

Received: 2006.04.18
Accepted: 2006.06.21
Published: 2006.07.24

Doświadczalne oraz wybrane kliniczne aspekty czynnej immunoterapii w białaczkach*

Experimental and selected clinical aspects of active immunotherapy in leukemia

Włodzimierz Łuczyński¹, Maryna Krawczuk-Rybak¹, Anna Stasiak-Barmuta²

¹ Klinika Onkologii Dziecięcej Samodzielnego Publicznego Dziecięcego Szpitala Klinicznego, Akademii Medycznej w Białymstoku

² Pracownia Cytometrii Przepływowej Samodzielnego Publicznego Dziecięcego Szpitala Klinicznego, Akademii Medycznej w Białymstoku

Streszczenie

Celem pracy jest podsumowanie aktualnej wiedzy dotyczącej zastosowania aktywnej immunoterapii w białaczkach. Przedstawiono mechanizmy molekularne oraz implikacje kliniczne różnego rodzaju szczepionek stosowanych w białaczkach u dzieci i dorosłych. Brak eliminacji komórek nowotworowych przez organizm człowieka może wynikać z mechanizmów immunologicznych, w tym wytwarzania przez komórki białaczkowe substancji upośledzających funkcję układu odpornościowego oraz słabej ekspresji cząstek kostymulujących i adhezyjnych na powierzchni błastów. Komórki ostrej białaczki limfoblastycznej oraz przewlekłej białaczki limfocytowej mogą być przekształcone w komórki prezentujące antygeny nowotworowe za pomocą stymulacji substancją CD40L, w ten sposób nabierają cech fenotypowych i funkcjonalnych komórek dendrytycznych. W wielu badaniach udowodniono, że stymulują one odpowiedź auto- lub allogeniczną limfocytów T. Reakcja układu odpornościowego na szczepionkę przeciwnowotworową może dotyczyć odporności komórkowej i humoralnej, a jej rodzaj jest intensywnie badany. Podobne efekty, ale z użyciem cytokin: GM-CSF, TNF- α oraz IL-4 uzyskano w ostrej białaczce szpikowej i zespołach mielodysplastycznych. Doświadczenia kliniczne z zastosowaniem przygotowanych w ten sposób szczepionek są niewielkie, jednak niektóre wstępne raporty przynoszą obiecujące rezultaty. Szczepionki są bezpieczne, wywołują odpowiedź gospodarza i prawdopodobnie wydłużają przeżycie pacjentów.

Słowa kluczowe:

ostra białaczka limfoblastyczna • przewlekła białaczka limfocytowa • szczepionka • immunoterapia • CD40L

Summary

The aim of the review is to summarize current knowledge concerning active immunotherapy in leukemia. The molecular mechanisms and selected clinical implications of different cancer vaccines used in pediatric and adult leukemias are discussed. Escape of neoplastic cells from elimination by host cells can be caused by immunological disturbances, such as the production of immunosuppressive cytokines and downregulation of costimulatory and adhesion molecules. Cells of acute lymphoblastic leukemia and chronic lymphocytic leukemia can be induced into antigen-presenting cells with the CD40 ligation system. After CD40 stimulation, leukemic cells achieve the phenotypic and functional characteristics of dendritic cells. In many studies it was

* Praca sponsorowana przez grant KBN nr 2P05A 166 29.

confirmed that these cells stimulate auto- and/or allogeneic T-cell response. Immunological response can be of cellular and humoral origin and is extensively examined. Similar effects using different cytokines such as GM-CSF, TNF- α , and IL-4 can be observed in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. Clinical experience with such vaccines is limited, but the results of some preliminary reports are quite promising. Cancer vaccines are safe, result in host response, and probably prolong patients survival.

Key words: acute lymphoblastic leukemia • chronic lymphocytic leukemia • vaccine • immunotherapy • CD40L

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/9493.pdf

Word count: 3815

Tables: –

Figures: –

References: 51

Adres autora: dr n. med. Włodzimierz Łuczynski, Klinika Onkologii Dziecięcej, ul. Waszyngtona 17, 15-274 Białystok, e-mail: w.luczynski@wp.pl

Wykaz skrótów: **ALL** – ostra białaczka limfoblastyczna; **AML** – ostra białaczka szpikowa; **APC** – komórki prezentujące antygen; **B-CLL** – przewlekła białaczka limfocytowa z komórek B; **CLL** – przewlekła białaczka limfocytowa; **CML** – przewlekła białaczka szpikowa; **DC** – komórki dendrytyczne; **DISC** – kompleks indukujący śmierć komórki; **FISH** – hybrydyzacja *in situ*; **GM-CSF** – czynnik wzrostu kolonii granulocytarno-makrofaagowych; **HLA** – antygeny zgodności tkankowej; **ICAM** – międzykomórkowa cząstka adhezyjna; **IFN** – interferon; **IL** – interleukina; **LPS** – lipopolisacharydy; **PMA** – mitogen szkarłatki; **TGF** – transformujący czynnik wzrostowy; **TNF** – czynnik martwicy nowotworów.

WSTĘP

W niektórych rodzajach białaczek, szczególnie u dzieci, w tym najczęstszej w wieku rozwojowym ALL, uzyskuje się długotrwałe remisje w 80% przypadków z użyciem standardowej chemioterapii. Jednak część pacjentów cierpi z powodu nawrotu choroby. W innych rodzajach białaczek, np. B-CLL u dorosłych (w stadiach zaawansowanych) nie jest możliwe całkowite wyleczenie. Z tego powodu potrzebne są nowe metody terapii. Intensywnie prowadzone badania dotyczą geno- i immunoterapii. Docelowo mają one mieć zastosowanie nie tylko w grupach pacjentów, którzy byli już leczeni standardową chemio- i radioterapią, ale również w leczeniu chorych w przypadku pierwszego zachorowania. Podobnie było z przeciwciałami monoklonalnymi, które początkowo były stosowane jako terapia II czy III rzutu, obecnie część z nich jest podawana jednocześnie z chemioterapią zaraz po rozpoznaniu choroby nowotworowej.

Od dawna wiadomo, że odpowiedź przeciwnowotworowa istnieje u każdego pacjenta z białaczką, jednak komórki białaczkowe unikają tej odpowiedzi m.in. dzięki słabej prezentacji antygenów zgodności tkankowej, cząsteczek kostymulujących oraz wydzielaniu substancji osłabiających układ odpornościowy pacjenta. Od pewnego czasu próbuje się stymulować system immunologiczny człowieka w celu eradykacji nowotworu. Metody stosowane w tym celu są zarówno swoiste jak i nieswoiste [37]. Dowodem na istnienie silnej odpowiedzi przeciwnowotworowej są dobre wyniki leczenia CML za pomocą infuzji limfocytów T dawcy. Z kolei w AML wysoki odsetek pacjentów uzyskuje pierw-

szą remisję, ale też wielu z nich cierpi z powodu wznowy choroby. Koncepcja szczepienia czy innej stymulacji układu odpornościowego po uzyskaniu remisji hematologicznej w tej chorobie wydaje się bardzo atrakcyjna. Ideą immunoterapii w białaczkach nie jest niszczenie dużej masy guza tylko eradykacja choroby resztkowej [37].

Doświadczenia wielu autorów oraz nasze dotychczasowe badania potwierdzają, że główne przyczyny braku odpowiedzi przeciwnowotworowej oraz upośledzenia funkcji układu odpornościowego w białaczkach to:

- niska ekspresja cząsteczek kostymulujących na blastach białaczkowych (w tym CD1a, CD80, CD83, CD86),
- wytwarzanie cytokin immunosupresyjnych przez komórki nowotworowe (w tym TGF- β oraz IL-10),
- przewaga subpopulacji limfocytów Th₂ oraz Th₃/Tr₁ [18,26,27,29].

Mimo iż komórki białaczkowe mają na swojej powierzchni antygeny zgodności tkankowej I i II klasy, do pełnej aktywacji limfocytów T i odpowiedzi przeciwnowotworowej potrzebny jest tzw. drugi sygnał kostymulujący, w tym ekspresja cząsteczek rodziny B7 (CD80, CD86). W większości badań odsetek komórek białaczkowych z ekspresją ww. cząstek jest niewielki lub bliski zeru. Zwiększenie immunogenności komórek nowotworowych stanowi zatem jedno z podstawowych wyzwań immunoterapii w onkologii.

Potencjalne szczepionki przeciwnowotworowe muszą spełniać trzy zasadnicze warunki, tj. prowadzić do:

- 1) identyfikacji/prezentacji antygenów związanych z nowotworem,



- 2) aktywacji swoistych limfocytów T,
- 3) pokonania tolerancji antygenów nowotworu w organizmie gospodarza [19].

Jedną z koncepcji immunoterapii w nowotworach jest użycie komórek dendrytycznych. Komórki dendrytyczne to komórki prezentujące antygeny i prowadzące do inicjacji odpowiedzi immunologicznej limfocytów T. Są one jednym z ważniejszych elementów odpowiedzi przeciwnowotworowej. W warunkach laboratoryjnych komórki dendrytyczne są uzyskiwane najczęściej z komórek pnia (CD34⁺) ze szpiku, krwi pępowinowej lub krwi obwodowej. Komórki dendrytyczne uzyskane z komórek nowotworowych powinny przynajmniej teoretycznie łączyć funkcję komórek prezentujących antygeny oraz ekspresję antygenów nowotworowych. Mogą więc być idealnymi kandydatami do szczepionek przeciwnowotworowych. Dane laboratoryjne wskazują na możliwość przekształcenia komórek nowotworowych w komórki prezentujące antygeny, jednak funkcja powstałych w ten sposób komórek nie jest do końca poznana [10]. Poza tym możliwość uzyskania komórek dendrytycznych z komórek nowotworowych na razie dotyczy tylko białaczek szpikowych i limfoblastycznych [24]. Immunoterapia z użyciem komórek dendrytycznych w ostrych białaczkach ma zdecydowaną przewagę nad innymi metodami ponieważ komórki nowotworowe mogą zachowywać się jak komórki prezentujące antygeny. Komórki dendrytyczne uzyskane z komórek AML stymulują nie tylko allogeniczną, ale również autologiczną odpowiedź limfocytów T. Limfocyty te wykazują swoistą cytotoksyczność przeciwko komórkom białaczkowym [37].

CD40 to cząsteczka z rodziny receptorów TNF, która ulega ekspresji na limfocytach B i odgrywa rolę w ich przeżyciu i różnicowaniu [50]. Natomiast drugi element systemu – ligand CD40 (CD40L) ulega ekspresji na aktywowanych leukocytach w tym limfocytach T (zarówno CD4 jak i CD8), komórkach tucznych, eozynofilach, komórkach NK [9]. Stymulacja CD40/CD40L prowadzi do proliferacji, różnicowania, wzrostu ekspresji cząsteczek kostymulujących, wzrostu wytwarzania cytokin (IL-1, -6, -12, TNF- α) oraz prezentacji antygenów przez limfocyty B, komórki dendrytyczne i monocyty [50]. CD40 znajduje się także na powierzchni komórek nowotworowych, w tym hematologicznych (białaczki, chłoniaki) oraz czerniaków, raków nosogardła, jajnika i wątroby [9]. Udowodniono, że aktywacja CD40L zwiększa zdolności prezentacji antygenów nie tylko przez prawidłowe, ale także nowotworowe komórki B. Dokonuje się to przez wzrost ekspresji cząsteczek adhezji międzykomórkowej (ICAM-1), rodziny B7 oraz wytwarzanie chemokin. Jednak wpływ CD40L na dojrzewanie komórek dendrytycznych nie jest do końca wyjaśniony i wymaga dalszych intensywnych badań.

Ponieważ u pacjenta z białaczką komórki nowotworowe w szpiku lub krwi obwodowej mogą być wymieszane z komórkami pnia (CD34⁺) oraz monocytami, zdaniem niektórych autorów należy koniecznie potwierdzić pochodzenie uzyskanych komórek dendrytycznych [7]. W tym celu do hodowli używa się komórek ALL z fuzją genów bcr-abl i następnie ocenia obecność fuzji po hodowli metodą FISH [21]. Mohty i wsp. potwierdzili tą metodą nowotworowe pochodzenie komórek dendrytycznych po hodowli, natomiast w B-CLL takim kryterium była ekspresja antygeny

CD5 (unikalnego dla komórek B-CLL) [35]. Li i wsp. udowodnili, że komórki dendrytyczne wywodzące się z blastów AML wykazują ciągłą ekspresję antygenów związanych z nowotworem, w tym PRAME, RHAMM/CD168, WT-1 i proteiny 3 [24]. Jest to kolejny dowód na to, że komórki te są pochodzenia nowotworowego. Antygeny te mogą stanowić świetny cel do immunoterapii – można np. wprowadzić mRNA kodującą WT1 do profesjonalnych komórek dendrytycznych i podawać je pacjentom, mając nadzieję na uzyskanie swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej [49]. Takim antygenem w przypadku ALL może być *BAX-delta*, gen ten został wyodrębniony po porównaniu ekspresji genów w prawidłowych limfocytach B z komórkami białaczkowymi B-ALL [31].

Komórki dendrytyczne uzyskane z komórek nowotworowych są bardziej efektywne w stymulacji limfocytów T niż niezmiennione blasty białaczkowe. Ich możliwości stymulacyjne są sprawdzane w mieszanej hodowli z limfocytami T. Jednak odpowiedź zależna od limfocytów T wymaga nie tylko ekspresji cząsteczek kostymulujących (rodzina B7), ale także migracji tych komórek do węzłów chłonnych w celu kontaktu z limfocytami T; w tym celu należy ocenić funkcjonalność komórek dendrytycznych – wytwarzanie cytokin i chemokin.

Niektórzy autorzy podnoszą znaczenie nie tylko odpowiedzi przeciwnowotworowej limfocytów T, ale także roli komórek NK. Transplantacja szpiku w przypadku niezgodności receptorów KIR na komórkach NK między dawcą a biorcą daje dobre efekty lecznicze, co może potwierdzać działanie przeciwbiałaczkowe tych komórek [42]. Infuzja autologicznych komórek NK skierowanych przeciwko komórkom AML powodowała zmniejszenie liczby komórek nowotworowych o 8–77%. Badania te były jednak przeprowadzone na modelu zwierzęcym [43]. Ciekawe doświadczenia były prowadzone przez Grubera i wsp. [13]. Wprowadzili oni geny CD40L, CD80 i GM-CSF do komórek białaczkowych pre-B ALL. Komórki białaczkowe z ekspresją tych cząsteczek były odrzucane przez układ odpornościowy myszy, w przeciwieństwie do komórek bez ekspresji tych cząsteczek. Natomiast deplecja limfocytów NK zwierząt prowadziła do utraty obrony przez komórkami nowotworowymi nawet z ekspresją cząsteczek CD40L, CD80 i GM-CSF. Potwierdza to rolę komórek NK w odpowiedzi przeciwnowotworowej.

ASPEKTY DOŚWIADCZALNE

Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) i ostra białaczka szpikowa (AML)

Ostra białaczka limfoblastyczna jest najczęstszym nowotworem u dzieci. Obecnie prawie u 80% pacjentów w wieku rozwojowym udaje się uzyskać trwałą remisję. Tym niemniej u niektórych dzieci następuje wznowa choroby. Z tego powodu potrzebne są nowe metody terapeutyczne, przede wszystkim skuteczne, ale również mniej toksyczne i obciążone mniejszą śmiertelnością niż np. megachemioterapia z następową transplantacją komórek hematopoetycznych. Wstępne dane doświadczalne i kliniczne świadczą o tym, że można użyć komórek białaczkowych jako komórek prezentujących antygeny nowotworowe. Większość komórek nowotworowych ALL nie ma na swojej powierzchni cząsteczek kostymulujących, w tym najważniejszych z rodziny

B7. Komórki ALL pierwotnie (bez stymulacji) najczęściej nie wykazują ekspresji CD1a, CD80, CD83 i CD86, obecna jest natomiast średnia ekspresja CD54 i CD58 i wysoka CD40, HLA I i II klasy [28,35].

Pierwsze dane laboratoryjne dotyczące przekształcenia komórek białaczkowych w komórki dendrytyczne opublikowali Cignetti i wsp. [7]. W hodowli AML z GM-CSF, TNF- α i IL-4 po 3 tygodniach udało się uzyskać fenotyp komórek dendrytycznych (oceniany za pomocą cytometrii przepływowej), natomiast komórki ALL były stymulowane CD40L i IL-4, z podobnym efektem. Nowotworowe pochodzenie komórek dendrytycznych zostało potwierdzone dzięki wykryciu fuzji bcr-abl metodą hybrydyzacji *in situ* (FISH). W badaniach naszych i innych autorów stymulacja za pomocą CD40L prowadziła do wzrostu ekspresji cząsteczek kostymulujących w tym: CD80, CD86, CD40, MHC klasy I i II, CD54 oraz CD58 [10,28]. Komórki dendrytyczne z jednocześnie ekspresją CD80 i CD86 są uważane przez niektórych autorów za w pełni dojrzałe i indukujące proliferację autologicznych i allogenicznych limfocytów T [21]. W naszych badaniach nie wykazaliśmy jednak wzrostu odsetka populacji komórek CD80⁺CD86⁺ po stymulacji CD40L [28]. W badaniach D'Amico i wsp. komórki ALL stymulowane CD40L zawierały fenotyp komórek dendrytycznych i wykazywały wytwarzanie chemokiny CCR7, nie wytwarzały jednak większych ilości prozapalnej IL-12 oraz nie prowadziły do generacji alloreaktywnych limfocytów T o fenotypie Th₁ [10]. Profil Th₁ uzyskano dopiero po dodaniu do hodowli IL-12. Autorzy tego raportu uważają, że prosta stymulacja CD40L nie prowadzi do uzyskania ochronnej, przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej i sugerują użycie dodatkowych sygnałów w szczepionkach przeciwnowotworowych. Natomiast w badaniach innych autorów ALL i CML indukowane CD40L i IL-4 nie tylko nabierały fenotypu dojrzałych komórek dendrytycznych, lecz także stymulowały odpowiedź proliferacyjną naiwnych limfocytów T o profilu Th1, wytwarzających IFN- γ [35,47].

W badaniach dotyczących ludzi zdrowych komórki dendrytyczne zmodyfikowane genetycznie z ekspresją CD40L wytwarzały cytokiny prozapalne w tym IL-12 i IFN- γ oraz – co niezmiernie ważne – były odporne na działanie cytokin immunosupresyjnych wytwarzanych przez komórki nowotworowe w tym IL-10 oraz TGF- β [25]. Być może jest to spowodowane zmniejszoną ekspresją receptorów tych cytokin i może mieć znaczenie w przyszłej immunoterapii nowotworów. W czynności komórek dendrytycznych pełnią rolę cytokiny prozapalne, w tym IL-12 oraz podobna do niej IL-23. Wpływają one na proliferację limfocytów T pamięci oraz wytwarzanie przez nie IFN- γ . D'Amico i wsp. wykazali wzrost ekspresji podjednostki p19 IL-23 w komórkach ALL po stymulacji CD40L [10]. Znaczenie IL-23 w immunoterapii nowotworów pozostaje nieznane.

Niewiele raportów dotyczy wytwarzania chemokin przez komórki nowotworowe. Są to substancje biorące udział w chemotaksji, krążeniu komórek układu odpornościowego do miejsc objętych procesem zapalnym. Mają one znaczenie w odpowiedzi immunologicznej w tym prezentacji antygenów oraz przenikaniu limfocytów T do węzłów chłonnych. W jednym eksperymencie wykazano, że stymulacja CD40L indukuje sekrecję MDC i TARC – chemokin biorących udział w chemotaksji i migracji limfocytów T [12].

Migracja do węzłów chłonnych jest zależna od osi chemokin CCR7/CCL19. Po stymulacji CD40L komórki ALL nie tylko wykazywały wyższą ekspresję chemokiny CCR7, ale również migrowały w odpowiedzi na CCL19 [10]. W badaniach Mohty i wsp. komórki ALL wykazywały podobną ekspresję CCR7 jak dojrzałe komórki dendrytyczne uzyskane z monocytów, w przeciwieństwie do ich niedojrzałych postaci, natomiast CCR5 ulegała zmniejszonej ekspresji w czasie dojrzewania i nie pojawiała się na komórkach nowotworowych przed ani po hodowli [35].

Komórki AML mogą również (podobnie jak komórki innych białaczek) być modyfikowane genetycznie. Można np. wprowadzać do wnętrza blastów białaczkowych geny cytokin prozapalnych albo stymulujących odpowiedź immunologiczną [37]. Dokonuje się transdukcji IL-4, TNF- α i GM-CSF, IL-12 lub genów cząsteczek kostymulujących rodziny B7 [37]. Kolejnym sposobem terapii pacjentów z AML jest izolacja autologicznych limfocytów T cytotoksycznych swoicie przeciwko komórkom AML, ich namnażanie i podawanie pacjentom w remisji. Jeszcze inne podejście do immunoterapii w AML, to szczepionki z nagim DNA kodującym gen fuzyjny *PML-RAR α* [37]. Jest to gen odpowiedzialny za zaburzenia różnicowania komórek linii mieloidalnej i powstanie ostrej białaczki promielocytowej (translokacja t(15;17)). Pierwsze wyniki zastosowania tej postaci szczepionki u myszy potwierdziły dłuższe przeżycie osobników szczepionych.

Z doświadczalnego punktu widzenia niezmiernie ważne są warunki hodowli komórek nowotworowych w czasie stymulacji cytokinami lub metodami inżynierii genetycznej. Autorzy włoscy uważają, iż długotrwała (nawet do 12 dni) hodowla komórek ALL jest możliwa tylko na komórkach podścieliska szpiku (human bone marrow stromal cells – HBMS), inne ośrodki – w tym nasz – nie korzystają z tego medium uzyskując wysoką, długotrwałą żywotność w hodowlach z RPMI i FBS (dane niepublikowane) [9,10]. Komórki dendrytyczne są hodowane z komórek progenitorowych CD34⁺ oraz monocytów (CD14⁺) pod wpływem różnych zestawów cytokin. Monocyty krwi obwodowej różnicują się do niedojrzałych komórek dendrytycznych najczęściej pod wpływem GM-CSF i IL-4. Ich dalsze dojrzewanie można uzyskać za pomocą TNF- α , CD40L lub LPS (zestaw cytokin GM-CSF, IL-4 oraz TNF- α jest uważany za standardowy, "klasyczny"). Natomiast wiele różnych strategii jest wykorzystywanych przez innych badaczy w celu zwiększenia immunogenności komórek nowotworowych. Podejmowane są próby zastosowania różnych kombinacji stymulatorów w celu uzyskania komórek dendrytycznych z blastów zarówno ostrej białaczki limfoblastycznej jak i szpikowej [35]. Wyniki tych badań nie są jednak jednoznaczne. Do przekształcenia komórek białaczkowych ALL w komórki dendrytyczne używa się wielu kombinacji cytokin. Według Lee i wsp. optymalne jest połączenie CD40L z IL-1 β , IL-3, IL-7, TNF- α i SCF [21]. Stymulatory w AML mogą być:

- a) pozakomórkowe (kombinacje cytokin: GM-CSF, IL-4, TNF- α), indukcja CD40L, IFN- α ,
- b) niezależne od błony komórkowej induktory sygnałów wewnątrzkomórkowych (A 23187, PMA) [19].

Kharfan-Dabaja i wsp. uważają, że użycie sygnału, który omija receptory błonowe, w tym PMA i substancji A23187,



daje największą aktywację limfocytów T. Co ciekawe, aktywacja ta nie korelowała jednak z ekspresją cząsteczek kostymulujących. Jednak różne kombinacje cytokin/sygnali dawały ekspresję różnych cech fenotypowych komórek dendrytycznych, przy czym żadna z nich nie powodowała stymulacji wszystkich cech [19]. W doświadczeniach Cignetti i wsp. zanotowano dalsze dojrzewanie komórek dendrytycznych uzyskanych z komórek AML po dodaniu CD40L do "klasycznego" zestawu cytokin, tj. GM-CSG, IL-4 i TNF- α [8]. W ten sposób otrzymane komórki wytwarzały IL-12 i IL-15, ale bez wzrostu ekspresji IL-10. Brak wzrostu wytwarzania immunosupresyjnej IL-10 po stymulacji komórek nowotworowych potwierdzają również nasze niepublikowane wyniki. Podobnie Lee i wsp. uważają, że dodanie CD40L do kombinacji "klasycznych" cytokin w hodowli komórek AML powoduje uzyskanie bardziej dojrzałych, silnie stymulujących odpowiedź immunologiczną komórek dendrytycznych [22]. Zaskakująca jest również stymulacja komórek nowotworowych bez użycia cytokin, hodowanych z samym medium [28]. Nasze doświadczenia w tym zakresie potwierdzają również Urbaniak-Kujda i wsp. [48]. Autorzy uzyskali wzrost ekspresji cząsteczek kostymulujących CD80 na komórkach ostrej białaczki szpikowej (szczególnie podtyp M4 i M5), natomiast ekspresja CD86 była wysoka również przed hodowlą. Potwierdza to zdolność komórek białaczkowych do różnicowania w kierunku komórek dendrytycznych bez swoistej stymulacji za pomocą cytokin czy sygnałów zewnątrz- lub wewnątrzplazmatycznych.

Jak już wspomniano, prawidłowa aktywacja limfocytów T poza prezentacją antygenów w kontekście HLA wymaga tzw. drugiego sygnału z cząsteczek kostymulujących. Główną drogą kostymulacji jest aktywacja CD28-B7 (CD80, CD86), inne drogi to TNFR/TNF ligand (w tym 4-1BB/4-1BB ligand), CD27/CD70 oraz OX40/OX40L [5]. W związku z tym niektórzy autorzy próbują wprowadzić do komórki AML nie tylko "klasyczne" geny rodziny B7, ale również inne elementy drugiego sygnału np. 4-1BBL [5]. Wyniki tych eksperymentów są obiecujące.

Kolejnym interesującym podejściem do immunoterapii w ALL jest modyfikacja genetyczna limfocytów T tak, by niszczyły komórki CD19⁺ (większość komórek ALL) [40]. Takie postępowanie może być szczególnie przydatne w prewencji wznowy po allogenicznej transplantacji komórek hematopoetycznych.

Podsumowując, wyniki wielu prac wskazują, że stymulacja CD40L wystarcza do uzyskania komórek dendrytycznych z komórek ALL, to podejście wydaje się nam prostsze od strategii opartych na terapii genowej (trudniejszej do realizacji i potencjalnie niebezpiecznej).

Przewlekła białaczka limfocytowa B-komórkowa (B-CLL)

B-CLL to w większości przypadków wolno postępująca choroba nowotworowa prowadząca po kilku latach do śmierci pacjenta. W przeciwieństwie do ALL, B-CLL pozostaje w większości przypadków chorobą nieuleczalną. W leczeniu B-CLL są stosowane: obserwacja, sterydy, leki alkilujące, analogi puryn oraz przeciwciała monoklonalne, ostatnio również autologiczne i allogeniczne

transplantacje komórek hematopoetycznych [2,50]. Kilka cech tej choroby, w tym przewlekły przebieg oraz starszy wiek chorych powodują, że powinna ona być idealnym celem immunoterapii. Pacjenci z B-CLL mają podobne objawy do tych, które występują we wrodzonym niedoborze CD154 (CD40L). Od strony immunologicznej B-CLL charakteryzuje się akumulacją nowotworowych komórek B z koekspresją CD5, CD19 i CD23, średnią ekspresją cząsteczek MHC klasy I i II, ICAM-1, CD27, CD40 i CD154 (CD40L) oraz słabą lub brakiem ekspresji CD80 i CD86 [50]. Komórki B-CLL nie tylko nie zawierają na swojej powierzchni cząsteczek kostymulujących, ale także wytwarzają cytokiny immunosupresyjne w tym IL-10 i TGF- β . Stymulacja CD40L, podobnie jak w ALL prowadzi do wzrostu ekspresji cząsteczek kostymulujących i adhezyjnych w tym CD80, CD86, CD54 i CD58 oraz indukcji odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów T. Zdaniem Mayr i wsp. lepsze efekty w stymulacji odpowiedzi limfocytów T uzyskuje się po wprowadzeniu CD40L metodami genetycznymi, a nie zwykłą hodowlą z rozpuszczalnym CD40L [32]. Być może dane te dotyczą tylko B-CLL.

Stymulacja komórek B-CLL za pomocą CD40L jest również badana w kierunku wzrostu lub osłabienia wrażliwości na apoptozę komórek nowotworowych po przekształceniu w komórki dendrytyczne. Dane dotyczące wpływu stymulacji CD40L na apoptozę komórek B-CLL są sprzeczne. Według Katera i wsp., mimo wzrostu ekspresji profilu antiapoptotycznego w tym Bcl-x1 i Bfl-1 wzrastała również ekspresja Bid oraz bardzo znacznie aktywność cytotoksyczna limfocytów T, tak więc komórki B-CLL pozostawały idealnym celem dla komórek T [17]. Pojedyncze doniesienia wskazują na oporność na apoptozę komórek B-CLL indukowanych CD40L, mimo wzrostu ekspresji FAS oraz braku zmian w ekspresji innych elementów apoptozy (cząsteczki systemu DISC) [11]. Autorzy tego doniesienia przypuszczają, że oporność na apoptozę może wynikać z upośledzonej aktywacji kaspaz lub nieprawidłowego współdziałania elementów systemu DISC.

Pierwsze próby szczepienia w B-CLL polegały na użyciu całych komórek jako antygenów, produkcja takich szczepionek jest jednak pracochłonna [33]. Komórki dendrytyczne generowane *ex vivo* mogą zawierać zarówno lizaty komórkowe jak i całkowite RNA lub też komórki nowotworowe w stadium apoptozy. Komórki apoptotyczne indukują najsilniejszą odpowiedź limfocytów T (ocenianą jako odpowiedź proliferacyjna oraz wytwarzanie IFN- γ).

Pacjenci z B-CLL bez mutacji w zakresie regionów zmienionych łańcuchów ciężkich immunoglobulin (immunoglobulin heavy chain variable region genes, IgVH genes) oraz ekspresją CD38 mają gorsze rokowanie niż pacjenci z mutacją i bez ekspresji tej cząsteczki. Jednak komórki dendrytyczne uzyskane z komórek nowotworowych obu grup pacjentów nie różnią się funkcjonalnie, co stwarza nadzieję na wyleczenie również pacjentów z gorszym rokowaniem [34]. Niezmiernie interesującego odkrycia dokonali Buhmann i wsp., którzy wykazali, że stymulacja komórkami dendrytycznymi wygenerowanymi z komórek B-CLL limfocytów T allogenicznych prowadzi do ekspansji cytotolitycznych limfocytów CD8⁺, natomiast limfocytów autologicznych – stymulacji limfocytów CD4⁺ (profil Th1) [4]. Potwierdzenie nowotworowego pochodzenia komórek

dendrytycznych w B-CLL łatwo jest udowodnić w cytometrii przepływowej, gdyż komórki te charakteryzują się koekspresją CD5 i CD19.

Interesującym podejściem do immunoterapii w B-CLL jest oparcie szczepionki na autologicznych komórkach dendrytycznych wymieszanych (pulsed) z lizatem komórek nowotworowych [46]. Efektem było pojawienie się swoistej odpowiedzi limfocytów T wytwarzających IFN- γ . System ten był jeszcze bardziej efektywny, jeśli wcześniej komórki B-CLL hodowano w obecności CD40L i IL-4. Kolejną modyfikacją jest wprowadzenie do komórek dendrytycznych RNA kodującego antygeny związane z nowotworem oraz całe RNA komórki nowotworowej. Pierwsze dane dotyczące tego systemu wskazują na jego bezpieczeństwo oraz możliwość uzyskania odpowiedzi cytotoksycznych limfocytów T [14]. Wstępne próby kliniczne zastosowano u pacjentów z rakiem prostaty i nerki. Immunoterapia w B-CLL może być również łączona z chemioterapią lub z nowoczesnymi lekami, które mają niewielkie działanie immunosupresyjne np. inhibitory białka szoku termicznego, inhibitory proteasomów oraz inhibitory angiogenezy [3]. Natomiast inhibitory kinazy tyrozynowej powodują zmniejszenie proliferacji limfocytów T i wytwarzanie IL-2 [3].

Niektórzy autorzy dokonują modyfikacji genetycznych komórek B-CLL przez wprowadzenie nie jednej (np. B7-1) a wielu cząsteczek kostymulujących. Ostatni tego typu raport przedstawiony przez grupę amerykańskim badaczy (Palena i wsp.) dotyczy udanego wprowadzenia genów dla B7-1, ICAM-1 i LFA-3 (razem nazywanych TRICOM) do komórek B-CLL [36]. Autologiczne limfocyty T wygenerowane przez stymulację genetycznie zmienionymi komórkami B-CLL wykazywały cytotoksyczność przeciwko niezmodyfikowanym komórkom B-CLL.

Jeszcze inne podejście prezentują Romano i wsp., którzy wyizolowali limfocyty T od pacjentów z B-CLL, następnie aktywowali je *in vitro* za pomocą PMA i ionomycyny [39]. W ten sposób aktywowane limfocyty T były hodowane z blastami B-CLL, które po hodowli wykazywały wzrost ekspresji cząsteczek kostymulujących, a także wskaźników apoptozy (CD95). Według tych autorów mechanizm ten był niezależny od systemu CD40L.

Oprócz CD40L ważnym sygnałem kostymulującym, obecnym na komórkach dendrytycznych, znaczącym w późnym sygnale kostymulacyjnym (obok TCR i CD28) jest ligand OX40 (CD134L). Jego aktywacja zwiększa proliferację i przeżycie limfocytów T CD4⁺ pamięci [30]. Efekty stymulacji OX40 mogą być widoczne dopiero po wcześniejszej stymulacji CD40L. Biagi i wsp. wprowadzili CD40L oraz OX40L do komórek B-CLL, prowadząc nie tylko do wzrostu ekspresji cząsteczek kostymulujących, ale również wzrostu wytwarzania IFN- γ oraz granzymu B/perforyny przez autologiczne limfocyty T [1]. Najnowsze dane wykazują, że nową metodą w immunoterapii B-CLL może być stymulacja receptorów Toll-like (TLRs), są one głównymi regulatorami odpowiedzi immunologicznej. Podawanie agonistów TLR7 prowadziło nie tylko do wzrostu stymulacji, wytwarzania cytokin prozapalnych, ale także zwiększenia wrażliwości komórek nowotworowych na "zabijanie" cytotoksyczne [45].

ASPEKTY KLINICZNE

Dane dotyczące klinicznego zastosowania szczepionek w białaczkach są do tej pory nieliczne. Pierwsze doświadczenia nie były zachęcające. Haining i wsp. z Dana-Farber Cancer Institute ze Stanów Zjednoczonych podawali szczepionkę w postaci komórek dendrytycznych uzyskanych z blastów dzieciom ze wznową ALL [15]. Jednak większość pacjentów zmarła lub wykazywała znaczną progresję choroby zanim uzyskano szczepionkę. Z tego powodu autorzy przeprowadzili analizę stanu układu immunologicznego pacjentów z nowo rozpoznaną ALL. Obserwowane znaczne zaburzenia immunologiczne nasunęły wniosek, iż podawanie szczepionki dzieciom z ALL nie jest możliwe wobec braku komórek (w tym limfocytów T, B i NK), które miałyby odpowiedzieć na to szczepienie. W innym badaniu spośród 22 pacjentów z AML zakwalifikowanych do szczepienia autologiczną szczepionką opartą na komórkach dendrytycznych uzyskanych z komórek białaczkowych tylko 5 uzyskało remisję i możliwość szczepienia, z tego tylko 2 pozostaje w remisji [38]. Autorzy tego raportu uważają, że możliwość produkcji szczepionki dotyczy niewielkiego odsetka pacjentów z AML i nie prowadzi do efektów klinicznych. Natomiast ostatnio Rousseau i wsp. wprowadzili geny IL-2 i CD40L do komórek AML i ALL. IL-2 ma tu podwójne zadanie: po pierwsze – zwiększa immunogenność blastów, po drugie – pobudza proliferację limfocytów T. W ten sposób przygotowaną szczepionkę podawali pacjentom (w tym dzieciom) w remisji cytologicznej, zarówno po transplantacji szpiku jak i standardowej chemioterapii [41]. W części laboratoryjnej badania zanotowali pojawienie się zarówno odpowiedzi humoralnej (wytwarzanie przeciwciał przeciwko blastom), jak i komórkowej (indukcja profilu Th₁ i Th₂, wytwarzanie IFN- γ , granzymu B i IL-5). Spośród 10 pacjentów 8 pozostaje bez objawów choroby, nie zanotowano objawów niepożądanych. Podobnie Li i wsp. obserwowali specyficzną odpowiedź przeciwnowotworową u pacjentów z AML szczepionych komórkami dendrytycznymi wygenerowanymi z komórek białaczkowych [23]. Dane te z pewnością dają nadzieję na wyleczenie większej liczby pacjentów niż dotychczas. Podawanie szczepionki wg autorów powinno dotyczyć szczególnie pacjentów z dużym ryzykiem wznowy choroby. To podejście terapeutyczne może mieć szczególnie zastosowanie w grupie pacjentów wysokiego ryzyka wznowy. Zdaniem innych autorów najlepiej jest szczepić pacjentów w początkowych stadiach zaawansowania klinicznego, najlepiej przed chemio- i radioterapią, kiedy choroba ulega powolnej akceleracji lub w stabilnej fazie choroby po terapii cytoredukcyjnej [33].

Pierwsze próby kliniczne szczepionki w B-CLL wykazały zmniejszenie liczby krążących komórek nowotworowych oraz zmniejszenie węzłów chłonnych, towarzyszyło temu zwiększenie ekspresji CD95 (wskaźnika apoptyzytycznego), być może spowodowane przez lityczne działanie limfocytów CD4 [6,51]. Jeszcze innym podejściem jest podawanie pacjentom z B-CLL autologicznych komórek nowotworowych po utlenieniu (oxidised) [44]. Obserwowano częściowe remisje oraz stabilizację choroby u większości pacjentów. Według autorów to podejście może być potencjalną alternatywą do strategii "watch and wait". We wczesnych stadiach B-CLL stosowa-



wano z dobrym wynikiem komórki dendrytyczne używane z allogenicznymi monocytów z wprowadzonymi lizatami komórek nowotworowych lub apoptotycznych. Potwierdzono bezpieczeństwo takiej szczepionki bez efektu klinicznego [16].

Antygeny nowotworowe można też dostarczać do "prawidłowych" komórek dendrytycznych [20]. W jednej z prac porównano użycie do tego celu komórek w apoptozie, lizatów komórkowych oraz RNA nowotworowego w indukowaniu odpowiedzi limfocytów T. Najlepsze efekty, w tym odpowiedzi typu Th₁, uzyskano po hodowli komórek dendrytycznych z ciałami apoptotycznymi [20].

Przyszłe badania nad immunoterapią w białaczkach będą zmierzały w kierunku:

- określenia optymalnego czasu podania szczepionki,
- unikania organicznych związków z immunosupresją powodowaną przez chorobę i jej leczenie,
- łączenia immunoterapii z klasyczną lub celowaną chemioterapią [2].

Przeprowadzona analiza dostępnego piśmiennictwa oraz własne doświadczenia nasuwają stwierdzenie, że czynna immunoterapia w białaczkach, mimo bardzo intensywnej badań eksperymentalnych jest w fazie wstępnej oceny klinicznej i na jej efekty w codziennej praktyce będzie trzeba jeszcze poczekać.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Biagi E., Dotti G., Yvon E., Lee E., Pule M., Vigouroux S., Gottschalk S., Popat U., Rousseau R., Brenner M.: Molecular transfer of CD40 and OX40 ligands to leukemic human B cells induces expansion of autologous tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood*, 2005; 105: 2436–2442
- [2] Bruserud O., McCormack E., Gjertsen B.T.: Immunotherapy in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2006; 55: 185–187
- [3] Bruserud O., Tronstad K.J., McCormack E., Gjertsen B.T.: Is targeted chemotherapy an alternative to immunotherapy in chronic lymphocytic leukemia? *Cancer Immunol. Immunother.*, 2006; 55: 221–228
- [4] Buhmann R., Nolte A., Westhaus D., Emmerich B., Hallek M.: CD40-activated B-cell chronic lymphocytic leukemia cells for tumor immunotherapy: stimulation of allogeneic versus autologous T cells generates different types of effector cells. *Blood*, 1999; 93: 1992–2002
- [5] Cheuk A.T., Chan L., Czepulkowski B., Berger S.A., Yagita H., Okumura K., Farzaneh F., Mufti G.J., Guinn B.A.: Development of a whole cell vaccine for acute myeloid leukaemia. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2006; 55: 68–75
- [6] Chu P., Deforce D., Pedersen I.M., Kim Y., Kitada S., Reed J.C., Kipps T.J.: Latent sensitivity to Fas-mediated apoptosis after CD40 ligation may explain activity of CD154 gene therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 3854–3859
- [7] Cignetti A., Bryant E., Allione B., Vitale A., Foa R., Cheever M.A.: CD34(+) acute myeloid and lymphoid leukemic blasts can be induced to differentiate into dendritic cells. *Blood*, 1999; 94: 2048–2055
- [8] Cignetti A., Vallario A., Roato I., Circosta P., Allione B., Casorzo L., Ghia P., Caligaris-Cappio F.: Leukemia-derived immature dendritic cells differentiate into functionally competent mature dendritic cells that efficiently stimulate T cell responses. *J. Immunol.*, 2004; 173: 2855–2865
- [9] D'Amico G., Marin V., Biondi A., Bonamino M.H.: Potential use of CD40 ligand for immunotherapy of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 2004; 17: 465–477
- [10] D'Amico G., Vulcano M., Bugarin C., Bianchi G., Pirovano G., Bonamino M., Marin V., Allavena P., Biagi E., Biondi A.: CD40 activation of BCP-ALL cells generates IL-10-producing, IL-12-defective APCs that induce allogeneic T-cell anergy. *Blood*, 2004; 104: 744–751
- [11] De Toter D., Montera M., Rosso O., Clavio M., Balleari E., Foa R., Gobbi M.: Resistance to CD95-mediated apoptosis of CD40-activated chronic lymphocytic leukemia B cells is not related to lack of DISC molecules expression. *Hematol. J.*, 2004; 5: 152–160
- [12] Ghia P., Transidico P., Veiga J.P., Schaniel C., Sallusto F., Matsushima K., Sallan S.E., Rolink A.G., Mantovani A., Nadler L.M., Cardoso A.A.: Chemoattractants MDC and TARC are secreted by malignant B-cell precursors following CD40 ligation and support the migration of leukemia-specific T cells. *Blood*, 2001; 98: 533–540
- [13] Gruber T.A., Skelton D.C., Kohn D.B.: Requirement for NK cells in CD40 ligand-mediated rejection of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cells. *J. Immunol.*, 2002; 168: 73–80
- [14] Grunebach F., Muller M.R., Brossart P.: New developments in dendritic cell-based vaccinations: RNA translated into clinics. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2005; 54: 517–525
- [15] Haining W.N., Cardoso A.A., Keczemethy H.L., Fleming M., Neuber D., DeAngelo D.J., Stone R.M., Galinsky I., Silverman L.B., Sallan S.E., Nadler L.M., Guinan E.C.: Failure to define window of time for autologous tumor vaccination in patients with newly diagnosed or relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Exp. Hematol.*, 2005; 33: 286–294
- [16] Hus I., Rolinski J., Tabarkiewicz J., Wojas K., Bojarska-Junak A., Greiner J., Giannopoulos K., Dmoszynska A., Schmitt M.: Allogeneic dendritic cells pulsed with tumor lysates or apoptotic bodies as immunotherapy for patients with early-stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 2005; 19: 1621–1627
- [17] Kater A.P., Evers L.M., Remmerswaal E.B., Jaspers A., Oosterwijk M.F., Van Lier R.A., Van Oers M.H., Eldering E.: CD40 stimulation of B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells enhances the anti-apoptotic profile, but also Bid expression and cells remain susceptible to autologous cytotoxic T-lymphocyte attack. *Br. J. Haematol.*, 2004; 127: 404–415
- [18] Kebelmann-Betz C., Korner G., Badiali L., Buchwald D., Moricke A., Korte A., Kochling J., Wu S., Kappelmeier D., Oettel K., Henze G., Seeger K.: Characterization of cytokine, growth factor receptor, costimulatory and adhesion molecule expression patterns of bone marrow blasts in relapsed childhood B cell precursor ALL. *Cytokine*, 2001; 13: 39–50
- [19] Kharfan-Dabaja M., Ayala E., Lindner I., Cejas P.J., Bahlis N.J., Kolonias D., Carlson L.M., Lee K.P.: Differentiation of acute and chronic myeloid leukemic blasts into the dendritic cell lineage: analysis of various differentiation-inducing signals. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2005; 54: 25–36
- [20] Kokhaei P., Choudhury A., Mahdian R., Lundin J., Moshfegh A., Osterborg A., Mellstedt H.: Apoptotic tumor cells are superior to tumor cell lysate, and tumor cell RNA in induction of autologous T cell response in B-CLL. *Leukemia*, 2004; 18: 1810–1815
- [21] Lee J., Sait S.N., Wetzler M.: Characterization of dendritic-like cells derived from t(9;22) acute lymphoblastic leukemia blasts. *Int. Immunol.*, 2004; 16: 1377–1389
- [22] Lee J.J., Choi B.H., Nam J.H., Park M.S., Song W.H., Yang D.H., Kim Y.K., Cho S.H., Chung I.J., Park K.S., Lee I.K., Kim H.J.: The generation of leukemic dendritic cells from acute myeloid leukemia cells is potentiated by the addition of CD40L at the terminal maturation stage. *J. Clin. Apher.*, 2004; 19: 130–136
- [23] Li L., Giannopoulos K., Reinhardt P., Tabarkiewicz J., Schmitt A., Greiner J., Rolinski J., Hus I., Dmoszynska A., Wiesneth M., Schmitt M.: Immunotherapy for patients with acute myeloid leukemia using autologous dendritic cells generated from leukemic blasts. *Int. J. Oncol.*, 2006; 28: 855–861
- [24] Li L., Reinhardt P., Schmitt A., Barth T.F., Greiner J., Ringhoffer M., Dohner H., Wiesneth M., Schmitt M.: Dendritic cells generated from acute myeloid leukemia (AML) blasts maintain the expression of immunogenic leukemia associated antigens. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2005; 54: 685–693
- [25] Loskog A., Ninalga C., Totterman T.H.: Dendritic cells engineered to express CD40L continuously produce IL12 and resist negative signals from Tr1/Th3 dominated tumors. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2006; 55: 588–597

- [26] Luczynski W., Kovalchuk O., Krawczuk-Rybak M., Malinowska I., Mitura-Lesiuk M., Chyczewski L., Matysiak M., Kowalczyk J.: Higher mRNA expression for TGF-beta in CD8⁺ cells at the time of diagnosis of acute lymphoblastic leukemia in children. *Pol. J. Environ. Studies*, 2005; 14(Supl.2): 283–285
- [27] Luczynski W., Stasiak-Barmuta A., Ilendo E., Kovalchuk O., Krawczuk-Rybak M., Malinowska I., Mitura-Lesiuk M., Chyczewski L., Matysiak M., Kowalczyk J., Jaworowski R.: Low expression of costimulatory molecules and mRNA for cytokines are important mechanisms of immunosuppression in acute lymphoblastic leukemia in children? *Neoplasma*, 2006; (w druku)
- [28] Luczynski W., Stasiak-Barmuta A., Ilendo E., Krawczuk-Rybak M., Malinowska I., Mitura-Lesiuk M., Parfienczyk A., Szymanski M.: CD40 stimulation induces differentiation of acute lymphoblastic leukemia cells into dendritic cells. *Acta Biochim. Pol.*, 2006; 53: 377–382
- [29] Luczynski W., Stasiak-Barmuta A., Krawczuk-Rybak M., Malinowska I.: Assessment of selected co-stimulatory, adhesion and activatory molecules and cytokines of Th₁/Th₂ balance in acute lymphoblastic leukemia in children. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2005; 53: 357–363
- [30] Ma B.Y., Mikolajczak S.A., Danesh A., Hosiawa K.A., Cameron C.M., Takaori-Kondo A., Uchiyama T., Kelvin D.J., Ochi A.: The expression and the regulatory role of OX40 and 4-1BB heterodimer in activated human T cells. *Blood*, 2005; 106: 2002–2010
- [31] Maia S., Haining W.N., Ansen S., Xia Z., Armstrong S.A., Seth N.P., Ghia P., Den Boer M.L., Pieters R., Sallan S.E., Nadler L.M., Cardoso A.A.: Gene expression profiling identifies BAX-delta as a novel tumor antigen in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.*, 2005; 65: 10050–10058
- [32] Mayr C., Kofler D.M., Buning H., Bund D., Hallek M., Wendtner C.M.: Transduction of CLL cells by CD40 ligand enhances an antigen-specific immune recognition by autologous T cells. *Blood*, 2005; 106: 3223–3226
- [33] Mellstedt H., Choudhury A.: T and B cells in B-chronic lymphocytic leukaemia: Faust, Mephistopheles and the pact with the Devil. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2006; 55: 210–220
- [34] Messmer D., Telusma G., Wasil T., Messmer B.T., Allen S., Rai K.R., Chiorazzi N.: Dendritic cells from chronic lymphocytic leukemia patients are normal regardless of Ig V gene mutation status. *Mol. Med.*, 2004; 10: 96–103
- [35] Mohty M., Isnardon D., Charbonnier A., Lafage-Pochitaloff M., Merlin M., Sainty D., Olive D., Gaugler B.: Generation of potent Th1 responses from patients with lymphoid malignancies after differentiation of B lymphocytes into dendritic-like cells. *Int. Immunol.*, 2002; 14: 741–750
- [36] Palena C., Foon K.A., Panicali D., Yafal A.G., Chinsangaram J., Hodge J.W., Schlom J., Tsang K.Y.: Potential approach to immunotherapy of chronic lymphocytic leukemia (CLL): enhanced immunogenicity of CLL cells via infection with vectors encoding for multiple costimulatory molecules. *Blood*, 2005; 106: 3515–3523
- [37] Robin M., Schlageter M.H., Chomienne C., Padua R.A.: Targeted immunotherapy in acute myeloblastic leukemia: from animals to humans. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2005; 54: 933–943
- [38] Roddie H., Klammer M., Thomas C., Thomson R., Atkinson A., Sproul A., Waterfall M., Samuel K., Yin J., Johnson P., Turner M.: Phase I/II study of vaccination with dendritic-like leukemia cells for the immunotherapy of acute myeloid leukemia. *Br. J. Haematol.*, 2006; 133: 152–157
- [39] Romano C., De Fanis U., Sellitto A., Dalla Mora L., Chiurazzi F., Giunta R., Rotoli B., Lucivero G.: Effects of preactivated autologous T lymphocytes on CD80, CD86 and CD95 expression by chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leuk. Lymphoma*, 2003; 44: 1963–1971
- [40] Rossig C., Pscherer S., Landmeier S., Altvater B., Jurgens H., Vormoor J.: Adoptive cellular immunotherapy with CD19-specific T cells. *Klin. Padiatr.*, 2005; 217: 351–356
- [41] Rousseau R.F., Biagi E., Dutour A., Yvon E.S., Brown M.P., Lin T., Mei Z., Grilley B., Popek E., Heslop H.H., Gee A.P., Krance R.A., Popat U., Carrum G., Margolin J.F., Brenner M.K.: Immunotherapy of high-risk acute leukemia with a recipient (autologous) vaccine expressing transgenic human CD40L and IL-2 after chemotherapy and allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, 2006; 107: 1332–1341
- [42] Ruggeri L., Capanni M., Urbani E., Perruccio K., Schlomchik W.D., Tosti A., Posati S., Rogaia D., Frassonni F., Aversa F., Martelli M.F., Velardi A.: Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*, 2002; 295: 2097–2100
- [43] Sieglar U., Kalberer C.P., Nowbakht P., Sendelov S., Meyer-Monard S., Wodnar-Filipowicz A.: Activated natural killer cells from patients with acute myeloid leukemia are cytotoxic against autologous leukemic blasts in NOD/SCID mice. *Leukemia*, 2005; 19: 2215–2222
- [44] Spaner D.E., Hammond C., Mena J., Foden C., Deabreu A.: A phase I/II trial of oxidized autologous tumor vaccines during the “watch and wait” phase of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2005; 54: 635–646
- [45] Spaner D.E., Shi Y., White D., Mena J., Hammond C., Tomic J., He L., Tomai M.A., Miller R.L., Booth J., Radvanyi L.: Immunomodulatory effects of Toll-like receptor-7 activation on chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, 2006; 20: 286–295
- [46] Suresh K., Fraser G., Scheid E., Leber B., Gaudie J., Foley R.: Generation of *in vitro* B-CLL specific HLA class I restricted CTL responses using autologous dendritic cells pulsed with necrotic tumor lysate. *Leuk. Lymphoma*, 2006; 47: 297–306
- [47] Todisco E., Gaipa G., Biagi E., Bonamino M., Gramigna R., Introna M., Biondi A.: CD40 ligand-stimulated B cell precursor leukemic cells elicit interferon-gamma production by autologous bone marrow T cells in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 2002; 16: 2046–2054
- [48] Urbaniak-Kujda D., Wołowicz D., Tomaszewska-Toporowska B., Jaźwiec B., Frydecka I., Kapelko-Słowik K., Kuliczkowski K.: Wpływ krótkoterminowych hodowli blastów ostrych białaczek na ekspresję cząsteczek kostymulujących i na zdolność indukcji proliferacji autologicznych limfocytów T. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2004; 13: 567–573
- [49] Van Driessche A., Gao L., Stauss H.J., Ponsaerts P., Van Bockstaete D.R., Berneman Z.N., Van Tendeloo V.F.: Antigen-specific cellular immunotherapy of leukemia. *Leukemia*, 2005; 19: 1863–1871
- [50] Von Bergwelt-Baildon M., Maecker B., Schultze J., Gribben J.G.: CD40 activation: potential for specific immunotherapy in B-CLL. *Ann. Oncol.*, 2004; 15: 853–857
- [51] Wierda W.G., Cantwell M.J., Woods S.J., Rassenti L.Z., Prussak C.E., Kipps T.J.: CD40-ligand (CD154) gene therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2000; 96: 2917–2924

