

SZCZEPIONKI PRZECIWNOWOTWOROWE WYDZIELAJĄCE GM-CSF

GM-CSF-SECRETING TUMOR CELL VACCINES

Rafał WOLNY, Witold LASEK

Zakład Immunologii, Centrum Biostruktury
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Streszczenie: W pracy przedstawiono aktualny stan zaawansowania prac badawczych oraz klinicznych nad szczepionkami przeciwnowotworowymi wydzielającymi GM-CSF. Szczepionki przeciwnowotworowe modyfikowane genami dla cytokin to jedna z form immunoterapii stosowanej eksperymentalnie w leczeniu nowotworów w stadium przerzutowym jako czynnik wspomagający lub jako terapia podstawowa. Mechanizm ich działania polega na dostarczeniu do organizmu chorego antygenów nowotworu w skojarzeniu z GM-CSF, który wzmacnia rekrutację i aktywację komórek dendrytycznych, przyczyniając się do wydajniejszej prezentacji antygenów. Spośród metod transferu genów dla cytokin do komórek nowotworowych, retrowirusy i adenowirusy są najpowszechniej stosowane z powodu najwyższej wydajności. Skuteczność terapii szczepionkowej w badaniach przedklinicznych, które w większości dotyczyły mysich modeli czerniaka, była wysoka zarówno w układzie profilaktycznym, jak i terapeutycznym. Badania kliniczne I fazy, przeprowadzone głównie u pacjentów z przerzutowym czerniakiem, rakiem płuca oraz gruczołu krokowego, potwierdziły bezpieczeństwo terapii, u większości badanych wykazały zwiększoną aktywację układu immunologicznego, lecz jedynie u nielicznych przeżycie było dłuższe od oczekiwanego. Badania kliniczne II i III fazy nie potwierdziły dotąd przewagi terapii szczepionkowej nad terapią konwencjonalną. Prowadzone są prace mające na celu wskazanie przyczyn ograniczonej skuteczności szczepionek przeciwnowotworowych wydzielających GM-CSF u ludzi. Metody wzmocnienia ich działania ukierunkowane są m.in. na limfocyty T regulatorowe $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, białko MFG-E8 oraz cząsteczkę kostymulującą CTLA-4.

Słowa kluczowe: immunoterapia, szczepionki przeciwnowotworowe, GM-CSF.

Summary: In the paper the current state-of-the-art of the preclinical and clinical trials concerning GM-CSF-secreting tumor cell vaccines was presented. Cytokine gene-modified cancer vaccines are experimental immunotherapeutics applied as adjuvants or as main medications in the treatment of metastatic neoplasms. The principle of their action consists in the delivery of cancer antigens in association with GM-CSF to the patient's organism. The cytokine improves recruitment and activation of dendritic cells, leading to more efficient antigens' presentation. Retroviruses and adenoviruses are the most widely applied vectors for cytokine gene transfer because of the high efficiency. Effectiveness of the vaccine therapy in the preclinical studies, usually in the models of murine melanoma, was high in the prophylactic as well as in the therapeutic model. Phase I clinical trials, carried out in the patients with metastatic melanoma, lung cancer and prostate cancer, confirmed safety of the therapy, indicated augmented immune

response in most of the patients, but only some of them experienced prolonged survival in comparison to the prognosis. Phase II and III studies did not reveal the superiority of vaccination over standard therapy so far. The research carried on at the moment are aimed at finding the reasons for limited clinical efficiency of GM-CSF-secreting tumor cell vaccines. Methods of augmenting its effectiveness contain the following main targets: suppressor $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T-cells, MFG-E8 protein and co-stimulatory molecule CTLA-4.

Keywords: immunotherapy, cancer vaccines, GM-CSF.

WPROWADZENIE

Odkąd w roku 1957 Burnett odkrył fakt występowania odpowiedzi immunologicznej gospodarza przeciwko powstałym w jego organizmie komórkom nowotworowym [8], podejmowano próby wzmocnienia aktywności układu odpornościowego człowieka w celu eliminacji nowotworu lub nasilenia skuteczności innych form terapii. Działania te określa się wspólnym mianem immunoterapii nowotworów.

Liczne antygeny nowotworowe wywołują u człowieka odpowiedź immunologiczną zarówno humoralną, jak i komórkową, zwykle jednak zbyt słabą, aby ograniczyć w istotnym stopniu rozwój choroby. W ostatnich latach poznano wiele antygenów nowotworowych, których podział przedstawiono w tabeli 1.

Antygeny te stanowią potencjalną podstawę stosowania immunoterapii aktywnej. Same w sobie są jednak zazwyczaj mało immunogenne, dlatego poszukuje się sposobów stymulacji antygenowo-swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej, na przykład poprzez ich modyfikowanie lub podawanie łącznie z adiuwantami.

Źródłem antygenów nowotworowych, mających na celu aktywację odpowiedzi immunologicznej przeciwko nowotworowi mogą być komórki nowotworowe, czasem odpowiednio zmodyfikowane przy użyciu metod inżynierii genetycznej, jak również charakterystyczne dla nowotworów białka lub peptydy. Preparaty te określa się mianem szczepionek przeciwnowotworowych [64]. W przeciwieństwie do powszechnie stosowanych profilaktycznych szczepień indukujących odporność przeciwko antygenom mikroorganizmów, szczepionki przeciwnowotworowe to eksperymentalna forma terapii nowotworów, stosowana głównie w stadium przerzutowym, kiedy niemożliwa jest lecznicza interwencja chirurgiczna lub radioterapia.

Badania dotyczące szczepionek przeciwnowotworowych uwzględniają ich zastosowanie jako samodzielnego środka terapeutycznego (głównie w eksperymentach

TABELA 1. Główne grupy antygenów nowotworowych wraz z przykładami

TABLE 1. Main groups and examples of tumor-associated antigens

Grupa antygenów	Przykłady
Antygeny rakowo-jądrowe	MAGE, BAGE, GAGE, NY-ESO-1
Antygeny różnicowania	MART-1/Melan A, gp100, TRP-1
Antygeny ulegające nadekspresji	HER-2/neu, MUC-1
Białka zmutowane	TP53, RAS
Antygeny wirusowe	białka wirusów EBV, HPV, HBV, HTLV
Białka fuzyjne	BCR-ABL

przedklinicznych) lub w leczeniu wspomagającym konwencjonalną chemioterapię i leczenie chirurgiczne (przede wszystkim w próbach klinicznych). Inne, nieomawiane tu szerzej formy swoistej immunoterapii nowotworów, to immunoterapia adoptywna wykorzystująca modyfikowane *ex vivo* limfocyty T naciekające guz – TIL (*tumor infiltrating lymphocytes*) [59] lub komórki dendrytyczne pochodzące od pacjenta oraz terapia przeciwciałami monoklonalnymi.

Szczepionki przeciwnowotworowe ze względu na postać, w jakiej podawane są antygeny nowotworowe, można podzielić na następujące typy [13]:

- 1) białkowe;
- 2) peptydowe;
- 3) złożone z komórek nowotworowych;
 - a) autologiczne,
 - b) allogeniczne,
 - c) modyfikowane genowo,
- 4) złożone z komórek dendrytycznych;
- 5) złożone z rekombinowanych wirusów zawierających geny dla antygenów nowotworowych oraz dla cząsteczek kostymulujących.

Szczepionki złożone z samych antygenów nowotworowych, wyekstrahowanych z komórek nowotworowych wyizolowanych od chorego bądź namnożonych *in vitro*, jak również zawierające całe napromieniowane komórki guza, nie stymulują w pożądanym stopniu odpowiedzi immunologicznej [15]. Konieczne wydaje się zastosowanie adiuwantów, które intensyfikują rozpoznawanie i niszczenie komórek nowotworowych przez mechanizmy efektorowe. Okazało się, że immunostymulatorami właściwymi do takich zastosowań mogą być cytokiny [3, 12].

Odkąd dowiedziono, że zmiana proporcji stężeń cytokin w mikrośrodowisku nowotworu może spowodować istotne zmiany w sile odpowiedzi przeciwko antygenom guza [25], podjęto intensywne badania licznych cząsteczek immunostymulujących, obserwując ich potencjalny efekt przeciwnowotworowy. Okazało się, że okologuzowa iniekcja niektórych cytokin, w szczególności IL-2, stymulowała niszczenie nowotworu poprzez nasilenie aktywności neutrofilów, eozynofilów, makrofagów, komórek NK i limfocytów. Przeprowadzono liczne eksperymenty na modelach mysich, mające na celu określenie, które cytokiny wykazują największą zdolność potencjalizacji szczepień antygenami nowotworowymi. W badaniach z użyciem modelu czerniaka B16 wykazano, że podskórne podanie napromieniowanych

TABELA 2. Potencjał szczepionkowy napromieniowanych, zmodyfikowanych genetycznie komórek czerniaka B16 u myszy syngenicznych szczepu C57BL/6 [13]
TABLE 2.. Antitumor potential of irradiated or genetically modified B16 melanoma cells in C57BL/6 syngeneic mice [13]

Cząsteczka wytwarzana przez komórki szczepionkowe	% ochrony
GM-CSF	90%
IL-3, IL-4, IL-6	40%
IL-1, IL-7, SCF, G-CSF, Flt-3-ligand, eotaksyna, cyklofilina	20%
IL-2, IL-5, IL-10, IL-12, IL-18, TNF- α , IL-1Ra, B7-1, M-CSF, RANTES, MIP- α , MIP-1 β , ICAM, TGF- β , CD2, MIF	0%

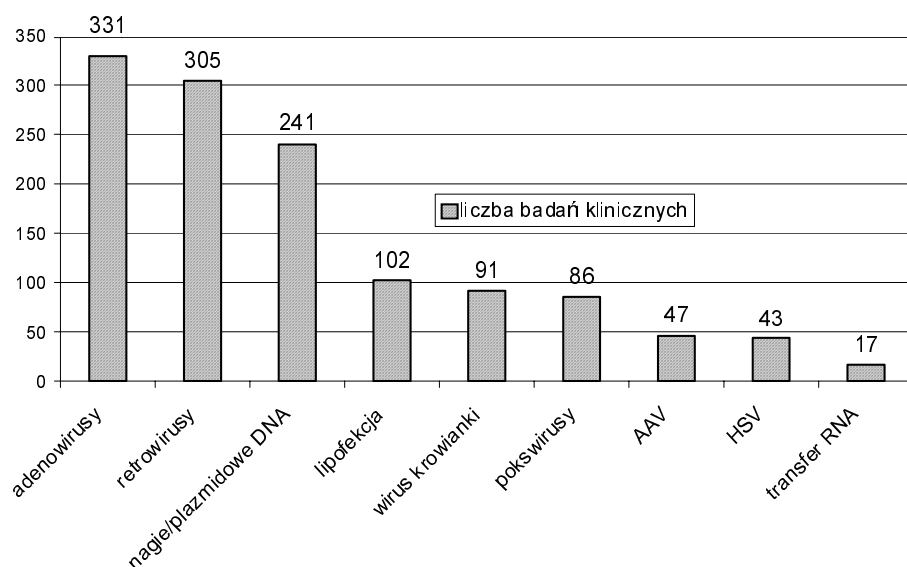
komórek nowotworowych modyfikowanych genem dla GM-CSF, w 90% chroniło przed rozwojem choroby po powtórnej iniekcji żywych komórek czerniaka (tab. 2). Inne cytokiny lub białka biorące udział w rozwoju odpowiedzi immunologicznej wywierały efekt słabszy, lub nie miały podobnego działania [13].

METODY TRANSFERU GENÓW DO KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Istotne przyspieszenie prac nad immunoterapią nowotworów nastąpiło w momencie opracowania wydajnych metod transferu genów dla cytokin do komórek nowotworowych [25]. Ich ilościowy udział w przygotowaniu szczepionek w badaniach klinicznych przedstawiono na rycinie 1. Metody te umożliwiły przygotowanie szczepionek z własnych, unikalnych pod względem antygenowym komórek nowotworowych pacjenta. Zaletą tych preparatów jest brak immunogenności w stosunku do autoantygenów oraz reprezentowanie wszystkich antygenowo różnych białek charakterystycznych dla tkanki nowotworowej chorego, które mogą przez to stać się celem odpowiedzi immunologicznej.

Badania nad transferem genów zwiększających immunogenność komórek nowotworowych dotyczą ingerencji w następujące białka:

- a) powierzchniowe cząsteczki kostymulujące (np. B7 [4]);
- b) immunogenne cząsteczki powierzchniowe, głównie MHC;
- c) cytokiny wydzielane parakrynowo (np. GM-CSF).



RYCINA 1. Zestawienie udziału metod transferu genów w badaniach klinicznych w latach 1997–2007 [17]

FIGURE 1. Gene therapy vectors used in clinical trials until 2007 [17]

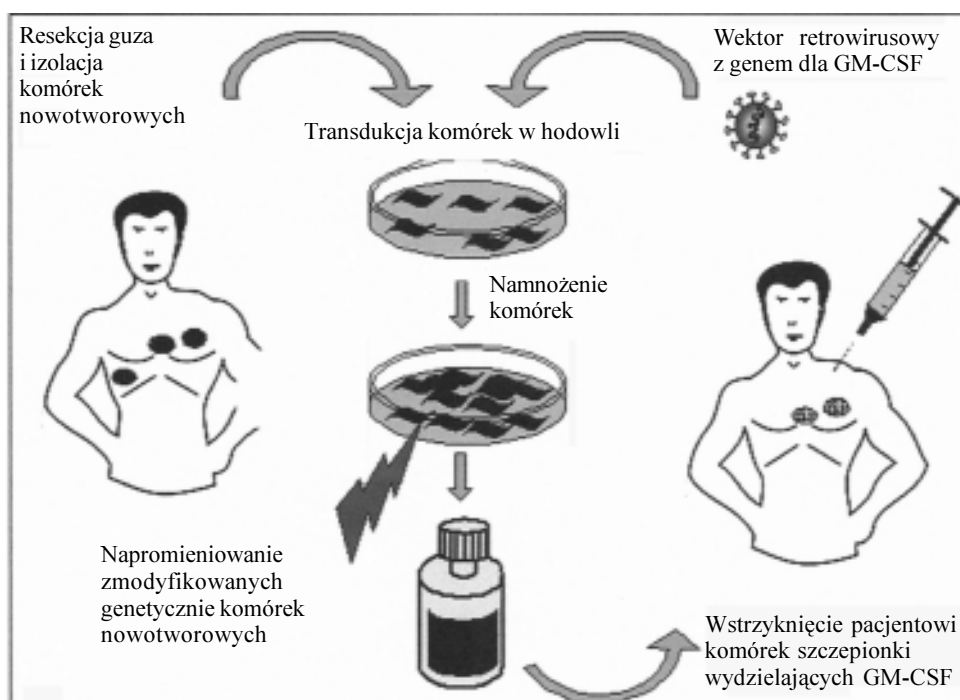
TABELA 3. Zestawienie metod transferu genu dla GM-CSF wykorzystywanych w badaniach nad szczepionkami przeciwnowotworowymi wydzielającymi GM-CSF [23, 45, 58,]

TABLE 3. Methods of GM-CSF gene transfer used in trials with GM-CSF-secreting tumor cell vaccines [23, 45, 58]

Wektor	Zalety	Wady	Uwagi	Pismien- nictwo
Retrovirus	Wysoka wydajność Stabilny transfer Dobra dostępność	Tylko komórki dzielące się Możliwość mutagenyzy	Pierwszy historycznie wektor Najczęściej stosowany Bezpśrednie porównanie z adenowirusem wskazuje na lepszą skuteczność	13, 73, 51, 75
Adenowirus	Wysoka wydajność Duża pojemność (do 29 kb) Transformacja także komórek postmitotycznych	Stopniowo obniżająca się ekspresja genu	Wektor często stosowany Bardzo wysoka ilość wytwarzanego M-CSF, co może zmniejszać skuteczność szczepienia	7, 1, 32, 68
Transfer nagięgo DNA	Łatwość w produkcji Bezpieczeństwo	Niska skuteczność Krótkotrwała ekspresja genu	Na 17 pacjentów, dla których przygotowywano szczepionkę, tylko dla 4 uzyskano ilość GM-CSF > 3 g/10 ⁶ kom./24 h	61
Lipofekcja	Bezpieczeństwo Łatwość metody	Krótkotrwała ekspresja genu	Wykazano skuteczność na przykładzie transferu genu dla GM-SF do komórek ludzkiego raka nerki Największa produkcja cytokiny 48 h po transferze, utrzymująca się przez 5 dni	30
Elektroporacja	Wysoka ekspresja przez krótki czas po transfekcji	Nietrwałość transferu	Metoda o zmiennej skuteczności <i>in vivo</i> w próbach ze szczepionką wydzielającą GM-CSF	26, 27
Flawivirus	Wydajność transferu	Niewielkie doświadczenie z wektorem	Wykazano skuteczność doguzowej terapii doświadczalnych nowotworów CT-26 i B16-OVA z użyciem wektora opartego na flawivirusie K unin kodującego gen dla GM-CSF	62

Terapia szczepionkowa to forma terapii genowej przeprowadzanej *ex vivo*, w przeciwieństwie do terapii *in vivo*, której zadaniem jest wprowadzenie genu do puli komórek pacjenta znajdujących się w jego organizmie w celu wywołania efektu terapeutycznego.

W badaniach przedklinicznych i klinicznych nad szczepionkami przeciwnowotworowymi wydzielającymi GM-CSF stosuje się wektory wymienione w tabeli 3. Ogólną zasadę przygotowywania szczepionek przeciwnowotworowych wydzielających GM-CSF przedstawiono na rycinie 2.



RYCINA 2. Ogólna zasada przygotowania szczepionek przeciwnowotworowych wydzielających GM-CSF

FIGURE 2. General rules of preparation of GM-CSF-secreting tumor cell vaccines

SKUTECZNOŚĆ SZCZEPIONEK WYDZIELAJĄCYCH GM-CSF W BADANIACH NA ZWIERZĘTACH

Układ profilaktyczny

Szczepionki złożone z komórek nowotworowych wydzielających GM-CSF wykazały bardzo silne profilaktyczne działanie przeciwnowotworowe w modelach zwierzęcych. Nowotworem, który najczęściej wykorzystywano do badań, był mało immunogenny mysz czarniak B16. W jednym z pierwszych badań, w którym udowodniono skuteczność napromieniowanych komórek czarniaka B16 F0 wydzielających

jących GM-CSF, 90% myszy, które otrzymały podskórnie szczepionkę, uzyskało trwałą odporność na inokulowane żywe syngeniczne komórki nowotworowe [11]. W doświadczeniu, w którym podawano komórki czerniaka B16 domózgowo, 50% myszy, które otrzymały szczepionkę, wykazało oporność na komórki nowotworowe [73]. Przeprowadzone w dalszej kolejności eksperymenty potwierdziły zdolność silnego wzmocnienia odpowiedzi przeciwnowotworowej przez komórki guza wydzielające GM-CSF [7]. Wykazano skuteczność tej terapii w stosunku do mysiego modelu chłoniaka z limfocytów B [50]. Podjęto także skuteczną próbę zastosowania profilaktycznego szczepionki wydzielającej GM-CSF w terapii ostrej białaczki szpikowej (AML) u myszy [16]. W tym modelu 80% badanych zwierząt, którym podano GM-CSF, wykazywało oporność na inokulowane komórki białaczkowe. W kolejnym badaniu szczepionki złożone z napromieniowanych komórek mysiego raka jelita grubego CT-26, raka nerki RENCA, włókniakomięsaka CMS-5 i raka płuca LLC, wydzielające GM-CSF indukowały układową odpowiedź przeciwnowotworową przeciwko odpowiednim guzom istotnie silniejszą w porównaniu z komórkami nietransfekowanymi [40]. Obiecujący, 100% efekt protekcyjny, uzyskano w modelu mysiego nowotworu neuroblastoma C1300 podczas terapii syngenicznymi komórkami nowotworu wydzielającymi 150 ng GM-CSF/ 10^6 komórek w ciągu 72 h [74]. Inne eksperymenty wykazały, że efekt indukcji odporności przeciwnowotworowej był zależny od ilości syntetyzowanego przez komórki szczepionkowe GM-CSF i był maksymalny dla linii komórkowych wytwarzających ponad 40 ng GM-CSF/ 10^6 komórek w ciągu 24 h [40]. Ponadto zaobserwowano silny efekt synergistyczny szczepionek wydzielających jednocześnie GM-CSF oraz IFN- γ w indukowaniu odporności w stosunku do eksperymentalnie indukowanego nowotworu neuroblastoma. W badaniu tym u 100% szczepionych myszy wykształciła się odporność na komórki nowotworowe [5]. Podjęto też próby wykorzystania komórek allogenicznych zarówno pochodzących od myszy niemających cząsteczek MHC, jak i myszy o normalnej ekspresji tych genów. Okazało się, że obecność allogenicznych cząsteczek MHC na komórkach szczepionkowych nie zmniejsza ogólnoustrojowego efektu przeciwnowotworowego, a wręcz przeciwnie, nasila go, nie indukując istotnych efektów ubocznych [71]. Interesującą kwestią było też określenie, czy podanie samej cytokiny przed lub po podaniu niemodyfikowanych komórek nowotworowych okaże się skuteczniejsze od podawania jednoczesnego w postaci szczepionki. Wyniki eksperymentów dowodzą, że najskuteczniejsze jest jednoczesne podanie komórek nowotworowych z cytokiną lub wcześniejsze podanie komórek guza, natomiast podanie ich po wstrzyknięciu GM-CSF może wywołać osłabienie odpowiedzi [28].

Układ terapeutyczny

Skuteczność szczepionek przeciwnowotworowych w układzie terapeutycznym, w którym podejmuje się próbę leczenia wcześniej wyindukowanego nowotworu, jest trudniejsza do udowodnienia. Mimo to, wyniki przeprowadzonych doświadczeń potwierdziły efektywność opisywanej metody także jako sposobu leczenia nowotworu.

Po domózgowej iniekcji komórek czerniaka B16 u myszy, trwałe wyleczenie uzyskano u 20% zwierząt, którym podano szczepionkę [73]. Wykorzystanie w tym modelu komórek wydzielających jednocześnie GM-CSF, jak i IL-4 spowodowało wzrost odsetka wyleczeń do 40%. W modelu mysiego guza sutka MET-1 podanie szczepionki znamienne spowalniało wzrost guzów i zmniejszało liczbę odległych przerzutów. Badane guzy wykazywały intensywny naciek z makrofagów oraz mniejszą liczbę naczyń krwionośnych [20]. Pojedyncze szczepienie myszy za pomocą komórek czerniaka B16 wydzielających GM-CSF indukowało powstanie limfocytów T, które przyczyniały się do regresji wyindukowanego wcześniej guza [51]. Jednakże wielokrotne podania szczepionki, skutkujące większym ogólnoustrojowym stężeniem GM-CSF, powodowały osłabienie odpowiedzi przeciwnowotworowej u myszy z limfopenią, u których wcześniej odtworzono pulę limfocytów z wykorzystaniem dziewiczych splenocytów [49]. Efekt ten związany był ze zwiększeniem całkowitej liczby limfocytów regulatorowych $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, a zastosowanie przeciwciał anty-CD4 przywracało efekt terapeutyczny. W innym badaniu ustalono, że szczepienie przy użyciu komórek wydzielających bardzo duże ilości GM-CSF (3000, 6000 ng/ 10^6 kom./24 h) może pogarszać przeżycie myszy z wyindukowanym czerniakiem B16, podczas gdy niższe dawki cytokiny (300 ng/ 10^6 kom./24 h) działały korzystnie [52]. Linie komórkową czerniaka B78-H1 wydzielającą GM-CSF, użytą w systemie *bystander* w połączeniu z autologicznymi komórkami guza, wykorzystano także jako leczenie adiuwantowe w terapii przerzutowego raka sutka po resekcji z wykorzystaniem NST (niemieloablacyjnego przeszczepu szpiku) i następnych DLI (infuzji limfocytów dawcy). W ten sposób udało się wyleczyć 100% myszy nie wywołując choroby GVH [71].

SKUTECZNOŚĆ SZCZEPIONEK WYDZIELAJĄCYCH GM-CSF W BADANIACH NA LUDZIACH

Zachęcające wyniki doświadczeń przedklinicznych skłoniły do szybkiego podjęcia testów szczepionki na pacjentach. Wydajne metody transferu genów, głównie z wykorzystaniem wektorów retrowirusowych i adenowirusowych pozwoili na zaplanowanie badań klinicznych, w których dla każdego pacjenta z przerzutowym nowotworem przygotowywano indywidualną szczepionkę z jego własnych komórek nowotworowych. W celu uproszczenia i przyspieszenia terapii podejmowano też próby stosowania uniwersalnej linii komórek nowotworowych wydzielających GM-CSF (w systemie *bystander*) w połączeniu z innymi formami swoistej immunoterapii [71]. Najczęstszy protokół badań obejmował resekcję guza pierwotnego lub przerzutów i przygotowanie *in vitro* szczepionki poprzez izolację komórek, hodowlę, transfer genu dla GM-CSF i napromienienie komórek, a następnie kilkukrotne podawanie komórek preparatu szczepionki śródskórną lub podskórną.

Czerniak

Zdecydowanie najwięcej badań klinicznych przeprowadzono na pacjentach z przerzutowym czerniakiem (*melanoma malignum*).

W jednym z badań I fazy spośród leczonej grupy 26 pacjentów, u 19 stwierdzono lokalną odpowiedź immunologiczną w miejscu podania szczepionki w postaci nacieku komórkowego. Podobny naciek wraz z martwicą w przerzutach stwierdzono u 10 pacjentów, u 17 pacjentów rozwinęła się nadwrażliwość typu opóźnionego na antygeny nowotworu, natomiast u 10 uzyskano stabilny przebieg choroby przez 36 miesięcy. U 4 spośród leczonych pacjentów uzyskano wyleczenie. Nie wykazano zależności między liczbą podanych komórek szczepionkowych i ilością wytwarzanego przez nie GM-CSF a rokowaniem [68]. Inne badanie I fazy objęło 28 pacjentów, u których po szczepieniu oceniano liczbę limfocytów T specyficznych wobec antygenów czerniaka. Wzrost liczby tych komórek stwierdzono u 14 pacjentów, natomiast u 6 pacjentów uzyskano stabilny przebieg choroby przez okres 5 lat [51]. Oba powyższe badania wskazały na bezpieczeństwo stosowania szczepionek u ludzi. Zastrzeżenia mógł wzbudzać fakt, że ilości GM-CSF, produkowane przez komórki dla poszczególnych pacjentów, różniły się od siebie bardzo znacznie (11–2608 ng/10⁶ kom./24 h), a żywotność samych komórek też wykazywała dużą zmienność. W podobnie zaplanowanym badaniu na 29 pacjentach, u 80% uzyskano odpowiedź immunologiczną w okolicy guza, a u 4 pacjentów doszło do zniszczenia unaczynienia nowotworu [13].

Podjęto także próbę zastosowania terapii onkolitycznym wirusem HSV, replikującym się selektywnie w komórkach guza, zawierającym gen dla GM-CSF. Spośród 50 pacjentów leczonych doguzowymi podaniami zawiesiny wirusów, u 13 odnotowano kliniczną odpowiedź [47]. W I fazie badań klinicznych oceniano też skuteczność szczepionki złożonej z autologicznych komórek nowotworowych połączonych z linią wydzielającą GM-CSF i CD40L w systemie *bystander*. U sześciu spośród 10 pacjentów uzyskano wydłużenie czasu stabilnego przebiegu choroby, u czterech z nich wykazano specyficzną odpowiedź puli limfocytów T specyficznych w stosunku do guza [10].

Podczas gdy nadal w toku są badania kliniczne kolejnych faz z użyciem komórkowych szczepionek wydzielających GM-CSF, zakończyło się związane z tą dziedziną randomizowane badanie dotyczące grupy 97 pacjentów z przerzutowym czerniakiem, u których porównywano skuteczność komercyjnej komórkowej szczepionki Canvaxin zawierającej niemodyfikowane komórki nowotworowe z łącznym podawaniem szczepionki i GM-CSF. U pacjentów z grupy, która otrzymywała GM-CSF, zanotowano nasilenie odpowiedzi humoralnej przeciwko antygenom czerniaka w klasach IgG i IgM, obniżenie nadwrażliwości późnej na tuberkulinę oraz, co niepokojące, wzrost liczby wczesnych nawrotów choroby oraz zgonów [21]. Także w innym, zakończonym niedawno badaniu randomizowanym II fazy nad skutecznością GM-CSF dodawanego jako adiuwant do wielopeptydowej szczepionki w leczeniu czerniaka zaobserwowano zmniejszenie liczby swoistych dla antygenów czerniaka komórek T CD4⁺ i CD8⁺ u pacjentów otrzymujących szczepionkę i GM-CSF [65].

Niedrobnokomórkowy rak płuca

Nowotworem, który na równi z czerniakiem budzi nadzieje na skuteczność terapii szczepionkowej, jest przerzutowy niedrobnokomórkowy rak płuca – NSCLC (*non-small-cell lung cancer*). Pośród bardzo licznych strategii terapii, łącznie ze szczepieniem peptydami antygenowymi, komórkami dendrytycznymi oraz rekombinowanymi wirusami wraz z adiuwantami, prowadzi się także badania kliniczne nad wykorzystaniem komórek nowotworowych wydzielających GM-CSF [46].

Badania pierwszej fazy przeprowadzono dla szczepionki złożonej z autologicznych komórek pobranych z usuniętych przerzutów guza, dokonując transferu genu przy użyciu wektora adenowirusowego. Zastrzeżenia mogła budzić ich bardzo zmienna żywotność (2–100%) i ilość wytwarzanej cytokiny (6–3000 ng/10⁶ kom./24 h). Odpowiedź immunologiczną na antygeny nowotworu oraz reakcję nadwrażliwości typu późnego stwierdzono u 18/25 pacjentów, a u 5 z nich uzyskano stabilny przebieg choroby przez 3–33 miesiące. W międzyczasie u 6 pacjentów wykonano zabiegi chirurgiczne resekcji guzów przerzutowych. W 3 próbkach guzów zaobserwowano nasilone nacieki zapalne [61]. Kolejne badanie I fazy wykazało zależną od dawki szczepionki korzyść u pacjentów z wczesnym oraz przerzutowym NSCLC [55]. Obecnie ta terapia testowana jest w badaniach klinicznych II fazy (NCT 00074295 – trwające [33], NCT 00089726 – zakończone, wyniki dotychczas nieopublikowane [34]).

Próby uproszczenia metody oraz uzyskania bardziej przewidywalnych stężeń GM-CSF doprowadziły do opracowania linii wydzielającej duże ilości cytokiny do wykorzystania w modelu *bystander*. Obecnie taka linia wykorzystywana jest w badaniu II fazy, w której oceniany jest efekt łącznej terapii szczepionką, cyklofosfamidem i tretinoią [63].

Rak gruczołu krokowego nawracający po terapii hormonalnej

Nawracający po terapii hormonalnej rak gruczołowy prostaty – HPRC (*hormone-refractory prostate cancer*) to przykład nowotworu, który okazał się dobrze reagować na terapię szczepionkową. Badania fazy I z wykorzystaniem autologicznych komórek guza wykazały nasilenie lokalnej odpowiedzi komórkowej oraz – u części pacjentów – także humoralnej [67]. Przeprowadzono większe badanie II fazy, w którym rekrutowano 55 pacjentów z HPRC niepoddawanych wcześniej chemioterapii, a leczonych przy użyciu szczepionki GVAX, będącej mieszanką komórek dwóch linii raka prostaty wydzielających GM-CSF. Stwierdzono istotne obniżenie stężenia antygenu specyficznego dla prostaty (PSA) oraz wydłużenie przeżycia w stosunku do prognozowanych wartości dla tej grupy pacjentów [29]. Niedawno przedstawiono wyniki w pełni randomizowanych badań III fazy VITAL I i VITAL II, w których porównywano skuteczność terapii szczepionką GVAX ze standardową chemioterapią. Schemat leczenia samą szczepionką skutkował zbliżonym całkowitym przeżyciem pacjentów w porównaniu ze standardową terapią docetakselem i prednizolonem. Z kolei skojarzenie szczepionki z docetakselem skutkowało istotnie zwiększoną śmiertelnością w porównaniu ze schematem standardowym [29,

66]. Nakazuje to rozważenie dokładniejszego ustalenia możliwie optymalnych parametrów szczepienia w badaniach przedklinicznych oraz dużą ostrożność podczas planowania kolejnych badań klinicznych.

Inne nowotwory

Przeprowadzono niewielkie badanie kliniczne I fazy na 4 pacjentach chorych na raka jasnokomórkowego nerki w stadium IV. Cykl szczepień autologicznymi komórkami nowotworowymi wydzielającymi GM-CSF spowodował u wszystkich wyraźną odpowiedź immunologiczną, a u 2 pacjentów osiągnięto wielomiesięczny (58- i 40-miesięczny) stabilny przebieg choroby [70]. Podobne badanie dotyczyło 14 osób chorych na raka trzustki po pankreatektomii. Podanie szczepionki w dużej dawce (10^8 komórek) nasiliło w sposób istotny odpowiedź immunologiczną pod postacią nadwrażliwości typu opóźnionego na antygeny nowotworu oraz spowodowało wydłużenie czasu bezobjawowego powyżej 25 miesięcy u 3 pacjentów [41]. W obu powyższych badaniach dowiedziono bezpieczeństwa tej formy terapii. Obecnie trwają badania kliniczne II fazy (NCT00399529 [35], NCT00971737 [36]), w których ocenie poddana będzie skuteczność łącznej terapii pacjentów z rakiem sutka w stadium IV mającym receptory HER2/neu z wykorzystaniem cyklofosfamid i allogenicznego szczepionki wydzielającej GM-CSF oraz efektywność tego leczenia wraz z przeciwciałem trastuzumab.

W celu oceny skuteczności szczepienia autologicznymi komórkami wydzielającymi GM-CSF we wzmacnianiu tak zwanej reakcji przeszczep przeciwko białaczce (GVL) po alogenicznym niemieloablacyjnym przeszczepie szpiku u pacjentów z ostrą białaczką limfatyczną (AML) lub zespołem mielodysplastycznym (MDS), przeprowadzono badanie I fazy, w którym u 9/10 leczonych pacjentów uzyskano trwałe kompletne remisje (mediana ich trwania wyniosła 26 miesięcy) nie obserwując nasilenia ostrej i przewlekłej reakcji GVH [31].

GM-CSF w iniekcjach stosowano także jako adiuwant w badaniach nad terapią szczepionkową szpiczaka mnogiego [60] oraz jako dodatek do leczenia autologicznymi immunoglobulinami w zakończonych sukcesem próbach eliminacji minimalnej choroby resztkowej u pacjentów z chłoniakiem grudkowym [6].

MECHANIZMY DZIAŁANIA SZCZEPIONEK PRZECIWNOWOTWOROWYCH WYDZIELAJĄCYCH GM-CSF

Podanie zwierzętom doguzowo samego GM-CSF samo w sobie powodowało ograniczenie wzrostu guzów, ograniczało liczbę przerzutów, obniżenie ilości tlenu w guzie, wzrost liczby makrofagów w nacieku – ze zmianą ich fenotypu z M2 na M1, nasilenie nekrozy oraz wzrost produkcji VEGF-R1 w mysim modelu raka sutka [20]. Idea szczepionek przeciwnowotworowych wydzielających GM-CSF opiera się na założeniu, że antygeny dostarczone w postaci komórek guza będą wydajniej prezentowane przez komórki prezentujące, a odpowiedź przeciw nim będzie silniejsza w

TABELA 4. Charakterystyczne cechy komórek dendrytycznych stymulowanych GM-CSF [13, 53]
 TABLE 4. Characteristics of dendritic cells stimulated with GM-CSF [13, 53]

Cecha komórek prezentujących antygen stymulowanych GM-CSF	Skutek
Fenotyp CD11b ⁺ , CD8α ⁻ Duża ekspresja CD80 (B7.1) Duża ekspresja CD1d	Wydajniejsza fagocytoza Wysoka dojrzałość Możliwość stymulacji komórek NKT

obecności cytokiny w mikrośrodku reakcji. Podstawowym mechanizmem, jakim GM-CSF wzmacnia skuteczność szczepionek złożonych z komórek nowotworowych jest rekrutacja i aktywacja komórek dendrytycznych, prowadząca do zwiększenia wydajności prezentacji antygenów nowotworowych [13, 2, 38]. Udowodniono, że podawanie szczepionki powoduje akumulację komórek dendrytycznych w tkankach okołoguzowych, co może sprzyjać bardziej efektywnej prezentacji antygenów nowotworowych dziewiczym limfocytom T [58]. Dodatkowo w środowisku guza stwierdza się zwiększoną liczbę limfocytów T i B, granulocytów obojętnochłonnych, zasadochłonnych i makrofagów zarówno w modelach zwierzęcych [53], jak i w guzach wyciętych od pacjentów [14], których ocena histopatologiczna wykazywała zwykle także obrzęk, zwłóknienie i cechy zaawansowanej destrukcji.

Komórki prezentujące antygen stymulowane przez GM-CSF mają pewne cechy korzystniejsze z punktu widzenia odpowiedzi przeciwnowotworowej w porównaniu z podobnymi komórkami stymulowanymi innymi cząsteczkami, np. Flt-3L, co przedstawiono w tabeli 4.

Odpowiedź gospodarza po podaniu szczepionki przejawia się głównie w rekrutacji specyficznych w stosunku do komórek guza limfocytów T CD8⁺, T CD4⁺, komórek NKT rozpoznających antygeny w kontekście CD1d oraz wzrost syntezy przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom guza [72, 14]. Jednak skuteczna odpowiedź przeciwnowotworowa nie zależy tylko od cytotoksyczności komórkowej, ale także od odpowiedzi humoralnej. Okazuje się, że działanie GM-CSF obejmuje zwiększenie u badanych zwierząt liczby limfocytów pomocniczych zarówno populacji Th1, jak i Th2 [58].

Wyniki badań nie dowodzą w sposób jednoznaczny, jakie komórki układu odpornościowego są niezbędne do skutecznego działania szczepionek przeciwnowotworowych wydzielających GM-CSF. Większość autorów sądzi, że do wywołania odpowiedzi konieczny jest udział limfocytów T CD8⁺, gdyż nie wykazano skuteczności szczepionek u zwierząt pozbawionych tej populacji komórek [11, 50, 16].

POTENCJALNE PRZYCZYNY OGRANICZONEJ SKUTECZNOŚCI TERAPII

Wysoka skuteczność GM-CSF w badaniach *in vitro* oraz w próbach przedklinicznych nie ma dotąd bezpośredniego przełożenia na wyniki badań na pacjentach, w których efekt terapeutyczny jest słabszy od oczekiwanego, a czasem terapia szczepionkowa negatywnie wpływa na przeżycie. Skłania to do poszukiwań przyczyny takiego stanu rzeczy wśród immunologicznych mechanizmów supresorowych.

W modelach mysich i u pacjentów z zaawansowanym czerniakiem podanie GM-CSF może spowodować rekrutację niedojrzałych szpikowych komórek supresorowych o fenotypie $CD11b^{+}Gr-1^{+}$ w środowisku guza i we krwi obwodowej, skutkującą dysfunkcją aktywności przeciwnowotworowej limfocytów T [22]. Analizując wyniki badań na myszach pozbawionych genu dla GM-CSF odkryto, że cytokina ta sprzyja powstawaniu tolerancji na autoantygeny, prawdopodobne więc jest jej działanie hamujące limfocyty T. Komórki dendrytyczne tych zwierząt wydzielają bardzo mało MFG-E8 (*milk fat globule epidermal growth factor protein-8*). Białko to stanowi istotny element szlaku fagocytozy komórek apoptotycznych [44]. Autorzy wnioskują, że GM-CSF powoduje wzrost wytwarzania MFG-E8, które ukierunkowuje komórki dendrytyczne na promocję różnicowania komórek $CD4^{+}$ w limfocyty regulatorowe $Foxp3^{+}$ oraz restrikcję populacji Th1 i Th17 [43]. Działanie prokancerogenne zwiększonych stężeń MFG-E8 może także zależeć od nasilonej angiogenezy VEGF-zależnej [42, 56]. Także CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*), jako centralna cząsteczka kostymulująca hamująca odpowiedź przeciwnowotworową efektorowych limfocytów T jest podejrzewana o limitowanie skuteczności szczepień. Jej połączenie z ligandem znajdującym się na powierzchni komórki dendrytycznej ogranicza podziały limfocytu oraz zmniejsza syntezę cytokin [44].

U części pacjentów, którzy dobrze odpowiadali na terapię szczepionką wydzielającą GM-CSF, stwierdzono wyższy poziom przeciwciał anty-MICA (*MHC class I-related protein A*). Przeciwciała te wiążą rozpuszczalną formę cząsteczki MICA (sMICA), której negatywna rola w ograniczaniu odpowiedzi przeciwnowotworowej polega na ograniczaniu ekspresji cząsteczki powierzchniowej NKG2D na powierzchni limfocytów T i komórek NK. Cząsteczka ta w normalnych warunkach sprzyja ich funkcji cytotoksycznej [44]. Uznaje się, że immunosupresja wywoływana przez sMICA wywołuje oporność części pacjentów na terapię szczepionkową.

METODY WZMACNIANIA SKUTECZNOŚCI PRZECIWNOWOTWOROWEJ SZCZEPIONEK WYDZIELAJĄCYCH GM-CSF

Wstępne wyniki doświadczeń badających możliwości wzmocnienia działania przeciwnowotworowego szczepionek wydzielających GM-CSF są zachęcające. Przykładowo, w modelu mysiego czerniaka dodanie do komórek szczepionkowych przeciwciał anty-CTLA-4 skutkowało 80% efektem terapeutycznym. 100% wyleczonych myszy uzyskało odporność na powtórna inokulację nowotworu [18]. Ludzkie przeciwciała anty-CTLA-4 (ipilimumab) jako dodatek do terapii przerzutowego raka prostaty z użyciem podskórnych iniekcji GM-CSF spowodowały wzrost stężenia przeciwciał przeciw antygenom nowotworu oraz liczby aktywowanych limfocytów T $CD25^{+}$, $CD69^{+}$, $CD8^{+}$ w porównaniu z terapią samą szczepionką [24].

Zastosowanie w układzie profilaktycznym i terapeutycznym szczepionki złożonej z komórek mysiego raka płuc Lewisa (LLC) modyfikowanych genami dla GM-CSF

oraz FasL wykazało efekt synergistyczny w indukcji skutecznej odpowiedzi przeciwnowotworowej [30]. Blokada białka MFG-E8, którego ekspresja w naturalny sposób ulega zmniejszeniu pod wpływem stresu, agonistów TLR lub obecności komórek nekrotycznych może okazać się skuteczna, co potwierdzają udane próby na myszach mających zmodyfikowane MFG-E8 [44].

Sposoby wzmocnienia efektywności szczepionek, które były testowane, zestawiono w tabeli 5.

TABELA 5. Zestawienie testowanych metod wzmocnienia skuteczności przeciwnowotworowej szczepionek wydzielających GM-CSF

TABLE 5. Methods of enhancement of antitumor efficacy of GM-CSF-secreting vaccines

Cel terapii	Stosowany czynnik/metoda	Piśmien- nictwo
Limfocyty CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	Przeciwciała anti-CD25 Cyklofosfamid	69
MFG-E8	Przeciwciała anti-MFG-E8 (?)	37
CTLA-4	Przeciwciała anti-CTLA-4	73, 24, 37
Modyfikacja mikrośrodowiska guza	IL-12 IL-6	9 48
Migracja limfocytów T i komórek dendrytycznych	TARC RANTES	39
Kostymulacja	Komórki transfekowane genem dla CD80 Komórki transfekowane genem dla CD40L	54 10
Apoptoza komórek nowotworowych	Wprowadzenie genu dla FasL do komórek szczepionkowych	20
Nasilenie działania cytotoksycznego	Lewamizol, doksorubicyna	57

PODSUMOWANIE

Okazuje się, że obiecujące rezultaty doświadczeń przedklinicznych nie przekładają się na satysfakcjonującą skuteczność opisywanej terapii w badaniach klinicznych. Konieczne wydaje się dokładniejsze poznanie mechanizmów działania szczepionki i opracowanie sposobów zwiększenia jej efektywności podczas stosowania u pacjentów.

Choć nie opublikowano jeszcze wyników badań klinicznych II i III fazy w leczeniu czerniaka, nieskuteczność GM-CSF stosowanego jako adiuwant w immunoterapii tego nowotworu skłania do ostrożnej oceny wyników tych prób [72]. Wyniki niedawno zakończonych badań klinicznych III fazy z wykorzystaniem szczepionek wydzielających IL-2 w terapii czerniaka, zakończone przedwcześnie z powodu wyraźnie mniejszej skuteczności terapii alternatywnej w stosunku do standardowego leczenia dakarbazyną sugerują daleko idącą ostrożność podczas projektowania kolejnych badań z użyciem szczepionek [62].

Wydaje się jednak, że idea szczepionek przeciwnowotworowych może budzić nadzieje na przyszłość. Do tej pory do użycia w klinice w niektórych krajach zaaprobowano już kilka preparatów, m.in. Oncophage w raku nerki, OncoVAX w

terapii raka jelita grubego, DCVax-Brain w terapii glejaków oraz niedawno – Provenge w raku prostaty. W opracowaniu tej ostatniej wykorzystano GM-CSF jako adiuwant. Provenge zawiera komórki dendrytyczne poddane inkubacji z rekombinowanym białkiem składającym się z kwaśnej fosfatazy i GM-CSF.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ABE J, WAKIMOTO H, YOSHIDA Y et al. Antitumor effect induced by granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor gene-modified tumor vaccination: comparison of adenovirus- and retrovirus-mediated genetic transduction. *J Cancer Res Clin Oncol* 1995; **12**: 587–592.
- [2] BANCHEREAU J, BRIERE F, CAUX C et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; **18**: 767–811.
- [3] BASAK GW, ZAPALA L, WYSOCKI PJ et al. Interleukin 15 augments antitumor activity of cytokine gene-modified melanoma cell vaccines in a murine model. *Oncol Rep* 2008; **19**: 1173–1179.
- [4] BASKAR S, OSTRAND-ROSENBERG S, NABAVI N et al: Constitutive expression of B7 restores immunogenicity of tumor cells expressing truncated MHC class II molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 5687–5690.
- [5] BAUSERO MA, PANOSKALTSIS-MORTARIA A, BLAZAR BR, KATSANIS E. Effective immunization against neuroblastoma using double-transduced tumor cells secreting GM-CSF and interferon-gamma. *J Immunother Immunol* 1996; **19**: 113–124.
- [6] BENDANDI M, GÖCKE CD, KOBRIN CB. Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor against lymphoma. *Nature Med* 1999; **10**: 1171–1177.
- [7] BONNEKOH B, GREENHALGH DA, CHEN SH et al. *Ex vivo* and *in vivo* adenovirus-mediated gene therapy strategies induce a systemic anti-tumor immune defence in the B16 melanoma model. *J Invest Dermatol* 1998; **110**: 867–871.
- [8] BURNETT FM. Cancer – a biological approach. *BMJ* 1957; **1**: 841–847.
- [9] CHANG C-J, CHEN Y-H et al. Combined GM-CSF and IL-12 gene therapy synergistically suppresses the growth of orthotopic liver tumors. *Hepatology* 2007; **45**: 746–754.
- [10] DESSUREAULT S, NOYES D, LEE D et al. A phase-I trial using a universal GM-CSF-producing and CD40L-expressing bystander cell line in the formulation of autologous tumor cell-based vaccines for cancer patients with stage IV disease. *Ann Surg Oncol* 2007; **14**: 869–884.
- [11] DRANOFF G, JAFFEE E, LAZENBY A, et al. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 3539–3543.
- [12] DRANOFF G, MULLIGAN RC. Gene transfer as cancer therapy. *Adv Immunol* 1995; **58**: 417–454.
- [13] DRANOFF G. GM-CSF-based cancer vaccines. *Immunol Rev* 2002; **188**: 147–154.
- [14] DRANOFF G. GM-CSF-secreting melanoma vaccines. *Oncogene* 2003; **22**: 3188–3192.
- [15] DUNN GP, OLD LJ, SCHREIBER RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoeediting. *Immunity* 2004; **21**: 137–148.
- [16] DUNUSSI-JOANNOPOULOS K, DRANOFF G, WEINSTEIN H J et al. Gene immunotherapy in murine acute myeloid leukemia: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor tumor cell vaccines elicit more potent antitumor immunity compared with B7 family and other cytokine vaccines. *Blood* 1998; **91**: 222–230.
- [17] EDELSTEIN ML, ABEDI MR, WIXON J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007 – an update. *J Gene Med* 2007; **9**: 833–842.
- [18] EGGERMONT MM. Immunostimulation versus immunosuppression after multiple vaccinations: the woes of therapeutic vaccine development. *Clin Cancer Res* 2009; **15**: 6745–6748.
- [19] EGGERMONT MM. Therapeutic vaccines in solid tumors: Can they be harmful? *Eur J Cancer* 2009; **45**: 2087–2090.
- [20] EUBANK TD, ROBERTS RD, KHAN M et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inhibits breast cancer growth and metastasis by invoking an anti-angiogenic program in tumor-educated macrophages. *Cancer Res* 2009; **69**: 2133–2140.

- [21] FARIES MB, HSUEH EC, YE X et al. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on vaccination with allogeneic whole-cell melanoma vaccine. *Clin Cancer Res* 2009; **15**: 7029–7035.
- [22] FILIPAZZI P, VALENTI R, HUBER V et al. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-based antitumor vaccine. *J Clin Oncol* 2007; **25**: 2546–2553.
- [23] FLOTTE TR. Gene therapy: the first two decades and the current state-of-the-art. *J Cell Physiol* 2007, **213**: 301–305.
- [24] FONG L, KWEK SS, O'BRIEN S. Potentiating endogenous antitumor immunity to prostate cancer through combination immunotherapy with CTLA-4 blockade and GM-CSF. *Cancer Res* 2009; **69**: 609–615.
- [25] FORNI G, GIOVARELLI M, SANTORINI A. Lymphokine activated tumor inhibition *in vivo*. The local administration of interleukin-2 triggers nonreactive lymphocytes from tumor bearing mice to inhibit tumor growth *in vivo*. *J Immunol* 1985; **134**: 1305–1312.
- [26] HELLER L, POTTINGER C, JAROSZESKI MJ et al. *In vivo* electroporation of plasmids encoding GM-CSF or interleukin-2 into existing B16 melanomas combined with electrochemotherapy induces long-term antitumor immunity. *Melanoma Res* 2000; **10**: 577–583.
- [27] HERNÁNDEZ A, ZÖLLER K, ENCZMANN J et al. Differential transfection efficiency rates of the GM-CSF gene into human renal cell carcinoma lines by lipofection. *Cancer Gene Ther* 1997; **4**: 59–65.
- [28] HERRERO MJ, BOTELLAR R, DASÍ F et al. Antigens and cytokine genes in antitumor vaccines: the importance of the temporal delivery sequence in antitumor signals. *Ann NY Acad Sci* 2006; **1091**: 412–424.
- [29] HIGANO C, SAAD F, SOMER B et al. A phase III trial of GVAX immunotherapy for prostate cancer versus docetaxel plus prednisone in asymptomatic, castration-resistant prostate cancer (CRPC). Proceedings of the 2009 Genitourinary Cancer Symposium (Abstract No. LBA-150); American Society of Clinical Oncology (ASCO), Orlando, FL, USA. 26–28 Feb, 2009.
- [30] HO MY, SUN GH, LEU SJ et al. Combination of FasL and GM-CSF confers synergistic antitumor immunity in an *in vivo* model of the murine Lewis lung carcinoma. *Int J Cancer* 2008; **123**: 123–133.
- [31] HO VT, VANNEMAN M, KIM H et al. Biologic activity of irradiated, autologous, GM-CSF-secreting leukemia cell vaccines early after allogeneic stem cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 15825–15830.
- [32] HOANG-LE D, SMEENK L, ANRAKU I et al. A Kunjin replicon vector encoding granulocyte macrophage colony-stimulating factor for intra-tumoral gene therapy. *Gene Ther* 2009; **16**: 190–199.
- [33] <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00074295>.
- [34] <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00089726>.
- [35] <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00399529>.
- [36] <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00971737>.
- [37] HURWITZ AA, YU TF, LEACH DR, ALLISON JP. CTLA-4 blockade synergizes with tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of an experimental mammary carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 10067–10071.
- [38] INABA K, INABA M, ROMANIN, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1992; **176**: 1693–1702.
- [39] INOUE H, IGAM, XIN M et al. TARC and RANTES enhance antitumor immunity induced by the GM-CSF-transduced tumor vaccine in a mouse tumor model. *Cancer Immunol Immunother* 2008; **57**: 1399–1411.
- [40] JAFFEE E, THOMAS M, HUANG A et al. Enhanced immune priming with spatial distribution of paracrine cytokine vaccines. *J Immunother* 1996; **19**: 176–183.
- [41] JAFFEE EM, HRUBAN RH, BIEDRZYCKI B. Novel allogeneic granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor vaccine for pancreatic cancer: a phase I trial of safety and immune activation. *J Clin Oncol* 2001; **19**: 145–156.
- [42] JINUSHI M, HODI FS, DRANOFF G. Enhancing the clinical activity of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor cell vaccines. *Immunol Rev* 2008; **222**: 287–298.
- [43] JINUSHI M, NAKAZAKI Y, CARRASCO DR et al. Milk fat globule EGF-8 promotes melanoma progression through coordinated Akt and twist signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Res* 2008; **68**: 8889–8898.
- [44] JINUSHI M, NAKAZAKI Y, DOUGAN M et al. MFG-E8-mediated uptake of apoptotic cells by APCs links the pro- and antiinflammatory activities of GM-CSF. *J Clin Invest* 2007; **117**: 1902–1913.
- [45] JUNE C H, BLAZAR B R, RILEY J L. Engineering lymphocyte subsets: tools, trials and tribulations. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**: 704–716.

- [46] KAKIMI K, NAKAJIMA J, WADA H. Active immunotherapy and cell-transfer therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2009; **65**: 1–8.
- [47] KAUFMAN HL, KIM DW, DERAFFELE G et al. Local and distant immunity induced by intralesional vaccination with an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF in patients with stage IIIc and IV melanoma. *Ann Surg Oncol* 2010; **17**: 718–730.
- [48] KINOSHITA Y, KONO T, YASUMOTO R et al. Antitumor effect on murine renal cell carcinoma by autologous tumor vaccines genetically modified with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 cells. *J Immunother* 2001; **24**: 205–211.
- [49] LACELLE MG, JANSEN SM, FOX BA. Partial CD4 depletion reduces regulatory T cells induced by multiple vaccinations and restores therapeutic efficacy. *Clin Cancer Res* 2009; **15**: 6881–6890.
- [50] LEVITSKY H, MONTGOMERY J, AHMADZADEH M. Immunization with GM-CSF-transduced, but not B7-1 transduced lymphoma cells primes idiotype specific T cells and generated potent systemic anti-tumor immunity. *J Immunol* 1996; **156**: 3858–3865.
- [51] LUITEN RM, KUETER EW, MOOI W et al. Immunogenicity, including vitiligo, and feasibility of vaccination with autologous GM-CSF-transduced tumor cells in metastatic melanoma patients. *J Clin Oncol* 2005; **35**: 8978–8991.
- [52] LUZNIK L, SLANSKY JE, JALLA S. Successful therapy of metastatic cancer using tumor vaccines in mixed allogeneic bone marrow chimeras. *Blood* 2003; **101**: 1645–1652.
- [53] MACH N, GILLESSEN S, WILSON SB et al. Differences in dendritic cells stimulated in vivo by tumors engineered to secrete GM-CSF or flt3-ligand. *Cancer Res* 2000; **60**: 3239–3246.
- [54] NAKAZAKI Y, TANI K, LIN ZT et al. Vaccine effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or CD80 gene-transduced murine hematopoietic tumor cells and their cooperative enhancement of antitumor immunity. *Gene Ther* 1998; **5**: 1355–1362.
- [55] NEMUNAITIS J, STERMAN D, JABLONS D et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-modified autologous tumor vaccines in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004; **96**: 326–331.
- [56] NEUTZNER M, LOPEZ T, FENG X et al. MFG-E8/lactadherin promotes tumor growth in an angiogenesis-dependent transgenic mouse model of multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 2007; **67**: 6777–6785.
- [57] NIGAM A, YACAVONE RF, ZAHURAK ML et al. Immunomodulatory properties of antineoplastic drugs administered in conjunction with GM-CSF-secreting cancer cell vaccines. *Int J Oncol* 1998; **12**: 161–170.
- [58] RISSANEN TT, YLA-HERTTUALA S. Current status of cardiovascular gene therapy. *Mol Ther* 2007; **15**: 1233–1247.
- [59] ROSENBERG SA. Shedding light on immunotherapy for cancer. *N Engl J Med* 2004; **350**: 1461–1463.
- [60] ROSENBLATT J, AVIGAN D. Cellular immunotherapy for multiple myeloma. *Best Practice Res Haematol* 2008; **21**: 559–577.
- [61] SALGIA R, LYNCH T, SKARIN A et al. Vaccination with irradiated autologous tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments antitumor immunity in some patients with metastatic non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2003; **21**: 624–630.
- [62] SERAFINI P, CARBLEY R, NOONAN KA et al. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res* 2004; **64**: 6337–6343.
- [63] SIMONS J, MIKHAK B, CHANG J-F et al. Induction of immunity to prostate cancer antigens: results of a clinical trial of vaccination with autologous prostate tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using *ex vivo* gene transfer. *Cancer Res* 1999; **59**: 5160–5168.
- [64] SIMONS JW, MIKHAK B. *Ex vivo* gene therapy using cytokine-transduced tumor vaccines: molecular and clinical pharmacology. *Sem Oncol* 1998; **25**: 661–676.
- [65] SINGULF CL. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on circulating CD8⁺ and CD4⁺ T-cell response to a multi-peptide melanoma vaccine – outcome of multicentre randomized trial. *Clin Cancer Res* 2009; **15**: 7036–7044.
- [66] SMALL E, DEMKOW T, GERRITSEN WR et al. A phase III trial of GVAX immunotherapy for prostate cancer in combination with docetaxel versus docetaxel plus prednisone in symptomatic, castration-resistant prostate cancer (CRPC). Proceedings of the 2009 Genitourinary Cancer Symposium (Abstract No. 4); American Society of Clinical Oncology (ASCO), Orlando, FL, USA. 26–28 Feb, 2009.

- [67] SMALL EJ, SACKS N, NEMUNAITIS J et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-secreting allogeneic cellular immunotherapy for hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 3883–3891.
- [68] SOIFFER R, HODI FS, HALUSKA F et al. Vaccination with irradiated, autologous melanoma cells engineered to secrete GM-CSF by adenoviral-mediated gene transfer augments antitumor immunity in patient with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2003; **21**: 3343–3350.
- [69] SUTMULLER RP, VAN DUIVENVOORDE LM, VAN ELSAS A et al. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 2001; **194**: 823–832.
- [70] TANI K, AZUMA M, NAKAZAKI Y et al. Phase I study of autologous tumor vaccines transduced with the GM-CSF gene in four patients with stage IV renal cell cancer in Japan: clinical and immunological findings. *Mol Ther* 2004; **10**: 799–816.
- [71] THOMAS M, GRETEN T, PARDOLL D, JAFFEE E. Enhanced tumor protection by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression at the site of an allogeneic vaccine. *Hum Gene Ther* 1998; **9**: 835–843.
- [72] VAN ELSAS A, HURWITZ A, ALLISON JP. Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-CTLA-4 and GM-CSF-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J Exp Med* 1999; **190**: 355–366.
- [73] WAKIMOTO H, ABE J, TSUNODA R et al. Intensified antitumor immunity by a cancer vaccine that produces granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4. *Cancer Res* 1996; **56**: 1828–1833.
- [74] YOSHIDA H, ENOMOTO H, KAWAMURA K et al. Antitumor vaccine effect of irradiated murine neuroblastoma cells producing interleukin-2 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Int J Oncol* 1998; **13**: 73–78.

Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz

Otrzymano: 11.06. 2010 r.

Przyjęto: 22.07. 2010 r.

Prof. Witold Lasek

Zakład Immunologii Centrum Biostruktury, Warszawski Uniwersytet Medyczny

ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa

E-mail: witold.lasek@wum.edu.pl