

Received: 2006.07.04
Accepted: 2006.09.26
Published: 2006.10.26

Czy komórki dendrytyczne modyfikowane wektorami retrovirusowymi z genami cytokin staną się narzędziem terapeutycznym?*

Do dendritic cells modified with retroviral vectors carrying cytokine genes become a therapeutic tool?

Anna Szyda¹, Joanna Rossowska¹, Elżbieta Pajtasz-Piasecka², Danuta Duś¹

¹ Laboratorium Oddziaływań Międzykomórkowych Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

² Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

Streszczenie

Od wielu lat są poszukiwane sposoby zwiększenia reaktywności układu odpornościowego w chorobie nowotworowej, przez stosowanie różnego rodzaju immunomodulatorów. Wśród nich znaczące miejsce znalazły cytokiny. Jednym z potencjalnych narzędzi terapeutycznych do modyfikacji środowiska cytokinowego nowotworu są komórki dendrytyczne z wprowadzonymi genami kodującymi cytokiny. Jako nośniki genów cytokin najczęściej wykorzystuje się wektory retrovirusowe. Szeroko zakrojone badania nad optymalizacją procesu modyfikacji genetycznej komórek dendrytycznych za pomocą wektorów wirusowych powinny przybliżyć ich stosowanie w immunoterapii przeciwnowotworowej.

Słowa kluczowe:

komórki dendrytyczne • wektory retrovirusowe • cytokiny

Summary

For many years, the application of various types of immunostimulators (among which cytokines have proved to play a crucial role) has been one of the ways to enhance anti-tumor immunity. Dendritic cells genetically modified towards cytokine production have been proposed as a potential therapeutic tool to enable restoration of the cytokine environment diminished by a growing tumor. Retroviral vectors have been the most often used carriers of cytokine genes. Therefore, optimization of the genetic procedure of inserting retroviral vectors into DCs has been widely studied largely in order to achieve better immunotherapeutic effects against tumor.

Key words:

dendritic cells • retroviral vectors • cytokines

Full-text PDF:

http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/9733.pdf

* Praca finansowana ze środków Ministra Nauki w latach 2004–2006, jako projekt badawczy zamawiany: PBZ-KBN-091/PO5/2003, oraz ze środków Komitetu Badań Naukowych w latach 2004–2005, jako projekt badawczy: 2/P05A/034/27/2004.



Word count:	2844
Tables:	1
Figures:	5
References:	81

Adres autorki: dr Elżbieta Pajtasz-Piasecka, Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: pajtasz@immuno.iitd.pan.wroc.pl

Wykaz skrótów: **APC** – komórka prezentująca antygen (antigen presenting cell); **CD** – kompleks różnicowania (cluster of differentiation); **CD40L** – CD154 – ligand antygeny CD40; **CTL** – cytotoksyczne limfocyty T; **CMV** – cytomegalowirus (cytomegalovirus); **DC** – komórka dendrytyczna (dendritic cell); **Flt3-L** – Flt3 ligand (fms-like tyrosine kinase 3 ligand); **G-CSF** – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (granulocyte colony-stimulating factor); **GM-CSF** – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor); **IL** – interleukina; **IFN** – interferon; **LPS** – lipopolisacharyd; **LTR** – sekwencja promotorowa (long terminal repeat); **MHC** – główny układ zgodności tkankowej (major histocompatibility complex); **TAA** – antygeny związane z nowotworem (tumor associated antigens); **TA** – antygeny nowotworowo swoiste (tumor specific antigens); **TGF-β** – transformujący czynnik wzrostu beta (transforming growth factor-β); **Th** – pomocnicze limfocyty T; **TNF** – czynnik martwicy nowotworów (tumor necrosis factor); **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (vascular endothelial growth factor).

CYTOKINY W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

W fazie progresywnego wzrostu nowotworu układ odpornościowy staje się niewydolny, zarówno na poziomie odpowiedzi nieswoistej, jak i swoistej. Jednym z czynników odpowiedzialnych za tę niewydolność jest zmieniony profil cytokin w środowisku nowotworu, w którym dominują czynniki hamujące odpowiedź odpornościową, takie jak VEGF, TGF-β czy IL-10 [19]. Dlatego poszukuje się kompleksowego sposobu przywrócenia reaktywności układu odpornościowego przez zastosowanie różnego rodzaju immunomodulatorów, w tym również cytokin, które właściwie dobrane, mogą być wykorzystane w generowaniu skutecznej odpowiedzi przeciwnowotworowej [22]. Niektóre cytokiny i czynniki wzrostowe są już stosowane w klinice. Dotyczy to zwłaszcza interferonów, czynników koloniotwórczych (np. GM-CSF), a także interleukin, m. in. IL-2, -6 i -12 [13,60].

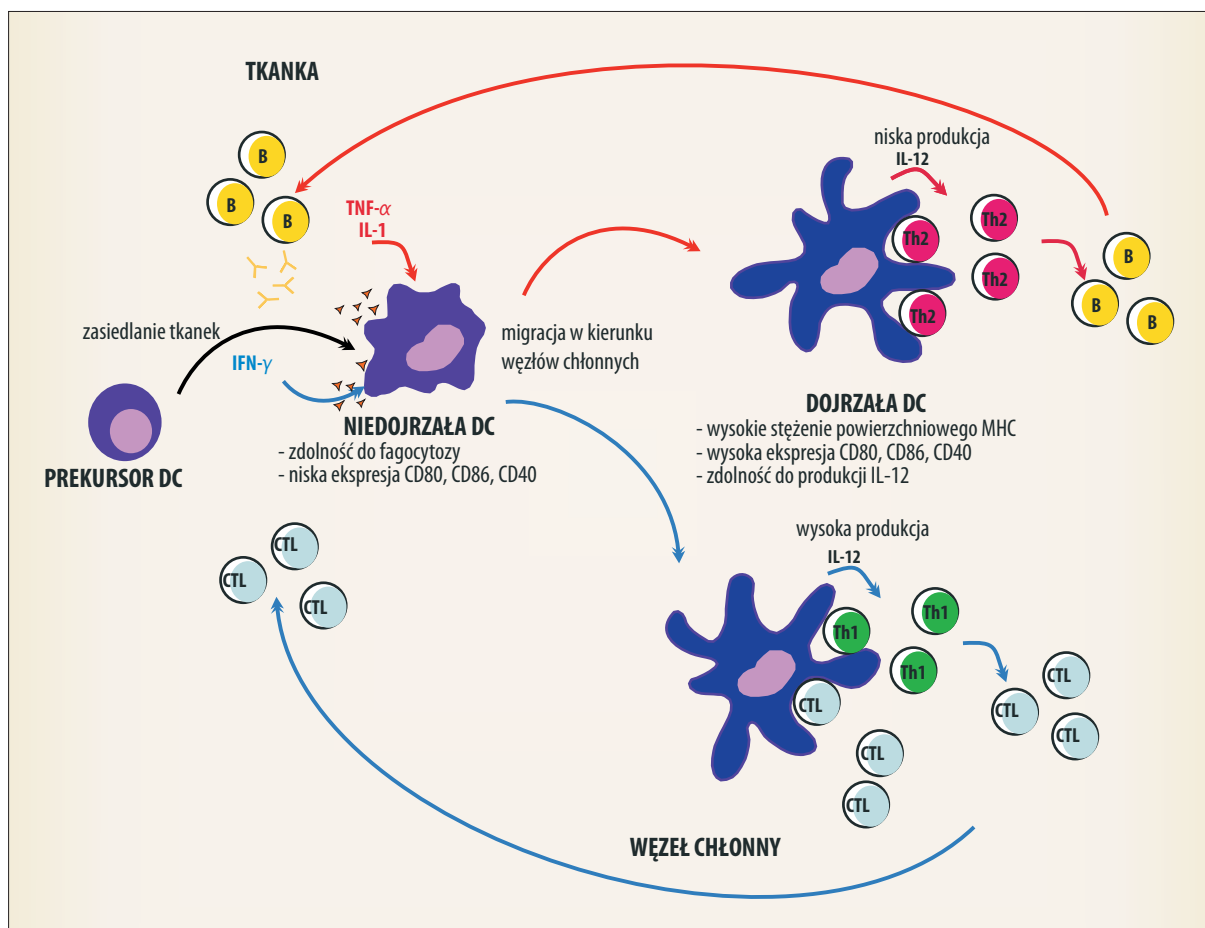
W warunkach fizjologicznych, IFN-α jest czynnikiem stymulującym aktywność cytotoksyczną komórek NK i zwiększającym ekspresję antygenów zgodności tkankowej na komórkach prezentujących antygen (APC). Obecnie jest on stosowany w terapii zarówno chorób rozrostowych krwi (białaczki, chłoniaki B- i T-komórkowe), jak i u pacjentów z innymi nowotworami (czerniak, rak nerki, mięsak Kaposiego) [69]. Z kolei IL-2 uczestniczy w różnicowaniu i aktywacji dojrzałych cytotoksycznych limfocytów T, limfocytów B oraz komórek NK. Jednak próby wykorzystania rekombinowanej IL-2 w leczeniu chorych z czerniakiem i rakiem nerki nie przyniosły oczekiwanych rezultatów ze względu na często występujące działania niepożądane [30]. Kolejną cytokiną, której zastosowanie w terapii wydawało się bardzo obiecujące jest IL-12. Jest ona czyn-

nikiem zaangażowanym w aktywację odpowiedzi typu TH1, komórek NK oraz w stymulację antygenowo swoistych cytotoksycznych limfocytów T (CTL). W eksperymentach na myszach wykazano, że IL-12 dzięki swojej aktywności prozapalnej i immunoregulatorowej jest zdolna do indukowania silnej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Natomiast ze względu na znaczną toksyczność jej zastosowanie w zwalczaniu nowotworów ludzkich okazało się kontrowersyjne [63,78].

Działania niepożądane, spowodowane przez konieczność częstego, systemowego podawania dużych dawek cytokin, zmusiły badaczy do poszukiwania sposobów, które pozwoliłyby na zmniejszenie dawek cytokin, a także przedłużyły ich okres półtrwania w organizmie. Jednym z takich rozwiązań jest stosowanie tzw. cytokin pegyloowanych w postaci koniugatu z polimerem glikolu polietylenowego. Pegylacji poddaje się takie cytokiny, jak: IFN-α, IFN-γ, IL-2, oraz GM-CSF i G-CSF [28]. Alternatywnym sposobem miejscowego dostarczania cytokin są immunocytokiny, składające się z dwóch części: segmentu o charakterze przeciwciała, rozpoznającego cząsteczki powierzchniowe komórek nowotworowych oraz samej cytokiny. Przykładem może być konstrukt niosący IL-2 połączoną z fragmentem przeciwciała skierowanego przeciwko jednej z cząsteczek adhezyjnych o nazwie EpCAM, obecnej na powierzchni komórek nowotworowych pochodzenia nabłonkowego [63].

Innym źródłem cytokin mogą być szczepionki komórkowe. Wykorzystuje się w nich komórki zarówno transfekowane, jak i transdukowane¹ genami cytokin. Takim modyfikacjom poddaje się często komórki nowotworowe (autologiczne lub allogeniczne), które pełnią wtedy rolę źródła zarówno cytokin, jak i antygenów nowotworowych [52].

¹ Dla zjawiska wprowadzania genów z użyciem nośników chemicznych lub fizycznych przyjęto nazwę transfekcja, podczas gdy proces przenoszenia genów *via* nośniki wirusowe określany jest mianem transdukcji. Jest to niereplikacyjny proces infekcji wprowadzający do komórki docelowej funkcjonalną informację genetyczną z rekombinowanego wektora wirusowego [10].



Ryc. 1. Schemat dojrzewania komórek dendrytycznych; status DC jest określany na podstawie wielu parametrów, m.in. cech morfologicznych, fenotypowych i funkcjonalnych oraz zdolności do migracji w odpowiedzi na bodźce chemotaktyczne. Bardzo ważną cechą DC jest ich zdolność do różnicowania. Komórki te przechodzą w postaci dojrzałej w wyniku stymulacji antygenowej (rozpoznanie i pochłanianie antygeny) lub pod wpływem cytokin prozapalnych. Na powierzchni DC dochodzi wtedy do zmian w ekspresji receptorów chemokin (obniżenie poziomu CCR6 i wzrost CCR7), co umożliwia tym komórkom migrację w kierunku wtórnych narządów limfatycznych. Wzrasta również ekspresja cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej (MHC) klasy I i klasy II oraz cząsteczek kostymulujących (CD80, CD86, CD40) [16]. W tej postaci komórki DC są zdolne do aktywowania naiwnych limfocytów T. Właściwości immunogenne DC są w dużej mierze określane poprzez ich potencjał do wytwarzania cytokin (TNF-α, IL-12, -15, -18, IFN-γ), za pomocą których regulują swoistą, odpowiedź komórkową. Szczególnie istotną rolę pełni tu IL-12, która powoduje polaryzację odpowiedzi odpornościowej. W odpowiedzi na infekcję bakteryjną lub wirusową DC pochodzenia mieloidalnego wytwarzają IL-12 w ilości, która wspomaga różnicowanie niedojrzałych pomocniczych limfocytów T, oraz promuje wydzielanie IFN-γ przez limfocyty Th1 [69]. Natomiast w obecności innych czynników aktywujących (takich jak np. TNF-α, IL-1, niektóre toksyny lub FasL) ilość IL-12 wytwarzanej przez DC jest zbyt mała, aby uruchomić odpowiedź komórkową. Prowadzi to do generowania odpowiedzi typu Th2 [32]

W badaniach na zwierzętach, którym podawano komórki nowotworowe wytwarzające GM-CSF, w miejscu podania obserwowano zwiększony napływ dojrzałych DC, makrofagów i eozynofili, co wymagało skutecznej prezentacji antygenów nowotworowych. W doświadczeniach, w których myszom wszczepiano komórki mysiego raka sutka wytwarzające cytokiny (IL-4, -7, -6, -1, IFN-γ, TNF-α lub G-CSF), obserwowano obniżenie, a nawet zanik ich tumorigenności. W niektórych przypadkach eliminacja transduktantów chroniła myszy przed przyjęciem się przeszczepu sprawdzającego [53]. Zastosowane jako szczepionka komórki mysiego czerniaka B16, wytwarzające IL-1β, indukowały reakcje odpornościowe powodujące odrzucenie nietransdukowanych komórek tego czerniaka [11]. Jednak w przypadku komórek mysiego raka płuc Lewis (LL2) również transdukowanych genem IL-1β, po ich wszczepieniu zaobserwowano wprawdzie nasilenie procesu zapalnego,

lecz towarzyszył temu szybszy wzrost guza oraz wzmożona angiogeneza, w porównaniu z nietransdukowanymi komórkami kontrolnymi LL2 [66]. W próbach leczenia chorych z rakiem nerki i czerniakiem, którym podano autologiczne komórki nowotworowe wytwarzające GM-CSF, obserwowano zwiększoną aktywność swoistych dla tych nowotworów limfocytów T, a sporadycznie nawet regresję nowotworu [26]. Podawanie autologicznych komórek nowotworowych transdukowanych IL-2 lub IL-7 prowadziło do zwiększenia ekspansji i czasu przeżycia limfocytów T, a w efekcie do zahamowania wzrostu neuroblastoma i czerniaka u pacjentów poddanych terapii [12,18].

Stosowanie genetycznie modyfikowanych komórek nowotworowych ma również swoje ograniczenia. Komórki nowotworowe są słabo rozpoznawane przez komórki układu odpornościowego, mogą również same wytwarzać czyn-



niki immunosupresyjne i proangiogenne. Dlatego w terapii przeciwnowotworowej jako nośniki cytokin próbuje się wykorzystywać inne komórki. Początkowo były to fibroblasty, które stosunkowo łatwo ulegają modyfikacjom genetycznym. Wykazano, że doguzowe wprowadzanie fibroblastów transdukowanych IL-12 pacjentom z zaawansowanym czerniakiem wywoływało nekrozę guza i przejściową redukcję jego masy [34]. Jednak to właśnie wykorzystanie komórek dendrytycznych (DC) w charakterze szczepionki komórkowej jest jedną z najlepiej rokujących metod immunoterapii przeciwnowotworowej.

KOMÓRKI DENDRYTYCZNE JAKO ŹRÓDŁO CYTOKIN

Komórki dendrytyczne (DC) to komórki leukocytarne, wyspecjalizowane w pochłanianiu i prezentacji antygenów, zdolne do generowania odpowiedzi komórkowej. Uważa się, że DC nie tylko aktywują układ odpornościowy w odpowiedzi na patogeny, ale również utrzymują tolerancję na antygeny własne. Pełnią więc funkcję regulatorową zarówno w zdrowiu, jak i w stanach chorobowych [71].

Opracowanie odpowiednich procedur pozyskiwania DC *ex vivo* oraz metod namnażania ich *in vitro* umożliwiły postęp w badaniach nad ich zastosowaniem w terapii – zwłaszcza w immunoterapii pacjentów obciążonych nowotworem. Źródłem ludzkich DC są komórki CD34⁺ (które można pozyskiwać ze szpiku kostnego, krwi pępowinowej i z krwi obwodowej), a także monocyty (CD14⁺). W wyniku kilkudniowej hodowli w obecności czynników wzrostowych komórki te przeobrażają się w tzw. „niedojrzałe” DC, zdolne do pochłaniania i przetwarzania obcych antygenów. Niedojrzałe DC, w obecności antygenów, oraz takich czynników jak: TNF- α , LPS, IFN- γ lub CD40L dojrzewają, nabywając zdolności do migracji i prezentowania antygenów w węzłach chłonnych (ryc. 1). Większość badaczy podkreśla, że w charakterze szczepionki przeciwnowotworowej powinny być zastosowane komórki dojrzałe [68, praca przeglądowa 64].

Ribas i wsp. podkreślili, że zarówno mysie, jak i ludzkie DC transdukowane genami kodującymi antygeny nowotworowe indukują długotrwałą odpowiedź komórkową [62]. Modyfikacje genetyczne mogą zatem prowadzić do aktywacji DC. Uzyskane wyniki zachęciły do podjęcia prób klinicznych w leczeniu pacjentów obciążonych rakiem nerki [72], rakiem jelita grubego [50] oraz innymi nowotworami [57]. Udowodniono, że stosowane w charakterze szczepionki, modyfikowane antygenem nowotworowym DC są bezpieczne i dobrze tolerowane przez pacjentów. W wyniku ich podania uzyskać można stymulację odpowiedzi przeciwnowotworowej organizmu, spowolnienie progresji nowotworu, a w nielicznych przypadkach nawet jego regresję.

Podjęmowane były również próby modyfikacji DC przez wprowadzenie genów kodujących cząsteczki immunostymulujące, takie jak IL-2, -12, -7, CD-40L, GM-CSF czy SLC [7,20,23,36,38,47]. Na podstawie uzyskanych wyników można wykazać, że wytwarzanie odpowiednich cytokin może poprawić wydajność procesu prezentacji antygenów przez DC, a także zwiększyć ich migrację do lokalnych węzłów chłonnych.

METODY TRANSFERU GENÓW DC

Komórki dendrytyczne mogą być poddawane modyfikacjom genetycznym przez wprowadzenie DNA (RNA) nagięgo lub w kompleksach z liposomami [24,33,39]. Stosując te metody należy się jednak liczyć z możliwym działaniem toksycznym lub zmianą fenotypu komórek dendrytycznych [8,65,81]. Jak dotąd najbardziej obiecującym sposobem wprowadzania nowych genów do komórek dendrytycznych wydaje się wykorzystanie nośników opartych na wirusach. Idealny wektor wirusowy powinien charakteryzować się:

- określonym powinowactwem do komórek docelowych,
- dużą „pojemnością” (możliwością przenoszenia genów o wielkości >5 kpz),
- obecnością minimalnych sekwencji wirusowych, niezdolnych do samodzielnej replikacji czy do rekombinacji z materiałem genetycznym gospodarza (tzw. replication-defectiveness),
- długo utrzymującą się ekspresją transgenów,
- brakiem toksyczności *in vivo* i małą immunogennością.

Takie cechy mają wektory konstruowane na bazie osłonkowych wirusów RNA z rodziny *Retroviridae* (ryc. 2 i 3).

Mają one enzym zwany odwrotną transkryptazą, umożliwiającą przepisanie materiału genetycznego wirusa na transkrypt DNA, który może zostać włączony w genom gospodarza [17,35,37,56,79]. Stosunkowo prosta budowa retrowirusów (ryc. 4) oraz ich właściwości biologiczne pozwoliły na uczynienie z nich wydajnego i chętnie stosowanego narzędzia do transferu genów, używanego w jednej czwartej protokołów klinicznych terapii genowej na świecie [48].

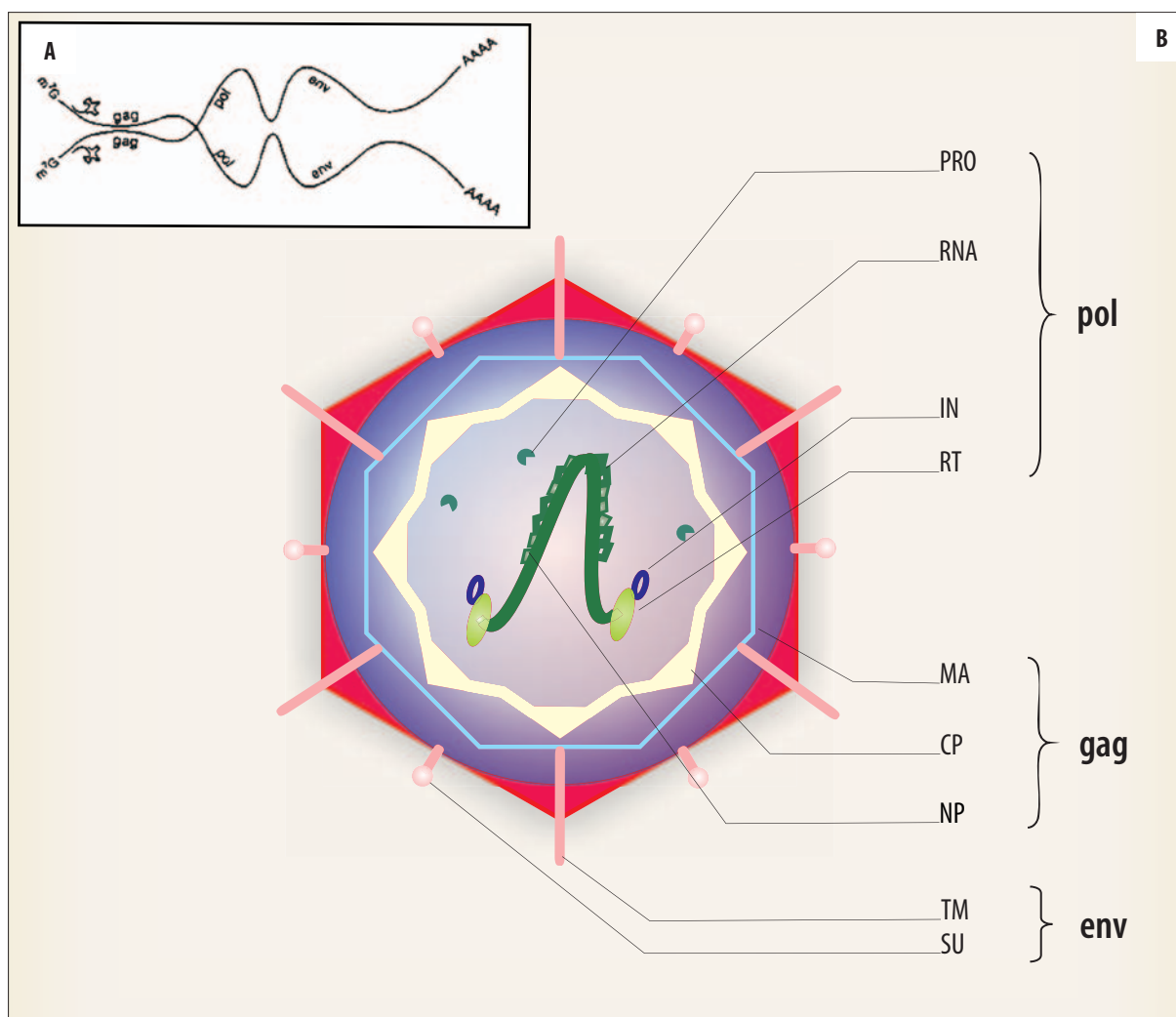
OGÓLNA STRATEGIA KONSTRUKCJI WEKTORÓW WIRUSOWYCH

W celu stworzenia wektora wirusowego o wysokiej swoistości wobec komórek gospodarza należy zoptymalizować jego cechy dobierając odpowiednio:

- szkielet wirusowy i promotory,
- linię pakującą, wytwarzającą osłonki wirusowe o silnym tropizmie do komórek docelowych,
- warunki hodowli i transdukcji komórek docelowych.

Pierwszy wektor wirusowy skonstruowano w 1983 r. na bazie mysiego wirusa białaczki Moloneya (Moloney murine leukemia virus – MLV), który do dziś jest wykorzystywany jako tzw. baza wektorowa [9,31]. W konstrukcji nośników retrowirusowych stosuje się także inne bazy wirusowe, dobierane w zależności od gatunku i rodzaju komórek docelowych, zarówno spośród wirusów RNA (np. z rodzin *Coronaviridae*, *Picornaviridae*, *Togaviridae*), a także wirusów DNA (np. z rodzin: *Herpesviridae*, *Polyomaviridae*, *Adenoviridae*). Poszczególne części składowe rekombinowanego wektora mogą pochodzić z jednego lub nawet kilku różnych wirusów oraz zawierać elementy bakterieryjnych plazmidów DNA, co pozwala na pracę nad nimi z zastosowaniem tradycyjnych metod biologii molekularnej [17,31,35,37,56].

W zależności od wielkości transgenów, jak i liczby wprowadzanych genów stosowane są różne typy nośników wirusowych (ryc. 5). W **wektorach typu LTR** (long terminal



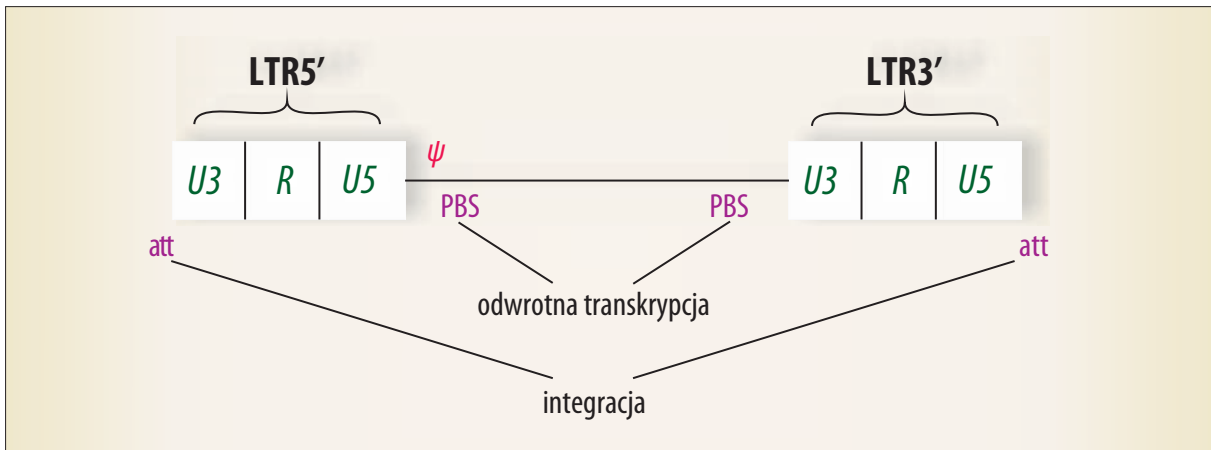
Ryc. 2. Budowa wirionu retrowirusowego; (A) genom wirionu retrowirusowego jest zbudowany z dwóch jednakowych, sensownych nici RNA. Obie tak samo zorientowane kopie połączone są wiązaniami wodorowymi w pobliżu końców 5', które blokuje 7-metyloguanozyna. Na końcach 5', na odcinku około 18 pz, znajduje się komplementarnie związana cząsteczka tRNA, pochodząca z komórki gospodarza, będąca starterem dla odwrotnej transkryptazy. Na końcach 3' znajdują się 9 nukleotydowe fragmenty poliadenylowe (poliA). Materiał genetyczny przechowuje informacje o trzech podstawowych genach wirusa *gag*, *pol* i *env*, których produkty budują strukturę wirusa [21,9,17,58]; (B) wirion otacza osłonka zbudowana częściowo z fragmentów błony komórkowej gospodarza, a częściowo z białek kodowanych przez gen *env* (białka SU i TM). Białko powierzchniowe SU jest odpowiedzialne za kontakt wirusa z odpowiednim receptorem na powierzchni komórki, zaś białko TM – tzw. białko transbłonowe odpowiada za fuzję osłonki wirusa z błoną komórkową gospodarza. Produktami genu *gag* są białka kapsydu CP, białko matrycowe MA i nukleoproteina NP. Białko CP tworzy białko o kształcie dwudziestościanu równoległobocznego czyli ikosaedru, który otacza materiał genetyczny wirusa. Białko NP, zawierające domenę odpowiedzialną za wiązanie RNA, stanowi bezpośrednią ochronę materiału genetycznego. Wspólnie tworzą dobrą ochronę dla białek enzymatycznych wirusa, kodowanych przez gen *pol*. Białka te związane z RNA wirusa to integraza IN, odwrotna transkryptaza RT z właściwościami RNA-azy H oraz polimeraza PRO [21,9,17,58]

repeat) ekspresja transgeny zachodzi z jednego **endogenego promotora**, gdzie proces składania mRNA prowadzi do powstania odrębnych matryc do syntezy poszczególnych białek. Innym typem nośników są wektory z promotorem egzogennym, w których ekspresja każdego z wprowadzonych genów odbywa się z osobnego promotora, takiego jak np. CMV (*cytomagalovirus*) albo PGK (phosphoglycerate kinase). Coraz częściej wykorzystuje się również **wektory dwu- lub wielocistronowe**, w których poszczególne geny są połączone sekwencją IRES (internal ribosome entry site), dzięki czemu produkty genów ulegają translacji na matrycy jednego mRNA. Jednak w niektórych przypadkach wprowadzenie sekwencji IRES w wektorach retro-

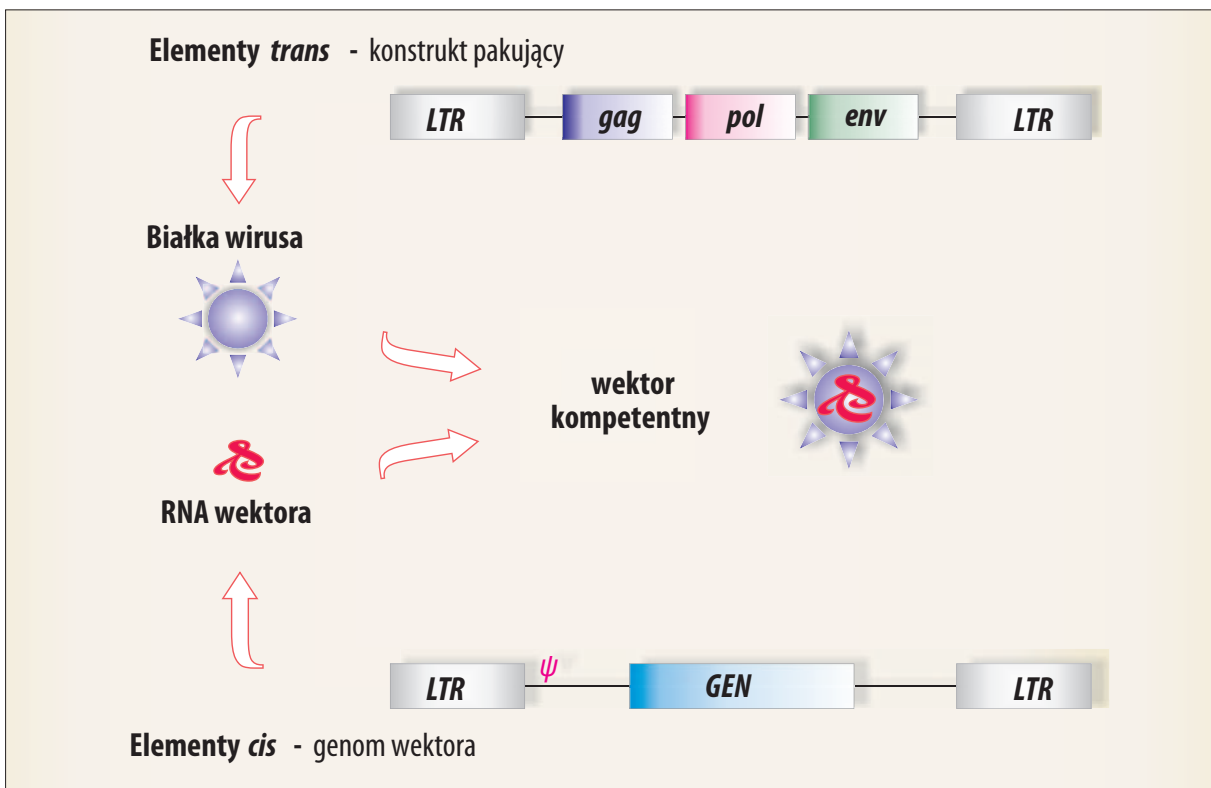
wirusowych prowadziło do różnicy w poziomie ekspresji genów z poszczególnych cistronów, w zależności od wielkości i rodzaju wprowadzanych genów, w kolejności ich ułożenia – przed lub za sekwencją IRES, a także rodzaju komórek, do których wprowadzany jest wektor [1,25,56]. Do wprowadzania genów składających się z kilku podjednostek stosowane jest ich połączenie za pomocą poliaminokwasowego linkera (tzw. **fuzja genowa**). W rezultacie z jednego genu powstaje mRNA, ulegające następnie translacji do jednego, ciągłego peptydu (ryc. 5).

W tabeli 1 zebrano przykładowe konstrukty wektorów wirusowych, stosowane do modyfikacji komórek dendrytycznych,

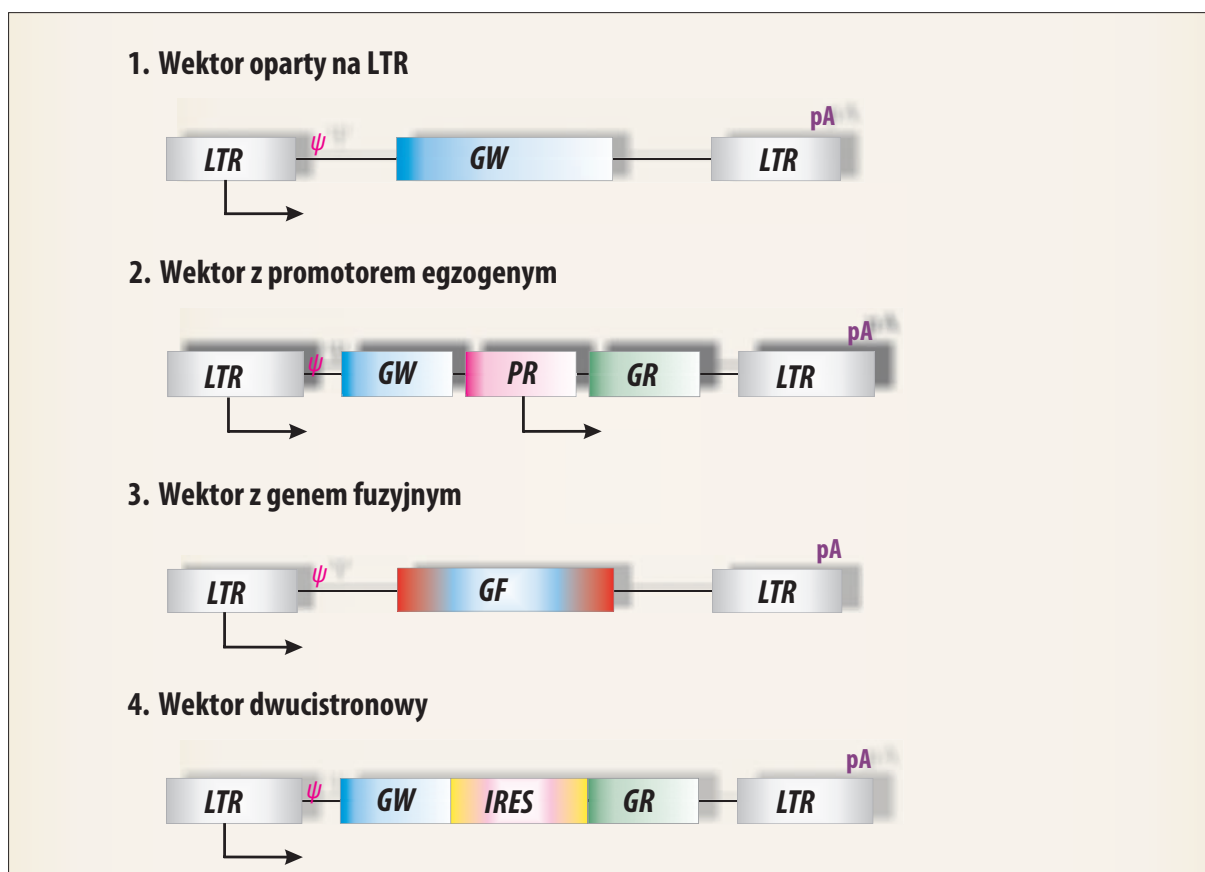




Ryc. 3. Organizacja sekwencji RNA wirusa; genom wirionu retrowirusowego budują sekwencje kodujące (geny *gag*, *pol* i *env*) oraz niekodujące. Sekwencja niekodująca utworzona jest przez umieszczone na obu końcach RNA długie powtórzenia końcowe – LTR (long terminal repeats). Każdy LTR jest zbudowany z trzech regionów: sekwencji unikatowych **U3** i **U5** (unique) oraz fragmentu **R** (redundant). Regiony LTR rozpoczynają i kończą sekwencje *att*, miejsca sygnału integracyjnego, pomiędzy którymi odbywa się integracja genomu. Obszar **LTR 5'** zawiera region **promotor/enhancer** umiejscowiony w regionie U3. Promotor kieruje polimerazę RNA do specyficznego miejsca inicjacji, zaś enhancer ułatwia transkrypcję nawet nie będąc w sąsiedztwie miejsca inicjacji. Region U5 jest odpowiedzialny za integrację z DNA gospodarza oraz za konstrukcję wirionów. Na końcu 5' znajduje się sekwencja **PBS** (primer binding site) wiążąca starterowe tRNA. Fragment **LTR 3'** zawiera fragment **poliA** umiejscowiony w obszarze R/U5. Na końcu 3' znajduje się sekwencja **PPT** (polypurine tract), która tak samo jak PBS pełni istotną rolę w procesie odwrotnej transkrypcji. Sygnał pakujący Ψ , niezbędny w procesie włączenia genomu wirusa w kapsyd oraz sygnał **SD** (splice donor) znajdują się za fragmentem LTR 5'. Pomędzy genami *pol* i *env*, przed LTR 3' znajduje się sygnał **SA** (splice acceptor) [21,9,17,58]



Ryc. 4. Schemat konstrukcji wektora retrowirusowego [wg 9,17]; uzyskanie wektora retrowirusowego wymaga fizycznego rozdzielania poszczególnych genów wirionu na elementy **cis**- i **trans**-. Wektor (szkielet) retrowirusowy odpowiedzialny za przeniesienie wprowadzanego genu ma zredukowane lub częściowo nieczynne (defektywne) wirusowe elementy **cis**- odpowiedzialne za odwrotną transkrypcję wprowadzanego genu, jego integrację z genomem komórki gospodarza oraz ekspresję. Na **geny** sekwencji aktywnych **cis**- składają się: dwie jednostki **LTR**, sygnał pakujący Ψ oraz regiony sekwencji wiążących **PBS** (primer binding site) i **PPT** (polypurine tract). Pozostałe niezbędne fragmenty genomu wirusowego znajdują się w elemencie **trans**-, który pełni funkcję pomocniczą i umożliwia wytwarzanie osłonek wirusowych. Na element **trans**- składają się geny: **gag** – kodujące niektóre ze strukturalnych białek wirusa, **pol** – kodujące częściowo jego białka enzymatyczne oraz **env** – kodujące białka osłonki wirusa, z których formowana jest osłonka wirusowa (ryc. 3) [35,17,37,56]



Ryc. 5. Typy wektorów retrowirusowych; **GW** – gen wprowadzany, **PR** – promotor egzogenny, **GR** – gen reporterowy, **pA** – sygnał poliadenylacji, **LTR** – długie powtórzenia końcowe, **IRES** – wewnętrzny sygnał translacji, **GF** – gen fuzyjny, Ψ – retrowirusowy sygnał pakujący [wg 9,37]

proponowane przez różne grupy badawcze. Należy pamiętać, że wybór strategii konstrukcji wektorowej musi być podyktowany pożądanym efektem końcowym. W zależności bowiem od leczonego schorzenia, w jednym przypadku konieczna jest długotrwała ekspresja wprowadzonego genu w niewielkiej populacji zmodyfikowanych komórek, w innym zaś – krótkotrwały wysoki poziom produktu tego genu [37,56,79].

OPTIMALIZACJA PROCESU TRANSDUKCJI DC

Niedojrzałe DC łatwo poddają się transdukcji za pośrednictwem wektorów retrowirusowych, pod warunkiem, że wektory te charakteryzują się dużą wydajnością infekcji wyrażaną w jednostkach MOI (multiplicity of infection), czyli liczbą zakaźnych cząsteczek wirusowych przypadających na jedną komórkę docelową. Zastosowanie nośników retrowirusowych nie wpływa na czas życia DC, nie powoduje też efektu cytopatogenego ani cytolitycznego [33,73]. W przeciwieństwie do wektorów opartych na pokswirusach czy wirusie HSV, wprowadzenie wektorów retrowirusowych nie powoduje dojrzewania DC ani zmiany ich fenotypu [27,33]. Jednak im bardziej dojrzała jest komórka DC, tym transfer genu jest trudniejszy, co jest związane z obniżeniem zdolności tych komórek do proliferacji.

W niewielu z opublikowanych dotychczas badań poruszono kwestię, jak zmiany w konstrukcji wektora mogą wpływać na skuteczność transferu genów cytokin do komórek DC. Prace takie są jednak bardzo istotne. Na przykład, ze-

spół Lindemanna [41] wykazał swoiste wygaszanie ekspresji wprowadzonego transgeny przenoszonego na wektorze retrowirusowym w trakcie różnicowania się komórek progenitorowych w kierunku DC. Obserwacja ta dotyczyła transgeny, którego promotorem był LTR, podczas gdy ekspresja transgeny w komórkach z wprowadzonym wektorem zawierającym promotor CMV utrzymywała się na stałym poziomie.

Zdolność retrowirusów do zakażenia wyłącznie komórek dzielących się oraz swoistość zakażenia przez rozpoznawanie unikalnego receptora na powierzchni komórki pozwala na konstruowanie wektorów selektywnie skierowanych, czyli o tzw. silnym tropizmie komórkowym. Czynnikiem warunkującym tropizm i infekcyjność rekombinowanych retrowirusów jest dobór białek osłonki wirusa, dostarczanych przez komórki linii pakującej. Obecnie stosowane komórki pakujące wektorów retrowirusowych dzieli się – ze względu na powinowactwo do komórek zakażanych – na linie amfotropowe, wytwarzające osłonki mające powinowactwo do większości komórek ssaków, oraz ekotropowe, wytwarzające cząstki wirusowe zakażające wyłącznie komórki mysie i szczurze. Istnieją także pseudotypowe linie pakujące, wytwarzające białka pochodzące z gatunków wirusów nie należących do rodziny retrowirusów, na przykład białka G z wirusa VSV (vesicular stomatitis virus) czy białka osłonkowe GaL V (gibbon ape leukemia virus) [35,37].

W celu transdukcji komórek DC zarówno ludzkich, jak i mysich, zespoły badawcze wykorzystują różne linie pa-



Tabela 1. Przykłady konstrukcji wektorów retrowirusowych i ich wykorzystania w transdukcji komórek dendrytycznych

Cytokina	Konstrukcja wektora	Pochodzenie komórek DC	Szkielet wektora	Piśmiennictwo
IL-12	wektor dwucystronowy ekspresja podjednostek p40 i p35 połączonych sekwencją IRES, prowadzona z promotora LTR 5' wektora pMFGS	ludzkie	wektor pMFGS (pochodzący z retrowektora MLV), nie zawiera genów selekcyjnych; stosowany w badaniach z wykorzystaniem sekwencji antygenów przeciwnowotworowych bazę wektorową pMFGS stosuje się również do przenoszenia mysich cytokin	[3]
IL-12	wektor z genem fuzyjnym (linker genowy) * z podjednostki p40 usunięto kodon terminacyjny, a z p35 sekwencję sygnałową; obie podjednostki połączono sekwencją trzech powtórzeń aminokwasów GlyGlyGlySer; * obie podjednostki mysiej mIL-12 zostały połączone linkerem aminokwasowym w PCR zakładowym	ludzkie mysie	* generacja sztucznego linkera zapewnia jednoczesne i równoilościowe wytwarzanie obu podjednostek IL-12 wektor pMX, ekspresja genu oparta na LTR * wektor pMFGS (pochodzący z MLV)	[6] [4]
IL-2	wektor pojedynczy Pojedynczy gen, bez genu reporterowego	mysie	jako nośnik wykorzystano wektor pMX do przenoszenia pojedynczego genu (IL-2, GFP)	[7]
IL-7	wektor z egzogennym promotorem Gen ludzkiej IL-7 pod kontrolą promotora LTR, gen reporterowy <i>neor</i> pod kontrolą egzogennego promotora SV40 wektor dwucystronowy hIL7 rozdzielone IRES wraz z genem reporterowym LNGFr (low – affinity nerve growth factor receptor)	ludzkie ludzkie	* wektor pLXSN, pochodzący z MLV, * wektor pLXSN	[80] [10]
IFN-γ	wektor pojedynczy wprowadzono do komórek samodzielnie lub w obecności genów selekcyjnych (reporterowych) – genów oporności na antybiotyki np. neomycynę <i>neor</i> czy <i>lacZ</i> genów kolorowych białek np. wzmocnionego zielonego białka EGFP	ludzkie	wektor pMFGS	[3] [2]
IL-10	gen mysiej IL-10 lub gen IL-10 pozyskanej z wirusa Epsteina-Barr	mysie	wektor pMFG również z wprowadzonym reporterowym genem EGFP,	[75] [77] [76] [42] [15]
TGF-β	gen ludzkiego TGF-β	mysie	wektor pMFG	[74]
IL-4	gen interleukiny 4	mysie	wektor pRET6 zawiera sekwencje LTR wyprowadzone z wirusa MSV (myeloproliferative sarcoma virus).	[49]

kujące wytwarzające wektory retrowirusowe. Wciąż jednak niewiele jest danych określających zależność między typem linii pakującej, pochodzeniem komórek DC a rodzajem zastosowanego szkieletu retrowirusowego. Powszechnie stosowaną jest linia pakująca mysich komórek fibroblastycznych PA 317, w której wytwarzanie amfotropowych białek osłonki oraz pakowanie wektora odbywa się w oparciu o geny pochodzące z wirusa MLV, wprowadzone na jednym wspólnym plazmidzie [37]. Do innych często używanych linii pakujących należą ekotropowa linia mysich fibroblastów embrionalnych GP+E86 [67] oraz jej wariant amfotropowy GP+envAM-12 [41,46]. Tutaj infor-

macja genetyczna odpowiedzialna za sygnał pakujący oraz za wytwarzanie osłonek została rozdzielona na dwa osobne plazmidy. Jeden zawiera geny *gag*, *pol*, drugi przenosi informację o rodzaju osłonki. Inną używaną linią jest linia PG 13 z ekspresją białek osłonki GaL V [44]. Niektóre zespoły badawcze stosują również ludzką amfotropową linię komórek epitelialnych BOSC 23, która zapewnia dużą wydajność transdukcji mysich komórek izolowanych ze szpiku kostnego [55,74].

Do transdukcji komórek DC, zarówno ludzkich, jak i mysich, stosuje się różne procedury. Jedną z nich zakłada

24-godzinna inkubację modyfikowanych komórek z za-
każnym wektorem wirusowym w obecności odpowied-
nich cytokin (np. GM-CSF, TNF- α , SCF, IL-4) pobu-
dzających komórki do proliferacji [7,29,74,76]. W celu
zwiększenia wydajności transdukcji są dodawane sub-
stancje ułatwiające kontakt wirus-komórka, np. związki
polikationowe, takie jak polibren czy siarczan protaminy
[5,7,24,29,46,49,51,80]. Inne procedury zalecają stosowa-
nie płytek opłaszczonych fibronektyną [6,10], wirowanie
(1–2 godz, 2400–2500 rpm) lub obniżenie temperatury
w czasie transdukcji do 32°C, co przedłuża okres pół-
trwania wektora wirusowego [24,41,55,76]. Transdukcja
może być powtarzana kilkakrotnie, w odstępach 24-go-
dzinnych [7,24,46,55,76,80]. Stosuje się również kil-
kudniową kokultywację linii pakującej z DC [49,70].
Odpowiedni dobór wszystkich parametrów pozwala na
uzyskanie dużej wydajności transdukcji dochodzącej na-
wet do 70–90% [51].

PERSPEKTYWY WYKORZYSTANIA DC TRANSDUKOWANYCH GENAMI CYTOKIN

Jak już wcześniej podkreślono, transdukcje DC genami
cytokin mogą prowadzić do:

- 1) zmian w profilu wytwarzania cytokin,
- 2) zmian profilu migracji komórek DC w organizmie,
- 3) indukcji dojrzewania komórek lub przedłużenia ich ży-
cia np. przez zahamowanie apoptozy [14,39,43,70].

Niezależnie od postępu badań nad wykorzystaniem wek-
torów wirusowych nadal istnieje kilka kontrowersyjnych
kwestii. Czy obecność, nawet nieczynnych sekwencji wi-
rusowych, pozostawionych w wektorze może dodatkowo
aktywować DC, prowadząc np. do uruchomienia odpowie-
dzi przeciwwirusowej? Czy zastosowanie nowoczesnych
wektorów, do konstrukcji których użyto geny pochodzące
z różnych gatunków wirusów, może wpływać na przeżycie
komórek DC. Czy wirusowe nośniki wektorowe mogą mieć
wpływ na funkcje biologiczne DC, takie jak prezentacja an-
tygeny czy dojrzewanie komórek [14,33,39,41]? Niezależnie
od konieczności odpowiedzi na powyższe pytania pojawia
się coraz więcej przykładów badań mających na celu za-
stosowanie DC jako narzędzia terapeutycznego.

Istnieją prace, w których zarówno okologuzowe jak i doguzowe
podawanie DC z wprowadzonym genem IL-12 powodowało
zahamowanie wzrostu i regresję mysich nowotworów, takich
jak fibrosarkoma MCA205, czerniak B16 czy linia raka płuc
typu Lewis D122, w znacznie wyższym stopniu niż w przy-
padku stosowania niemodyfikowanych DC czy fibroblastów
transdukowanych genami IL-12 [7,55]. Udanego transferu
IL-12 do ludzkich DC za pomocą nośnika retrowirusowe-
go dokonali Akiyama i wsp. wykazując, że izolowane z krwi
pępowinowej komórki CD34⁺ po transdukcji retrowirusem za-
wierającym geny IL-12 są zdolne do różnicowania się do ko-
mórek dendrytycznych oraz skutecznej stymulacji komórek T,
w porównaniu z komórkami kontrolnymi transdukowanymi
retrowirusem z genem zielonego białka, GFP [6].

Uzyskanie DC wytwarzających duże ilości IL-12 stwarza
możliwość wykorzystania ich jako efektywnego narzędzia
nie tylko w immunoterapii nowotworów [6], ale również
wraz z IFN- γ , w zwalczaniu infekcji bakteryjnych [3] czy
w zapobieganiu schorzeniom atopowym np. astmie [40].

Inną cytokiną, wprowadzaną do komórek dendrytycz-
nych jest IL-2. W badaniach Akiyamy i wsp. mysie DC
pochodzenia szpikowego zmodyfikowano genem IL-2.
Transduktanty zastosowano w terapii myszy obciążonych
czerniakiem B16F10 o małej immunogenności, uzyskując
redukcję masy guza i przedłużenie życia myszy [7].

Pojawiły się również prace, w których ludzkie komórki den-
drytyczne, pozyskiwane z hodowli obwodowych komórek
mononuklearnych lub izolowane od pacjentów z ostrą biał-
cząką szpikową (acute myelogenous leukemia – AML),
modyfikowano genem IL-7. Z uzyskanych danych wyni-
ka, że komórki dendrytyczne wytwarzające IL-7 powodują
stymulację proliferacji limfocytów T, zależną od poziomu
wytwarzanej IL-7, oraz efektywnie stymulują cytotoksycz-
ne komórki T [10,80].

Z kolei komórki dendrytyczne z wprowadzonymi genami cy-
tokin modulujących odpowiedź odpornościową (IL-4) lub im-
munosupresyjnych (IL-10, TGF- β) mogą się stać użytecznym
narzędziem w ochronie alopreszczepów lub leczeniu scho-
rzeń o podłożu autodegeneracyjnym [42,59,74,76]. Morita
i wsp. prowadzili badania nad zastosowaniem DC uwalniają-
cych IL-4 w leczeniu doświadczalnego reumatoidalnego zapa-
lenia stawów (rheumatoid arthritis – RA). Zaobserwowano, że
nawet po jednokrotnym podaniu DC transdukowanych wekto-
rem retrowirusowym pRET6-IL-4, zmniejsza się poziom cyto-
kin zapalnych w miejscach objętych schorzeniem [49]. Z kolei
zespół Takayamy analizował wpływ transdukcji genami my-
siej IL-10 lub wirusowej IL-10 kodowanej przez wirus EBV
(vIL-10). Wirusowa IL-10 ma wysoką homologię do ssaczjej
IL-10 nie ma jednak jej zdolności do aktywowania komórek T.
Wykazano, że DC modyfikowane genem mysiej IL-10 stymu-
lowały powstawanie komórek CTL i aktywność komórek NK.
W myślim modelu transplantacyjnym, transdukowane mIL-10
komórki DC zmieszane z komórkami fibrosarkomy MCA205
wpływały na zahamowanie wzrostu guza. Gdy tymczasem DC
modyfikowane vIL-10 powodowały zmniejszenie odpowiedzi
CTL i nie wpływały na aktywność NK *in vitro*. Pojawiły się
przesłanki przemawiające za tym, że wykorzystanie DC tran-
sdukowanych vIL-10 dawałoby możliwość przedłużenia czasu
przeżycia alopreszczepów przez blokowanie odpowiedzi od-
pornościowej [76]. Jednak badania zespołu Buonocore'a nie
potwierdziły immunosupresyjnego działania vIL-10 w warun-
kach *in vivo* [15]. Zespół Takayamy wykazał również, że DC
transdukowane wektorem retrowirusowym zawierającym gen
TGF- β , charakteryzowały się wyraźnie zmniejszoną zdolno-
ścią do aktywacji komórek T, mimo to nie wpływały na prze-
dłużenie przeżycia alopreszczepu [74].

Terapia wykorzystująca modyfikowane genami cytokin ko-
mórki DC wydaje się potencjalnie bezpieczną i stosunkowo
łatwą do zastosowania u pacjentów obciążonych nowotwo-
rami [14]. Jak dotąd badania nad szczepionkami przeciwno-
wotworowymi opartymi na transdukowanych DC skupiają
się głównie na optymalizacji protokołów terapeutycznych
[14,39,45,54]. Proponuje się też zastosowanie wektorów
selektywnie rozpoznających antygeny powierzchniowe DC
np. DEC-205 (CD205) lub wektora z promotorem swoi-
ście aktywnym w komórkach DC (DC-specific promoter),
co pozwoliłoby na tzw. terapię celowaną (targeting thera-
py) [54]. Czy jest to pomysł na skuteczniejszą, niż do tej
pory, terapię z zastosowaniem transdukowanych komórek
dendrytycznych – pokaże najbliższa przyszłość.



PIŚMIENICTWO

- [1] Adam M.A., Ramesh N., Miller A.D., Osborne W.R.: Internal initiation of translation in retroviral vectors carrying picornavirus 5' non-translated regions. *J. Virol.*, 1991; 65: 4985–4990
- [2] Ahuja S.S., Brown M.R., Fleisher T.A., Ahuja S.K., Malech H.L.: Autocrine activation of hemopoietic progenitor-derived myelo-monocytic cells by IFN- γ gene transfer. *J. Immunol.*, 1996; 156: 4345–4353
- [3] Ahuja S.S., Mummidi S., Malech H.L., Ahuja S.K.: Human dendritic cell (DC)-based anti-infective therapy: engineering DCs to secrete functional IFN- γ and IL-12. *J. Immunol.*, 1998; 161: 868–876
- [4] Ahuja S.S., Reddick R.L., Sato N., Montalbo E., Kostecki V., Zhao W., Dolan M., Melby P.C., Ahuja S.K.: Dendritic cell (DC)-based anti-infective strategies: DCs engineered to secrete IL-12 are a potent vaccine in a murine model of an intracellular infection. *J. Immunol.*, 1999; 163: 3890–3897
- [5] Aicher A., Westermann J., Cayeux S., Willimsky G., Daemen K., Blankenstein T., Uckert W., Dorken B., Pezzutto A.: Successful retroviral mediated transduction of a reporter gene in human dendritic cells: feasibility of therapy with gene-modified antigen presenting cells. *Exp. Hematol.*, 1997; 25: 39–44
- [6] Akiyama Y., Maruyama K., Watanabe M., Yamaguchi K.: Retroviral-mediated IL-12 gene transduction into human CD34⁺ cell derived dendritic cells. *Int. J. Oncol.*, 2002; 21: 509–514
- [7] Akiyama Y., Watanabe M., Maruyama K., Ruscetti F.W., Wiltrout R.H., Yamaguchi K.: Enhancement of antitumor immunity against B16 melanoma tumor using genetically modified dendritic cells to produce cytokines. *Gene Ther.*, 2000; 7: 2113–2121
- [8] Arthur J.F., Butterfield L.H., Roth M.D., Bui L.A., Kiertscher S.M., Lau R., Dubinett S., Glaspy J., McBride W.H., Economou J.S.: A comparison of gene transfer methods in human dendritic cells. *Cancer Gene Ther.*, 1997; 4: 17–25
- [9] Baum C., Ostertag W., Stocking C., von Laer D.: Retroviral vector design for cancer gene therapy. *W: Gene Therapy of Cancer. Second Edition* red.: Lattime E.C., Gerson S.L. Academic Press, New York 2002; 3–29
- [10] Bello-Fernandez C., Stasakova J., Renner A., Carballido-Perrig N., Koenig M., Waclavicek M., Madjic O., Oehler L., Haas O., Carballido J.M., Buschle M., Knapp W.: Retrovirus-mediated IL-7 expression in leukemic dendritic cells generated from primary acute myelogenous leukemias enhances their functional properties. *Blood*, 2003; 101: 2184–2190
- [11] Bjorkdahl O., Dohlsten M., Sjogren H.O.: Vaccination B16 melanoma cells expressing a secreted form of interleukin-1 β induces tumor growth inhibition and an enhanced immunity against the wild-type B16 tumor. *Cancer Gene Ther.*, 2000; 7: 1365–1374
- [12] Bowman L., Grossmann M., Rill D., Brown M., Zhong W.Y., Alexander B., Leimig T., Coustan-Smith E., Campana D., Jenkins J., Woods D., Kitchingman G., Vanin E., Brenner M.: IL-2 adenovector-transduced autologous tumor cells induce antitumor immune responses in patients with neuroblastoma. *Blood*, 1998; 92: 1941–1949
- [13] Bubenik J.: Cytokine gene-modified vaccines in the therapy of cancer. *Pharmacol. Ther.*, 1996; 69: 1–14
- [14] Bubenik J.: Genetically engineered dendritic cell-based cancer vaccines. *Int. J. Oncol.*, 2001; 18: 475–478
- [15] Buonocore S., Van Meirvenne S., Demoor F.X., Paulart F., Thielemans K., Goldman M., Flamand V.: Dendritic cells transduced with viral interleukin 10 or Fas ligand: no evidence for induction of allotolerance *in vivo*. *Transplantation*, 2002; 73: S27–S30
- [16] Byrne S., Halliday G.: Dendritic cells: making progress with tumor regression? *Immunol. Cell Biol.*, 2002; 80: 520–530
- [17] Cannon P.M., Anderson W.F.: Retroviral vectors for gene therapy. *Gene Therapy. American Press*, 2000; 1–16
- [18] Carsana M., Tragni G., Nicolini G., Bersani I., Parmiani G., Anichini A., Sun Y.S., Moller P., Schadendorf D., Sensi M.L.: Comparative assessment of TCRBV diversity in T lymphocytes present in blood, metastatic lesions, and DTH sites of two melanoma patients vaccinated with an IL-7 gene-modified autologous tumor cell vaccine. *Cancer Gene Ther.*, 2002; 9: 243–253
- [19] Cebon J., Davis I., Luft T., Maraskovsky E.: Dendritic cells as recipients of cytokine signals. *W: Dendritic Cells*, red. Lotze M. Thomson A., wyd. 2., Academic Press, London 2001; 187–202
- [20] Chen Y., Emtage P., Zhu Q., Foley R., Muller W., Hitt M., Gauldie J., Wan Y.: Induction of ErbB-2/neu-specific protective and therapeutic antitumor immunity using genetically modified dendritic cells: enhanced efficacy by cotransduction of gene encoding IL-12. *Gene Ther.*, 2001; 8: 316–323
- [21] Coffin J.M., Hughes S.H.: *Retroviruses.*, red.: Varmus H.E., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1997
- [22] Coussens L.M., Werb Z.: Inflammatory cells and cancer: think different! *J. Exp. Med.*, 2001; 193: F23–F26
- [23] Curiel-Lewandrowski C., Mahnke K., Labeur M., Roters B., Schmidt W., Granstein R.D., Luger T.A., Schwarz T., Grabbe S.: Transfection of immature murine bone marrow-derived dendritic cells with the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene potently enhances their *in vivo* antigen-presenting capacity. *J. Immunol.*, 1999; 163: 174–183
- [24] De Veerman M., Heirman C., van Meirvenne S., Devos S., Corthals J., Moser M., Thielemans K.: Retrovirally transduced bone marrow-derived dendritic cells require CD4⁺ T cell help to elicit protective and therapeutic antitumor immunity. *J. Immunol.*, 1999; 162: 144–151
- [25] Douin V., Bornes S., Creancier L., Rochaix P., Favre G., Prats A.C., Couderc B.: Use and comparison of different internal ribosomal entry sites (IRES) in tricistronic retroviral vectors. *BMC Biotechnol.*, 2004; 4: 16
- [26] Dranoff G.: GM-CSF-based cancer vaccines. *Immunol. Rev.*, 2002; 188: 147–154
- [27] Drillien R., Spehner D., Bohbot A., Hanau D.: Vaccinia virus-related events and phenotypic changes after infection of dendritic cells derived from human monocytes. *Virology*, 2000; 268: 471–481
- [28] Eliason J.: Pegylated cytokines – potential application in immunotherapy of cancer. *BioDrugs*, 2001; 15: 705–711
- [29] Fresnay S., Chalmers D.E., Ferrand C., Colomban C., Newton I., Yerly-Motta V., Lienard A., Darodes de Tailly P., Herve P., Tiberghien P., Saas P.: Polybrene and interleukin-4: two opposing factors for retroviral transduction of bone marrow-derived dendritic cells. *J. Gene Med.*, 2002; 4: 601–612
- [30] Gaffen S.L., Liu K.D.: Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine*, 2004; 28: 109–123
- [31] Havenga M., Hoogerbrugge P., Valerio D., Van Es H.H.G.: Retroviral stem cell gene therapy. *Stem Cells*, 1997; 15: 162–179
- [32] Hirschowitz E., Weaver J., Hidalgo G., Doherty D.: Murine dendritic cells infected with adenovirus vectors show signs of activation. *Gene Ther.*, 2000; 7: 1112–1120
- [33] Jenne L., Schuler G., Steinkasserer A.: Viral vectors for dendritic cell-based immunotherapy. *Trends Immunol.*, 2001; 22: 102–107
- [34] Kang W.K., Park C., Yoon H.L., Kim W.S., Yoon S.S., Lee M.H., Park K., Kim K., Jeong H.S., Kim J.A., Nam S.J., Yang J.H., Son Y.I., Baek C.H., Han J., Ree H.J., Lee E.S., Kim S.H., Kim D.W., Ahn Y.C., Huh S.J., Cho Y.H., Lee J.H., Park M.H., Kong G.S., Park E.Y., Kang Y.K., Bang Y.J., Paik N.S., Lee S.N., Kim S.H., Kim S., Robbins P.D., Tahara H., Lotze M.T., Park C.H.: Interleukin-12 gene therapy of cancer by peritumoral injection of transduced autologous fibroblasts: outcome of a phase I study. *Hum. Gene Ther.*, 2001; 12: 671–684
- [35] Kay M.A., Glorioso J.C., Naldini L.: Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat. Med.*, 2001; 7: 33–40
- [36] Kikuchi T., Worgall S., Singh R., Moore M.A., Crystal R.G.: Dendritic cells genetically modified to express CD40 ligand and pulsed with antigen can initiate antigen-specific humoral immunity independent of CD4⁺ T cells. *Nat. Med.*, 2000; 6: 1154–1159
- [37] Kim S.H., Kim S., Robbins P.D.: Retroviral vectors. *Adv. Virus Res.*, 2000; 55: 545–563
- [38] Kirk C.J., Hartigan-O'Connor D., Nickoloff B.J., Chamberlain J.S., Giedlin M., Aukerman L., Mule J.J.: T cell dependent antitumor immunity mediated by secondary lymphoid tissue chemokine: augmentation of dendritic cell-based immunotherapy. *Cancer Res.*, 2001; 61: 2062–2070
- [39] Kirk C.J., Mule J.J.: Gene-modified dendritic cells for use in tumor vaccines. *Hum. Gene Ther.*, 2000; 11: 797–806
- [40] Kuipers H., Heirman C., Hijdra D., Muskens F., Willart M., van Meirvenne S., Thielemans K., Hoogsteden H.C., Lambrecht B.N.: Dendritic cells retrovirally overexpressing IL-12 induce strong Th1 responses to inhaled antigen in the lung but fail to revert established Th2 sensitization. *J. Leukoc. Biol.*, 2004; 76: 1028–1038

- [41] Lindemann C., Schilz A.J., Emons B., Baum C., Low R., Fauser A.A., Kuehlcke K., Eckert H.G.: Down-regulation of retroviral transgene expression during differentiation of progenitor-derived dendritic cells. *Exp. Hematol.*, 2002; 30: 150–157
- [42] Lu L., Lee W.C., Takayama T., Qian S., Gambotto A., Robbins P.D., Thomson A.W.: Genetic engineering of dendritic cells to express immunosuppressive molecules (viral IL-10, TGF-beta, and CTLA4lg). *J. Leukoc. Biol.*, 1999; 66: 293–296
- [43] Lyerly H.K., Clay T., Morse M.A.: Optimizing dendritic cells function by genetic modification. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000; 92: 1198–1199
- [44] MacNeill E.C., Hanenberg H., Pollok K.E., van der Loo J.C., Bierhuizen M.F., Wagemaker G., Williams D.A.: Simultaneous infection with retroviruses pseudotyped with different envelope proteins bypasses viral receptor interference associated with colocalization of gp70 and target cells on fibronectin CH-296. *J. Virol.*, 1999; 73: 3960–3967
- [45] Melero I., Vile R.G., Colombo M.P.: Feeding dendritic cells with tumor antigens: self-service buffet or a la carte?. *Gene Ther.*, 2000; 7: 1167–1170
- [46] Meyer zum Büschenfelde C., Nicklisch N., Rose-John S., Peschel C., Bernhard H.: Generation of tumor-reactive CTL against the tumor-associated antigen HER2 using retrovirally transduced dendritic cells derived from CD34⁺ hemopoietic progenitor cells. *J. Immunol.*, 2000; 165: 4133–4140
- [47] Miller P.W., Sharma S., Stolina M., Butterfield L.H., Luo J., Lin Y., Dohadwala M., Batra R.K., Wu L., Economou J.S., Dubinett S.M.: Intratumoral administration of adenoviral interleukin 7 gene-modified dendritic cells augments specific antitumor immunity and achieves tumor eradication. *Hum. Gene Ther.*, 2000; 11: 53–65
- [48] Morenweiser R.: Downstream processing of viral vectors and vaccines. *Gene Ther.*; 2005; 12(Suppl.1): S103–S110
- [49] Morita Y., Yang J., Gupta R., Shimizu K., Shelden E.A., Endres J., Mulé J.J., McDonagh K.T., Fox D.A.: Dendritic cells genetically engineered to express IL-4 inhibit murine collagen-induced arthritis. *J. Clin. Invest.*, 2001; 107: 1275–1284
- [50] Morse M.A., Nair S.K., Mosca P.J., Hobeika A.C., Clay T.M., Deng Y., Boczkowski D., Proia A., Neidzwiecki D., Clavien P.A., Hurwitz H.L., Schlom J., Gilboa E., Lyerly H.K.: Immunotherapy with autologous, human dendritic cells transfected with carcinoembryonic antigen mRNA. *Cancer Invest.*, 2003; 21: 341–349
- [51] Movassagh M., Baillou C., Cosset F.L., Klatzmann D., Guigon M., Lemoine F.M.: High level of retrovirus-mediated gene transfer into dendritic cells derived from cord blood and mobilized peripheral blood CD34⁺ cells. *Hum. Gene Ther.*, 1999; 10: 175–187
- [52] Murphy A., Westwood J., Teng M., Moeller M., Darcy P., Kershaw M.: Gene modification strategies to induce tumor immunity. *Immunity*, 2005; 22: 403–414
- [53] Musiani P., Modesti A., Giovarelli M., Cavallo F., Colombo M., Lollini P., Forni G.: Cytokines, tumour-cell death and immunogenicity: a question of choice. *Immunol. Today*, 1997; 18: 32–36
- [54] Nestle F.O., Banchereau J., Hart D.: Dendritic cells: on the move from bench to bedside. *Nat. Med.*, 2001; 7: 761–765
- [55] Nishioka Y., Hirao M., Robbins P.D., Lotze M.T., Tahara H.: Induction of systemic and therapeutic antitumor immunity using intratumoral injection of dendritic cells genetically modified to express interleukin 12. *Cancer Res.*, 1999; 59: 4035–4041
- [56] Onions D., Lees G.: The use of retroviral vectors in gene therapy. Technical Bulletin No. 17, Q-One Biotech Ltd., University of Glasgow, Glasgow, 1998
- [57] Pecher G., Haring A., Kaiser L., Thiel E.: Mucin gene (MUC1) transfected dendritic cells as vaccine: results of a phase I/II clinical trial. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2002; 51: 669–673
- [58] Piekarczyk A.: Podstawy wirusologii molekularnej. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2004
- [59] Qin L., Chavin K.D., Ding Y., Tahara H., Favaro J.P., Woodward J.E., Suzuki T., Robbins P.D., Lotze M.T., Bromberg J.S.: Retrovirus-mediated transfer of viral IL-10 gene prolongs murine cardiac allograft survival. *J. Immunol.*, 1996; 156: 2316–2323
- [60] Ravaud A., Delva R., Gomez F., Chevreau C., Douillard J.Y., Peny J., Coudert B., Negrier S., Groupe Francais d'Immunotherapie: Subcutaneous interleukin-2 and interferon alpha in the treatment of patients with metastatic renal cell carcinoma-Less efficacy compared with intravenous interleukin-2 and interferon alpha. Results of a multicenter Phase II trial from the Groupe Francais d'Immunotherapie. *Cancer*, 2002; 95: 2324–2330
- [61] Reis e Sousa C., Sher A., Kaye P.: The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. *Curr. Opin. Immunol.*, 1999; 11: 392–399
- [62] Ribas A., Butterfield L., Glaspy J., Economou J.: Cancer immunotherapy using gene-modified dendritic cells. *Curr. Gene Ther.*, 2002; 2: 57–78
- [63] Ribas A., Butterfield L., Glaspy J., Economou J.: Current developments in cancer vaccines and cellular immunotherapy. *J. Clin. Oncol.*, 2003; 21: 2415–2432
- [64] Rossowska J., Pajtasz-Piasecka E.: Zastosowanie komórek dendrytycznych w immunoterapii nowotworów – osiągnięcia i perspektywy. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2003; 57: 501–518
- [65] Ruggetti A., Biffoni M., Sabbatucci M., Rahimi H., Pellicciotta I., Fattorossi A., Pierelli L., Scambia G., Lavitrano M., Frati L., Nuti M.: Transfected human dendritic cells to induce antitumor immunity. *Gene Ther.*, 2000; 7: 1458–1466
- [66] Saijo Y., Tanaka M., Miki M., Usui K., Suzuki T., Maemondo Hong X., Tazawa R., Kikuchi T., Matsushima K., Nukiwa T.: Proinflammatory cytokine IL-1 beta promotes tumor growth of Lewis lung carcinoma by induction of angiogenic factors: *in vivo* analysis of tumor-stromal interaction. *J. Immunol.*, 2002; 169: 469–475
- [67] Schnell S., Young J.W., Houghton A.N., Sadelain M.: Retrovirally transduced mouse dendritic cells require CD4⁺ T cell help to elicit antitumor immunity: implications for the clinical use of dendritic cells. *J. Immunol.*, 2000; 164: 1243–1250
- [68] Schultz E.S., Berger T.G., Schuler G.: Immunotherapy and dendritic cells. *Enhancer Biotherapy of Cancer*, 2004; 1: 2–7
- [69] Smyth M., Cretney E., Kershaw M.H., Hayakawa Y.: Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunol. Rev.*, 2004; 202: 275–293
- [70] Specht J.M., Wang G., Do M.T., Lam J.S., Royal R.E., Reeves M.E., Rosenberg S.A., Hwu P.: Dendritic cells retrovirally transduced with a model antigen gene are therapeutically effective against established pulmonary metastases. *J. Exp. Med.*, 1997; 186: 1213–1221
- [71] Steinman R.M.: Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS.*, 2003; 111: 675–697
- [72] Su Z., Dannull J., Heiser A., Yancey D., Pruitt S., Madden J., Coleman D., Niedzwiecki D., Gilboa E., Vieweg J.: Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res.*, 2003; 63: 2127–2133
- [73] Szabolcs P., Gallardo H.F., Ciocon D.H., Sadelain M., Young J.W.: Retrovirally transduced human dendritic cells express a normal phenotype and potent T-cell stimulatory capacity. *Blood*, 1997; 90: 2160–2167
- [74] Takayama T., Kaneko K., Morelli A.E., Li W., Tahara H., Thomson A.W.: Retroviral delivery of transforming growth factor-beta1 to myeloid dendritic cells: inhibition of T-cell priming ability and influence on allograft survival. *Transplantation*, 2002; 74: 112–119
- [75] Takayama T., Nishioka Y., Lu L., Lotze M.T., Tahara H., Thomson A.W.: Retroviral delivery of viral interleukin-10 into myeloid dendritic cells markedly inhibits their allostimulatory activity and promotes the induction of T-cell hyporesponsiveness. *Transplantation*, 1998; 66: 1567–1574
- [76] Takayama T., Tahara H., Thomson A.W.: Differential effects of myeloid dendritic cells retrovirally transduced to express mammalian or viral interleukin-10 on cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell functions and resistance to tumor growth. *Transplantation*, 2001; 71: 1334–1340
- [77] Takayama T., Tahara H., Thomson A.W.: Transduction of dendritic cell progenitors with a retroviral vector encoding viral interleukin-10 and enhanced green fluorescent protein allows purification of potentially tolerogenic antigen-presenting cells. *Transplantation*; 1999; 68: 1903–1909
- [78] Trinchieri G.: Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3: 133–146
- [79] Vile R.: The retroviral life cycle and the molecular construction of retrovirus vectors. *Meth Mol Biol. Vol. 8. Practical Molecular Virology: Viral Vectors for Gene Expression*, red.: M. Collin, The Human Press Inc., Clifton, NJ 1991
- [80] Westermann J., Aicher A., Qin Z., Cayeux S., Daemen K., Blankenstein T., Dörken B., Pezzutto A.: Retroviral interleukin-7 gene transfer into human dendritic cells enhances T cell activation. *Gene Ther.*, 1998; 5: 264–271
- [81] Wysocki P.J., Grabarczyk P., Mackiewicz-Wysocka M., Kowalczyk D.W., Mackiewicz A.: Genetically modified dendritic cells – a new, promising cancer treatment strategy? *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2002; 2: 835–845

