

Immunoterapia komórkowa w leczeniu nowotworów u psów

Iwona Monika Szopa, Joanna Katarzyna Bujak, Kinga Majchrzak

z Katedry Nauk Fizjologicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

Cellular immunotherapy in canine tumors treatment

Szopa I.M., Bujak J.K., Majchrzak K., Department of Physiological Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

Cellular immunotherapy is a modern method of neoplasm treatment, which involves administration of immune cells that specifically recognize and eliminate tumor cells. This therapy, also referred to as adoptive cell transfer (ACT), has been successfully used to treat hematological malignancies and melanoma in humans. The source of the immune cells used in ACT therapy may be neoplastic tissue or peripheral blood of an oncological patient. Isolated from the blood, peripheral T lymphocytes are genetically modified *ex vivo* to express a chimeric antigen receptor (CAR), against tumor-specific antigens, which allows them to recognize and effectively eradicate cancer cells. However, further development of immunotherapy of solid tumors in humans requires pre-clinical and clinical studies using immunocompetent hosts. Domestic dog, in which tumors arise spontaneously while maintaining the functionality of the immune system, is a suitable research model. Like in humans, neoplasms in dogs are characterized by high intratumoral heterogeneity and the ability to metastasize. Chemo- and radiotherapy protocols are similar, as well as the response to the treatments. Importantly, dogs and humans also share similarities in terms of immune system performance. Herein, we discuss newest research concerning adoptive transfer of T lymphocytes, lymphokine-activated killer (LAK) cells and NK cells in veterinary oncology. Studies on a domestic dog, being a patient of veterinary clinics, are not only important for comparative oncology but are also of great importance in extending the range of anticancer therapies offered for animals.

Keywords: adoptive cell transfer, chimeric antigen receptor, tumor-infiltrating lymphocytes, comparative oncology, dogs.

W medycynie weterynaryjnej, podobnie jak ludzkiej, choroba nowotworowa jest główną przyczyną śmierci, zwłaszcza u starszych psów (1). Guzy złośliwe, charakteryzujące się możliwością tworzenia wtórnych ognisk przerzutowych w węzłach chłonnych lub odległych narządach, są odpowiedzialne za większość zgonów związanych z nowotworami (2, 3). Mimo opracowania różnych strategii walki z rakiem, w wielu przypadkach pozostaje on nadal chorobą nieuleczalną.

Po latach sceptycyzmu w kwestii wykorzystania układu immunologicznego do eliminacji transformowanych komórek, jesteśmy obecnie świadkami rozkwitu immunoterapii nowotworów (4). Jest to nowa i bardzo obiecująca forma leczenia chorób nowotworowych, która obok stosowanych dotychczas chemioterapii i radioterapii może stać się równorzędną metodą terapeutyczną, dającą nadzieję nie tylko na remisję, ale też całkowite wyleczenie pacjentów onkologicznych.

Immunoterapia nowotworów dzieli się na czynną, bierną i adoptywną (5, 6). Czynną formą immunoterapii są szczepionki przeciwnowotworowe, oparte na

podawaniu nowotworowych białek antygenowych i wspomaganii rozpoznawania komórek rakowych poprzez aktywację komórek dendrytycznych prezentujących antygeny (7). Do immunoterapii biernej zalicza się z kolei metody stymulacji układu immunologicznego, np. poprzez stosowanie przeciwciał monoklonalnych lub cytokin. Obecnie w medycynie ludzkiej dużą skuteczność wykazują inhibitory punktów kontroli na limfocytach T, tzw. checkpoint inhibitors. Są to przeciwciała monoklonalne, których działanie polega na blokowaniu sygnału z receptorów hamujących aktywację i namnażanie limfocytów T w mikrośrodkowisku nowotworowym, a tym samym na uwolnieniu ich potencjału (8). Zastosowanie znalazło też podawanie interleukiny 2 (IL-2), zwanej czynnikiem wzrostu limfocytów, która stymuluje proliferację komórek układu immunologicznego oraz produkcję interferonu gamma (IFN- γ), przyczyniając się do niszczenia komórek nowotworowych (9). Ostatnią formę stanowi immunoterapia adoptywna, która wykorzystuje efektorowe komórki układu immunologicznego jako leki (10). Charakteryzuje się ona wysoką efektywnością u ludzi, zwłaszcza w leczeniu hematologicznych nowotworów złośliwych i czerniaków (11, 12). Sukces tej metody opiera się na wprowadzeniu do organizmu pacjenta jako leku żywych komórek, które mogą się samoistnie namnażać, a co najważniejsze, specyficznie rozpoznają antygeny na komórkach nowotworowych, co pozwala na ich precyzyjne niszczenie (13).

Adoptywny transfer komórek

Główną formą immunoterapii komórkowej jest adoptywny transfer komórek (ACT, adoptive cell transfer). ACT polega na podaniu do krwiobiegu pacjenta onkologicznego miliardów (1×10^{11}) autologicznych, żywych komórek układu immunologicznego, zdolnych do eliminacji nowotworu. Źródłem komórek efektorowych do transferu może być sam guz nowotworowy lub krew obwodowa pacjenta. W pierwszym przypadku z tkanki nowotworowej lub lokalnych węzłów chłonnych izolowane są tzw. limfocyty infiltrujące nowotwór (TILs, tumor infiltrating lymphocytes). Następnie namnażane są one *ex vivo* z zastosowaniem wysokich dawek IL-2 przez okres 1–2 tygodni. Po uzyskaniu odpowiedniej liczby komórek, hodowle podlegają selekcji w kierunku rozpoznawania antygenów nowotworowych. Selekcja polega na kohodowli z komórkami nowotworowymi i określeniu stopnia produkcji IFN- γ , lub na izolacji komórek, które wykazują ekspresję markerów aktywacji (np. OX40) w odpowiedzi na stymulację określonym antygenem nowotworowym. Następnie wyselekcjonowane komórki są namnażane przez kolejne 3–4 tygodnie. Procedury te pozwalają uzyskać dużą liczbę komórek, które

będą specyficznie rozpoznawały komórki nowotworowe *in vivo*. Mimo że metoda jest czasochłonna, to daje bardzo dobre rezultaty, zwłaszcza w leczeniu złośliwego czerniaka w zaawansowanym stadium u ludzi (14, 15, 16). Czerniak jest nowotworem, z którego najczęściej uzyskuje się limfocyty infiltrujące, służące do hodowli. Jest to bowiem jeden z najbardziej immunogennych typów nowotworów, co oznacza, że może być rozpoznawany przez układ immunologiczny (17). Skutkuje to dużym naciekiem zapalnym i infiltracją guza przez limfocyty. Niemniej jednak, niesprzyjające warunki w mikrośrodkowisku nowotworowym, takie jak: hipoksja, niskie pH, obecność komórek immunosupresyjnych (mieloidalnych komórek supresorowych, limfocytów T regulatorowych, makrofagów typu M2) oraz wytwarzanych przez nie cytokin (głównie IL-10, TGF- β) skutecznie hamują aktywność limfocytów T cytotoksycznych i komórek NK infiltrujących guz (18, 19, 20, 21, 22, 23). Stąd izolacja takich komórek z tkanki nowotworowej i namnożenie ich w warunkach laboratoryjnych bez negatywnego wpływu mikrośrodkowiska nowotworowego daje szansę na walkę układu immunologicznego z nowotworem i pozytywne efekty terapeutyczne po ich ponownym podaniu pacjentowi (6).

Nacieki limfocytów jest korzystnym wskaźnikiem prognostycznym w licznych guzach litych u ludzi, w tym w raku piersi (24, 25), a także w nowotworach gruczołu sutkowego u suk (26). Wykazano zwiększoną infiltrację limfocytów T cytotoksycznych w nowotworach o mniej agresywnym charakterze, natomiast w złośliwych nowotworach naciekających naczynia krwionośne i otaczające tkanki odnotowano skąpy nacieki komórek efektorowych (27). Jednakże w większości guzów litych infiltracja limfocytami nie występuje wcale lub w bardzo niewielkim stopniu (28, 29, 30). W związku z tym trudno uzyskać do hodowli komórki specyficznie rozpoznające nowotwór. Ponadto, w większości uzyskane limfocyty są anergiczne lub wycieńczone i trudno je namnożyć w warunkach laboratoryjnych (28, 30). Dlatego też obecnie badania skupiają się na tworzeniu protokołów bardziej efektywnej hodowli limfocytów infiltrujących nowotwory lite, m.in. z zastosowaniem inhibitorów wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych (31).

Modyfikacje genetyczne limfocytów

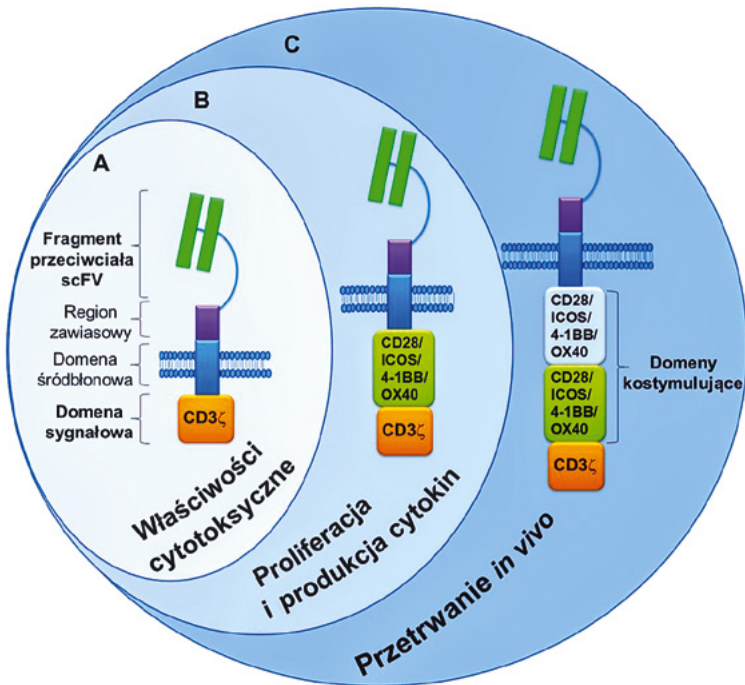
Do adoptywnego transferu mogą także zostać użyte limfocyty izolowane z krwi obwodowej pacjenta onkologicznego. Znika wówczas problem ilości uzyskanych komórek, ponieważ około 25–30% krążących leukocytów to limfocyty (32, 33). W przeciwieństwie do limfocytów infiltrujących nowotwór, komórki wyizolowane z krwi nie rozpoznają jednak specyficznie antygenów nowotworowych. W celu uzyskania możliwości identyfikacji komórek rakowych, limfocyty są modyfikowane genetycznie w warunkach laboratoryjnych tak, aby wykazywały ekspresję odpowiedniego receptora komórek T (TCR, T cell receptor). Za pomocą różnych TCR limfocyty T rozpoznają swoiste antygeny, także nowotworowe w kontekście cząstek zgodności tkankowej (MHC, major histocompatibility

complex) klasy I lub II (33), u psów określanych jako DLA – dog leukocyte antigens (34).

Modyfikacja genetyczna limfocytów polega na transfekcji wektorem lenti- lub retrowirusowym kodującym odpowiedni TCR. Zmodyfikowane limfocyty podlegają następnie namnożeniu i selekcji (podobnie jak TILs) przed adoptywnym transferem. Główne ograniczenia tej metody polegają na tym, że rozpoznawanie antygenów nowotworowych przez limfocyty T zależne jest wówczas od obecności cząstek MHC na powierzchni komórek nowotworowych. Natomiast w procesie tzw. ucieczki immunologicznej komórki nowotworowe obniżają ekspresję MHC, co pozwala im uniknąć rozpoznania przez komórki układu odpornościowego (35). Z kolei obecne w mikrośrodkowisku komórki dendrytyczne, które prezentują limfocytom T antygeny nowotworowe, są niedojrzałe i nie pełnią prawidłowo swoich funkcji (19, 20). Dużym problemem jest również fakt, że limfocyty ze zmodyfikowanym genetycznie TCR mogą tworzyć heterodimery z niezmodyfikowanymi limfocytami gospodarza, poprzez wymianę łańcuchów α lub β TCR. W konsekwencji powoduje to powstanie limfocytów o niezidentyfikowanej specyficzności i skutkuje dużą toksycznością terapii (36, 37).

Rewolucję w zakresie immunoterapii przyniosła możliwość genetycznej modyfikacji limfocytów T, tak aby dochodziło u nich do ekspresji chimerycznego receptora antygenowego (CAR, chimeric antigen receptor; 38). Receptor taki nie występuje naturalnie, jest to syntetyczna molekula, która stanowi połączenie elementów przeciwciała i receptora limfocytów T (38). Konstrukcja CAR składa się z domeny rozpoznającej swoisty antygen (jednołańcuchowy fragment zmienny przeciwciała – scFv), regionu związowego, domeny śródbłonkowej oraz wewnątrzkomórkowej domeny sygnalizacyjnej CD3 ζ (**ryc. 1A**). Dotychczas powstały trzy generacje CAR. Pierwsza generacja posiada tylko jedną niezbędną do aktywacji limfocytów domenę sygnałową (CD3 ζ), podczas gdy konstrukty CAR II generacji zawierają dodatkowo domenę kostymulującą, np. CD28 (39). Trzecia generacja CAR charakteryzuje się obecnością dwóch różnych domen kostymulujących, np. CD28 i 41BB (**ryc. 1B, C**). Wykazano, że transfekowane limfocyty T mają różną aktywność przeciwnowotworową, tempo proliferacji, właściwości cytotoksyczne oraz zdolności do przetrwania *in vivo* w zależności od zastosowanej generacji CAR, co przekłada się również na skuteczność terapii (40, 41, 42, 43).

Dzięki obecności fragmentu przeciwciała limfocyty T posiadające CAR (określane w niniejszej pracy jako limfocyty CAR) są w stanie rozpoznawać specyficzny antygen nowotworowy bez udziału MHC. Właściwość ta znacznie poprawia skuteczność działania limfocytów w stosunku do komórek nowotworowych. Po raz pierwszy limfocyty CAR zostały zastosowane z dużym sukcesem w leczeniu białaczki limfocytarnej i rozpoznawały cząsteczkę CD19 na zmienionych nowotworowo limfocytach B (44). Z czasem powstały kolejne receptory rozpoznające m.in. cząstki CD20 i CD22. Badania kliniczne na ludziach potwierdziły skuteczność leczenia z użyciem limfocytów CAR, skutkiem czego



Ryc. 1. Schemat przedstawiający budowę chimerycznego receptora antygenowego (CAR) A – I, B – II i C – III generacji oraz właściwości komórek, w których receptor ulega ekspresji

w 2017 r. dwie terapie zostały zaakceptowane przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA, Food and Drug Administration) do leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci (ALL) oraz zaawansowanego chłoniaka u osób dorosłych (13).

Obecnie trwają intensywne badania nad bezpieczeństwem stosowania i określeniem skutków ubocznych terapii z zastosowaniem limfocytów CAR w terapii nowotworów litych, a także dotyczące tworzenia nowych konstruktów CAR (45). Ponadto, niezwykle istotne jest zidentyfikowanie nowych antygenów nowotworowych stanowiących cel immunoterapii (46). Większość badań odbywa się na modelu gryzoni laboratoryjnych, który często nie pozwala przewidzieć wielu działań niepożądanych immunoterapii, np. u myszy laboratoryjnych nie występuje tzw. burza cytokinowa, która pojawia się u ludzi po transferze limfocytów T czy zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych, np. anty CD28 (47). Stąd potrzeba wykorzystania do badań modeli zwierzęcych dokładniej odzwierciedlających przebieg odpowiedzi immunologicznej u ludzi. Takim modelowym zwierzęciem jest pies domowy, który dotychczas był wykorzystywany w badaniach przedklinicznych, dotyczących przeszczepu szpiku kostnego u ludzi (48). Obecnie natomiast może posłużyć do rozwoju i oceny skuteczności komórkowej immunoterapii nowotworów w ramach onkologii porównawczej.

Pies jako model do badań przeciwnowotworowej immunoterapii komórkowej

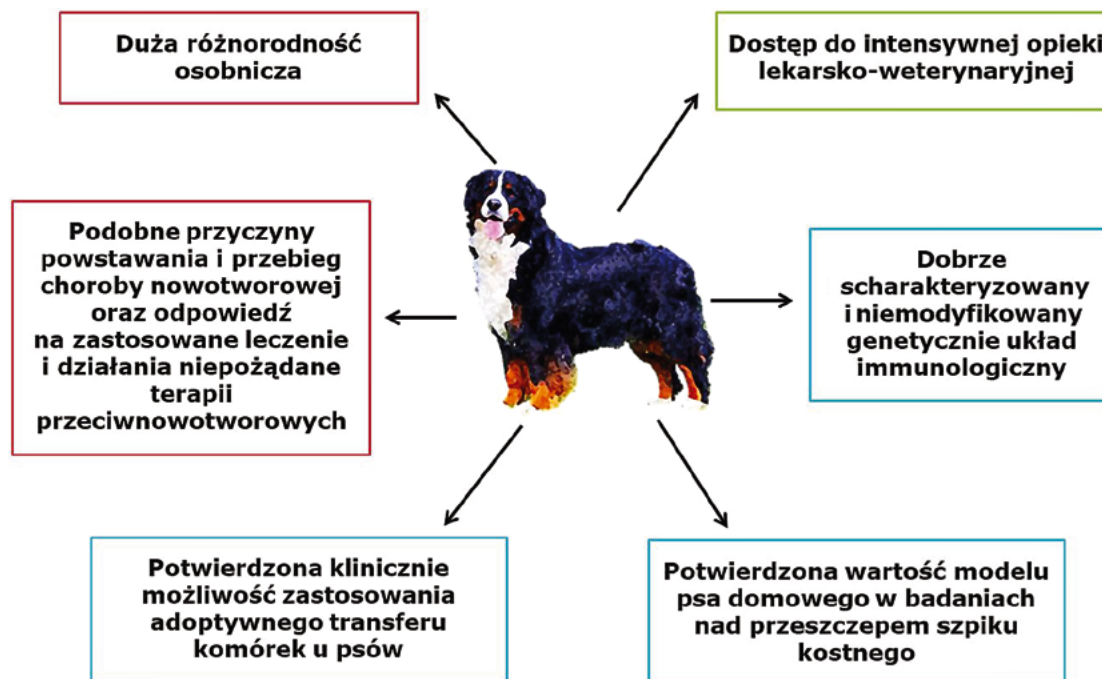
Pies domowy (*Canis lupus familiaris*) jest bardzo dobrym modelem do badań nowotworów u ludzi. Istnieje wiele podobieństw na poziomie genetycznym i komórkowym, a także epidemiologicznym i klinicznym między nowotworami u psów i ludzi (49,

50, 51, 52, 53). Szczególnie dotyczy to takich nowotworów, jak: białaczki, chłoniak nieziarniczy, kostniakomięsak, czerniak, rak płuc, nowotwory głowy i szyi, rak gruczołu krokowego, rak pęcherza moczowego oraz nowotwory gruczołu sutkowego u suk, stanowiące model do badań guzów piersi u kobiet (50, 54, 55, 56, 58). W przeciwieństwie do myszy, nowotwory u psów powstają naturalnie i spontanicznie, a częstość ich występowania wzrasta wraz z wiekiem, podobnie jak u ludzi. Ponadto, psy narażone są na podobne czynniki karcynogenne, a w przypadku wystąpienia nowotworu przebieg choroby jest niemal identyczny jak u ludzi (podobny mechanizm przerzutowania i lokalizacja wtórnych ognisk nowotworowych; 58). Podobne są też czynniki prognostyczne i rokownicze (tj. wielkość guza, umiejscowienie, obecność przerzutów w lokalnych węzłach chłonnych lub odległych narządach), a co najważniejsze – odpowiedź na zastosowane leczenie. Dlatego badania z wykorzystaniem modelu psa mają szczególnie istotne znaczenie dla onkologii porównawczej, zwłaszcza dla rozwoju i oceny nowych strategii terapeutycznych, badań farmakokinetyki i ewaluacji działań ubocznych nowych leków, a ostatnio także badań immunologicznych oraz dotyczących immunoterapii komórkowej (51, 59). **Rycina 2** przedstawia zalety modelu psa domowego, będącego pacjentem klinik weterynaryjnych, do badań adoptywnej immunoterapii nowotworów.

Główne populacje komórek układu odpornościowego zostały dobrze scharakteryzowane u psów i wykazują dużą homologię do komórek ludzkich (60). Międzynarodowe forum naukowców określiło możliwość fenotypowania populacji komórek immunologicznych u psów, określając homologiczne markery i definiując rozpoznające je zestawy przeciwciał (61). Działania te otworzyły drogę do badań nad immunoterapią komórkową w leczeniu nowotworów u psów.

Adoptywny transfer komórek u psów

Jednym z pierwszych badań *in vivo* były doświadczenia przeprowadzone przez O'Connor i wsp. (62), dotyczące transferu limfocytów T u psów z chłoniakiem nieziarniczym (NHL, non-Hodgkin lymphoma). Badacze zastosowali niespecyficzne nowotworowo komórki T pamięci izolowane z krwi obwodowej 8 chorych psów. Limfocyty T hodowano przez 5 tygodni w obecności IL-2 i IL-21 wspólnie z komórkami linii K562, uprzednio naświetlanymi promieniowaniem gamma. Dodatkowo komórki linii K562 zostały genetycznie zmodyfikowane tak, aby wykazywały ekspresję ligandów kostymulujących i działały jak sztuczne komórki prezentujące antygen (aAPC, artificial antigen presenting cells), co zapewniło aktywację i ekspansję limfocytów T. Większość (88±2%) komórek użytych do transferu stanowiły limfocyty cytotoksyczne (CD3⁺/CD8⁺). Spośród nich około 70% stanowiły komórki T pamięci (CD3⁺/CCR7⁺), charakteryzujące się wysoką sekrecją IFN-γ. Badania wykazały, że trzykrotny transfer autologicznych limfocytów T poprawił wyniki leczenia i znacznie wydłużył czas przeżycia leczonych osobników w porównaniu



Ryc. 2. Schemat przedstawiający użyteczność modelu psa domowego do badań immuno-onkologicznych. W czerwonej ramce umieszczone zostały cechy związane z chorobą nowotworową, w niebieskiej – związane z układem immunologicznym i immunoterapią, w zielonej – inne walory modelu

do psów poddanych wyłącznie chemioterapii (z zastosowaniem cyclofosfamid, winkrystyny, dokso-rubicyny i prednizonu).

Podane komórki nie tylko przetrwały w krwiobiegu, ale zostały też zidentyfikowane w zmienionych nowotworowo węzłach chłonnych. Całkowita liczba limfocytów T CD8⁺ we krwi była wyższa do 49 dni po transferze u psów poddanych terapii ACT. Wzrost liczby limfocytów T korelował ze zwiększonym stężeniem kinazy tymidynowej (markera proliferacji) w surowicy oraz zwiększonym wytwarzaniem przez komórki granzymu B, który może bezpośrednio niszczy komórki nowotworowe. Ponadto, zanotowano zmniejszony stosunek neutrofilów do limfocytów. Psy leczone chemioterapią i terapią ACT osiągnęły pełną remisję trwającą od 104 do 369 dni (mediana 338 dni) po transferze komórek T, w porównaniu do psów leczonych jedynie chemioterapeutykami (12 psów), których mediana czasu przeżycia bez nowotworu wynosiła tylko 71 dni. Co ważne, nie zaobserwowano niebezpiecznych skutków ubocznych związanych z podaniem limfocytów T. Zanotowano jedynie biegunkę i wymioty o niewielkim nasileniu u dwóch leczonych osobników, natomiast jeden pies wymagał hospitalizacji z powodu odwodnienia (62). Badania wykazały możliwość zastosowania transferu komórek T i pozytywne wyniki kliniczne immunoterapii nowotworów u psów. Warto zauważyć, że było to pierwsze badanie pokazujące skuteczność tej terapii u psów, zapewniające podstawy do dalszych badań w dziedzinie immuno-onkologii weterynaryjnej.

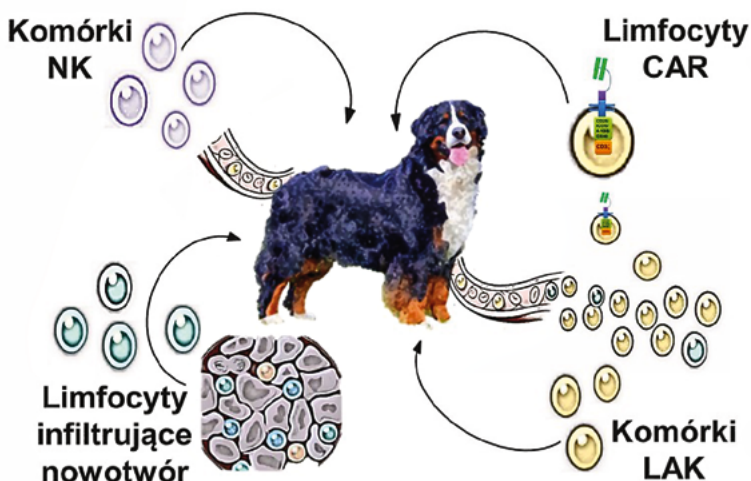
Kolejne doniesienia dotyczą zastosowania transferu limfocytów CAR w medycynie weterynaryjnej. Immunoterapia u psów nie jest tak zaawansowana jak u ludzi, a zatem literatura na ten temat jest wciąż ograniczona. Do tej pory tylko dwie grupy badawcze zastosowały technologię CAR w leczeniu

kostniakomięsaka (OS) i chłoniaka z komórek B u psów. Guzy te są uważane za wartościowy model do badań immunoterapii ludzkich nowotworów, ponieważ wykazują ekspresję identycznych jak ludzkie antygenów nowotworowych: HER2 i CD20 (odpowiednio dla OS i chłoniaka).

W przypadku kostniakomięsaka badacze wykorzystali limfocyty T uzyskane z krwi obwodowej zdrowych psów (63). Komórki aktywowano, stosując napromieniowane aAPC linii K562, genetycznie zmodyfikowane w celu uzyskania ekspresji ludzkich ligandów odpowiadających za kostymulację limfocytów T. Dodatkowo komórki stymulowano fitohemaglutyniną (PHA) i IL-21. Następnie hodowano przez okres 2 tygodni. Aktywowane limfocyty T transfekowano 2-krotnie wektorem wirusowym kodującym chimeryczny receptor antygenowy przeciwko psiemu antygenowi HER2 (α -CHER2 CAR). Wykorzystano konstrukt CAR II generacji, zawierający domeny CD3 ζ i CD28. Autorzy wykazali, że psie α -CHER2 limfocyty CAR rozpoznają zarówno ludzki, jak i psi antygen HER2. Ponadto, hodowane w kokulturze z kilkoma różnymi liniami komórkowymi psiego kostniakomięsaka, wydzielają znacznie więcej IFN- γ i wykazują lepszą zdolność do eliminowania komórek HER2⁺ *in vitro*, w porównaniu do niemodyfikowanych limfocytów T. Efekty te nie były obserwowane, kiedy zastosowano linie komórkowe niewykazujące ekspresji antygeny HER2 (63). Pomimo tych obiecujących wyników *in vitro*, terapia z użyciem psich α -CHER2 limfocytów CAR nie została jeszcze oceniona w badaniach *in vivo*.

Opierając się na jednak na tych zachęcających badaniach laboratoryjnych, Panjwani i wsp. (64) przeprowadzili badania kliniczne na psach cierpiących na chłoniaka z komórek B. Badacze wykorzystali autologiczne komórki T od chorych psów. Limfocyty były

prześciowo transfekowane za pomocą elektroporacji mRNA kodującym chimeryczny receptor antygenowy I generacji, rozpoznający psi antygen CD20 (α -cCD20 CAR). W obecności komórek psiego chłoniaka zmodyfikowane limfocyty T wydzielają znacznie więcej $IFN-\gamma$ *in vitro* niż niezmodyfikowane komórki lub anty-CD19 limfocyty CAR (stosowane jako niespecyficzna kontrola transfekcji). Dodatkowo swoiste dla antygeny CD20 limfocyty CAR powodowały liżę komórek nowotworowych *in vitro*. Następnie, w ramach pierwszych na świecie badań klinicznych z zastosowaniem limfocytów CAR u psów, terapii ACT poddano psa z chłoniakiem nawrotowym z komórek B. Pacjent poddany był wcześniej chemioterapii z użyciem L-asparaginazy, winkrystyny, cyklofosfamidu, doksorubicyny i prednizonu. W ramach terapii ACT pies otrzymał 3 dawki α -cCD20 limfocytów CAR (każda po 700 000 komórek/kg m.c.) w odstępie tygodniowym. Każde wstrzyknięcie spowodowało powiększenie docelowego węzła chłonnego, a także, co ważniejsze, zmniejszenie liczby komórek B nowotworowych (CD79a⁺/CD20⁺) i wzrost liczby nie-transformowanych limfocytów T (CD5⁺) w węzłach chłonnych. Ponadto, wykazano zwiększony poziom IL-6 i $IFN-\gamma$ w surowicy krwi po pierwszej dawce zmodyfikowanych limfocytów T. Są to cytokiny odpowiedzialne za wywoływanie tzw. burzy cytokinowej u ludzi. Niemniej jednak nie zaobserwowano niebezpiecznych efektów ubocznych po transferze, a jedynie niewielką, przejściową gorączkę po trzeciej dawce (limfocyty zostały wówczas podane dożylnie i lokalnie do węzła chłonnego). Niestety, ze względu na fakt, że transfekcja limfocytów nie była permanentna, tylko przejściowa, nie osiągnięto trwałej remisji (64). Przedstawione badania dowodzą, że adopcyjny transfer genetycznie zmodyfikowanych limfocytów jest możliwy u psów, przy czym może wywoływać działania niepożądane podobne do tych notowanych u ludzi. **Rycina 3** przedstawia możliwe do zastosowania i dotychczas zbadane *in vivo* strategie adopcyjnego transferu komórek w medycynie weterynaryjnej.



Ryc. 3. Schemat przedstawiający rodzaje immunoterapii komórkowej stosowanej lub możliwej do zastosowania u psów z wykorzystaniem komórek NK, limfocytów CAR, komórek LAK oraz limfocytów infiltrujących nowotwór

Komórki LAK w immunoterapii

W odróżnieniu od adopcyjnej terapii komórkowej, która wykorzystuje limfocyty T specyficznie rozpoznające antygeny nowotworowe, istnieje również immunoterapia obejmująca podawanie autologicznych limfocytów cytotoksycznych, określanych jako komórki LAK (lymphokine-activated killer cells). Stanowią one subpopulację leukocytów i powodują niespecyficzną liżę komórek nowotworowych niewykazujących ekspresji MHC (65). W medycynie człowieka tego typu immunoterapia stanowiła jeden z pierwszych rodzajów transferów komórkowych, jednak ze względu na poważne skutki uboczne zaprzestano jej stosowania (66, 67). Transfer z użyciem komórek LAK był również badany w medycynie weterynaryjnej (68, 69, 70). Komórki pochodzące z jednojądrzastych komórek krwi obwodowej stymulowano za pomocą przeciwciał przeciwko CD3 i namnażano w obecności IL-2. Początkowo terapia LAK była badana u zdrowych psów rasy beagle (68). Sekwencyjne podawanie komórek LAK zwiększało proliferację innych populacji komórek immunologicznych i poziom $IFN-\gamma$ w surowicy bez wywoływania poważnych działań niepożądanych. Wyniki sugerowały, że terapia LAK jest bezpieczna u psów i może stymulować ich układ odpornościowy. W kilku pracach opisano wytwarzanie komórek LAK i ich aktywność przeciwnowotworową *in vitro* przeciwko komórkom raka tarczycy i czerniaka u psów (68, 69, 70). Najnowsze prace dotyczą oceny terapii LAK *in vivo* w połączeniu z zabiegiem chirurgicznym u 15 psów z różnymi nowotworami (71). Pacjenci otrzymywali pięć dawek komórek LAK w odstępach 2–4 tygodni. Pojedynczy transfer powodował wzrost liczby limfocytów T cytotoksycznych (CD8⁺) we krwi. Mimo immunostymulującego efektu po podaniu komórek LAK, nie wykazano bezpośredniej eliminacji komórek nowotworowych. Z tego względu terapia LAK nie powinna być stosowana jako monoterapia, ale jej zastosowanie jest obiecujące jako forma leczenia uzupełniającego przy chemio- lub radioterapii (16, 64, 70).

Zastosowanie komórek NK w immunoterapii nowotworów u psów

W rozwijającej się immuno-onkologii szczególnego znaczenia nabierają obecnie komórki NK (72). Podobnie jak u ludzi i myszy, komórki NK u psów nie wymagają wcześniejszej aktywacji i nie muszą specyficznie rozpoznawać antygenów nowotworowych, aby aktywnie eliminować komórki nowotworowe (32). Dotychczasowym problemem była trudność identyfikacji tych komórek u psów i brak ich pełnej charakterystyki. Wiadomo, że psie komórki NK nie wykazują ekspresji CD56. Izolowano je zatem na podstawie niskiej ekspresji CD5 i braku ekspresji markerów dla limfocytów (CD3, CD4; 73). Obecnie specyficznym markerem dla psich komórek NK jest NCR-1, który pozwala na ich izolację z krwi obwodowej (74, 75). Canter i wsp. (72) wyizolowali na tej podstawie i namnożyli w warunkach laboratoryjnych psie komórki NK, które zostały następnie podane psom z kostniakomięsakiem,

po wcześniejszej radioterapii. Badacze w początkowym etapie wykazali, że radioterapia nowotworu zwiększa cytotoxyczność komórek NK w stosunku do linii komórkowej kostniakomięsaka *in vitro*, a także znacznie opóźnia rozwój nowotworów *in vivo* po podaniu komórek NK myszom z wszczepionym mięsakiem psów (model ksenogeniczny). Następnie przeprowadzili pierwsze badania kliniczne na psach z wykorzystaniem radioterapii i adoptywnego transferu komórek NK w leczeniu kostniakomięsaka. Psy zakwalifikowane do badania nie były wcześniej leczone za pomocą chemioterapii. Leczenie rozpoczynano zatem od radioterapii (9Gy) stosowanej cotygodniowo przez 4 tygodnie. Po jej zakończeniu psy otrzymywały 2-krotnie w odstępie tygodnia transfer komórek NK (7.5×10^6 komórek/kg m.c.) bezpośrednio do guza nowotworowego (intra-tumoral) podczas zabiegu w znieczuleniu ogólnym, pod kontrolą USG. Jednocześnie z komórkami podawano wysokie dawki IL-2, aby zapewnić przetrwanie podanym komórkom. Badania wykazały redukcję w formowaniu przerzutów i poprawę rezultatów klinicznych. Spośród 10 psów poddanych terapii 5 pozostało wolnych od przerzutów do płuc w tzw. 6-miesięcznym pierwszorzędownym punkcie końcowym, a u jednego pacjenta zanotowano rozpad guzków płucnych. Jest to niezwykle obiecujący wynik, zważywszy, że rokowanie dla pacjentów z miejscowym kostniakomięsakiem jest zwykle nieopomyślne, a ryzyko wystąpienia przerzutów do płuc i śmierci wynosi 85% w ciągu 6–12 miesięcy od diagnozy.

Korzystny efekt uzyskany w badaniu może być również związany z preferencyjnym niszczeniem przez przeszczepione komórki NK tzw. macierzystych komórek nowotworowych (cancer stem cells; 77, 78, 79). Autorzy podkreślają jednak przede wszystkim korzyści wynikające z wykorzystania skojarzonej terapii, a mianowicie zastosowania radioterapii przed transferem komórek NK. Zaobserwowano wówczas zwiększoną migrację przeszczepionych komórek NK do guza nowotworowego *in vivo* na modelu mysim, a także zwiększoną ogólną liczbę krążących komórek NK oraz lepsze przeżycie znakowanych komórek NK we krwi gospodarza po transferze u psów.

Wcześniejsze badania na ludziach udowodniły, że przygotowanie pacjentów do adoptywnego transferu komórek, polegające na systemowym zniszczeniu układu odpornościowego biorcy (tzw. kondycjonowanie), znacznie poprawia skuteczność terapeutyczną immunoterapii komórkowej (80, 81, 82). Wykazano, że chemioterapia składająca się z dużych dawek cyklofosfamid i fludarabiny lub radioterapia polegająca na napromieniowaniu ciała dawką niemieloablacyjną (2Gy) powoduje znaczne zmniejszenie liczby komórek układu immunologicznego gospodarza, co znacząco zwiększa efektywność ACT (80, 81). Mechanizm polega na stworzeniu przestrzeni do ekspansji dla podanych adoptywnie limfocytów T. Ponadto, radio- lub chemioterapia eliminuje komórki immunosupresyjne, takie jak limfocyty T regulacyjne oraz mieloidalne komórki supresorowe. Niszczą też komórki odpornościowe określane jako „pochlaniacze cytokin”, które współzawodniczą z podanymi

adoptywnie limfocytami T o cytokiny homeostatyczne. W ten sposób kondycjonowanie poprawia dostępność tych cytokin komórkom T podanym w transferze. Zwiększa się zwłaszcza stężenie takich cytokin, jak IL-7 i IL-15, które sprzyjają proliferacji limfocytów T *in vivo* (82).

W badaniach przeprowadzonych na psach Canter i wsp. (72) wykazali, że radioterapia wpływa korzystnie na ekspansję podanych w adoptywnym transferze komórek NK. Wskazuje to, że immunoterapia komórkowa powinna być stosowana równolegle z chemio- lub radioterapią dla uzyskania najlepszego efektu terapeutycznego.

Podsumowanie

W ciągu ostatnich lat znacznie wzrosło znaczenie immuno-onkologii i wykorzystanie komórek układu odpornościowego do walki z rakiem. W nowoczesnej onkologii ludzkiej coraz częściej równolegle do chemioterapii lub radioterapii wykorzystywane są różne rodzaje immunoterapii, w tym adoptywny transfer komórek. W przyszłości także medycyna weterynaryjna może korzystać z protokołów immunoterapii komórkowej. Nieliczne dotychczas prace wykazały możliwość zastosowania i efektywność adoptywnego transferu komórek u psów domowych. Obecnie immunoterapia komórkowa dostępna jest w onkologii weterynaryjnej w ramach badań klinicznych prowadzonych przez dr Nicole Mason w Szkole Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Pensylwanii (USA), gdzie stworzono program współpracy w zakresie ochrony zdrowia ludzi i zwierząt. (<https://www.vet.upenn.edu/research/centers-initiatives/mason-immunotherapy-research/therapies-trials>).

Modele zwierzęce, takie jak psy domowe, oferują wiele korzyści w badaniach immunologicznych i mają ogromne znaczenie dla onkologii porównawczej oraz rozwoju immuno-onkologii ludzkiej. Co jednak najważniejsze, takie badania dają także nadzieję na wyliczenie raka u najlepszego przyjaciela człowieka.

Piśmiennictwo

1. Fleming J.M., Creevy K.E., Promislow D.E.L.: Mortality in north american dogs from 1984 to 2004: an investigation into age-, size-, and breed-related causes of death. *J. Vet. Intern. Med.* 2011, 25, 187–198.
2. Kent M.S., Burton J.H., Dank G., Bannasch D.L., Rebhun R.B.: Association of cancer-related mortality, age and gonadectomy in golden retriever dogs at a veterinary academic center 1989–2016. *PLoS One* 2018, 13, e0192578.
3. Seyfried T.N., Huysentruyt L.C.: On the origin of cancer metastasis. *Crit. Rev. Oncog.* 2013, 18, 43–73.
4. Topalian S.L., Wolchok J.D., Chan T.A., Mellman I., Palucka K., Banchereau J., Rosenberg S.A., Dane Wittrup K.: Immunotherapy: The path to win the war on cancer? *Cell* 2015, 161, 185–186.
5. Hus, I.: Nowe kierunki w immunoterapii nowotworów układu krwiotwórczego. *Acta Haematol. Pol.* 2009, 39, 707–726.
6. Kirkwood J.M., Butterfield L.H., Tarhini A.A., Zarour H., Kalinski P., Ferrone S.: Immunotherapy of Cancer in 2012. *CA. Cancer J. Clin.* 2012, 62, 309–335.
7. Song Q., Zhang C.D., Wu X.H.: Therapeutic cancer vaccines: From initial findings to prospects. *Immunol. Lett.* 2018, 196, 11–21.
8. Dine J., Gordon R., Shames Y., Kasler M.K., Barton-Burke M.: Immune Checkpoint Inhibitors: An Innovation in Immunotherapy for the Treatment and Management of Patients with Cancer. *Asia-Pac. J. Oncol. Nurs.* 2017, 4, 127–135.
9. Foa R., Guarini A., Gansbacher B.: IL2 treatment for cancer: from biology to gene therapy. *Br. J. Cancer* 1992, 66, 992–998.

10. Zavala V.A., Kalergis A.M.: New clinical advances in immunotherapy for the treatment of solid tumours. *Immunology* 2015, **145**, 182–201.
11. Muranski P., Restifo N.P.: Adoptive immunotherapy of cancer using CD4+ T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 2009, **21**, 200–208.
12. Rosenberg S.A., Restifo N.P.: Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* 2015, **348**, 62–68.
13. Johnson L.A., June C.H.: Driving gene-engineered T cell immunotherapy of cancer. *Cell Res.* 2017, **27**, 38–58.
14. Besser M.J., Shapira-Frommer R., Treves A.J., Zippel D., Itzhaki O., Hershkovitz L., Levy D., Kubi A., Hovav E., Chermoshniuk N., Shalmon B., Hardan I., Catane R., Markel G., Apter S., Ben-Nun A., Kuchuk I., Shimoni A., Nagler A., Schachter J.: Clinical responses in a phase II study using adoptive transfer of short-term cultured tumor infiltration lymphocytes in metastatic melanoma patients. *Clin. Cancer Res.* 2010, **16**, 2646–2655.
15. Pilon-Thomas S., Kuhn L., Ellwanger S., Janssen W., Royster E., Marzban S., Kudchadkar R., Zager J., Gibney G., Sondak V.K., Weber J., Mulé J.J., Sarnaik A.A.: Efficacy of adoptive cell transfer of tumor-infiltrating lymphocytes after lymphopenia induction for metastatic melanoma. *J. Immunother.* 2012, **35**, 615–620.
16. Rosenberg S.A., Packard B.S., Aebbersold P.M., Solomon D., Topalian S.L., Toy S.T., Simon P., Lotze M.T., Yang J.C., Seipp C.A.: Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N. Engl. J. Med.* 1988, **319**, 1676–1680.
17. Lawrence M.S., Stojanov P., Polak P., Kryukov G.V., Cibulskis K., Sivachenko A., Carter S.L., Stewart C., Mermel C.H., Roberts S.A., Kiezun A., Hammerman P.S., McKenna A., Drier Y., Zou L., i wsp.: Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 2013, **499**, 214–218.
18. Chanmee T., Ontong P., Konno K., Itano N.: Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers* 2014, **6**, 1670–1690.
19. Grivennikov S.I., Greten F.R., Karin M.: Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010, **140**, 883–899.
20. Kim R., Emi M., Tanabe K.: Cancer immunoeediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 2007, **121**, 1–14.
21. Król M., Pawłowski K.M., Majchrzak K., Dółka I., Abramowicz A., Szyszko K., Motyl T.: Density of tumor-associated macrophages TAMs and expression of their growth factor receptor MCSF-R and CD14 in canine mammary adenocarcinomas of various grade of malignancy and metastasis. *Pol. J. Vet. Sci.* 2011, **14**, 3–10.
22. Mucha J., Majchrzak K., Taciak B., Hellmén E., Król M.: MDSCs mediate angiogenesis and predispose canine mammary tumor cells for metastasis via IL-28/IL-28RA IFN- λ signaling. *PLoS One* 2014, **9**, e103249.
23. Mytar B., Wołoszyn M., Szatanek R., Baj-Krzyworzeka M., Siedlar M., Ruggiero I., Wieckiewicz J., Zembala M.: Tumor cell-induced deactivation of human monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 2003, **74**, 1094–1101.
24. Mahmoud S.M.A., Paish E.C., Powe D.G., Macmillan R.D., Grainge M.J., Lee A.H.S., Ellis I.O., Green A.R.: Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2011, **29**, 1949–1955.
25. Wang K., Xu J., Zhang T., Xue D.: Tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer predict the response to chemotherapy and survival outcome: A meta-analysis. *Oncotarget* 2016, **7**, 44288–44298.
26. Souza T.A. de, de Campos C.B., De Biasi Bassani Gonçalves A., Nunes F.C., Monteiro L.N., Oliveira Vasconcelos R. de, Cassali G.D.: Relationship between the inflammatory tumor microenvironment and different histologic types of canine mammary tumors. *Res. Vet. Sci.* 2018, **119**, 209–214.
27. Badowska-Kozakiewicz, A.M., Malicka, E.: Apoptoza w nowotworach gruczołu sutkowego u psów. *Życie Weter.* 2009, **84**, 902–905.
28. Clay T.M., Custer M.C., Sachs J., Hwu P., Rosenberg S.A., Nishimura M.I.: Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity. *J. Immunol.* 1999, **163**, 507–513.
29. Hershkovitz L., Schachter J., Treves A.J., Besser M.J.: Focus on Adoptive T Cell Transfer Trials in Melanoma. *Clin. Dev. Immunol.* 2010, **260267**.
30. Kunert A., Straetmans T., Govers C., Lamers C., Mathijssen R., Sleijfer S., Debets R.: TCR-Engineered T Cells Meet New Challenges to Treat Solid Tumors: Choice of Antigen, T Cell Fitness, and Sensitization of Tumor Milieu. *Front. Immunol.* 2013, **4**, 363.
31. Majchrzak K., Nelson M.H., Bailey S.R., Bowers J.S., Yu X.Z., Rubinstein M.P., Himes R.A., Paulos C.M.: Exploiting IL-17-producing CD4+ and CD8+ T cells to improve cancer immunotherapy in the clinic. *Cancer Immunol. Immunother.* 2016, **65**, 247–259.
32. Brostoff J., Male D., Roitt I., Roth D.B.: Immunologia. Urban&Partner, Wrocław 2008.
33. Gołąb J., Jakóbiński M., Lasek W., Stokłosa T.: Immunologia. PWN, Warszawa 2009.
34. Wagner J.L.: Molecular organization of the canine major histocompatibility complex. *J. Hered.* 2003, **94**, 23–26.
35. Garrido F., Ruiz-Cabello F., Cabrera T., Pérez-Villar J.J., López-Botet M., Duggan-Keen M., Stern P.L.: Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol. Today* 1997, **18**, 89–95.
36. Bendle G.M., Linnemann C., Hooijkaas A.I., Bies L., Witte M.A. de, Jorritsma A., Kaiser A.D.M., Pouw N., Debets R., Kieback E., Uckert W., Song J.Y., Haanen J.B.A.G., Schumacher T.N.M.: Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy. *Nat. Med.* 2010, **16**, 565–570.
37. Loenen M.M. van, de Boer R., Amir A.L., Hagedoorn R.S., Volbeda G.L., Willemze R., van Rood J.J., Falkenburg J.H.F., Heemskerk M.H.M.: Mixed T cell receptor dimers harbor potentially harmful neoreactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010, **107**, 10972–10977.
38. Gross G., Waks T., Eshhar Z.: Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1989, **86**, 10024–10028.
39. Gilham D.E., Debets R., Pule M., Hawkins R.E., Abken H.: CAR-T cells and solid tumors: tuning T cells to challenge an inveterate foe. *Trends Mol. Med.* 2012, **18**, 377–384.
40. Berry L.J., Moeller M., Darcy P.K.: Adoptive immunotherapy for cancer: the next generation of gene-engineered immune cells. *Tissue Antigens* 2009, **74**, 277–289.
41. Dai H., Wang Y., Lu X., Han W.: Chimeric Antigen Receptors Modified T-Cells for Cancer Therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 2016, **108**, djv439.
42. Guedan S., Posey A.D., Shaw C., Wing A., Da T., Patel P.R., McGettigan S.E., Casado-Medrano V., Kawalekar O.U., Uribe-Herranz M., Song D., Melenhorst J.J., Lacey S.F., Scholler J., Keith B., Young R.M., June C.H.: Enhancing CAR T cell persistence through ICOS and 4-1BB costimulation. *JCI Insight* 2018, **3**, e96976.
43. Milone M.C., Fish J.D., Carpenito C., Carroll R.G., Binder G.K., Teachey D., Samanta M., Lakhani M., Gloss B., Danet-Desnoyers G., Campana D., Riley J.L., Grupp S.A., June C.H.: Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. *Mol. Ther.* 2009, **17**, 1453–1464.
44. Porter D.L., Levine B.L., Kalos M., Bagg A., June C.H.: Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2011, **365**, 725–733.
45. Kagoya Y., Tanaka S., Guo T., Anczurowski M., Wang C.H., Saso K., Butler M.O., Minden M.D., Hirano N.: A novel chimeric antigen receptor containing a JAK-STAT signaling domain mediates superior antitumor effects. *Nat. Med.* 2018, **24**, 352–359.
46. Wang R.F., Wang H.Y.: Immune targets and neoantigens for cancer immunotherapy and precision medicine. *Cell Res.* 2017, **27**, 11–37.
47. Hünig T.: The storm has cleared: lessons from the CD28 superagonist TGN1412 trial. *Nat. Rev. Immunol.* 2012, **12**, 317–318.
48. Lupu M., Storb R.: Five decades of progress in haematopoietic cell transplantation based on the preclinical canine model. *Vet. Comp. Oncol.* 2007, **5**, 14–30.
49. Mata M., Gottschalk S.: Man's Best Friend: Utilizing Naturally Occurring Tumors in Dogs to Improve Chimeric Antigen Receptor T-cell Therapy for Human Cancers. *Mol. Ther.* 2016, **24**, 1511–1512.
50. Paoloni M., Khanna C.: Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nat. Rev. Cancer* 2008, **8**, 147–156.
51. Park J.S., Withers S.S., Modiano J.F., Kent M.S., Chen M., Luna J.I., Culp W.T.N., Sparger E.E., Rebhun R.B., Monjazeb A.M., Murphy W.J., Canter R.J.: Canine cancer immunotherapy studies: linking mouse and human. *J. Immunother. Cancer* 2016, **4**, 97.
52. Schiffman J.D., Breen M.: Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2015, **370**, 20140231.
53. Stroud C., Dmitriev I., Kashentseva E., Bryan J.N., Curiel D.T., Rindt H., Reinero C., Henry C.J., Bergman P.J., Mason N.J., Gnanandarajah J.S., Engiles J.B., Gray F., Laughlin D., Gaurnier-Hausser A., Wallecha A., Huebner M., Paterson Y., O'Connor D., Trembl L.S., Stannard J.P., Cook J.L., Jacobs M., Wyckoff G.J., Likins L., Sabbagh U., Skaff A., Guloy A.S., Hays H.D., LeBlanc A.K., Coates J.R., Katz M.L., Lyons L.A., Johnson G.C., Johnson G.S., O'Brien D.P., Duan D., Calvet J.P., Gandolfi B., Baron D.A., Weiss M.L., Webster D.A., Karanu F.N., Robb E.J., Harman R.J.: A One Health overview, facilitating advances in comparative medicine and translational research. *Clin. Transl. Med.* 2016, **5**, 26.
54. Anderson K.L., Modiano J.F.: Progress in Adaptive Immunotherapy for Cancer in Companion Animals: Success on the Path to a Cure. *Vet. Sci.* 2015, **2**, 363–387.
55. Fenger J.M., London C.A., Kisseberth W.C.: Canine osteosarcoma: a naturally occurring disease to inform pediatric oncology. *ILARJ.* 2014, **55**, 69–85.
56. Gillard M., Cadieu E., De Brito C., Abadie J., Vergier B., Devauchelle P., Degorce F., Dréano S., Primot A., Dorso L., Lagadic M., Galibert E., Hédan B., Galibert M.D., André C.: Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014, **27**, 90–102.

57. Nishiya A.T., Massoco C.O., Felizzola C.R., Perlmann E., Batschinski K., Tedardi M.V., Garcia J.S., Mendonça P.P., Teixeira T.F., Zaidan Dagli M.L.: Comparative Aspects of Canine Melanoma. *Vet. Sci.* 2016, 3, 7.
58. Khanna C., Lindblad-Toh K., Vail D., London C., Bergman P., Barber L., Breen M., Kitchell B., McNeil E., Modiano J.F., Niemi S., Comstock K.E., Ostrander E., Westmoreland S., Withrow S.: The dog as a cancer model. *Nat. Biotechnol.* 2006, 24, 1065–1066.
59. National Cancer Policy Forum, Board on Health Care Services, Institute of Medicine, National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine: The Role of Clinical Studies for Pets with Naturally Occurring Tumors in Translational Cancer Research: Workshop Summary. National Academies Press US, Washington DC. 2015.
60. Felsburg P.J.: Overview of immune system development in the dog: comparison with humans. *Hum. Exp. Toxicol.* 2002, 21, 487–492.
61. Cobbold S., Metcalfe S.: Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW). *Tissue Antigens* 1994, 43, 137–154.
62. O'Connor C.M., Sheppard S., Hartline C.A., Huls H., Johnson M., Palla S.L., Maiti S., Ma W., Davis R.E., Craig S., Lee D.A., Champlin R., Wilson H., Cooper L.J.N.: Adoptive T-cell therapy improves treatment of canine non-Hodgkin lymphoma post chemotherapy. *Sci. Rep.* 2012, 2, 249.
63. Mata M., Vera J.F., Gerken C., Rooney C.M., Miller T., Pfent C., Wang L.L., Wilson-Robles H.M., Gottschalk S.: Toward immunotherapy with redirected T cells in a large animal model: ex vivo activation, expansion, and genetic modification of canine T cells. *J. Immunother.* 2014, 37, 407–415.
64. Panjwani M.K., Smith J.B., Schutsky K., Gnanandarajah J., O'Connor C.M., Powell D.J., Mason N.J.: Feasibility and Safety of RNA-transfected CD20-specific Chimeric Antigen Receptor T Cells in Dogs with Spontaneous B Cell Lymphoma. *Mol. Ther.* 2016, 24, 1602–1614.
65. Lafreniere R., Rosenberg S.A.: Successful immunotherapy of murine experimental hepatic metastases with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin 2. *Cancer Res.* 1985, 45, 3735–3741.
66. Lin S.R., Yang H.C., Kuo Y.T., Liu C.J., Yang T.Y., Sung K.C., Lin Y.Y., Wang H.Y., Wang C.C., Shen Y.C., Wu F.Y., Kao J.H., Chen D.S., Chen P.J.: The CRISPR/Cas9 System Facilitates Clearance of the Intrahepatic HBV Templates In Vivo. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 2014, 3, e186.
67. Rosenberg S.A., Lotze M.T., Muul L.M., Leitman S., Chang A.E., Ettinghausen S.E., Matory Y.L., Skibber J.M., Shiloni E., Vetto J.T.: Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N. Engl. J. Med.* 1985, 313, 1485–1492.
68. Ousterout D.G., Perez-Pinera P., Thakore P.I., Khabazi A.M., Brown M.T., Qin X., Fedrigo O., Mouly V., Tremblay J.P., Gersbach C.A.: Reading Frame Correction by Targeted Genome Editing Restores Dystrophin Expression in Cells From Duchenne Muscular Dystrophy Patients. *Mol. Ther.* 2013, 21, 1718–1726.
69. Qasim W., Zhan H., Samarasinghe S., Adams S., Amrolia P., Stafford S., Butler K., Rivat C., Wright G., Somana K., Ghorashian S., Pinner D., Ahsan G., Gilmour K., Lucchini G., Ingloft S., Mifsud W., Chiesa R., Peggs K.S., Chan L., Farzeneh F., Thrasher A.J., Vora A., Pule M., Veys P.: Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Sci. Transl. Med.* 2017, 9, eaaj2013.
70. Reardon S.: Leukaemia success heralds wave of gene-editing therapies. *Nature* 2015, 527, 146–147.
71. Torikai H., Reik A., Liu P.Q., Zhou Y., Zhang L., Maiti S., Huls H., Miller J.C., Kebriaei P., Rabinovich B., Rabinovitch B., Lee D.A., Champlin R.E., Bonini C., Naldini L., Rebar E.J., Gregory P.D., Holmes M.C., Cooper L.J.: A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR. *Blood* 2012, 119, 5697–5705.
72. Canter R.J., Grossenbacher S.K., Foltz J.A., Sturgill I.R., Park J.S., Luna J.I., Kent M.S., Culp W.T.N., Chen M., Modiano J.F., Monjazeb A.M., Lee D.A., Murphy W.J.: Radiotherapy enhances natural killer cell cytotoxicity and localization in pre-clinical canine sarcomas and first-in-dog clinical trial. *J. Immunother. Cancer* 2017, 5, 98.
73. Michael H.T., Ito D., McCullar V., Zhang B., Miller J.S., Modiano J.F.: Isolation and characterization of canine natural killer cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2013, 155, 211–217.
74. Foltz J.A., Somanchi S.S., Yang Y., Aquino-Lopez A., Bishop E.E., Lee D.A.: NCR1 Expression Identifies Canine Natural Killer Cell Subsets with Phenotypic Similarity to Human Natural Killer Cells. *Front. Immunol.* 2016, 7, 521.
75. Grøndahl-Rosado C., Bonsdorff T.B., Brun-Hansen H.C., Storset A.K.: NCR1+ cells in dogs show phenotypic characteristics of natural killer cells. *Vet. Res. Commun.* 2015, 39, 19–30.
76. Green E.M., Adams W.M., Forrest L.J.: Four fraction palliative radiotherapy for osteosarcoma in 24 dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 2002, 38, 445–451.
77. Ames E., Canter R.J., Grossenbacher S.K., Mac S., Chen M., Smith R.C., Hagino T., Perez-Cunningham J., Sckisel G.D., Urayama S., Monjazeb A.M., Fragoso R.C., Sayers T.J., Murphy W.J.: NK Cells Preferentially Target Tumor Cells with a Cancer Stem Cell Phenotype. *J. Immunol.* 2015, 195, 4010–4019.
78. Houdt I.S. van, Sluiter B.J.R., Moesbergen L.M., Vos W.M., de Gruijl T.D., Molenkamp B.G., van den Eertwegh A.J.M., Hooijberg E., van Leeuwen P.A.M., Meijer C.J.L.M., Oudejans J.J.: Favorable outcome in clinically stage II melanoma patients is associated with the presence of activated tumor infiltrating T-lymphocytes and preserved MHC class I antigen expression. *Int. J. Cancer* 2008, 123, 609–615.
79. Raval R.R., Sharabi A.B., Walker A.J., Drake C.G., Sharma P.: Tumor immunology and cancer immunotherapy: summary of the 2013 SITC primer. *J. Immunother. Cancer* 2014, 2, 14.
80. Dudley M.E., Wunderlich J.R., Yang J.C., Sherry R.M., Topalian S.L., Restifo N.P., Royal R.E., Kammula U., White D.E., Mavroukakis S.A., Rogers L.J., Gracia G.J., Jones S.A., Mangiameli D.P., Pelletier M.M., Gea-Banacloche J., Robinson M.R., Berman D.M., Filie A.C., Abati A., Rosenberg S.A.: Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 2005, 23, 2346–2357.
81. Dudley M.E., Yang J.C., Sherry R., Hughes M.S., Royal R., Kammula U., Robbins P.F., Huang J., Citrin D.E., Leitman S.F., Wunderlich J., Restifo N.P., Thomasian A., Downey S.G., Smith F.O., Klapper J., Morton K., Laurencot C., White D.E., Rosenberg S.A.: Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J. Clin. Oncol.* 2008, 26, 5233–5239.
82. Gattinoni L., Finkelstein S.E., Klebanoff C.A., Antony P.A., Palmer D.C., Spiess P.J., Hwang L.N., Yu Z., Wrzesinski C., Heimann D.M., Surr C.D., Rosenberg S.A., Restifo N.P.: Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 2005, 202, 907–912.

Mgr Iwona Szopa, e-mail: iwona_szopa@sggw.pl