



## Immunomodulujące działanie wybranych chemioterapeutyków przeciwnowotworowych

Jakub Gołąb<sup>1</sup>, Radosław Zagożdżon<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Immunologii, Centrum Biostruktury, Akademia Medyczna, Warszawa

<sup>2</sup>Klinika Immunoterapii i Chorób Wewnętrznych, Instytut Transplantologii, Akademia Medyczna, Warszawa

### Immunomodulatory effects of selected chemotherapeutics

#### Summary

Chemotherapeutics are still regarded as a mainstay of antitumor strategies. A number of observations indicate that these agents might be used at low doses with the same or even better efficacy than the high-dose chemotherapy. The efficacy of the low-dose chemotherapy might be at least partly explained by the regulation of the antitumor immune response. These immunomodulatory effects might be further potentiated by combinations with selected biological response modifiers, such as recombinant cytokines (IL-2, TNF, IL-12). The effectiveness of such combinations has already proved encouraging in pre-clinical models.

#### Key words:

immunomodulation, chemotherapy, cytokines, interleukin-12, tumors.

#### Adres do korespondencji

Jakub Gołąb,  
Zakład Immunologii,  
Centrum Biostruktury,  
Akademia Medyczna,  
ul. Chałubińskiego 5,  
02-004 Warszawa;  
e-mail:  
jgolab@ib.amwaw.edu.pl

### 1. Wprowadzenie

Od pierwszego zastosowania aminopteryny w leczeniu dziecięcej białaczki w 1948 r. (1), wiele nowych rodzajów chemioterapeutyków zostało z różnym skutkiem wprowadzone do leczenia chorób nowotworowych, a wiedza na temat działania tego rodzaju leków uległa bardzo znacznemu poszerzeniu. Znaczący postęp dokonał się zwłaszcza w rozumieniu działania poszczególnych związków zarówno na same komórki nowotworowe, jak również na cały poddawany leczeniu organizm. Początkowo sądzi-

no, że działanie chemioterapeutyków przeciwnowotworowych polega na wpływie antyproliferacyjnym i cytotoksycznym na namnażające się komórki, czyli na komórki nowotworowe, ale również na wiele rodzajów komórek prawidłowych. Sądzono też, że mechanizm ten powoduje, że wszystkie cytostatyki przeciwnowotworowe wywierają działanie immunosupresyjne, gdyż hamują nieswoiste procesy proliferacji niezbędne do wywoływania prawidłowej odpowiedzi immunologicznej. Jednakże na podstawie uzyskanych wyników badań zmieniono poglądy w tej kwestii. Pierwsze doniesienia dotyczące potęgowania przez chemioterapeutyki przeciwnowotworowe niektórych procesów zależnych od układu odpornościowego dotyczą między innymi działania cyklofosfamidu (2) oraz adriamycyny (doksorubicyny) (3). Obecnie kwestia immunomodulującego działania leków przeciwnowotworowych jest coraz częściej rozważana w trakcie poszukiwań nowych substancji tego typu lub też przy próbach modyfikacji struktury związków już znanych. Należy jednak zaznaczyć, że działanie na układ odpornościowy jest w przypadku cytostatyków zależne nie tylko od rodzaju samego preparatu, lecz również od użytej dawki, a przy próbach łączenia ich z immunoterapią często zależy od zastosowanego schematu leczenia i sekwencji czasowych podania obu rodzajów preparatów (4). W artykule tym opisano te spośród chemioterapeutyków przeciwnowotworowych, których modulujące działanie na niektóre procesy związane z układem odpornościowym zostało dobrze udokumentowane.

Większość obserwacji dotyczących immunomodulującego działania chemioterapeutyków przeprowadzono na zwierzętach doświadczalnych. Należy jednak pamiętać o dużych rozbieżnościach jakie mogą występować w badaniach na modelach zwierzęcych, a obserwacjami prowadzonymi w czasie leczenia ludzi. Decydują o tym co najmniej dwa czynniki. Pierwszy, to rozbieżności międzygatunkowe. Drugi, to sposób podawania chemioterapeutyków przeciwnowotworowych. W czasie badań laboratoryjnych możemy sobie pozwolić na zastosowanie chemioterapii w dawkach suboptymalnych. Natomiast we współczesnej onkologii klinicznej wciąż aktualny jest schemat podawania tych leków w maksymalnych, tolerowanych przez pacjenta dawkach. Stąd też prawie nieodłączną konsekwencją takiej chemioterapii jest krócej lub dłużej trwający stan immunosupresji. Zjawisko to leży u podłoża rozwoju chemioimmunoterapii, w której klasyczne chemioterapeutyki łączy się z czynnikami immunomodulującymi. Podejściu takiemu przyświecają co najmniej dwa cele. Pierwszym z nich jest przyspieszenie odnowy szpiku (a w konsekwencji również wielu elementów układu odpornościowego) po chemioterapii. Metoda ta jest obecnie powszechnie stosowana w wielu ośrodkach onkologicznych przez podawanie czynników wzmagających krwiotworzenie (G-CSF, GM-CSF, erytropoetyna). Drugim celem chemioimmunoterapii jest wzbudzenie lub wzmoczenie już istniejącej odpowiedzi immunologicznej przeciwko nowotworowi. Istotne są, jak się wydaje, chemioterapeutyki o przypuszczalnym działaniu immunomodulującym. Twórcy tego rodzaju modeli chemioimmunoterapeutycznych liczą na wzmoczenie korzystnych działań chemioterapeutyków poprzez dodanie, np. cytokin przeciwnowotworowych. Poda-



jemy również przykłady doświadczalnej chemioimmunoterapii z użyciem opisywanych leków.

## 2. Cyklofosfamid

Duże dawki cyklofosfamidu, leku używanego w leczeniu nowotworów u ludzi od lat sześćdziesiątych, wywołują stan znacznej immunosupresji. Z tego powodu lek ten klasycznie stosowany jest w niektórych chorobach autoimmunizacyjnych (np. pewnych postaciach kłębuszkowych zapaleń nerek). Jednakże użycie małych dawek cyklofosfamidu powoduje wzmożenie niektórych procesów immunologicznych. Po raz pierwszy zostało to dostrzeżone w roku 1967, kiedy to wykazano, że zastosowanie cyklofosfamidu może wzmacniać uczulenie kontaktowe po podaniu dinitrochlorobenzenu u świnki morskiej (2). W późniejszych badaniach zaobserwowano, że cyklofosfamid może wzmacniać procesy immunologiczne związane z funkcją limfocytów T. Efekt ten początkowo wiązano z hamowaniem przez cyklofosfamid odpowiedzi immunologicznej z udziałem przeciwciał, jednak w kolejnych doniesieniach opisywano wzmacnianie odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego również przez dawki cyklofosfamidu, które nie wpływały hamująco na wytwarzanie przeciwciał. Na podstawie uzyskanych wyników przypuszcza się, że cyklofosfamid hamuje *in vivo* nieokreśloną precyzyjnie populację komórek regulujących funkcję układu odpornościowego. Istotnie, w badaniach *in vitro* opisano znacznie większą podatność na działanie cyklofosfamidu dosyć jednolitej populacji komórek o działaniu immunosupresyjnym niż pozostałych populacji komórek układu odpornościowego (5). Wyniki tych badań zostały potwierdzone w trakcie oceny komórek krwi obwodowej u pacjentów z zaawansowanymi nowotworami poddawanych terapii cyklofosfamidem (6). Cyklofosfamid jest z tego powodu dość często używany w doświadczalnych schematach chemioimmunoterapii. Między innymi, posługując się jednym z najbardziej interesujących immunoterapeutyków przeciwnowotworowych – interleukiną-12, wykazano niedawno synergizm tej cytokiny z cyklofosfamidem we wzmacnianiu alergicznego kontaktowego zapalenia skóry u myszy (7). Opisano również korzystne wyniki zastosowania łączonej terapii IL-12 i cyklofosfamidem w modelu mysiego czerniaka B16 (8).

## 3. Doksorubicyna

Doksorubicyna jest lekiem wywierającym złożony wpływ na komórki docelowe. Do jej działania zalicza się m.in. tworzenie wiązań krzyżowych w DNA, hamowanie topoizomerazy II, fragmentowanie przerwań w nici DNA, a także tworzenie wolnych rodników (9). Jednakże w badaniach porównawczych wykazano, że efekt przeciwnowotworowy doksorubicyny (w przeciwieństwie do podobnej strukturalnie daunoru-



bicyny) zależny jest również od układu odpornościowego (3). Badania te zostały potwierdzone w pracach przeprowadzonych na komórkach opornych na bezpośrednie działanie doksorubicyny (10). Wyniki tych badań były zachętą do dokładniejszej analizy wpływu doksorubicyny na układ odpornościowy. Dotychczas wykazano, że doksorubicyna może wywierać stymulujący wpływ na wiele procesów związanych z układem odpornościowym, takich jak: wzmacnianie różnicowania i aktywacji makrofagów, wzmacnianie aktywności otrzewnowych komórek NK, stymulowanie funkcji limfocytów Tc w układzie allogenicznym, zwiększenie wytwarzania IL-1, zwiększenie wytwarzania IL-2. Dowiedziono także, że doksorubicyna synergizuje w aktywacji procesów immunologicznych, jak również w działaniu przeciwnowotworowym z takimi cytokinami, jak TNF (11), IL-2 (12) i M-CSF (13). Opisywano też korzystne wyniki zastosowania łączonej terapii IL-12 i doksorubicyną na modelu mysiego raka pęcherza moczowego MB-49 (12). Wykazano również, że mechanizmem współdziałania doksorubicyny z przeciwnowotworową odpowiedzią immunologiczną może być uwrażliwienie przez doksorubicynę komórek nowotworowych na zjawisko cytotoksyczności komórkowej zależnej od sygnału do apoptozy przekazywanego za pośrednictwem pary cząsteczek powierzchniowych Fas (CD95) – FasL (14).

Pojawiło się również doniesienie o wzmacnieniu działania przeciwnowotworowego doksorubicyny przez połączenie jej z IL-12 na modelu mysiego czerniaka B16F10 (15). Doniesienie to miało jednak formę nie pozwalającą na określenie czy był to wynik istotny statystycznie. Komentując je musimy stwierdzić, że w trakcie własnych badań nie udało nam się zaobserwować korzyści w działaniu przeciwnowotworowym po połączeniu doksorubicyny z IL-12 na modelu tego czerniaka (dane nie publikowane). Udało się jednak opisać wybitny synergizm w działaniu przeciwbiałaczkowym tych dwóch leków (16). Efekt ten wyraźnie zależny był od zachowanej prawidłowej czynności układu odpornościowego badanych zwierząt, gdyż znosiło go zarówno uprzednie, subletalne napromieniowanie myszy promieniami X, jak też eliminacja makrofagów. Nieoczekiwanie, choć oba czynniki pobudzają wytwarzanie tlenku azotu (NO) przez makrofagi, okazało się, że efekt przeciwnowotworowy jest niezależny od wydzielania tego mediatora cytotoksyczności (17).

#### 4. Cisplatyna

W przypadku cisplatyny, najlepiej dowiedziony jest aktywujący wpływ tego leku na przeciwnowotworowe właściwości makrofagów. Wykazano, że działanie cisplatyny na makrofagi powoduje zwiększenie wydzielania przez nie takich mediatorów odpowiedzi immunologicznej, jak IL-1 i TNF (18), tlenek azotu (NO) (19) czy też onkostatyna M (20). Znany jest również aktywujący wpływ cisplatyny na komórki NK (21). Podobnie jak to ma miejsce w przypadku doksorubicyny, cisplatyna również może uwrażliwiać komórki nowotworowe na działanie mechanizmów efektorowych układu odpornościowego (22). Efekt ten może być z jednej strony zależny od zwiększenia



szania przez cisplatynę ekspresji antygenów związanych z nowotworem na powierzchni komórek nowotworowych, z drugiej od zwiększenia podatności tych komórek na cytotoksyczność związaną ze szlakiem Fas-FasL (14). Stosunkowo niedawną obserwacją jest synergizm cisplatyny w działaniu przeciwnowotworowym z IFN- $\gamma$  (23) i TNF (23,24). Prace prowadzone w naszym ośrodku pozwoliły na opisanie potęgowania działania cisplatyny po połączeniu z IL-12 na modelu mysiego czerniaka (24) i białaczki (16).

## 5. Taxol

Taxol (nazwa substancji czynnej zalecana przez WHO – paclitaxel) jest najpóźniej odkrytym z opisywanych tu cytostatyków przeciwnowotworowych. Wyizolowany został z pnia i liści cisu *Taxus brevifolia*. Jednym z pierwszych odkrytych mechanizmów działania przeciwnowotworowego taxolu jest stabilizacja mikrotubul w komórkach docelowych (25), co czyniło z niego wyjątek wśród innych chemioterapeutyków przeciwnowotworowych. Wykazano, że działanie taxolu na komórki nowotworowe związane jest z zahamowaniem syntezy białek (26), indukowaniem apoptozy (27) oraz zwiększaniem podatności komórek na działanie radioterapii (28) i cytotoksyczność TNF (29). Jednakże oprócz działania bezpośredniego na komórki nowotworowe, wykazano swoisty, przypominający działanie LPS, wpływ taxolu na makrofagi (30). Wpływ ten, jak się wydaje, jest niezależny od stabilizacji mikrotubul przez taxol, gdyż inne znane obecnie związki hamujące tworzenie mikrotubul, nie mają aktywującego wpływu na makrofagi (31). Wykazano, że inkubacja makrofagów z taxolem powoduje zwiększenie w nich wydzielania m.in. IL-1 i TNF (30,32), a także wpływa modulująco na wydzielanie NO (33), jak również zwiększa właściwości przeciwnowotworowe makrofagów (33). Wykazano także, że w swoim wpływie na makrofagi taxol synergizuje z IFN- $\gamma$  (33). W trakcie naszych badań wykazaliśmy co prawda brak potęgowania działania przeciwbiałczkowego taxolu w połączeniu z IL-12 (16), ale za to na modelu mysiego czerniaka MmB16 efekt wzajemnego wzmagania skuteczności tych dwóch czynników był bardzo wyraźny (34).

## 6. 5-Fluorouracyl

5-FU ma właściwości immunomodulacyjne nieco podobne do cisplatyny, choć istnieją pewne różnice w działaniu tych chemioterapeutyków. Inkubacja tych leków z komórkami jednojądrzastymi krwi obwodowej *in vitro* prowadzi do wydzielania szeregu cytokin, takich jak IFN- $\gamma$ , TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 oraz IL-12 (35). Eliminacja komórek NK z populacji leukocytów poddawanych działaniu chemioterapeutyków niemal całkowicie znosi wzrost wydzielania cytokin. Sugerowałoby to, że komórki NK są głównym źródłem produkowanych cytokin. Biorąc jednak pod uwagę fakt, że ko-



mórki te nie są zdolne do produkcji IL-12, wskazywałoby to na bardziej złożony mechanizm działania chemioterapeutyków, które uruchamiają szereg interakcji między poszczególnymi populacjami leukocytów. Obok wpływu na wydzielanie cytokin 5-FU w nieznacznym stopniu wzmacnia również cytotoksyczność komórek NK (4). Podobne efekty odnotowano badając wpływ cisplatyny i 5-FU na leukocyty wyizolowane od pacjentów z rakami głowy i szyi (36). Immunomodulacyjne działanie tych chemioterapeutyków potwierdzają wyniki badań klinicznych, w których zaobserwowano, że 5-FU zwiększa aktywność komórek NK u tych chorych, którzy znacznie lepiej „odpowiedzieli” na terapię (37). Ponadto terapia niewielkimi dawkami 5-FU i cisplatyny, jak się wydaje, zmniejsza kooperacyjną supresję aktywności komórek NK u pacjentów z nowotworami przewodu pokarmowego (38).

Okazuje się, że usunięcie komórek NK z organizmu zwierząt doświadczalnych w znacznym stopniu zmniejsza efekt przeciwnowotworowy 5-FU i cisplatyny (36). Nieoczekiwanie jednak, efektywność terapii łączonej 5-FU z IL-12, prowadzącej do wyleczenia znacznego odsetka myszy mających przeszczepioną białaczkę L1210, jest niezależna od obecności komórek NK. Efekt terapii jest równie korzystny u myszy kontrolnych jak i u myszy, którym usunięto komórki NK. Z kolei u myszy Scid/Scid, pozbawionych limfocytów T i B, ale mających komórki NK kombinacja 5-FU z IL-12 jest nieefektywna (39).

Jeszcze bardziej przekonujących danych dokumentujących immunomodulujące właściwości 5-FU dostarczyły badania terapii genowej nowotworów, w których wykorzystywano strategię enzym/prolek. W tym podejściu terapeutycznym transfekuje się komórki nowotworowe genem kodującym enzym pochodzący z bakterii *E. coli*, określane jako deaminaza cytozyny. Enzym ten przekształca nieaktywny prolek – 5-fluorocytozynę w 5-FU. Nieoczekiwanie, całkowitym wyleczeniom towarzyszy trwała pamięć immunologiczna, charakteryzująca się tym, że wyleczone zwierzęta odrzucają ponownie podane, niezmodyfikowane genetycznie komórki nowotworowe (40). Wydawałoby się również, że tylko komórki transfekowane, w których znajduje się „samobójczy” gen powinny przekształcić nieaktywną substancję prekursorową w klasyczny chemioterapeutyk i zostać selektywnie zniszczone w przebiegu terapii. Okazuje się jednak, że w wyniku terapii giną nie tylko komórki zmodyfikowane genetycznie i sąsiadujące komórki nowotworowe, ale regresji ulegać mogą również odległe ogniska przerzutowe (41). Ten efekt określany jako „efekt odległego przypadkowego przechodnia” (*bystander effect at a distance*) można zaobserwować tylko u myszy ze sprawnym układem odpornościowym. Usunięcie komórek NK z organizmu zwierząt doświadczalnych niemal całkowicie znosi efekt przeciwnowotworowy (41).

Większości efektów immunomodulujących chemioterapeutyków nie udaje się przewidzieć na podstawie wyników doświadczeń *in vitro*. Dowodów na to dostarczają choćby eksperymenty, w których porównywano efekt przeciwbiałaczkowy kombinacji IL-12 z klasycznymi chemioterapeutykami. Choć niektóre chemioterapeutyki wywierają podobne efekty na te same populacje leukocytów to ich skuteczność



przeciwnowotworowa w kombinacji z IL-12 może być diametralnie odmienna. Dobrym przykładem jest porównanie cisplatyny i 5-FU. Choć, jak wspomniano, obie substancje wywierają bardzo podobne efekty immunomodulujące *in vitro* to jednak efekt *in vivo* jest zupełnie inny. Tylko terapia 5-FU w połączeniu z IL-12 prowadzi do całkowitego wyleczenia myszy. Cisplatyna jedynie nieznacznie zwiększa przeciwbiałaczkowy efekt IL-12.

## 7. Podsumowanie

Chemioimmunoterapia nowotworów jest nadal rzadko wykorzystywana w leczeniu nowotworów u ludzi. Dokładniejsze zrozumienie mechanizmów leżących u podłoża obserwowanych efektów w badaniach przedklinicznych coraz bardziej zbliżają jednak do podjęcia kolejnych prób zastosowania tego rodzaju terapii w klinice. Sprzyja temu również pojawienie się nowych cytokin o działaniu przeciwnowotworowym, spośród których niewątpliwie na pierwszym planie znajduje się nadal, pomimo wstępnych rozczarowań, interleukina 12.

## Literatura

1. Farber S., Diamond L. K., Mercer R. D., (1948), N. Engl. J. Med., 238, 787-793.
2. Maguire H. C., Ettore V. L., (1967), J. Invest. Dermatol., 48, 39-43.
3. Schwartz H. S., Gridney G. B., (1973), Cancer Res, 33, 1837-1844.
4. Gazit Z., Kedar E., (1994), Cancer Immunol. Immunother., 38, 243-252.
5. Cowens J. W., Ozer H., Ehrke M. J., (1984), J. Immunol., 132, 95-100.
6. Berd D., Mastrangelo M. J., (1988), Cancer Res., 48, 1671-1675.
7. Maguire H. C., (1996), Acta Derm. Venereol., 76, 277-279.
8. Teicher B. A., Ara G., Buxton D., Palombella V. J., Adams J., (1997), Clin. Cancer Res., 3, 1661-1667.
9. Tewey K. M., Rowe T. C., Yang L., Halligan B. D., Liu L. F., (1984), Science, 226, 466-468.
10. Maccubbin D. L., Wing K. R., Mace K. F., Ho R. L., Ehrke M. J., Mihich E., (1992), Cancer Res., 52, 3572-3576.
11. Ehrke M. J., Maccubbin D. L., Ho R. L. X., (1990), Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 31, 294.
12. Ho R. X. L., Maccubbin D. L., Ujhazy P., Zaleskis G., Eppolito C., Mihich E., Ehrke M. J., (1993), Oncol. Res., 5, 363-372.
13. Douzono M., Suzu S., Yamada M., Yanai N., Kawashima T., Hatake K., Motoyoshi K., (1995), Jpn. J. Cancer Res., 86, 315-321.
14. Micheau O., Solary E., Hammann A., Martin F., Dimanche-Boitrel M. T., (1997), J. Natl. Cancer Inst., 89, 783-789.
15. Brunda M. J., Luistro L., Rumennik L., Wright R. B., Dvoroziak M., Aglione A., Wigginton J. M., Wiltrout R. H., Hendrzak J. A., Palleroni A. V., (1996), Cancer Chemother. Pharmacol., 38, S16-S21.
16. Zagożdżon R., Gołąb J., Stokłosa T., Giermasz A., Nowicka D., Feleszko W., Lasek W., Jakóbiński M., (1998), Int. J. Cancer, 77, 720-727.
17. Zagożdżon R., Giermasz A., Gołąb J., Stokłosa T., Jalili A., Jakóbiński M., (1999), Cancer Lett, 147, 67-75.
18. Palma J. P., Aggarwal S. K., (1995), Anti-Cancer Drugs, 6, 311-316.
19. Son K., Kim Y.-M., (1995), Cancer Res., 55, 5524-5527.

20. Sohdi A., Shishodia S., Shrivastava A., (1997), *Immunol. Cell Biol.*, 75, 492-496.
21. Pai K., Sohdi A., (1992), *Neoplasma*, 39, 363-367.
22. Noguchi K., Tanimura H., Yamaue H., Iwahashi M., Tsunoda T., Tani M., Tamai M., Hotta T., Mizobata S., Arii K., (1998), *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 123, 345-351.
23. Clark S., McGuckin M. A., Hurst T., Ward B., (1994), *Cancer Immunol. Immunother*, 39, 100-104.
24. Zagożdżon R., Stokłosa T., Gołąb J., Giermasz A., Kaca A., Kultchitska L. A., Lasek W., Jakóbisiak M., (1997), *Anticancer Res.*, 17, 4493-4498.
25. Schiff P. B., Fant J., Horwitz S. B., (1979), *Nature*, 22, 665-667.
26. Manfredi J. J., Horwitz S. B., (1984), *Pharmacol. Ther.*, 25, 83-125.
27. Bhalla K., Ibrado A. M., Tourkina E., Tang C., Mahoney M. E., Huang Y., (1993), *Leukemia*, 7, 563-568.
28. Liebmann J., Cook J. A., Fisher J., Teague D., Mitchell J. B., (1994), *J. Natl. Cancer Inst.*, 86, 441-446.
29. Williams S., Mutch D. G., Xu L., (1992), *Am. J. Obstet Gynecol.*, 167, 1870-1876.
30. Bogdan C., Ding A., (1992), *J. Leukocyte Biol.*, 52, 119-121.
31. Muhlratt P. F., Sasse F., (1997), *Cancer Res.*, 57, 3344-3346.
32. Bottex-Gauthier C., Condemine F., Picot F., Vidal D., (1992), *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 14, 39-61.
33. Mullins D. W., Walker T. M., Burger C. J., Eglert K. D., (1997), *Cancer Immunol. Immunother*, 45, 20-28.
34. Zagożdżon R., Gołąb J., Mucha K., Foroniewicz B., Jakóbisiak M., (1999), *Int. J. Mol. Med.*, 4, 645-648.
35. Okamoto M., Kasetani H., Kaji R., Goda H., Ohe G., Yoshida H., Sato M., (1998), *Cancer Immunol. Immunother*, 47, 233-241.
36. Okamoto M., Ohe G., Oshikawa T., Nishikawa H., Furuichi S., Yoshida H., Sato M., (2000), *Anti-Cancer Drugs*, 11, 165-173.
37. Weiner L. M., Hudes G. R., Kitson J., Walczak J., Watts P., Litwin S., O'Dwyer P. J., (1993), *Cancer Immunol. Immunother.*, 36, 185-190.
38. Ishikawa K., Shimoda K., Shiraishi N., Adachi Y., Kitano S., (1998), *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 28, 374-377.
39. Gołąb J., Zagożdżon R., Kamiński R., Kozar K., Gryśka K., Iżycki D., Mackiewicz A., Stokłosa T., Giermasz A., Lasek W., Jakóbisiak M., (2001), *Leukemia*, 15, 613-620.
40. Mullen C. A., Coale M. M., Lowe R., Blease R. M., (1994), *Cancer Res.*, 54, 1503-1506.
41. Pierrefite-Carle V., Baque P., Gavelli A., Mala M., Chazal M., Gugenheim J., Bourgeon A., Milano G., Staccini P., Rossi B., (1999), *J. Natl. Cancer Inst.*, 91, 2014-2019.