/Melan-A gene.* Cancer Res 1998; 58: 5305-9.
19. Metharom P, Ellem KA, Schmidt C, Wei MQ. *Lentiviral vetor-mediated tyrosone-related protein 2 gene transfer to dendritic cells for the therapy of melanoma.* Hum Gene Ther 2001; 18: 2203-13.
20. Song W, Tong Y, Carpenter H, Kong HL, Crystal RG. *Persistent, antigen--specific, therapeutic antitumor immunity by dendritic cells genetically modified with an adenoviral vector to express a model tumor antigen.* Gene Ther 2000; 7: 2080-6.
21. Heiser A, Maurice MA, Yancey DR, et al. *Human dendritic cells transfected*

with renal tumor RNA stimulate polyclonal T-cell responses against antigens expressed by primary and metastatic tumors. Cancer Res 2001; 61: 3388-93.
22. Heiser A, Maurice MA, Yancey DR, et al. *Induction of polyclonal prostate cancer-specific CTL using dendritic cells transfected with amplified tumor RNA.* J Immunol 2001; 166: 2953-60.
23. Boczkowski D, Nair SK, Nam JH, Lyerly HK, Gilboa E. *Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transfected with messenger RNA amplified from tumor cells.* Cancer Res 2000; 60: 1028-34.
24. Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E. *Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo.* J Exp Med 1996; 184: 465-72.
25. Ashley DM, Faiola B, Nair S, et al. *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.
26. Zhang W, He L, Yuan Z, et al. *Enhanced therapeutic efficacy of tumor RNA-pulsed dendritic cells after genetic modification.* Hum Gene Ther 1999; 7: 1151-61.
27. Heiser A, Coleman D, Dannull J, et al. *Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. J Clin In*vest 2002; 109: 409-17.
28. Furumoto K, Arii S, Yamasaki S, et al. *Spleen-derived dendritic cells engineered to enhance interleukin-12 production elicit therapeutic antitumor immune responses.* Int J Cancer 2000; 5: 665-72.
29. Nishioka Y, Hirao M, Robbins PD, Lotze MT, Tahara H. *Induction of systemic and therapeutic antitumor immunity using intratumoral injection of dendritic cells genetically modified to express interleukin 12.* Cancer Res 1999; 16: 4035-41.
30. Shimizu T, Berhanu A, Redlinger RE JR, et al. *Interleukin-12 transduced dendritic cells induce regression of established murine neuroblastoma.* J Pediatr Surg 2001; 8: 1285-92.
31. Curiel-Lewandowski C, Mahnke K, Labeur M, et al. *Transfection of immature murine bone marrow-derived dendritic cells with the Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor gene potently enhances their in vivo antigen-presenting capacity.* J Immunol 1999; 163: 174-83.
32. Westermann J, Aicher A, Qin Z, et al. *Retroviral interleukin-7 gene transfer into human dendritic cells enhances T cell activation.* Gene Ther 1998; 5: 264-71.
33. Miller PW, Sharma S, Stolina, et al. *Intratumoral administration of adenoviral interleukin 7 gene-modified dendritic cells augments specific antitumor immunity and achieves tumor eradication.* Hum Gene Ther 2000; 11: 53: 65.
34. Trevor KT, Hersh EM, Brailey J, Balloul JM, Acres B. *Transduction of human dendritic cells with a recombinant modified vaccinia Ankara virus encoding MUC1 and IL-2.* Cancer Immunol Immunother (2001) 8: 397-407.
35. Tuting T, Wilson CC, Martin DM, et al. *Autologous human monocyte-derived dendritic cells genetically modified to express melanoma antigens elicit primary cytotoxic T cell responses in vitro: enhancement by cotransfection of genes encoding the Th1-biasing cytokines IL-12 and IFN-alpha.* J Immunol 1998; 3: 1139-47.
36. Kikuchi T, Moore MA, Crystal RG. *Dendritic cells modified to express CD40 ligand elicit therapeutic immunity against preexisting murine tumors.* Blood 2000; 1: 91-9.
37. Toes RE, Ossendorp F, Offringa R, Melief CJ. CD4 T *Cells and their role in antitumor immune responses.* J Exp Med 1999; 189: 753-56.
38. Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, et al. *Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling.* Nature 1998; 393: 478-80.
39. Ridge JP, DI Rosa F, Matzinger P. *A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell.* Nature 1998; 393: 474-8.
40. Schoenberger SP, Toes RE, Van Der Voort EI, Offringa R, Melief CJ. *T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions.* Nature 1998; 393: 480-3.
41. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, et al. *Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking.* J Exp Med 1994; 180: 1263-72.
42. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, et al. *Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation.* J Exp Med 1996; 184: 747-52.
43. Ludewig B, Ochsenbein AF, Odermatt B, et al. *Immunotherapy with dendritic cells directed against tumor antigens shared with normal host cells results in severe autoimmune disease.* J Exp Med 2000; 191: 795-804.

ADRES DO KORESPONDENCJI
dr med. Piotr. J. Wysocki
Zakład Immunologii Nowotworów
Akademia Medyczna
im. K. Marcinkowskiego
Wielkopolskie Centrum Onkologii
ul. Garbary 15
61-866 Poznań

Praca była sponsorowana przez grant KBN K002/P04/99.