

Komórki dendrytyczne w immunoterapii raka jajnika

Dendritic cells in ovarian cancer immunotherapy

© GinPolMedProject 2 (32) 2014

Artykuł poglądowy/Review article

IWONA WERTEL, WIESŁAWA BEDNAREK, GRZEGORZ POLAK, JUSTYNA SURÓWKA,
MONIKA KOSZŁA, JAN KOTARSKI

I Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii UM w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jan Kotarski

Adres do korespondencji/Address for correspondence:

Iwona Wertel

I Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii UM w Lublinie
ul. Staszica 16, 20-081 Lublin

Tel. +48 81 53278 47, fax. +48 81 5320608, e-mail: iwonawertel@wp.pl

Statystyka/Statistic

Liczba słów/Word count 1700/2063

Tabele/Tables 0

Ryciny/Figures 0

Piśmiennictwo/References 44

Received: 02.01.2014

Accepted: 19.02.2014

Published: 20.06.2014

Praca finansowana z grantu NN 407
160940 oraz NN 407 038537

The work financed from the grant NN
407 160940 and NN 407 038537

Streszczenie

Rak jajnika jest obecnie klasyfikowany na piątym miejscu najczęściej występujących nowotworów u kobiet w Polsce. Pod względem liczby zgonów, nowotwór złośliwy jajnika zajmuje w tej grupie czwarte miejsce. Nieustannie doskonalone techniki operacyjne oraz zmieniające się sposoby leczenia chemicznego nie wpływają istotnie na statystyki umieralności z powodu tego nowotworu. Wiadomo, że komórki nowotworowe rozwijają liczne mechanizmy, które utrudniają ich wykrycie i zniszczenie przez układ odpornościowy, co w konsekwencji wiąże się z niską skutecznością standardowych schematów leczenia. Obiecującą metodą leczenia raka jajnika wydaje się być immunoterapia z wykorzystaniem komórek dendrytycznych, która polega na modyfikacji stanu układu immunologicznego pacjenta. W prezentowanej pracy przedstawiono wyniki dotychczasowych badań, a także perspektywy immunoterapii raka jajnika z wykorzystaniem komórek dendrytycznych.

Słowa kluczowe: komórki dendrytyczne, rak jajnika, immunoterapia

Summary

Ovarian cancer is the fifth most common cancer and the fourth leading cause of cancer death among women in Poland. Despite improvements in surgical techniques and advances in chemotherapy, the overall survival rates still remain unacceptably low. Cancer cells develop many mechanisms to avoid detection and killing by activated effector cells of the host immune system, reducing effectiveness of standard anticancer treatment. One of the most promising approaches to modify immunological status of ovarian cancer patients and induce a tumor specific immune response is dendritic cell-based immunotherapy. In this paper we review the published literature on this subject and present perspectives of dendritic cells use in ovarian cancer immunotherapy.

Key words: DCs, ovarian cancer, immunotherapy

WPROWADZENIE

Układ odpornościowy może rozpoznawać i eliminować komórki nowotworowe przy udziale tych samych mechanizmów, które uczestniczą w zwalczaniu patogenów. Liczne dowody potwierdzają istotną rolę układu immunologicznego w walce z chorobą nowotworową. Należy do nich spontaniczna remisja u chorych na niektóre nowotwory, obecność swoistych limfocytów T-cytotoksycznych w mikrośrodowisku guza lub regionalnych węzłach chłonnych, obecność nacieków monocytarnych, limfocytarnych czy komórek plazmatycznych w obrębie guza, a także zwiększona zachorowalność na niektóre nowotwory u chorych poddanych immunosupresji [1].

Niestety, odpowiedź układu odpornościowego pozostaje nieskuteczna w większości przypadków nowotworów. Komórki nowotworowe rozwijają liczne mechanizmy, które utrudniają ich wykrycie i zniszczenie przez układ immunologiczny. Głównymi mechanizmami ucieczki nowotworu spod nadzoru immunologicznego są niewątpliwie zmiany w ekspresji antygenów czy cząsteczek kostymulujących, bezpośrednia supresja funkcji komórek dendrytycznych (DCs) oraz limfocytów T przez sekrecję cytokin o działaniu immunosupresyjnym tj. transformujący czynnik wzrostu beta (TGFβ), interleukina (IL-10) czy wytwarzanie przez komórki nowotworowe ligandów indukujących apoptotyczną śmierć limfocytów T.

Innym ważnym mechanizmem umożliwiającym ucieczkę komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego jest ekspresja cząsteczek kosupresorowych należących do rodziny białek B7, takich jak B7-H1 (PD-L1), B7-H4 oraz B7-H3 [2-5]. Prowadzone badania wykazały, że komórki raka jajnika oraz mieloidalne DCs infiltrujące raka jajnika wykazują ekspresję cząsteczki B7-H1 (PD-L1), która oddziałując z receptorem PD-1 obecnym na komórkach T wywołuje w nich anergię lub apoptozę [2]. Ponadto w komórkach raka jajnika, a także na makrofagach, tzw. TAMS (*ang. tumor associated macrophages*) stwierdzono ekspresję cząsteczki B7-H4. Wykazano, że B7-H4⁺ TAMS hamują rozwój antygenowo-specyficznej odpowiedzi immunologicznej u chorych na raka jajnika [3,4]. Podobnie cząsteczka B7-H3, której ekspresję wykazano w komórkach raka jajnika oraz komórkach endotelialnych hamuje rozwój przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej [5]. Ponadto istotnym mechanizmem osłabiającym przeciwnowotworową reaktywność immunologiczną u chorych na raka jajnika jest obecność supresorowych populacji komórkowych. Należą do nich: mieloidalne komórki supresorowe MSCs (*ang. Myeloid Suppressor Cells*) [6], limfocyty T regulatorowe (*tumor associated Tregs*) [7], B7-H4⁺ TAMS [3,4] oraz komórki dendrytyczne plazmocytoidalne [8,9].

INTRODUCTION

The immunity system may recognize and eliminate the cancerous cells with the participation of the same mechanisms, which take part in fighting off pathogens. Numerous evidence confirm the significant role of the immunological system in fighting off the carcinoma. It includes the spontaneous remission in patients with some carcinoma, the presence of specific T-cytotoxic lymphocytes in the micro-environment of the tumour or regional lymphatic nodes, the presence of monocytic, lymphocyte infiltration or plasma cells within the tumour, as well as an increased morbidity to some cancers in patients under immunosuppression [1].

Unfortunately, the response of the immunological system remains ineffective in the majority of neoplasms. The cancerous cells develop numerous mechanisms which make difficult their detection and destruction by the immunological system. The main carcinoma escape mechanisms from immunological supervision are undoubtedly changes in the expression of antigens or costimulating molecules, the direct suppression of dendritic cells (DCs) and lymphocytes-T by secretion of cytokines of an immunosuppressive action, that is transforming growth factor beta (TGFβ), interleukin (IL-10) or the creation of ligands inducing the apoptotic death of lymphocytes T and created by cancerous cells.

Another important mechanism allowing the escape of cancerous cells from immunological supervision is the expression of co-suppressive molecules belonging to the family of proteins B7, such as B7-H1 (PD-L1), B7-H4 and B7-H3 [2-5]. The conducted research showed that the cells of ovarian cancer and myeloid DCs infiltrating the ovarian cancer reveal an expression of molecule B7-H1 (PD-L1), which – acting with the receptor PD-1 present in T-cells triggers in them anergy or apoptosis [2]. Moreover, in the ovarian cancer cells, as well as in macrophages, that is TAMS (tumor associated macrophages), we stated molecule B7-H4 expression. We proved that B7-H4⁺ TAMS hinders the antigenic-specific development of immunological response in patients with ovarian cancer [3,4]. Similar B7-H3 molecules, whose expression was proved in the cells of ovarian cancers and in endothelial cells hinder the development of anti-cancerous immunological response [5]. Moreover, an essential mechanism weakening the anti-cancerous immunological reactivity in patients with ovarian cancer is the presence of suppressor cell populations. This includes: myeloid suppressor cells MSCs (Myeloid Suppressor Cells) [6], regulatory lymphocytes T (tumor associated Tregs) [7], B7-H4⁺ TAMS [3,4] and dendritic plasmacytoid cells [8,9].

LECZENIE KLASYCZNE RAKA JAJNIKA

Klasyczne schematy leczenia raka jajnika opierają się na usunięciu chirurgicznym guza i następowej chemioterapii [10].

Najbardziej skutecznym programem leczenia systemowego nowotworu złośliwego jajnika jest skojarzenie pochodnych platyny z taksanami [11]. Do najczęściej stosowanych schematów chemioterapii należą taksany w połączeniu z cisplatyną lub karboplatiną, powtarzane co 21 dni [12].

Jednakże chemioterapia stosowana w zaawansowanym raku jajnika nie gwarantuje wyleczenia, a jedynie nieznacznie wydłuża czas życia pacjentek. Odsetek przeżyć 5. letnich wynosi zaledwie ok. 20-25% dla guzów w III stopniu zaawansowania klinicznego wg FIGO oraz tylko 5% w IV stopniu choroby [13].

IMMUNOTERAPIA RAKA JAJNIKA

Alternatywą leczenia chorych na raka jajnika, wydaje się być immunoterapia przeciwnowotworowa, której głównym celem jest pobudzenie własnych mechanizmów obronnych pacjenta do niszczenia komórek nowotworowych.

W dotychczas stosowanych próbach terapii raka jajnika zastosowanie znalazły przeciwciała monoklonałne skierowane przeciwko antygenom związanym z nowotworem: anti-CA125; Oregovomab-MabB43.13 [14]; anti-HER-2; Trastuzumab [15], anti-MUC-1;HMFG1 [16], przeciwciała anti-idiotypowe (anti-idiotypic Abagovomab; ACA-125) [17], cytokiny (IL-2, IFN- α , IFN- γ) [18] oraz szczepionki [19].

Szczepionki przeciwnowotworowe mogą być oparte o wykorzystanie peptydów, całych komórek nowotworowych, białek szoku termicznego oraz komórek dendrytycznych [20]. Wykorzystanie komórek dendrytycznych w terapii raka jajnika budzi duże nadzieje.

Szczepionki przeciwnowotworowe na bazie DCs stanowią formę immunoterapii adoptywnej, w której do walki z nowotworem wykorzystuje się komórki układu odpornościowego aktywowane poza organizmem pacjenta antygenami nowotworowymi. Początkowo wyróżniono dwie grupy antygenów nowotworowych: antygeny swoiste dla nowotworu (*ang. tumor specific antigens – TSA*), które występują wyłącznie na komórkach nowotworowych oraz antygeny związane z nowotworem (*ang. tumor associated antigens – TAA*), które w większości nie są swoiste dla nowotworu i występują także na komórkach prawidłowych organizmu. Obecnie antygeny nowotworowe klasyfikowane są w oparciu o ich molekularną strukturę i źródło pochodzenia. Biorąc pod uwagę wymienione kryteria wyróżniono antygeny: różnicowania, nadekspresji/amplifikacji, mutacyjne, nowotworowo-jądrowe, rakowo-płodowe oraz wirusowe [21]. Do antygenów nowotworowych wywołujących reakcję immunologiczną w przypadku raka jajnika należą: HER2/neu [22], MUC1 [23], OA3 [24], CA-125 [25], receptor α kwasu foliowego [26],

CLASSICAL TREATMENT OF OVARIAN CANCER

Classical schemes of ovarian cancer treatment rely on the surgical removal of the tumour and subsequent chemotherapy [10].

The association of platine derivants with taxanes is the most effective programme of systemic treatment of the malignant ovarian cancer [11]. The most frequently applied schemes of chemotherapy are taxanes in connection with cisplatin or carboplatin, repeated every 21 days [12].

However, chemotherapy applied in advanced ovarian cancer does not guarantee recovery, and only slightly elongates the lifespan of patients. The percentage of survivals of five-year-olds amounts only to about 20-25% tumours in the III level of clinical advancement according to FIGO and only 5% in the IV level of the disease [13].

THE IMMUNOTHERAPY OF THE OVARIAN CANCER

An alternative to the treatment of patients with ovarian cancer seems to be anti-cancerous immunotherapy, whose main aim is the activation of patient's defense mechanisms to destroy cancerous cells.

In the so-far applied attempts of ovarian cancer therapy, monoclonal antigens were applied, directed at antigens related with the neoplasm: anti-CA125; Oregovomab-MabB43.13 [14]; anti-HER-2; Trastuzumab [15], anti-MUC-1;HMFG1 [16], anti-idiotypic antigens (anti-idiotypic Abagovomab; ACA-125) [17], cytokines (IL-2, IFN- α , IFN- γ) [18] and vaccins [19].

Anti-neoplastic vaccins may rely on the use of peptides, whole cancerous cells, proteins of circulatory shock and dendritic cells [20]. The use of dendritic cells in the ovarian cancer therapy brings new hopes.

Anti-cancerous vaccins on the base of DCs constitute a form of adoptive immunotherapy, in which the cells of the immunological system activated beyond the patient's organism with cancerous antigens are used for fighting off the neoplasm. Initially, we differentiated two groups of neoplastic antigens: tumor specific antigens – TSA, which occur exclusively in neoplastic cells tumor associated antigens – TAA, which in majority are not neoplasm-specific and occur also in the organism proper cells. At present, neoplastic antigens are classified on the basis of their molecular structure and source of origin. Taking into consideration the mentioned criteria, we distinguished the following antigens: differentiation, overexpression/amplification, mutational, neoplastic and testicular, cancerous and foetal, and viral [21]. The following belong to neoplastic antigens triggering an immunological reaction in case of ovarian cancer: HER2/neu [22], MUC1 [23], OA3 [24], CA-125 [25], receptor α of folic acid [26], TAG-72 [27], mezotelin [28], NY-ESO-1 [29], sialyl-Tn [30].

TAG-72 [27], mesotelina [28], NY-ESO-1 [29], sialyl-Tn [30].

Proces generacji DCs *in vitro* obejmuje kilka etapów: izolację komórek prekursorowych, stymulację ich różnicowania w niedojrzałe DCs, stymulację antygenami nowotworowymi, a następnie indukcję dojrzewania komórek dendrytycznych. Wygenerowane w ten sposób DCs podaje się chorym w postaci szczepionki [31]. Głównym zadaniem immunoterapii przy użyciu DCs jest indukcja swoistej i skutecznej odpowiedzi immunologicznej przeciwko antygenom nowotworowym.

•ródłem komórek dendrytycznych mogą być komórki macierzyste CD34⁺ izolowane z krwi pępowinowej, krwi obwodowej czy szpiku kostnego, a także monocyty krwi obwodowej [32]. Komórki CD34⁺ różnicują w DCs pod wpływem cytokin tj. GM-CSF i TNF α [33]. Wzbogacenie hodowli innymi czynnikami tj. SCF (*ang. stem cell factor*) oraz Flt3 ligand (Flt3L) zwiększa odsetek krążących DCs oraz nasila odpowiedź immunologiczną. Najczęściej wykorzystywanym źródłem DCs są monocyty krwi obwodowej (CD14⁺). W badaniach *in vitro* wykazano, że monocyty stymulowane rekombinowanymi ludzkimi (rh) cytokinami tj. rhGM-CSF i rhIL-4/IL-13 mogą przekształcać się w niedojrzałe komórki dendrytyczne zdolne do wychwytywania i przetwarzania antygeny [32]. Uzyskane w ten sposób niedojrzałe DCs można stymulować antygenami nowotworowymi w celu otrzymania wyspecjalizowanych komórek prezentujących antygen. Pod wpływem rhTNF α i/lub CD40L przekształcają się one w komórki dojrzałe, zdolne do prezentacji antygeny i stymulacji dziewięciu limfocytów T [34]. Wygenerowane w ten sposób DCs charakteryzują się wysoką ekspresją molekuł kostymulujących CD80, CD86, oraz wysoką ekspresją antygenów MHC klasy II. Do stymulacji DCs wykorzystywane są lizaty komórek nowotworowych, uzyskane z nich mRNA, cDNA lub ciała apoptotyczne [31]. Uzyskane *in vitro* DCs stymulują proliferację swoistych limfocytów cytotoksycznych skierowanych przeciwko autologicznym komórkom nowotworowym [34].

Skuteczność szczepionek z DCs analizowano w innych nowotworach w wielu próbach klinicznych. Najczęściej stosowano je w leczeniu czerniaka złośliwego, który jest nowotworem silnie immunogennym, a jego antygeny są stosunkowo dobrze zdefiniowane [1]. Sukcesem terapeutycznym okazało się opracowanie i wprowadzenie przez FDA do leczenia szczepionki Provenge. Szczepionka Provenge, składająca się z komórek dendrytycznych stymulowanych kwaśną fosfatazą sterczową i GM-CSF, wykazała wpływ na przedłużenie życia pacjentów z hormonoopornym rakiem prostaty o około 4,5 miesiąca w porównaniu do placebo [35].

U chorych na raka jajnika nie udało się jak dotąd zidentyfikować celu o tak preferencyjnej ekspresji, jak HPV w raku szyjki macicy. Tym niemniej interesującym celem dla immunoterapii raka jajnika wydają się

The generation process of DCs *in vitro* includes several stages: the isolation of progenitor cells, the stimulation of their differentiation into immature DCs, stimulation with neoplastic antigens, and then induction of dendritic cells maturation. The so generated DCs is administered to patients in the form of vaccin [31]. The main aim of immunotherapy with the use of DCs is the induction of specific and effective immunological response against neoplastic antigens.

The source of dendritic cells may be stem cells CD34⁺ isolated from umbilical cord blood, blood or bone marrow, as well as monocytes of the blood [32]. The CD34⁺ cells differentiate in DCs under the influence of cytokines that is GM-CSF and TNF α [33]. The enrichment of breed with other factors that is SCF (stem cell factor) and Flt3 ligand (Flt3L) increases the percentage of circulating DCs and intensifies the immunological response. The most frequently used source of DCs are blood monocytes (CD14⁺). In *in vitro* tests it was proved that monocytes stimulated with recombinated human (rh) cytokines that is rhGM-CSF and rhIL-4/IL-13 may be transformed into immature dendritic cells capable of detecting and processing the antigene [32]. The so obtained immature DCs may be stimulated with neoplastic antigens in order to obtain specialised cells presenting the antigene. Under the influence of rhTNF α and/or CD40L, they are transformed into mature cells, capable of presenting the antigene and stimulating virgin lymphocytes T [34]. The so generated DCs are characterized with a high expression of co-stimulating molecules CD80, CD86, and a high antigene expression of MHC class II. Lysates of neoplastic cells, mRNA, cDNA or apoptotic bodies obtained out of them are used for the stimulation of DCs [31]. The obtained *in vitro* DCs stimulate the proliferation of specific cytotoxic lymphocytes directed at the autological neoplastic cells [34].

The effectiveness of vaccins with DCs was analysed in other neoplasms in many clinical trials. Most frequently we applied them in the treatment of malignant melanoma, which is a strongly immunogenic neoplasm, and its antigens are relatively well-defined [1]. The drawing up and introduction of the Provenge vaccin by FDA as a treatment method turned out to be a success. The Provenge vaccin, consisting of dendritic cells stimulated by prostatoic acid phosphatase and GM-CSF, revealed its influence on the elongation of patients' life with hormon-resistant prostate cancer by 4,5 months in comparison with the placebo [35].

In patients with ovarian cancer, we did not succeed to identify an aim with such preferential expression, as HPV in the cervical cancer. Nevertheless, an interesting aim for ovarian cancer immunotherapy seem to be antigens, that is EGF receptors: HER2 (cerbB2,HER2/neu), neoplastic and testicular antigens: NY-ESO-1, serine proteases that is the stratum corneum chymotryptic enzyme (SCCE), hepsyn, matriptase, epithelial mucins: MUC1 (peptides M1.1 and M1.2), MUC2,

być antygeny tj. receptory EGF: HER2 (cerbB2,HER2/neu), antygeny nowotworowo-jądrowe: NY-ESO-1, proteazy serynowe tj. enzym chymotropowy warstwy rogowej (SCCE), hepsyna, matriptaza, nabłonkowe mucyny: MUC1 (peptydy M1.1 i M1.2), MUC2, MUC4, MUC5AC czy inne antygeny: antygen Ca125, białko p53, mezotelina, HE4 [36].

Rozwój antygenowo-swoistej odpowiedzi z udziałem DCs obserwowano nawet u chorych z zaawansowanym rakiem jajnika. Wykazano, że DCs stymulowane lizatami guza, eluowanymi peptydami [37] lub hybrydy DCs z komórkami guza [38] indukowały HLA (*ang. human leukocyte antigen*) klasy I zależną odpowiedź cytotosyczną przeciwko autologicznym komórkom guza. Co więcej, DCs inkubowane z martwymi komórkami pierwotnego guza jajnika, stymulowane do dojrzewania ligandem CD40 i TRANCE (*ang. tumor necrosis factor related activation-induced cytokine*) zdolne są do indukowania komórek T wydzielających IFN-g [39].

W literaturze naukowej niewiele jest doniesień klinicznych dotyczących immunoterapii raka jajnika z wykorzystaniem DCs. W badaniu przeprowadzonym przez Brossarta i wsp. [40] pacjentkom podawano 3. krotnie, podskórnice, w odstępach 2. tygodniowych szczepionkę z DCs stymulowaną produktami protoonkogenów HER-2/neu oraz nabłonkową mucyną (MUC1). U chorych poddanych szczepieniu obserwowano poprawę lub stabilizację choroby.

W kolejnej próbie terapeutycznej I fazy u trzech spośród sześciu pacjentek z rakiem jajnika, szczepionych DCs stymulowanymi lizatami komórek nowotworowych i białkiem KLH (*ang. keyhole limpet haemocyanin*), obserwowano stabilizację choroby trwającą od 25-45. tygodni. U dwóch kobiet włączonych do badań obserwowano rozwój antygenowo-specyficznej odpowiedzi immunologicznej [41].

W innym badaniu klinicznym przedstawiono wyniki szczepienia 61. letniej chorej na raka jajnika, u której, pomimo skojarzonego leczenia operacyjnego i chemioterapii stwierdzono progresję choroby nowotworowej. W szczepionce wykorzystano DCs stymulowane mRNA dla receptora alfa kwasu foliowego (FR- α). Szczepionkę podawano 10. krotnie w odstępach czterotygodniowych. W obrazie tomografii komputerowej po 3. miesiącach od ostatniej dawki wykazano częściową remisję, natomiast po 16. miesiącach stwierdzono ponad 50% regresję przerzutów do węzłów chłonnych. Stężenie markera CA-125 znacznie zmniejszyło się już po 4. tygodniach od pierwszej szczepionki i po 11. miesiącach od zakończenia leczenia utrzymywało się w granicach normy [42].

W kolejnym badaniu klinicznym I/II fazy, u 11. chorych na raka jajnika zastosowano autologiczne DCs stymulowane antygenami nowotworowymi Her2 /neu, hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*) i PADRE (*pan-DR epitope*). Dodatkowo na dwa dni przed szczepieniem pacjentki otrzymywały cyklofosfa-

MUC4, MUC5AC or other antigens: antigen Ca125, protein p53, mezotelin, HE4 [36].

The development of antigen-specific response with the participation of DCs was observed even in patients with advanced ovarian cancer. It was proved that DCs stimulated with tumour lysates, eluted peptides [37] or DCs hybrids with tumour cells [38] were inducing HLA (human leukocyte antigen) of I class-dependent cytotoxic response against autologic tumour cells. What's more, DCs incubated with dead cells of the initial ovarian tumour, growth-stimulated for maturation with ligand CD40 and TRANCE (tumor necrosis factor related activation-induced cytokine), are capable of inducing T cells excreting IFN-g [39].

In scientific literature, there are not many clinical reports concerning the immunotherapy of ovarian cancer with the use of DCs. In a research conducted by Brossarta et al. [40], patients were administered with a vaccin, three times, subcutaneously, in two-week-intervals. The vaccin was with DCs, stimulated with products of protooncogenes HER-2/neu and the epithelial mucin (MUC1). In vaccinated patients, there was a disease improvement or stabilisation.

In subsequent therapeutic trial of the I phase, in three out of six patients with ovarian cancer, vaccinated with DCs stimulated with lysates of neoplastic cancers and KLH protein (keyhole limpet haemocyanin), we observed a stabilisation of the disease lasting from 25 to 45 weeks. In two women included to the researches, we observed a development of antigen-specific immunological response [41].

In a different clinical research, we presented the results of the vaccination of a 61-year-old patient suffering from ovarian cancer in whom, despite associated surgical treatment and chemotherapy, we stated a progression of the neoplastic disease. In the vaccin, we used DCs stimulated mRNA for the alfa receptor of folic acid (FR- α). The vaccin was administered 10 times in four-week-intervals. In the computed tomography image, after 3 months from the latest dose, we proved a partial remission, whereas after 16 onths we stated a more than 50% regression of metastases to lymphatic nodes. The concentration of CA-125 marker has significantly reduced already after 4 weeks from the first vaccin and after 11 months from the end of the treatment remained with the limits of normal [42].

In a subsequent clinical research I/II phase, in 11 patients with ovarian cancer we applied autologic DCs stimulated with neoplastic antigens Her2 /neu, hTERT (human telomerase reverse transcriptase) and PADRE (pan-DR epitope). Additionally, two days before the vaccination, the patients were receiving cyclophosphamide in order to eliminate regulatory T-lymphocytes. In two out of 11 patients included to the researches, we observed the relapse of the disease. Among 9 women who received all four doses of the vaccin, in 3 patients we observed the relapse of the disease after 6, 17 and 26 months respectively. In the

mid w celu eliminacji limfocytów T regulatorowych. U dwóch spośród 11. pacjentek włączonych do badań zaobserwowano nawrót choroby. Spośród 9. kobiet, które otrzymały wszystkie cztery dawki szczepionki, u 3. chorych obserwowano nawrót choroby odpowiednio po 6, 17 i 26 miesiącach. U sześciu pozostałych pacjentek w ciągu 36. miesięcy obserwowano stabilizację choroby. Trzyletni okres przeżycia wynosił 90% [43].

U większości chorych leczonych immunoterapią komórkową DCs wykazano indukcję odpowiedzi immunologicznej, jednakże jedynie u nielicznych pacjentów obserwowano istotną odpowiedź kliniczną. Za brak skuteczności immunoterapii przeciwnowotworowej, mimo wzbudzenia odpowiedzi immunologicznej mogą być odpowiedzialne populacje komórek regulatorowych: limfocyty T regulatorowe, komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego, subpopulacje DCs o właściwościach tolerogennych, czy makrofagi związane z nowotworem. Stąd też wykorzystanie DCs w immunoterapii raka jajnika wymaga modyfikacji.

Istotne znaczenie dla poprawy wyników immunoterapii ma poszukiwanie antygenów swoistych dla danego nowotworu (*TSA*). Co więcej, uważa się, że szczepionki z DCs powinny być ukierunkowane przeciwko wielu antygenom związanym z tkanką nowotworową. Zalecana jest także optymalizacja warunków hodowli DCs (generacja DCs w obecności IL-15, IFN- α , IL-7). Ponadto szczepienia powinny być poprzedzone podaniem preparatów eliminujących limfocyty T regulatorowe tj. przeciwciała anti-CD25, ONTAK- białko hybrydowe złożone z toksyny błoniczej i IL-2 oraz hamujących ich aktywność (przeciwciała anti-CTLA-4, inhibitory dioksygenazy 2,3-indoleaminy (IDO) [44].

Według ostatnich doniesień, skuteczność immunoterapii można zwiększyć poprzez połączenie immunoterapii z konwencjonalną chemioterapią lub terapią celowaną. Wykazano, że niektóre chemioterapeutyki, którym dotychczas przypisywano wyłącznie efekt immunosupresyjny, wykazują działanie immunomodulujące czy wręcz immunostymulujące na drodze różnych mechanizmów:

- wywierają wpływ na komórki supresorowe tj.: Treg (cyklofosfamid, fludarabina, paklitaksel, docetksel, w połączeniu z karboplatiną i cyklofosfamidem) czy komórki supresyjne pochodzenia mieloidalnego (gemcytabina),
- wpływają na aktywność i dojrzewanie DCs oraz zwiększenie przez nie syntezy IL-12: (metronomic paklitaksel, doxorubicyna, vinkrystyna),
- powodują „uwrażliwienie” komórek nowotworowych na działanie limfocytów cytotoksycznych (CTL) i komórek NK (paklitaksel, cisplatyna, doksorubicyna) [44].

Inną strategią zwiększenia skuteczności immunoterapii może być połączenie immunoterapii z terapią celowaną poprzez zastosowanie przeciwciał monoklonalnych przeciw cząsteczkom hamującym odpowiedź

6 remaining patients during 36 months, we observed disease stabilisation. The three-year survival period amounted to 90% [43].

In the majority of patients treated with cellular immunotherapy DCs, we proved an induction of immunological response, however only in some patients we observed a significant clinical response. The lack of effectiveness in anti-neoplastic immunotherapy, despite arousing immunological response, may result from the regulatory cell populations: regulatory T lymphocytes, suppressory cells of myeloid origin, DCs subpopulations of tolerogenic properties, or macrophages related with the neoplasma. Hence the use of DCs in the ovarian cancer immunotherapy requires modification.

The search for antigens specific for a given neoplasma is of significant importance for the improvement of immunotherapy results (*TSA*). What's more, it is considered that vaccines with DCs should be directed against many antigens related with neoplastic tissue. We also recommend the optimisation of the conditions of DCs culture (generation of DCs in the presence of IL-15, IFN- α , IL-7). Moreover, the vaccines should be preceded with the administration of preparations eliminating regulatory T lymphocytes that is antigens anti-CD25, ONTAK- hybrid protein composed of fibre toxin and IL-2 and inhibiting their activity (antigens anti-CTLA-4, inhibitors of dihydroxylase 2,3-indoleamine (IDO) [44].

According to the latest reports, the effectiveness of the immunotherapy may be increased through the connection of immunotherapy with conventional chemotherapy or targeted therapy. It was proved that some chemotherapeutics with exclusively immunosuppressive effect to date show an immunomodulating action or even immunostimulating following different mechanisms:

- They influence the suppressory cells that is: Treg (cyclophosphamide, fludarabine, paclitaxel, docetaxel, combined with carboplatin and cyclophosphamide) or suppressory cells of myeloid origin (gemcitabine),
- They influence the activity and maturation of DCs and the increased synthesis IL-12: (metronomic paclitaxel, doxorubicin, vincristin),
- They cause 'sensitization' of neoplastic cells on the cytotoxic lymphocytes (CTL) and NK cells (paclitaxel, cisplatin, doxorubicin) [44].

Another strategy to increase the effectiveness of immunotherapy may be the connection of immunotherapy with targeted therapy through the application of monoclonal antigens against molecules inhibiting the immunological response such as B7-H1 (PD-1L), B7-H4, tolerogenic cytokines (IL-10, TGF- β) or chemokines (CCL22, CXCL12) attracting suppressory cell populations in the microenvironment of the tumour [36].

immunologiczną takim jak B7-H1 (PD-1L), B7-H4, tolerogennym cytokinom (IL-10, TGF- β) czy chemokinom (CCL22, CXCL12) przyciągającym supresorowe populacje komórek w mikrośrodowisko guza [36].

PODSUMOWANIE

Opracowanie skutecznej i bezpiecznej metody eliminacji populacji komórek regulatorowych oraz przełamanie immunosupresyjnego wpływu choroby nowotworowej stanowi cel licznych badań. Należy mieć nadzieję, że uzyskane w nich wyniki sprawią, że immunoterapia przestanie być jedynie leczeniem eksperymentalnym i znajdzie trwałe miejsce w rutynowej praktyce klinicznej.

SUMMARY

The goal of numerous researches is to draw up an effective and safe method of elimination of regulatory cell population and overcome the immunosuppressive influence of the neoplastic disease. Let's hope that the obtained results shall lead to a state where immunotherapy stops being an experimental treatment only and finds itself a place in the routine clinical practice.

Piśmiennictwo / References:

1. **Mackiewicz J, Mackiewicz A.** Immunoterapia nowotworów i perspektywy jej rozwoju. *Współczesna Onkol* 2010;14:59-71.
2. **Curiel T, Wie S, Dong H et al.** Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med* 2003;9:562-567.
3. **Kryczek I, Zou L, Rodriguez P et al.** B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *J Exp Med* 2006; 203:871-881.
4. **Tringler B, Liu W, Corral L et al.** B7-H4 overexpression in ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 2006;100:44-52.
5. **Zang X, Sullivan P, Soslow R et al.** Tumor associated endothelial expression of B7-H3 predicts survival in ovarian carcinomas. *Mod Pathol* 2010; 23: 1104-1112.
6. **Gabrilovich D, Bronte V, Chen S et al.** The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 2007;67:425,author reply 426.
7. **Curiel T, Coukos G, Zou L et al.** Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004;10:942-949.
8. **Curiel T, Cheng P, Mottram P et al.** Dendritic cells subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2004;64:5535-5538.
9. **Wertel I, Polak G, Tarkowski R et al.** SDF-1 α /CXCL12 and dendritic cells in ovarian cancer microenvironment. *Ginekolog Pol* 2011;82:421-425.
10. **Kędzia H.** Pierwotne nabłonkowe nowotwory jajnika. W: Nowotwory narządów płciowych kobiety. (Red. Kędzia H.) Ośrodek Wydawnictw Naukowych. Poznań, 1997;43-81.
11. **Wang J, Li A, Karlan B.** Chemotherapy in epithelial ovarian cancer. *Curr Womens Health Rep* 2002;2:20-26.
12. **Neijt J, Engelholm S, Tuxen M et al.** Exploratory phase III study of paclitaxel and cisplatin versus paclitaxel and carboplatin in advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2000;18:3084-3092.
13. **Ozols R, Rubin S, Thomas G et al.** Epithelial ovarian cancer. In: Principles and Practice of Gynecologic Oncology. Hoskins W, Perez C, Young R (Eds.), Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, USA, 2000;981-1057.
14. **Ehlen T, Hoskins P, Miller D et al.** A pilot phase 2 study of oregovomab murine monoclonal antibody to CA125 as an immunotherapeutic agent for recurrent ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2005;15:1023-1034.
15. **Agus D, Gordon M, Taylor C et al.** Phase I clinical study of pertuzumab, a novel HER dimerization inhibitor, in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:2534-2543.
16. **Nicholson S, Bomphray C, Thomas H et al.** A phase I trial of idiotype vaccination with HMFG1 in ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:809-816.
17. **Reinartz S, Köhler S, Schlebusch H et al.** Vaccination of patients with advanced ovarian carcinoma with the anti-idiotypic ACA125: immunological response and survival (phase Ib/II). *Clin Cancer Res* 2004;10:1580-1587.
18. **Berek J, Hacker N, Lichtenstein A et al.** Intraperitoneal recombinant alpha 2-interferon for «salvage» immunotherapy in persistent epithelial ovarian cancer. *Cancer Treat Rev* 1985; 12 Suppl B: 23-32.
19. **Odunsi K, Qian F, Matsuzaki J et al.** Vaccination with an NY-ESO-1 peptide of HLA class I/II specificities induces integrated humoral and T cell responses in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104:12837-12842.
20. **Liu B, Nash J, Runowicz C et al.** Ovarian cancer immunotherapy: opportunities, progresses and challenges. *J Hematol Oncol* 2010;3:7.
21. **Chu C, Kim S, June C et al.** Immunotherapy opportunities in ovarian cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008;8:243-257.
22. **Disis M, Gooley T, Rinn K et al.** Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines. *J Clin Oncol* 2002;20:2624-2632.
23. **Vlad A, Kettel J, Alajez N et al.** MUC1 immunobiology: from discovery to clinical applications. *Adv Immunol* 2004;82:249-293.
24. **Campbell I, Freemont P, Foulkes W et al.** An ovarian tumor marker with homology to vaccinia virus contains an IgV-like region and multiple transmembrane domains. *Cancer Res* 1992;52:5416-5420.

25. **Kenemans P.** CA 125 and OA 3 as target antigens for immunodiagnosis and immunotherapy in ovarian cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1990;36:221-228.
26. **Coliva A, Zaccetti A, Luison E et al.** 90Y Labeling of monoclonal antibody MOv18 and preclinical validation for radioimmunotherapy of human ovarian carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* 2005;54:1200-1213.
27. **Rosenblum M, Shawver L, Marks J et al.** Recombinant immunotoxins directed against the c-erb-2/HER2/neu oncogene product: in vitro cytotoxicity, pharmacokinetics, and in vivo efficacy studies in xenograft models. *Clin Cancer Res* 1999;5:865-874.
28. **Chang K, Pastan I.** Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:136-140.
29. **Odunsi K, Jungbluth A, Stockert E et al.** NY-ESO-1 and LAGE-1 cancer-testis antigens are potential targets for immunotherapy in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 2003;63:6076-6083.
30. **Sandmaier B, Oparin D, Holmberg L et al.** Evidence of a cellular immune response against sialyl-Tn in breast and ovarian cancer patients after high-dose chemotherapy, stem cell rescue, and immunization with Theratope STn-KLH cancer vaccine. *J Immunother* 1999; 22:54-66.
31. **Dallal R, Lotze M.** The dendritic cell and human cancer vaccines. *Curr Opin Immunol* 2000;12:583-588.
32. **Fong L, Engleman E.** Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 2000;18:245-273.
33. **Avigan D.** Dendritic cells: development, function and potential use for cancer immunotherapy. *Blood Rev* 1999;13:51-64.
34. **Tarte K, Klein B.** Dendritic cell-based vaccine: a promising approach for cancer immunotherapy. *Leukemia* 1999;13:653-663.
35. **Higano C, Schellhammer P, Small E et al.** Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer. *Cancer* 2009; 115:3670-3679.
36. **Chiriva-Internati M, Mirandola L, Kast W et al.** Understanding the cross-talk between ovarian tumors and immune cells: mechanisms for effective immunotherapies. *International Rev of Immunol* 2011;30:71-86.
37. **Santin A, Bellone S, Ravaggi A et al.** Induction of ovarian tumor-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes by acid - eluted peptide - pulsed autologous dendritic cells. *Obstet Gynecol* 2000;96:422-430.
38. **Gong J, Nikrui N, Chen D et al.** Fusions of human ovarian carcinoma cells with autologous or allogeneic dendritic cells induce antitumor immunity. *J Immunol* 2000;165:1705-1711.
39. **Schlienger K, Chu C, Woo E et al.** TRANCE- and CD40 ligand-matured dendritic cells reveal MHC class I-restricted T cells specific for autologous tumor in late-stage ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003; 9:1517-1527.
40. **Brossart P, Wirths S, Stuhler G et al.** Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* 2000;96:3102-3108.
41. **Hernando J, Park T, Kübler K et al.** Vaccination with autologous tumour antigen-pulsed dendritic cells in advanced gynaecological malignancies: clinical and immunological evaluation of a phase I trial. *Cancer Immunol Immunother* 2002;51:45-52.
42. **Hernando J, Park T, Fischer H et al.** Vaccination with dendritic cells transfected with mRNA-encoded folate-receptor-alpha for relapsed metastatic ovarian cancer. *Lancet Oncol* 2007;8:451-454.
43. **Chu C, Boyer J, Schullery D et al.** Phase I/II randomized trial of dendritic cell vaccination with or without cyclophosphamide for consolidation therapy of advanced ovarian cancer in first or second remission. *Cancer Immunol Immunother* 2012;61:629-641.
44. **Kandalaf L, Singh N, Liao J et al.** The emergence of immunomodulation: Combinatorial immunochemotherapy opportunities for the next decade. *Gynecol Oncol* 2010;116:222-233.