

Komórki dendrytyczne (DC) są nie tylko najbardziej skuteczne spośród komórek wyspecjalizowanych w prezentacji antygenów, ale też jako jedyne są zdolne do indukowania odpowiedzi pierwotnej naiwnych limfocytów T. Wykorzystanie DC do prezentacji antygenów nowotworowych stwarza możliwość wywołania odpowiedzi immunologicznej na słabo immunogenne antygeny nowotworowe i przełamania tolerancji immunologicznej. Użycie DC eksponowanych na antygeny czerniaka *in vitro* pozwala w warunkach hodowli otrzymać cytotoksyczne limfocyty T rozpoznające swoiste oligopeptydy będące fragmentami białek czerniaka i zdolne do lizy komórek linii czerniakowych. Za pomocą DC w badaniach *in vitro* wykryto szereg nowych epitopów białek nowotworowych, potencjalnie użytecznych w immunoterapii czerniaka. Preinkubacja DC z antygenami nowotworowymi *ex vivo*, a następnie użycie ich do szczepienia chorych na czerniaka prowadziło u części chorych do całkowitych lub częściowych remisji. W kilku badaniach klinicznych obserwowano regresję przerzutów do różnych narządów, jak też wzrost liczby cytotoksycznych limfocytów T swoistych dla antygenów czerniaka w krwi obwodowej i powstanie nadwrażliwości skórnej typu późnego na DC preinkubowane z oligopeptydami czerniaka. Szczepienia były dobrze tolerowane. DC stosowano też do uczulania limfocytów T *in vitro* w celu przygotowania cytotoksycznych limfocytów T CD8⁺ swoistych dla antygenów czerniaka do immunoterapii adoptywnej. Tak otrzymane limfocyty cytotoksyczne preferencyjnie lokalizują się w zmianach nowotworowych i wywołują odpowiedź antygenowo-swoistą, prowadzącą do eliminacji komórek posiadających odpowiednie antygeny. W wyniku tej odpowiedzi dochodzi do regresji poszczególnych przerzutów. Dobór antygenów do immunizacji, optymalizacja metod otrzymywania DC oraz drogi i czasu ich podawania mogą mieć

Wykorzystanie komórek dendrytycznych w leczeniu czerniaka

Dendritic cells in melanoma therapy

Sergiusz Markowicz

Zakład Immunologii, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

Oporność zaawansowanego czerniaka skóry na leczenie konwencjonalnymi metodami uzasadnia podejmowanie prób wykorzystania mechanizmów odpornościowych chorego do przeciwdziałania powstawaniu przerzutów. Jest to nowotwór potencjalnie immunogeny. W ulegających regresji zmianach czerniakowych dochodzi do klonalnej ekspansji swoistych cytotoksycznych limfocytów T. Rozliczne próby immunizacji szczepionkami z całych, napromieniowanych komórek czerniaka lub preparatami z rozbitych komórek nie doprowadziły, jak dotąd, do uzyskania znaczącego wpływu na przeżycie chorych [1]. Dopiero poznanie w ostatnich latach roli komórek dendrytycznych (DC) w inicjowaniu odpowiedzi komórkowej umożliwiło sterowanie swoistą odpowiedzią immunologiczną [2]. Pozwoliło ponadto zrozumieć przyczyny uprzednich niepowodzeń w próbach wywoływania reakcji układu odpornościowego na antygeny nowotworowe. Są to bowiem antygeny słabo immunogenne lub tolerowane. Prezentacja antygenów nowotworowych przez DC stwarza możliwość przełamania tolerancji poprzez aktywację limfocytów z receptorami o słabym powinowactwie dla tych antygenów. Zidentyfikowano szereg antygenów różnicowania wspólnych dla komórek czerniaka i melanocytów, jak też antygenów występujących w komórkach nowotworowych, ale nieobecnych w tkankach normalnych z wyjątkiem tkanki jąder [3]. Stworzyło to podstawy do immunizacji oligopeptydami wyosobnionymi z białek czerniaka, podawanymi do komórek wyspecja-

lizowanych w prezentacji antygenów limfocytom T, jak też do immunizacji z użyciem komórek, do których wprowadzono geny białek nowotworowych.

Receptor dla antygenów na limfocycie T CD8⁺ rozpoznaje swoiste określony oligopeptyd, związany niekowalencyjnie z cząsteczką zgodności tkankowej MHC klasy I wraz z otaczającym go fragmentem tej cząsteczki. Cząsteczki MHC klasy I wynoszą na powierzchnię komórki oligopeptydy pochodzące z białek zdegradowanych wewnątrz cytoplazmy, w tym również białek nowotworowych. Aby osiągnąć zdolność do rozpoznawania oligopeptydu związanego przez cząsteczkę MHC klasy I na wszystkich komórkach prezentujących ten oligopeptyd, naiwny limfocyt T CD8⁺ po opuszczeniu grasicy musi najpierw zostać uczulony przez komórkę dendrytyczną. Inne komórki wyspecjalizowane w prezentacji antygenów, tj. makrofagi i limfocyty B, nie posiadają zdolności uczulania pierwotnego naiwnych limfocytów T.

DC pochodzące ze szpiku kostnego występują w niewielkiej liczbie, praktycznie we wszystkich tkankach i narządach organizmu. Trudności w wyodrębnianiu DC sprawiły, że ich rola w inicjowaniu odpowiedzi immunologicznej została poznana stosunkowo późno. Dojrzałe funkcjonalnie DC w ludzkiej krwi obwodowej stanowią ok. 1 proc. komórek jednojądrzastych. Odróżnia je silna ekspresja antygenów zgodności tkankowej HLA-DR i brak markerów charakteryzujących inne li-

wpływ na efektywność szczepionki opartej na wykorzystaniu DC jako naturalnego adjuwantu.

Słowa kluczowe: komórki dendrytyczne, czerniak skóry, szczepionka przeciwnowotworowa, antygeny nowotworowe, cytokiny, oligopeptydy.

nie leukocytów (CD3, CD14, CD16, CD20). Dzielą się na dwie subpopulacje: mieloidalne DC1 o fenotypie CD11c⁺CD123⁻ i plazmacytoidalne DC2 o fenotypie CD11c⁻CD123⁺. Obie subpopulacje są zdolne do inicjowania odpowiedzi pierwotnej limfocytów T.

Stwierdzenie, że użycie DC wyizolowanych z ludzkiej krwi obwodowej, ale nie makrofagów, do prezentacji antygenów podanych w formie oligopeptydów lub białka w pierwszym etapie stymulacji naiwnych limfocytów T CD8⁺ *in vitro* pozwala generować antygenowo-swoiste linie limfocytów cytotoksycznych [4], stało się inspiracją do podjęcia pierwszej próby immunizacji chorych na nowotwory swoim antygenem nowotworowym z użyciem DC jako naturalnego adjuwantu. Szczepienie autologicznymi DC wyodrębnianymi z krwi obwodowej i inkubowanymi *ex vivo* z białkiem idiotypowym doprowadziło do całkowitej remisji u dwóch spośród czterech chorych na chłoniaki z komórek B [5].

Bakker i wsp. [6] przy użyciu DC eksponowanych na peptydy czerniakowe HLA-A2-zależne wykazali możliwość generowania limfocytów cytotoksycznych rozpoznających antygeny czerniaka z prekursorów obecnych w krwi obwodowej zdrowych dawców. Tak otrzymane limfocyty cytotoksyczne były zdolne do lizy komórek linii czerniaka. Do prezentacji antygenów użyli DC pochodzących z monocytów. Populacja DC pochodząca z monocytów uzyskiwana jest po hodowli komórek przylegających do plastiku. W trakcie hodowli przez 7 dni w obecności czynnika stymulującego kolonie granulocytarno-monocytarne (GM-CSF) i interleukiny 4 (IL-4), w obecności płodowej surowicy cielęcej (FCS) lub w pożywce niezawierającej surowicy, część populacji monocytów CD14⁺ traci ten marker, odlepia się od plastiku i ujawnia na swej powierzchni cząsteczki CD80 i CD86, upodabniając się fenotypowo i funkcjonalnie do subpopulacji mieloidalnych komórek dendrytycznych. Dodatkowa stymulacja lipopolisacharydem (LPS) lub czynnikiem martwicy nowotworów (TNF- α), dodanym w ostatnim dniu hodowli zwiększa jeszcze ekspresję CD80 i CD86, co określa się jako *dojrzewanie* DC pochodzących z monocytów. Subpopulacja DC1, pierwotnie obecna w krwi, przeżywa w hodowli w obecności GM-CSF i IL-4 i również odlepia się od

plastiku. Stanowi domieszkę populacji DC pochodzących z monocytów. Choć wykazano, że DC pochodzące z monocytów, zarówno niedojrzałe, jak i dojrzałe, są mniej skuteczne w indukowaniu swoistej odpowiedzi na antygeny niż oczyszczona populacja DC1 [7], to jednak w praktyce do immunizacji częściej stosuje się DC pochodzące z monocytów, ze względu na łatwość i większą wydajność ich otrzymania z krwi.

Nestle i wsp. [8] w pilotowym badaniu klinicznym do szczepienia 16 chorych na czerniaka skóry wykorzystali DC pochodzące z monocytów krwi obwodowej indukowanych GM-CSF i IL-4 w hodowli z dodatkiem FCS. DC inkubowane były – zależnie od typu HLA chorego – z oligopeptydami pochodzącymi z tyrozynazy, Melan-A/MART-1 i białka gp100 wiążącymi się do cząsteczek HLA-A2 i/lub z oligopeptydami pochodzącymi z MAGE-1 i MAGE-3 wiążącymi się do HLA-A1, albo z lizatem autologicznych komórek czerniaka. DC wstrzykiwano pod kontrolą ultrasonograficzną do pachwinowych węzłów limfatycznych niezajętych nowotworowo. Do szczepienia zastosowano również hemocjaninę ślimaka morskiego (KLH) jako antygen indukujący pomocnicze komórki T CD4⁺, a jednocześnie pozwalający określić wydolność układu odpornościowego. Jest prawdopodobne, że FCS obecny w pożywce również działał jako antygen pomocniczy. U dwóch chorych po szczepieniu doszło do całkowitej remisji, u trzech do częściowej, z regresją przerzutów w różnych narządach. Szczepienie było dobrze tolerowane przez wszystkich chorych. Stwierdzono występowanie nadwrażliwości skórnej typu późnego na DC preinkubowane z peptydami i z KLH. Wykazano też naciekanie swoistych komórek cytotoksycznych w miejscach wstrzyknięcia DC preinkubowanych z peptydami. Chakraborty i wsp. [9] szczepiąc chorych DC indukowanymi jedynie przez GM-CSF i preinkubowanymi z lizatem komórek guza wywołali u większości chorych nadwrażliwość skórną typu późnego na komórki preinkubowane lizatem. DC wstrzykiwane były śródskórnie w okolicy węzłów chłonnych. Komórki namnożone z populacji naciekającej miejsce podania szczepionki były swoście cytotoksyczne wobec autologicznych komórek prezentujących antygen (APC), ekspono-

Dendritic cells (DC) are the most efficient stimulators of T lymphocyte response among professional antigen presenting cells (APC), and the only APC capable to prime naive T lymphocytes with the antigen. A response to weakly immunogenic and tolerogenic tumor antigens can be achieved with the use of DC as APC. DC pulsed with oligopeptides derived from melanoma antigens induced in vitro antigen-specific cytotoxic T lymphocytes capable to lyse melanoma cells. Primary in vitro immunization with peptide-pulsed DC was used to select melanoma-specific cytotoxic T-lymphocyte epitopes for melanoma immunotherapy. Objective clinical responses were observed in a substantial part of melanoma patients vaccinated with DC pulsed ex vivo with tumor antigens. DC-based vaccinations caused regression of metastases in various organs, and elicited melanoma-specific cytotoxic T lymphocytes and delayed-type hypersensitivity to peptide-pulsed DC. The vaccinations were well tolerated and safe. DC were used to generate specific cytotoxic T CD8⁺ lymphocytes from metastatic melanoma patients for adoptive therapy. Adoptively transferred T cell clones preferentially localized to tumor sites and mediated antigen-specific immune response. Antigen-positive tumor cells were eliminated and regression of individual metastases was observed. Appropriate antigen selection for immunization, optimizing of methods of DC isolation, culture and administration, and improvement of strategy of vaccine timing and dosage may increase the effectiveness of DC-based vaccination in cancer.

Key words: dendritic cells, melanoma, tumor vaccine, tumor-associated antigens, cytokines, oligopeptides.

wanych na lizat komórek czerniaka, jak też produkowały TNF po stymulacji przez APC inkubowane z peptydami czerniaka. Do częściowej remisji doszło tylko u jednego z 13 szczepionych chorych.

Thurner i wsp. [10] zastosowali DC pochodzące z monocytów, preinkubowane z peptydem MAGE-3 wiążącym się z HLA-A1, do immunizacji 11 chorych na czerniaka w IV stopniu zaawansowania. Wykonywali 3 wstrzykiwania pod- i śródskórne, poprzedzające 2-krotne podawanie dożylnie. U 6 spośród 11 chorych doszło do regresji poszczególnych zmian nowotworowych w skórze, węzłach limfatycznych, płucach i w wątrobie. Po wstrzykiwaniu podskórnym u 8 z 11 chorych stwierdzono znaczący wzrost liczby prekursorów komórek cytotoksycznych we krwi obwodowej. Liczba ich jednak spadała po dożylnym podaniu DC. Toungouz i wsp. [11] podając dożylnie względnie dużą ilość preinkubowanych z peptydem DC pochodzących z monocytów, również obserwowali znaczny, ale przejściowy wzrost liczby obwodowych limfocytów T wydzielających IFN- γ w odpowiedzi na stymulację peptydem użytym do szczepienia. Po czwartym cyklu szczepienia poziom peptydowo-swoistych limfocytów T wracał do wartości wyjściowych obserwowanych przed szczepieniem. W badaniu tym KLH podawana u części chorych jako antygen wspomagający nie miała żadnego znaczenia dla polepszenia efektywności immunizacji. Małą skuteczność szczepienia DC pochodzącymi od monocytów, podanymi w dużej ilości dożylnie po preinkubacji z peptydami wykazała Panelli i wsp. [12]. Mała skuteczność tego szczepienia mogła wynikać zarówno ze sposobu przygotowania, jak i podania DC.

Mackensen i wsp. [13] do szczepienia zastosowali DC generowane z komórek macierzystych krwiotworzenia CD34⁺ zbieranych po mobilizacji wywołanej wstrzykiwaniem czynnika stymulującego kolonie granulocytarne (G-CSF). Komórki macierzyste były stymulowane *ex vivo* w ciągu trzech tygodni w obecności IL-3, IL-6 i czynnika stymulującego komórki macierzyste (SCF), następnie GM-CSF i IL-4, a ostatecznie ich dojrzewanie było indukowane przez TNF- α . Szczepionkę podawali dożylnie. U dwóch spośród 14 chorych doszło do regresji zaawansowanych zmian nowotworowych. Nad-

wrażliwość typu późnego na peptydy czerniakowe wystąpiła u 4 chorych, a u jednego doszło do znaczącej ekspansji cytotoksycznych limfocytów swoście rozpoznających antygeny Melan-A i gp100. U jednego chorego po szczepieniu wystąpiło bielactwo.

Banchereau i wsp. [14] zastosowali do szczepienia DC generowane w hodowlach prowadzonych w obecności GM-CSF, Flt3-ligandu i TNF- α z komórek macierzystych otrzymywanych po mobilizacji wywołanej G-CSF. Użyli do szczepienia czterech HLA-A2-zależnych peptydów pochodzących z różnych białek czerniaka. U 9/10 chorych, u których po szczepieniu wystąpiła reaktywność na więcej niż 2 peptydy, doszło do stabilizacji choroby, gdy zaś u 6/7 chorych, którzy zareagowali na szczepienie na 2 lub mniej peptydy, doszło do progresji choroby w ciągu 10 tyg. od rozpoczęcia badania. Wywołanie odpowiedzi na KLH u 16/18 chorych świadczyło, że układ odpornościowy u większości tych chorych mimo znacznego stopnia zaawansowania choroby był sprawny.

Jonuleit i wsp. [15] porównali efektywność szczepienia chorych na czerniaka w trakcie progresji choroby niedojrzałymi i dojrzałymi DC pochodzącymi z monocytów. Dojrzewanie DC indukowali poprzez dodanie TNF α , IL-6 i IL-1 β do hodowli DC po 6 dniach od jej rozpoczęcia. DC preinkubowane z peptydami czerniaka wstrzykiwali do węzłów limfatycznych. Stwierdzili, że dojrzałe DC pochodzące z monocytów były bardziej efektywne w indukowaniu swoistych cytotoksycznych limfocytów T zdolnych do lizy komórek docelowych, mierzonej *in vitro* uwalnianiem chromu i limfocytów odpowiadających produkcją IFN- γ na stymulację peptydami czerniaka. Badanie to potwierdziło, że w IV stopniu zaawansowania czerniaka nie dochodzi do tolerancji na antygeny czerniaka. Na możliwość wyczerpywania się zdolności układu odpornościowego w zaawansowanej chorobie nowotworowej wskazują badania Andersen i wsp. [16]. Szczepienie 2 chorych na czerniaka z użyciem DC preinkubowanych z peptydami doprowadziło do uczulenia na te peptydy i do stabilizacji choroby. Po kilku miesiącach mimo doszczepiania zdolność do reakcji na antygeny nowotworowe zaczęła się zmniejszać i doszło do progresji choroby.

Immunogenne peptydy czerniakowe mają powinowactwo do określonych cząsteczek zgodności tkankowej, co wyklucza ich uniwersalne stosowanie. Dlatego interesującą alternatywą dla szczepienia DC preinkubowanymi z peptydami stanowi podawanie hybryd komórek czerniaka i DC. Fuzja autologicznych komórek czerniaka z allogenicznymi DC lub z autologicznymi DC pozwala otrzymać hybrydy komórkowe, zawierające wszystkie antygeny pochodzące z komórki nowotworowej, w tym również własne antygeny zgodności tkankowej klasy I, i cały aparat komórkowy potrzebny do skutecznej prezentacji antygenów pochodzący z komórki dendrytycznej. Trzeba brać pod uwagę możliwość utraty antygenów zgodności tkankowej przez autologiczne komórki czerniaka użyte do hybrydyzacji, ale wówczas w ogóle skuteczność immunizacji staje się problematyczna. Podawanie podskórnie hybryd DC i komórek czerniaka otrzymywanych drogą fuzji z użyciem glikolu polietylenowego [17] lub elektropulsu [18], a następnie napromieniowanych, pozwoliło u części chorych uzyskać remisję lub stabilizację choroby. Prowadzono również badania *in vitro* nad efektywnością uczulania limfocytów T na antygeny przez hybrydy DC z komórkami czerniaka [19] i możliwością utrzymywania linii hybryd w hodowli [20]. Komórki linii hybryd dość szybko traciły determinanty antygenów zgodności tkankowej charakteryzujące APC, ale efekt ten można było odwracać drogą separacji z użyciem przeciwciał wiązanych do kulek magnetycznych.

Metodyka izolacji i hodowli DC, droga i częstość ich podawania oraz ilość DC użytych do szczepienia mogą zapewnić w znacznym stopniu determinować skuteczność uczulania z użyciem DC jako naturalnego adjuwantu. Protokoły dotychczas przeprowadzonych badań klinicznych nie są ujednolicone na tyle, by wyżej wymienione aspekty metodyki można było porównać. W dodatku kryteria doboru chorych w różnych badaniach były odmienne, co nie pozwala w prosty sposób porównywać skuteczności szczepienia. Osiągnięto powodzenie w uczulaniu na antygeny czerniaka zarówno przy zastosowaniu DC niedojrzałych i dojrzałych, pochodzących z monocytów, jak i DC generowanych z komórek macierzystych krwiotworzenia CD34⁺. Te ostatnie są

bardziej efektywne w indukowaniu limfocytów cytotoksycznych z prekursorów występujących z niską częstością w krwi obwodowej [21], ale ich otrzymywanie jest bardziej skomplikowane i wiąże się z podawaniem chorym cytokin mobilizujących komórki macierzyste. W szczepieniach chorych na czerniaka nie stosowano dotąd mobilizacji DC *in vivo* przy użyciu Flt3-ligandu, którego podawanie stanowi alternatywę dla wstrzykiwania G-CSF i pozwala zwiększyć liczebność DC w krwi obwodowej [22]. Ryzyko podawania chorym na czerniaka cytokin indukujących *in vivo* komórki macierzyste nie jest w pełni określone.

Droga podania DC ma wpływ na ich lokalizację. DC generowane z komórek CD34⁺ podane dożylnie przejściowo lokalizują się w płucach, a potem trafiają do śledziony i wątroby. Podane do naczyń limfatycznych trafiają do drenujących węzłów limfatycznych [23]. U chorych na czerniaka dojrzałe DC pochodzące z monocytów bardziej efektywnie po wstrzyknięciu śródskórnym migrują do węzłów limfatycznych niż populacja niedojrzałych DC [24]. Jak dotąd w badaniach klinicznych jako sposoby ekspozycji DC na antygeny czerniaka stosowano inkubację DC z oligopeptydami, lizatem komórek nowotworowych i hybrydyzację DC z komórkami czerniaka. Inne sposoby ekspozycji na antygen, prowadzonej dla uzyskania prezentacji epitopów czerniakowych przez DC, takie jak inkubacja DC z zabitymi komórkami czerniaka [25–27] lub wprowadzanie genów białek czerniaka do DC za pomocą wektorów wirusowych [28], były dotychczas wykorzystywane w badaniach *in vitro*.

Celowość prób indukowania reaktywności na antygeny czerniaka poprzez generowanie DC *ex vivo* i podawanie ich do miejsc niezajętych nowotworowo uzasadniają obserwacje, wskazujące na upośledzanie dojrzewania populacji DC przez komórki czerniaka [29], jak też upośledzanie funkcji DC przez cytokiny wydzielane przez komórki czerniaka [30]. DC izolowane z guzów ulegających regresji silniej stymulowały odpowiedź proliferacyjną limfocytów T na alloantygeny niż DC izolowane z guzów w trakcie progresji. DC izolowane z guzów w trakcie progresji powodowały anergię syngenicznych limfocytów T CD4⁺ [30].

Alternatywę dla prób uczulania poprzez podanie DC preinkubowanych z antygenem stanowi immunoterapia adoptywna, polegająca na wstrzykiwaniu cytotoksycznych limfocytów T uczulonych *in vitro*. Postęp w rozwijaniu immunoterapii adoptywnej był również warunkowany przez użycie DC. Za pomocą DC można indukować cytotoksyczne limfocyty T z receptorami o słabym powinowactwie do epitopów antygenowych. Można też testować *in vitro* immunogenność poszczególnych epitopów z użyciem oligopeptydów, jak też ujawnić epitopy potencjalnie immunogenne, nie rozpoznawane w normalnej odpowiedzi immunologicznej i wymagające odpowiedniej prezentacji przez DC [31, 32]. Limfocyty T uczulone *in vitro* przez DC ekspozowane na peptydy czerniakowe i podane chorym dożylnie, preferencyjnie lokalizowały się w zmianach nowotworowych i pośredniczyły w niszczeniu komórek czerniaka posiadających odpowiednie antygeny, co prowadziło do regresji niektórych zmian nowotworowych [33]. W zmianach nowotworowych pozostawały jednak komórki czerniaka nieposiadające antygeny rozpoznawanego przez uczulone limfocyty. Wskazuje to, że immunoterapia adoptywna wymaga stosowania mieszanek limfocytów T, rozpoznających możliwie jak najbardziej różnorodny zakres epitopów. Odnosi się to w tym samym stopniu do prób immunizacji opartej na podawaniu DC preinkubowanych z antygenem, gdzie zestaw antygenów podawanych do DC również powinien być jak najszerszy, aby utrudnić *ucieczkę* nowotworu.

Większa skuteczność wykorzystania DC w terapii chorych na czerniaka będzie warunkowana przez zwiększenie ilości antygenów czerniaka stosowanych do immunizacji, ulepszenie metod wyodrębniania i hodowli DC, strategii i sposobu podawania DC ekspozowanych na antygeny, a także przez stosowanie szczepionki u chorych w niższym stopniu zaawansowania.

PIŚMIENNICTWO

- Schadendorf D, Paschen A, Sun Y. *Autologous, allogeneic tumor cells or genetically engineered cells as cancer vaccine against melanoma*. Immunology Letters 2000; 74: 67-74.
- Banchereau J, Steinman RM. *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature 1998; 392: 245-52.

3. Rosenberg SA. *A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens*. *Immunity* 1999; 10: 281-7.
4. Mehta-Damani A, Markowicz S, Engleman EG. *Generation of antigen-specific CD8⁺ CTLs from naive precursors*. *J Immunol* 1994; 153: 996-1003.
5. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, Levy R. *Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells*. *Nature Med* 1996; 2: 52-8.
6. Bakker ABH, Marland G, de Boer AJ, Huijbens RJF, Danen EHJ, Adema GJ, Figdor CG. *Generation of antimelanoma cytotoxic T lymphocytes from healthy donors after presentation of melanoma-associated antigen-derived epitopes by dendritic cells in vitro*. *Cancer Res* 1995; 55: 5330-4.
7. Osugi Y, Vuckovic S, Hart DNJ. *Myeloid blood CD11c⁺ dendritic cells and monocytedendritic cells differ in their ability to stimulate T lymphocytes*. *Blood* 2002; 100: 2858-66.
8. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. *Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells*. *Nature Med* 1998; 4: 328-32.
9. Chakraborty NG, Sporn JR, Tortora AF, Kurtzman SH, Yamase H, Ergin MT, Mukherji B. *Immunization with a tumor-cell-lysate-loaded autologous-antigen-presenting-cell-based vaccine in melanoma*. *Cancer Immunol Immunother* 1998; 47: 58-64.
10. Thurner B, Haendle I, Roder 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.
11. Toungouz M, Libin M, Bulte F, et al. *Transient expansion of peptide-specific lymphocytes producing IFN- γ after vaccination with dendritic cells pulsed with MAGE peptides in patients with mage-A1/A3-positive tumors*. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 937-43.
12. Panelli MC, Wunderlich J, Jeffries J, Wang E, Mixon A, Rosenberg SA, Marincola FM. *Phase 1 study in patients with metastatic melanoma of immunization with dendritic cells presenting epitopes derived from the melanoma-associated antigens MART-1 and gp100*. *J Immunother* 2000; 23: 487-98.
13. Mackensen A, Herbst B, Chen J-L, et al. *Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34⁺ hematopoietic progenitor cells*. *Int J Canc* 2000; 86: 385-92.
14. Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, et al. *Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34⁺ progenitor-derived dendritic cell vaccine*. *Cancer Res* 2001; 61: 6451-8.
15. Jonuleit H, Giesecke-Tuettenberg A, Tuting T, et al. *A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection*. *Int J Canc* 2001; 93: 243-51.
16. Andersen MH, Keikavoussi P, Brocker E-B, et al. *Induction of systemic CTL responses in melanoma patients by dendritic cell vaccination: cessation of CTL responses is associated with disease progression*. *Int J Canc* 2001; 94: 820-4.
17. Krause SW, Neumann C, Soruri A, Mayer S, Peters JH, Andreesen R. *The treatment of patients with disseminated malignant melanoma by vaccination with autologous cell hybrids of tumor cells and dendritic cells*. *J Immunother* 2002; 25: 421-8.
18. Trefzer U, Weingart G, Chen Y, et al. *Hybrid cell vaccination for cancer immune therapy: first clinical trial with metastatic melanoma*. *Int J Canc* 2000; 85: 618-26.
19. Soruri A, Fayyazi A, Neumann C, et al. *Ex vivo generation of human anti-melanoma autologous cytolytic T cells by dendritic cell/melanoma cell hybridomas*. *Cancer Immunol Immunother* 2001; 50: 307-14.
20. Jantschke P, Spagnoli G, Zajac P, Rochlitz CF. *Cell fusion: an approach to generating constitutively proliferating human tumor antigen-presenting cells*. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51: 367-75.
21. Mortarini R, Anichini A, Di Nicola M, et al. *Autologous dendritic cells derived from CD34⁺ progenitors and from monocytes are not functionally equivalent antigen-presenting cells in the induction of MelanA/Mart-1₂₇₋₃₅-specific CTLs from peripheral blood lymphocytes of melanoma patients with low frequency of CTL precursors*. *Cancer Res* 1997; 57: 5534-41.
22. Maraskovsky E, Daro E, Roux E, et al. *In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand*. *Blood* 2000; 96: 878-84.
23. Mackensen A, Krause T, Blum U, Uhrmeister P, Mertelsmann R, Lindemann A. *Homing of intravenously and intralymphatically injected human dendritic cells generated in vitro from CD34⁺ hematopoietic progenitor cells*. *Cancer Immunol Immunother* 1999; 48: 118-22.
24. de Vries IJM, Krooshoop DJEB, Scharenborg NM, et al. *Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state*. *Cancer Res* 2003; 63: 12-17.
25. Berard F, Blanco P, Davoust J, et al. *Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells*. *J Exp Med* 2000; 192: 1535-43.
26. Jenne L, Arrighi J-F, Jonuleit H, Saurat J-H, Hauser C. *Dendritic cells containing apoptotic melanoma cells prime human CD8⁺ T cells for efficient tumor cell lysis*. *Cancer Res* 2000; 60: 4446-52.
27. Russo V, Tanzarella S, Dalerba P, Rigatti D, Rovere P, Villa A, Bordignon C, Traversari C. *Dendritic cells acquire the MAGE-3 human tumor antigen from apoptotic cells and induce a class I-restricted T cell response*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 2185-90.
28. Perez-Diez A, Butterfield LH, Li L, Chakraborty NG, Economou JS, Mukherji B. *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.
29. Berthier-Vergnes O, Gaucherand M, Peguet-Navarro J, Plouet J, Pageaux J-F, Schmitt D, Staquet M-J. *Human melanoma cells inhibit the earliest differentiation steps of human Langerhans cell precursors but failed to affect the functional maturation of epidermal Langerhans cells*. *Br J Canc* 2001; 85: 1944-51.
30. Enk AH, Jonuleit H, Saloga J, Knop J. *Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma*. *Int J Canc* 1997; 73: 309-16.
31. Tsai V, Southwood S, Sidney J, Sakaguchi K, Kawakami Y, Appella E, Sette A, Celis E. *Identification of subdominant CTL epitopes of the gp100 melanoma-associated tumor antigen by primary in vitro immunization with peptide-pulsed dendritic cells*. *J Immunol* 1997; 158: 1796-802.
32. Kawashima I, Tsai V, Southwood S, Takesako K, Celis E, Sette A. *Identification of gp100-derived, melanoma specific cytotoxic T-lymphocyte epitopes restricted by HLA-A3 supertype molecules by primary in vitro immunization with peptide-pulsed dendritic cells*. *Int J Cancer* 1998; 78: 518-24.
33. Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E, Greenberg PD. *Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8⁺ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 16168-173.

ADRES DO KORESPONDENCJI

dr n. przyr. **Sergiusz Markowicz**
 Zakład Immunologii
 Centrum Onkologii – Instytut
 im. Marii Skłodowskiej-Curie
 ul. Roentgena 5
 02-781 Warszawa
 tel. 0 (prefiks) 22 546 26 60
 e-mail: sergiusz@coi.waw.pl