POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 32 2005 NR 1 (97–109)

PERSPEKTYWY ZASTOSOWANIA IMMUNOTERAPII W LECZENIU NEUROBLASTOMA*

PERSPECTIVES OF APPLICATION OF IMMUNOTHERAPY IN NEUROBLASTOMA TREATMENT

Irena HORWACIK

Pracownia Genetyki Molekularnej i Wirusologii, Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Streszczenie: Neuroblastoma jest najczęstszym pozaczaszkowym guzem litym u dzieci. Pomimo intensywnego leczenia u większości dzieci z neuroblastoma wysokiego ryzyka dochodzi do wznowy. Konieczne jest opracowanie nowych metod walki z minimalną chorobą resztkową, które polepszyłyby przeżywalność dzieci z neuroblastoma wysokiego ryzyka. Immunoterapia jest jedną z obecnie rozwijanych strategii. W pracy omówiono opublikowane w ostatnich latach dane literaturowe dotyczące immunoterapii neuroblastoma. Przytoczono publikacje, w których badano wzajemne oddziaływanie neuroblastoma i składników układu odpornościowego. Omówiono rozwijane w badaniach klinicznych i przedklinicznych podejścia immunoterapeutyczne do walki z tą chorobą: bierną i czynną terapię, której celem jest antygen neuroblastoma gangliozyd GD2, zastosowanie modyfikowanych komórek neuroblastoma i komórek dendrytycznych jako szczepionek.

Słowa kluczowe: neuroblastoma, immunoterapia nowotworów, przeciwciała monoklonalne, gangliozyd GD2.

Summary: Neuroblastoma is the most common extracranial tumour of childhood. Despite of the application of intensive treatment regiments, the majority of high-risk patients are eventually relapsing. This stresses the need for new therapeutical approaches to eradicate residual tumour cells, which might improve the survival of the high-risk group neuroblastoma patients. Immunotherapy of neuroblastoma is one of the currently developed strategies. In this publication recent data on application of immunotherapy in neuroblastoma treatment have been reviewed. They include the publications investigating neuroblastoma interactions with immune system. Clinically tested and preclinically developed approaches engaging the immune system to fight the tumour have been reviewed. They include data on development of the passive and active therapies targeting a neuroblastoma antigen GD2 ganglioside, as well as application of modified tumour cells and dendritic cells as vaccines.

Key words: neuroblastoma, immunotherapy, monoclonal antibody, GD2 ganglioside.

*Praca finansowana z projektu naukowo badawczego Ministerstwa Nauki i Informatyzacji 3P05A00124

1. WPROWADZENIE

Neuroblastoma (nerwiak zarodkowy współczulny) jest chorobą nowotworową wieku wczesnodziecięcego. Zaliczana jest do grupy guzów „drobno-okrągło-komórkowych". Jej źródłem są pierwotne komórki nerwowe, wędrujące z cewy nerwowej, aby dać początek strukturom obwodowego układu nerwowego. Jest to najczęstszy pozaczaszkowy guz lity [2]. Rocznie, neuroblastoma stanowi w przybliżeniu 10% wszystkich nowotworów diagnozowanych u dzieci i młodzieży (w Polsce około 70 zachorowań).

Guz pierwotny, w największej liczbie przypadków, umiejscowiony jest w okolicy nadnerczy (zwłaszcza u dzieci młodszych), a dalej w śródpiersiu, okolicach szyi i okolicy krzyżowej [25]. Stopień kliniczny neuroblastoma określany np. według międzynarodowego systemu klasyfikacji neuroblastoma (INSS, ang. *International Neuroblastoma Staging System*) i wiek są ważnymi czynnikami prognozującymi przebieg choroby [2]. U dzieci poniżej pierwszego roku życia, ze zlokalizowaną chorobą prognozy są dobre. W tej grupie wiekowej występuje również rozsiany typ choroby, z wtórnymi ogniskami nowotworu głównie w wątrobie i skórze (stopień 4S INSS). Takie dzieci, pomimo obecności wtórnych ognisk nowotworu, mają ogólnie bardzo dobre prognozy, co ma związek z obserwowaną spontaniczną regresją (zanikiem) choroby. Większość przypadków neuroblastoma nie zanika spontanicznie. Neuroblastoma wysokiego ryzyka daje złe prognozy na wyleczenie. Do tej grupy zalicza się głównie dzieci mające powyżej 1 roku życia, u których występuje: zaawansowana neuroblastoma (stopień 4 INSS) z wtórnymi ogniskami nowotworu przede wszystkim w szpiku kostnym, kościach, węzłach chłonnych lub dzieci z chorobą w stopniu 2 i 3 INSS z amplifikacją onkogenu *MYCN* [2,21].

Oprócz stopnia zaawansowania choroby czy wieku pacjenta prognostyczne znaczenie ma również typ histologiczny guza. Neuroblastoma charakteryzuje się heterogennością. Guzy różnią się stopniem zróżnicowania i dojrzewania, stąd podział na neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, ganglioneuroma [25,49]. Dodatkowo, bada się również cechy genetyczne neuroblastoma w kierunku występowania mutacji somatycznych, np. amplifikacji genu *MYCN*, zmian ploidalności, delecji 1p [35]. Amplifikacja onkogenu *MYCN* źle rokuje w przebiegu neuroblastoma [58,65].

Metody leczenia pacjentów z neuroblastoma wysokiego ryzyka obejmują intensywną indukcyjną chemioterapię, zabieg chirurgiczny, mieloablatywną konsolidację z przeszczepem komórek krwiotwórczych, radioterapię. W leczeniu minimalnej choroby resztkowej (MRD, ang. *minimal residual disease*), a więc w niszczeniu tych klonów komórek nowotworowych, które pozostały po chemioterapii i radioterapii próbuje się stosować np. pochodne kwasu retinowego czy immunoterapię [2,62]. Zastosowanie intensywnej terapii u pacjentów wysokiego ryzyka pozwala na wydłużenie czasu, w którym choroba pozostaje w remisji. Niestety, u większości pacjentów z neuroblastoma wysokiego ryzyka dochodzi do wznowy, często w miejsca odległe niż guz pierwotny, zazwyczaj do szpiku kostnego i kości, a komórki za nią odpowiedzialne charakteryzują się m.in. chemiooopornością.

Przeżywalność dzieci z neuroblastoma wysokiego ryzyka jest wciąż niezadowalająca, co skłania do opracowania nowych programów leczenia. Jednym z kierunków badań nad metodami walki z MRD jest opracowanie immunoterapii neuroblastoma, u której podstaw leży mobilizacja układu odpornościowego pacjenta do walki z tą chorobą.

2. ODDZIAŁYWANIE NEUROBLASTOMA Z UKŁADEM ODPORNOŚCIOWYM

Opracowanie skutecznej immunoterapii, wymaga poznania związków pomiędzy komórkami transformowanymi a układem odpornościowym. Oddziaływanie to ma charakter złożony. Dla wielu typów nowotworów wykazano zdolność układu odpornościowegodo rozpoznania i niszczenia komórek transformowanych. Z drugiej strony poznano także mechanizmy ucieczki komórek rakowych spod kontroli tego układu, czy opisano udział jego składników w patogenezie raka [22,23,28,60].

Szereg prac z ostatnich lat dostarcza informacji o oddziaływaniu neuroblastoma z układem odpornościowym**:**

- w 53% z 98 preparatów guza pierwotnego od pacjentów z neuroblastoma w 4 stopniu choroby przed wdrożeniem leczenia wykazano obecność komórek NK T, co związane było z ekspresją chemokiny CCL2 w badanych guzach. Obecność tych komórek silnie korelowała z 5-letnią zdolnością do przeżycia chorych dzieci [34],
- u niektórych osób zdrowych i pacjentów z neuroblastoma wykazano obecność przeciwciał klasy IgM skierowanych przeciwko neuroblastoma [18],
- zbadano, że naturalne przeciwciała klasy IgM (od osób zdrowych) hamują *in vivo* wzrost oraz tworzenie wtórnych ognisk u szczurów z ksenoprzeszczepem ludzkiej linii neuroblastoma LAN-1 [17],
- u 3 z 47 pacjentów z neuroblastoma stwierdzono obecność przeciwciał klasy IgG wiążących antygen NY-ESO-1 obecny na neuroblastoma [48],
- *in vitro,* w hodowlach limfocytów od niektórych pacjentów z neuroblastoma wykazano, że limfocyty T $CD4^+$ i $CD8^+$ po uprzedniej stymulacji swoiście eliminują komórki neuroblastoma wykazujące ekspresję białka NY-ESO-1 [48],
- świeżo izolowane dziewicze oraz aktywowane przy pomocy interleukiny 2 (IL-2) limfocyty Tγδ od zdrowych dawców zabijają komórki neuroblastoma [54].

Wymienione obserwacje, a także fakt, iż u większości dzieci z neuroblastoma w stopniu 4S obserwuje się spontaniczną regresję choroby, co może mieć związek z zaangażowaniem mechanizmów odpornościowych, stanowią uzasadnienie dla prowadzenia badań na opracowaniem immunoterapeutycznego podejścia do leczenia tego rozrostu.

2.1. Antygenowość i immunogenność neuroblastoma

Na komórkach neuroblastoma wykazano ekspresję szeregu cząsteczek zaliczanych do antygenów związanych z nowotworami, co ma znaczenie dla wzbudzania swoistej komórkowej czy humoralnej odpowiedzi przeciwnowotworowej.

Gangliozyd GD2, glikolipidowy antygen, wykazuje stabilną i dość jednorodną ekspresję na komórkach neuroblastoma [26]. Dla neuroblastoma wykazano nadekspresję MYCN [53], obecność hydroksylazy tyrozyny [20], czy też białek należących do tzw. antygenów wspólnych (jądro/nowotwór), np. NY-ESO-1, MAGE-A1, MAGE-A3/A6 [48,68]. Wölfl i współpracownicy, wykazali ekspresję MAGE-A1, MAGE-A3/A6, NY-ESO-1 u odpowiednio 44, 21 i 28% spośród 19 preparatów guzów barwionych immunohistochemicznie. Otrzymany wzór barwienia świadczył o heterogennej ekspresji tych antygenów związanych z nowotworami. Zjawisko to obserwowane również dla innych typów nowotworów stanowi ograniczenie dla skutecznej eliminacji komórek rakowych z udziałem swoistych mechanizmów, w tym limfocytów T cytotoksycznych (CTL) [68].

Problem podatności neuroblastoma na CTL wciąż nurtuje badaczy. Neuroblastoma jest słabo immunogennym nowotworem, co jest związane m.in. z niskim poziomem lub brakiem cząsteczek MHC [68]. W badaniach, opisano szereg mechanizmów prowadzących do obniżenia lub braku ekspresji cząsteczek MHC I i MHC II w komórkach neuroblastoma, w tym również ekspresji indukowanej przez INF-γ [14,15,71]. Jednak, stosując metody czulsze od technik immunohistochemicznych, Spierings i współpracownicy wykazali, że nawet niski poziom cząsteczek MHC I jest wystarczający dla rozpoznania i lizy komórek neuroblastoma przez swoiste limfocyty T $CD8^+$. Pozwala to przypuszczać, że neuroblastoma może być celem dla immunoterapii, jeśli opracowane zostaną metody aktywowania swoistych CTL [61].

Co więcej, na neuroblastoma brak jest wielu cząsteczek kostymulujących. Obecność mRNA dla CD40, CD80, CD86, PD-1L, B7H2, OX40L, 4-1BBL stwierdzono dla szeregu ludzkich linii neuroblastoma oraz w komórkach neuroblastoma od pacjentów. Ekspresję białka OX40L wykazano tylko dla linii GI-CA-N i IMR-32. Co ważne na komórkach neuroblastoma ze szpiku kostnego od pacjentów wykazano ekspresję cząsteczki CD40 (we wszystkich 6 przebadanych próbkach), co otwiera możliwość opracowania terapiiz zastosowaniem CD40L. W połowie z tych próbek wykazano obecność cząsteczki CD86 [1].

2.2. Immunosupresja komórek dendrytycznych

Intensywnie badany jest wpływ neuroblastoma na komórki dendrytyczne (DC, ang. *dendritic cell*), co ma związek ze szczególną rolą pełnioną przez te profesjonalne komórki prezentujące antygeny w powstawaniu przeciwnowotworowej odpowiedzi odpornościowej oraz zdolnością do wzbudzania stanu tolerancji przez niedojrzałe DC [29,67].

Badania wykonane na układach modelowych wskazują na immunosupresję DC pod wpływem neuroblastoma. Wykazano, że DC różnicowane *in vitro* z prekursorów szpikowych od myszy z zaawansowaną neuroblastoma były dysfunkcjonalne, nawet po transdukcji wektorem adenowirusowym kodującym gen mysiej IL-12. Użycie tych komórek jako szczepionki podawanej do guza u myszy nie prowadziło do jego zaniku, co obserwowano z użyciem DC wyprowadzonych od zwierząt zdrowych [44]. Wykazano również, iż neuroblastoma w bezpośrednim kontakcie hamuje indukowane przez TNF-α dojrzewanie DC, obniżając ich zdolność do stymulacji allogenicznych limfocytów T, a także promuje apoptozę w hodowlach DC [10].

Shurin i współpracownicy zbadali, że komórki mysiej linii neuroblastoma Neuro-2a i ludzkiej linii neuroblastoma SK-N-BE, a także obecne na nich gangliozydy, odpowiednio GM3 i GD2, upośledzają proces różnicowania się DC z komórek wyjściowych (odpowiednio szpikowych progenitorów i komórek prekursorowych $CD34^+$ z krwi pępowinowej) [56].

Hamujące działanie gangliozydów na układ odpornościowy zostało szeroko opisane i jest nadal badane. U pacjentów z neuroblastoma gangliozydy, w tym GD2, są obecne we krwi. Wykazano zdolność tych związków do wiązania się do cytokin czy receptorów na komórkach krwi. Pozwala to przypuszczać, iż immunosupresyjny efekt jest wywierany nie tylko w mikrośrodowisku nowotworu, lecz również ogólnie ustrojowo [6].

2.3. Ucieczka spod kontroli komórek NK i dopełniacza

Niski poziom cząsteczek MHC lub ich brak aktywuje komórki NK, które mają zdolność do efektywnej lizy komórek nowotworowych i wydzielania limfokin [31]. Neuroblastoma jest wrażliwa na efektorowe mechanizmy z udziałem komórek NK. Wykazano skoordynowane współdziałanie obecnych na komórkach NK receptorów naturalnej cytotoksyczności NKp46 (NCR1), NKp44 (NCR2), NKp30 (NCR3) w zabijaniu komórek ludzkich linii neuroblastoma ACN i SK-N-BE [59].

Jednak Castriconi i współpracownicy [8] zaproponowali, że cząsteczka 4Ig-B7-H3 obecna u pacjentów na komórkach neuroblastoma (negatywnych pod względem ekspresji MHC I) hamuje cytotoksyczność komórek NK. Inny mechanizm ucieczki przed aktywnością komórek NK wykazano analizując fenotyp komórek neuroblastoma NXS2 izolowanych z guzów od myszy A/J. Guzy te rozwinęły się u zwierząt po początkowym zaniku, na skutek szczepienia suboptymalną dawką immunocytokiny hu14.18-IL-2 (białko fuzyjne „uczłowieczonego" przeciwciała wiążącego gangliozyd GD2 i IL-2). Terapia ta aktywuje komórki NK. *In vitro*, w tych komórkach neuroblastoma wykazano przejściowy wzrost ekspresji MHC I, ale spadek zawartości gangliozydu GD2. Dodatkowo udało się pokazać, że komórki o takim fenotypie były mniej podatne na bezpośrednią lizę z udziałem komórek NK, jak i na cytotoksyczność komórkową z udziałem przeciwciała hu14.18-IL-2 [36].

Heterogenność jest cechą charakterystyczną guzów typu neuroblastoma. Również w hodowlach *in vitro*, występują różniące się klony komórek: dominujący typ N o fenotypie neuroblastów, typ S odpowiadający komórkom Schwanna, a także typ pośredni [49]. Obserwowana zmienność może mieć znaczenie również dla oddziaływania ze składnikami układu odpornościowego. Neuroblastoma jest wrażliwa na mechanizmy zabijania z udziałem przeciwciał. Jednak, porównując podatność, na cytotoksyczność zależną od dopełniacza (CDC, ang. *complement-dependent cytotoxicity*) odpowiadających sobie klonów typu N i S stwierdzono, że komórki typu S były bardziej oporne na CDC. Korelowało to ze zwiększoną ekspresją związanych z błoną inhibitorów dopełniacza głównie cząsteczki CD59 [9].

3. IMMUNOTERAPIA NEUROBLASTOMA – KIERUNKI PROWADZONYCH BADAŃ

Z powyższych danych wynika, że tolerancja immunologiczna neuroblastoma jest aktywnie ustanawiana i utrzymywana. Lepsze poznanie mechanizmów regulujących to zjawisko daje szansę na opracowanie nowych metod leczenia, w tym szczepionek, zdolnych do przełamania tego stanu i mobilizacji do walki z chorobą mechanizmów obronnych pacjenta.

Ze względu na ograniczoną liczbę dzieci z neuroblastoma, które mogą uczestniczyć w badaniach I fazy klinicznej, podstawowe znaczenie dla rozwoju nowych metod leczenia tej choroby mają modele zwierzęce. Należy do nich model immunokompetentnych myszy A/J, do których transplantuje się komórki syngenicznej linii neuroblastoma C1300, TBJ, Neuro-2a czy NXS2 [4]. Ze względu na niski poziom ekspresji cząsteczek MHC I czy charakter wzbudzanej odpowiedzi przeciwnowotworowej, modele te dobrze oddają stan obserwowany u pacjentów. Komórki NXS2 wykazują heterogenną, ale stabilną ekspresję gangliozydu GD2. Zastosowanie m.in. tej linii, pozwala na modelowanie przerzutów, a zdolność tworzenia przez nią ognisk nowotworu w wątrobie i szpiku kostnym przypomina zaawansowany przebieg choroby u dzieci. Inne stosowane w badaniach modele to np. ksenoprzeszczepy ludzkiej neuroblastoma u gryzoni z niedoborami układu odpornościowego, myszy transgeniczne *MYCN* [4,17,41].

Obecnie rozwijanych jest szereg immunoterapii do walki z neuroblastoma. Poniżej omówiono wybrane prace z ostatnich lat dotyczące tej tematyki.

3.1. Przeciwciała wiążące gangliozyd GD2 w terapii neuroblastoma

Ponieważ gangliozyd GD2 wykazuje wysoką i dość jednorodną ekspresję na komórkach neuroblastoma, a także ograniczone występowanie na komórkach normalnych, przeciwciała swoiście wiążące ten antygen stosowane są dla diagnozowania tej choroby i oceny postępów leczenia [46]. Ten antygen cukrowy związany z nowotworami jest także celem opracowanych immunoterapii. Wykazano, że obecność gangliozydu GD2 w stanie wolnym w surowicy chorych nie jest wystarczająca, aby ingerować z biodystrybucją swoistych przeciwciał. Dodatkowo, wiadomo, że zastosowanie biernej terapii z udziałem przeciwciał wiążących gangliozyd GD2 nie prowadzi do spadku jego ekspresji na komórkach neuroblastoma [26].

Pozyskano szereg przeciwciał monoklonalnych wiążących gangliozyd GD2 [43]. Spośród nich 2 przeciwciała mysie 3F8 (IgG3), 14G.2a (IgG2a) oraz przeciwciało chimeryczne (powstałe z połączenia z regionów zmiennych mysiego przeciwciała i regionów stałych ludzkiej IgG1) ch14.18 są testowane w próbach klinicznych [12]. Dotychczas zgromadzone dane sugerują, że bierna terapia przy pomocy tych przeciwciał może mieć zastosowanie dla leczenia MRD (konsolidacja remisji) u pacjentów z neuroblastoma wysokiego ryzyka. Szereg krajów Unii Europejskiej w tym również ośrodki w Polsce będą uczestniczyć w randomizowanych badaniach III fazy klinicznej nad zastosowaniem przeciwciała ch14.18 w leczeniu MRD u dzieci z neuroblastoma

wysokiego ryzyka (dane z E-SIOP Neuroblastoma Meeting, Kraków, 22–24 października 2004). W doświadczeniach *in vitro*, wykazano, że przeciwciała wiążące gangliozyd GD2 pośredniczą w reakcjach CDC i ADCC (cytotoksyczność zależna od przeciwciał, ang. *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) [9,33,41]. Dodatkowo, wykazano, że efekt leczniczy może być związany z wzbudzaniem sieci przeciwciał idiotypowych. Po 6 i 14 miesiącach od zakończenia terapii, w surowicy pacjentów z neuroblastoma, leczonych przeciwciałem 3F8 wykazano obecność przeciwciał anty-antyidiotypowych (Ab3 oraz wiążących gangliozyd GD2 Ab3'), co dodatnio korelowało z przeżyciem pacjentów [11]. Prowadzone są badania nad immunomodulacją tej terapii z zasto-sowaniem adjuwantów, np. GM-CSF, β-glukanem [13,39]. W badaniach II fazy klinicznej wykazano odpowiedź u pacjentów z neuroblastoma oporną na leczenie po terapii z udziałem przeciwciała 3F8 i GM-CSF [27].

W hodowlach komórkowych i z zastosowaniem modeli mysiej neuroblastoma bada się szereg pochodnych przeciwciał wiążących gangliozyd GD2, np.

- **immunocytokiny** np. hu14.18-GM-CSF, ch14.18-IL-2 (białka fuzyjne przeciwciał i cytokin), które w mikrośrodowisku guza podnoszą poziom cytokin [30,33],
- **immunotoksyny** będące białkami fuzyjnymi przeciwciał i modyfikowanych genetycznie toksyn, np. łańcucha A rycyny, egzotoksyny A *Pseudomonas*, domeny katalitycznej dyfterotoksyny, które swoiście wiążą się z komórkami nowotworowymi i wywierają na nie bezpośredni efekt cytotoksyczny [32,63,66],
- **miniciała** [5],
- **przeciwciała o podwójnej swoistości,** np. wiążące gangliozyd GD2 i CD3 [32],
- **immunoliposomy,** w których przyłączone na powierzchni przeciwciała wiążące gangliozyd GD2 umożliwiają selektywne dostarczanie do komórek neuroblastoma np. doksorubicyny, fenretynidu (4-HPR), antysensownych nukleotydów dla onkogenu *c-myb* [7,40,42].
- **chimeryczne antygenowe receptory** (ang. *chimeric antigen receptor*), które ulegając ekspresji np. na CTL kierowałyby aktywność tych komórek przeciw neuroblastoma. Przykładem jest receptor, który tworzą jednołańcuchowe fragmenty Fv przeciwciała wiążącego GD2 połączone zawiasem z cytoplazmatyczną domeną sygnałową CD3ζ [50].

Dla porządku należy dodać, iż efekt terapeutyczny próbuje się uzyskać z zastosowaniem przeciwciał skierowanych także przeciwko białkowym antygenom występującym na komórkach neuroblastoma [16, 37].

3.2. Czynna terapia, której celem jest gangliozyd GD2

Antygeny węglowodanowe związane z nowotworami wykazując największy poziom ekspresji na komórkach rakowych stanowią atrakcyjny cel również dla czynnej terapii. Wiadomo, iż gangliozyd GD2 jest słabo immunogenny u ludzi. Antygeny cukrowe zaliczane są bowiem do grupy antygenów grasiczoniezależnych. Próbuje się przełamać ten stan tolerancji. Przykładem może być zastosowanie do szczepienia zamiast antygenów cukrowych cząsteczek zastępczych, np. przeciwciał antyidiotypowych czy mimotopów peptydowych.

Badana jest szczepionka DNA kodująca w formie wydzielniczej jednołańcuchowe fragmenty Fv przeciwciała antyidotypowego 1A7 (Ab2β), które zawierają „wewnętrzny obraz" gangliozydu GD2. Podanie jej domięśniowo myszom wzbudzało odpowiedź humoralną skierowaną przeciwko fragmentom przeciwciała 1A7, a także przeciwko gangliozydowi GD2. Ta szczepionka nie wzbudzała jednak odpowiedzi komórkowej [72].

Kolejnym podejściem jest użycie mimotopów peptydowych wyłowionych z fagowych bibliotek peptydowych, by naśladowały wyjściowy antygen. Trafność takiego podejścia wykazano m.in. dla antygenu cukrowego Lewis Y [24]. Trwają prace nad zastosowaniem mimotopów peptydowych również w przypadku gangliozydu GD2. Przy pomocy przeciwciała 14G2a wyłowiono peptydy ulegające fagowej ekspresji, a wiążące się do tego przeciwciała. Aktualnie, bada się ich antygenowe właściwości i zdolność do wzbudzania swoistej dla gangliozydu GD2 odpowiedzi odpornościowej (informacja własna autora).

3.3. Modyfikowane komórki nowotworowe jako szczepionki

Wykorzystanie do szczepienia komórek rakowych ma już długą tradycję, również w przypadku neuroblastoma. Stosuje się zarówno autologiczne, jak i allogeniczne komórki. Prowadzone są badania nad wzmocnieniem immunogennych właściwości szczepionek opartych na komórkach nowotworowych. Z użyciem wektorów wirusowych i niewirusowych modyfikuje się te komórki w celu uzyskania ekspresji (przejściowej lub stabilnej) cytokin, chemokin, cząsteczek MHC, czy cząsteczek kostymulujących. W ostatnich latach opublikowano szereg badań z wykorzystaniem szczepionek opartych na modyfikowanych komórkach neuroblastoma.

W badaniach I fazy klinicznej sprawdzano szczepionkę opartą na mieszaninie naświetlonych allogenicznych komórek linii neuroblastoma SJNB-JG-G12 produkujących ludzką IL-2 i limfotaktynę. Była ona dobrze tolerowana w badanych dawkach. Jej zastosowanie wzmagało reaktywność immunologiczną u pacjentów. Obserwowano m.in. naciekanie miejsca iniekcji przez limfocyty T $CD4^+$, $CD8^+$, komórki Langerhansa $CD1a^+$, a u części pacjentów wzrost aktywności cytotoksycznej komórek NK, wzrost IL-5 w osoczu czy wreszcie wzbudzenie przeciwciał klasy IgG wiążących się do komórek użytych do immunizacji [51].

Na modelach zwierzęcych sprawdzane są kolejne szczepionki. Użycie do nastrzykiwania guzów powstałych z niemodyfikowanych komórek Neuro-2a szczepionki z naświetlonych Neuro-2a wykazujących ekspresję ludzkiej IL-2 oraz białka fuzyjnego ludzkiej IL-12 dawało lepszy efekt terapeutyczny, w porównaiu z komórkami modyfikowanymi tylko jedną z tych cytokin. Szczepionka ta aktywowała limfocyty T $CD8^+$ i $CD4^+$ [57]. Zdolność do hamowania wzrostu ustalonych guzów i wytworzenia przeciwnowotworowej pamięci immunologicznej wykazano dla szczepionki, złożonej z komórek Neuro-2a transdukowanych wektorem retrowirusowym kodującym GM-CSF w połączeniu z oligodeoksynukleotydami zawierającymi niemetylowane sekwencje CpG [52].

Yan i współpracownicy porównali przeciwnowotworowe właściwości szczepionki z agresywnego klonu komórek Neuro-2a, AGN2a, stabilnie transfekowanego cząsteczkami kostymulującymi: 4-1BBL i B7-1, B7-2 i B7-1 oraz tylko B7-1. Najlepszą oporność przed niemodyfikowanym klonem AGN2a uzyskano po podaniu komórek transfekowanych 4-1BBL i B7-1, a najsłabszą po podaniu komórek z ekspresją tylko B7-1 [69].

Ciekawym podejściem jest również wykorzystanie onkolitycznego replikującego wirusa opryszczki pospolitej typu-1. Użyto go do transdukcji *in vivo* guzów u myszy konstruktem genowym kodującym rozpuszczalne białko fuzyjne dimeru B7-1 (części zewnątrzkomórkowej) i części Fc przeciwciała IgG1. Białko to uwalniane w środowisku komórek nowotworowych może dostarczać sygnału niezbędnego do aktywacji przeciwnowotworowej odpowiedzi komórkowej. Zastosowanie takiej metody modyfikacji komórek nowotworowych prowadziło do znaczącego ograniczenia wzrostu guza, w czym pośredniczyły limfocyty T $CD8^+$ [64].

3.4. Zastosowanie komórek dendrytycznych

Jeszcze innym podejściem są próby użycia DC, choć wymagają one optymalizacji szeregu parametrów, np. stopnia dojrzałości, dawki, drogi i częstości podawania DC, metody dostarczenia antygenu do DC [3]. Na modelu myszy A/J bada się przeciwnowotworową aktywność DC transdukowanych wektorem adenowirusowym kodującym mysią IL-12 [45]. W testach I fazy klinicznej u dzieci z guzami litymi sprawdzono mieszaninę niedojrzałych DC inkubowanych osobno z lizatem autologicznych komórek nowotworowych od pacjentów i KLH. U niektórych pacjentów, w tym jednego z neuroblastoma, po szczepieniu obserwowano wzbudzenie swoistej przeciwnowotoworowej odpowiedzi limfocytów T w hodowli świeżo izolowanych niestymulowanych PBMC (jednojądrzastych komórek krwi obwodowej) [19]. Bada się także szczepionki oparte na zfuzjowanych metodą elektroporacji DC i komórki Neuro-2a [38].

4. PODSUMOWANIE

Metody immunoterapeutyczne w leczeniu MRD u dzieci z neuroblastoma wysokiego ryzyka są obecnie sprawdzane w badaniach klinicznych i intensywnie rozwijane w badaniach przedklinicznych. Należy również wspomnieć o innych potencjalnych możliwościach leczenia opartych na biologicznych właściwościach neuroblastoma. Bada się m.in. różnicowanie neuroblastoma z udziałem pochodnych kwasu retinowego, zastosowanie aktywnie pobieranej przez neuroblastoma ^{131}I-meta-jodobenzyloguanidyny, związków hamujących angiogenezę, czy indukujących apoptozę [47,55,70]. W przyszłości po optymalizacji mogą one uzupełnić stosowane już programy leczenia tej choroby. Należy mieć nadzieję, że ich zastosowanie przyczyni się do poprawy przeżywalności dzieci z neuroblastoma wysokiego ryzyka.

LITERATURA

[1] AIROLDI I, LUALDI S, BRUNO S, RAFFAGHELLO L, OCCHINO M, GAMBINI C, PISTOIA V, CORRIAS MV. Expression of costimulatory molecules in human neuroblastoma. Evidence that CD40+ neuroblastoma cells undergo apoptosis following interaction with CD40L. *Br J Cancer* 2003; **88**: 1527–1536.

[2] BALWIERZ W. Strategia postępowania w nerwiaku zarodkowym współczulnym. *Przegl Lek* 2004; **61**; supl. 2: 3–8.

[3] BANCHEREAU J, SCHULER-THURNER B, PALUCKA AK, SCHULER G. Dendritic cells as vectors for therapy. *Cell* 2001; **106**: 271–274.
[4] BELTINGER C, DEBATIN KM. Murine models for experimental therapy of pediatric solid tumors with poor prognosis. *Int J Cancer* 2001; **92**: 313–318.
[5] BESTAGNO M, OCCHINO M, CORRIAS MV, BURRONE O, PISTOIA V. Recombinant antibodies in the immunotherapy of neuroblastoma: perspectives of new developments. *Cancer Lett* 2003; **197**: 193-198.
[6] BIRKLE S, ZENG G, GAO L, YU RK, AUBRY J. Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochemie* 2003; **85**: 455–463. *Br J Cancer* 2004; **90**: 2210–2218.
[7] BRIGNOLE C, PAGNAN G, MARIMPIETRI D, COSIMO E, ALLEN TM, PONZONI M, PASTORINO F. Targeted delivery system for antisense oligonucleotides: a novel experimental strategy for neuroblastoma treatment. *Cancer Lett* 2003; **197**: 231–235.
[8] CASTRICONI R, DONDERO A, AUGUGLIARO R, CANTONI C, CARNEMOLLA B, SEMENTA AR, NEGRI F, CONTE R, CORRIAS MV, MORETTA L, MORETTA A, BOTTINO C. Identification of 4Ig-B7-H3 as a neuroblastoma-associated molecule that exerts a protective role from an NK cell-mediated lysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 12640–12645.
[9] CHEN S, CARAGINE T, CHEUNG NK, TOMLINSON S. Surface antigen expression and complement susceptibility of differentiated neuroblastoma clones. *Am J Pathol* 2000; **156**: 1085–1891.
[10] CHEN X, DOFFEK K, SUGG SL, SHILYANSKY J. Neuroblastoma cells inhibit the immunostimulatory function of dendritic cells. *J Pediatr Surg* 2003; **38**: 901–905.
[11] CHEUNG NK, GUO HF, HELLER G, CHEUNG IY. Induction of Ab3 and Ab3' antibody was associated with long-term survival after anti-G(D2) antibody therapy of stage 4 neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 2653–2660.
[12] CHEUNG NK, KUSHNER BH, KRAMER K. Monoclonal antibody-based therapy of neuroblastoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 2001; **15**: 853–866.
[13] CHEUNG NK, MODAK S. Oral (1–>3), (1–>4)-β-D-glucan synergizes with antiganglioside GD2 monoclonal antibody 3F8 in the therapy of neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2002; **8**: 1217–1223.
[14] CORRIAS MV, OCCHINO M, CROCE M, DE AMBROSIS A, PISTILLO MP, BOCCA P, PISTOIA V, FERRINI S. Lack of HLA-class I antigens in human neuroblastoma cells: analysis of its relationship to TAP and tapasin expression. *Tissue Antigens* 2001; **57**: 110–117.
[15] CROCE M, DE AMBROSIS A, CORRIAS MV, PISTOIA V, OCCHINO M, MEAZZA R, GIRON-MICHEL J, AZZARONE B, ACCOLLA RS, FERRINI S. Different levels of control prevent interferon-γ-inducible HLA-class II expressionin human neuroblastoma cells. *Oncogene* 2003; **22**: 7848–7857.
[16] DEHAL PK, EMBLETON MJ, KEMSHEAD JT, HAWKINS RE. Targeted cytokine delivery to neuroblastoma. *Biochem Soc Trans* 2002; **30**: 518–520.
[17] ENGLER S, THIEL C, FORSTER K, DAVID K, BREDEHORST R, JUHL H. A novel metastatic animal model reflecting the clinical appearance of human neuroblastoma: growth arrest of orthotopic tumors by natural, cytotoxic human immunoglobulin M antibodies. *Cancer Res* 2001; **61**: 2968–2973.
[18] FUKUDA M, NOZAKI C, ISHIGURO Y, HORIBE K. Distribution of natural antibody against human neuroblastoma among children with or without neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2001; **36**: 147–148.
[19] GEIGER JD, HUTCHINSON RJ, HOHENKIRK LF, MCKENNA EA, YANIK GA, LEVINE JE, CHANG AE, BRAUN TM, MULE JJ. Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression. *Cancer Res* 2001; **61**: 8513–8519.
[20] HUEBENER N, LANGE B, LEMMEL C, RAMMENSEE HG, STRANDSBY A, WENKEL J, JIKAI J, ZENG Y, GAEDICKE G, LODE HN. Vaccination with minigenes encoding for novel «self» antigens are effective in DNA-vaccination against neuroblastoma. *Cancer Lett* 2003; **197**: 211–217.
[21] IKEDA H, IEHARA T, TSUCHIDA Y, KANEKO M, HATA J, NAITO H, IWAFUCHI M, OHNUMA N, MUGISHIMA H, TOYODA Y, HAMAZAKI M, MIMAYA J, KONDO S, KAWA K, OKADA A, HIYAMA E, SUITA S, TAKAMATSU H. Experience with International Neuroblastoma Staging System and Pathology Classification. *Br J Cancer* 2002 **8**; 86: 1110–1116.
[22] KAWIAK J, HUS I, ROLIŃSKI J, HOSER G, DMOSZYŃSKA A. Mechanizmy immunologiczne w nowotworach i próby wykorzystania ich w immunoterapii. *Post Biol Kom* 2004; **31**; supl. 22: 67–77.
[23] KHONG HT, RESTIFO NP. Natural selection of tumor variants in the generation of „tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 2002; **3**: 999–1005.
[24] KIEBER-EMMONS T, MONZAVI-KARBASSI B, WANG B, LUO P, WEINER DB. Cutting edge: DNA immunization with minigenes of carbohydrate mimotopes induce functional anti-carbohydrate antibody response. *J Immunol* 2000; **165**: 623–627.

[25] KLEPACKA T, MICHALAK E, PTASZYNSKI K, SZELIGA M, LIEBHART M. Neuroblastoma – epidemiologia, diagnostyka patomorfologiczna i molekularna, prognoza. *Przegl Lek* 2003; **60**; supl. 5: 22–26.
[26] KRAMER K, GERALD WL, KUSHNER BH, LARSON SM, HAMEED M, CHEUNG NK. Disaloganglioside GD2 loss following monoclonal antibody therapy is rare in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2001; **36**: 194–196.
[27] KUSHNER BH, KRAMER K, CHEUNG NK. Phase II trial of the anti-G(D2) monoclonal antibody 3F8 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2001; **19**: 4189–4194.
[28] LIN EY, POLLARD JW. Role of infiltrated leucocytes in tumour growth and spread. *Br J Cancer* 2004; **90**: 2053–2058.
[29] LIU YJ. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adoptive immunity. *Cell* 2001; **106**: 259–262.
[30] LODE HN, REISFELD RA. Targeted cytokines for cancer immunotherapy. *Immunol Res* 2000; **21**: 279–288.
[31] LONG EO. Tumor cell recognition by natural killer cells. *Semin Cancer Biol* 2002; **12**: 57–61.
[32] MANZKE O, RUSSELLO O, LEENEN C, DIEHL V, BOHLEN H, BERTHOLD F. Immunotherapeutic strategies in neuroblastoma: antitumoral activity of deglycosylated Ricin A conjugated anti-GD2 antibodies and anti-CD3xanti-GD2 bispecific antibodies. *Med Pediatr Oncol* 2001; **36**: 185–189.
[33] METELITSA LS, GILLIES SD, SUPER M, SHIMADA H, REYNOLDS CP, SEEGER RC. Antidisialoganglioside/granulocyte macrophage-colony-stimulating factor fusion protein facilitates neutrophil antibody-dependent cellular cytotoxicity and depends on FcgammaRII (CD32) and Mac-1 (CD11b/CD18) for enhanced effector cell adhesion and azurophil granule exocytosis. *Blood* 2002; **99**: 4166–4173.
[34] METELITSA LS, WU HW, WANG H, YANG Y, WARSI Z, ASGHARZADEH S, GROSHEN S, WILSON SB, SEEGER RC. Natural killer T cells infiltrate neuroblastomas expressing the chemokine CCL2. *J Exp Med* 2004; **199**: 1213–1221.
[35] MORA J, GERALD WL, QIN J, CHEUNG NK. Molecular genetics of neuroblastoma and the implications for clinical management: a review of the MSKCC experience. *Oncologist* 2001; **6**: 263–268.
[36] NEAL ZC, IMBODEN M, RAKHMILEVICH AL, KIM KM, HANK JA, SURFUS J, DIXON JR, LODE HN, REISFELD RA, GILLIES SD, SONDEL PM. NXS2 murine neuroblastomas express increased levels of MHC class I antigens upon recurrence following NK-dependent immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2004; **53**: 41–52.
[37] ONDA M, WANG QC, GUO HF, CHEUNG NK, PASTAN I. *In vitro* and *in vivo* cytotoxic activities of recombinant immunotoxin 8H9(Fv)-PE38 against breast cancer, osteosarcoma, and neuroblastoma. *Cancer Res* 2004; **64**: 1419–1424.
[38] ORENTAS RJ, SCHAUER D, BIN Q, JOHNSON BD. Electrofusion of a weakly immunogenic neuroblastoma with dendritic cells produces a tumor vaccine. *Cell Immunol* 2001; **213**: 4–13.
[39] OZKAYNAK MF, SONDEL PM, KRAILO MD, GAN J, JAVORSKY B, REISFELD RA, MATTHAY KK, REAMAN GH, SEEGER RC. Phase I study of chimeric human/murine anti-anglioside G(D2) monoclonal antibody (ch14.18) with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in children with neuroblastoma immediately after hematopoietic stem-cell transplantation: a Children's Cancer Group Study. *J Clin Oncol* 2000; **18**: 4077–4085.
[40] PASTORINO F, BRIGNOLE C, MARIMPIETRI D, SAPRA P, MOASE EH, ALLEN TM, PONZONI M. Doxorubicin-loaded Fab' fragments of anti-disialoganglioside immunoliposomes selectively inhibit the growth and dissemination of human neuroblastoma in nude mice. *Cancer Res* 2003; **63**: 86–92.
[41] RAFFAGHELLO L, MARIMPIETRI D, PAGNAN G, PASTORINO F, COSIMO E, BRIGNOLE C, PONZONI M, MONTALDO PG. Anti-GD2 monoclonal antibody immunotherapy: a promising strategy in the prevention of neuroblastoma relapse. *Cancer Lett* 2003; **197**: 205–209.
[42] RAFFAGHELLO L, PAGNAN G, PASTORINO F, COSIMO E, BRIGNOLE C, MARIMPIETRI D, BOGENMANN E, PONZONI M, MONTALDO PG. Immunoliposomal fenretinide: a novel antitumoral drug for human neuroblastoma. *Cancer Lett* 2003; **197**: 151–155.
[43] RAVINDRANATH MH, MORTON DL. Antigens: carbohydrates. [w] Encyclopedia of Life Sciences, London: Nature Publishing Group 2001, http://www.els.net.
[44] REDLINGER RE JR, MAILLIARD RB, BARKSDALE EM JR. Advanced neuroblastoma impairs dendritic cell function in adoptive immunotherapy. *J Pediatr Surg* 2003; **38**: 857–862.

[45] REDLINGER RE JR, MAILLIARD RB, BARKSDALE EM JR. Neuroblastoma and dendritic cell function. *Semin Pediatr Surg* 2004; **13**: 61–71.
[46] REULAND P, GEIGER L, THELEN MH, HANDGRETINGER R, HAASE B, MULLER-SCHAUENBURG W, NIETHAMMER D, BARES R. Follow-upin neuroblastoma: comparison of metaiodobenzylguanidine and a chimeric anti-GD2 antibody for detection of tumor relapse and therapy response. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001; **23**: 437–442.
[47] REYNOLDS CP, MATTHAY KK, VILLIBLANCA J, MAURER BJ. Retionoid therapy of high risk neuroblastoma. *Cancer Lett* 2003; **197**: 185–192.
[48] RODOLFO M, LUKSCH R, STOCKERT E, CHEN YT, COLLINI P, RANZANI T, LOMBARDO C, DALERBA P, RIVOLTINI L, ARIENTI F, FOSSATI-BELLANI F, OLD LJ, PARMIANI G, CASTELLI C. Antigen-specific immunity in neuroblastoma patients: antibody and T-cell recognition of NY-ESO-1 tumor antigen. *Cancer Res* 2003; **63**: 6948–6955.
[49] ROSS RA, BIEDLER JL, SPENGLER BA. A role for distinct cell types in determining malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors. *Cancer Lett* 2003; **197**: 35–39.
[50] ROSSIG C, BOLLARD CM, NUCHTERN JG, MERCHANT DA, BRENNER MK. Targeting of G(D2)-positive tumor cells by human T lymphocytes engineered to express chimeric T-cell receptor genes. *Int J Cancer* 2001; **94**: 228–236.
[51] ROUSSEAU RF, HAIGHT AE, HIRSCHMANN-JAX C, YVON ES, RILL DR, MEI Z, SMITH SC, INMAN S, COOPER K, ALCOSER P, GRILLEY B, GEE A, POPEK E, DAVIDOFF A, BOWMAN LC, BRENNER MK, STROTHER D. Local and systemic effects of an allogeneic tumor cell vaccine combining transgenic human lymphotactin with interleukin-2 in patients with advanced or refractory neuroblastoma. *Blood* 2003; **101**: 1718–1726.
[52] SANDLER AD, CHIHARA H, KOBAYASHI G, ZHU X, MILLER MA, SCOTT DL, KRIEG AM. CpG oligonucleotides enhance the tumor antigen-specific immune response of a granulocyte macrophage colony-stimulating factor-based vaccine strategy in neuroblastoma. *Cancer Res* 2003; **63**: 394–399.
[53] SARKAR AK, BURLINGAME SM, ZANG YQ, DULAI V, HICKS MJ, STROTHER DR, NUCHTERN JG. Lysis of MYCN-amplified neuroblastoma cells by MYCN peptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 2000; **60**: 1908–1913.
[54] SCHILBACH KE, GEISELHART A, WESSELS JT, NIETHAMMER D, HANDGRETINGER R. Human γδ T lymphocytes exert natural and IL-2-induced cytotoxicity to neuroblastoma cells. *J Immunother* 2000; **23**: 536–548.
[55] SCHOR NF. Neuroblastoma as a neurobiological disease. *J Neurooncol* 1999; **41**:159–166.
[56] SHURIN GV, SHURIN MR, BYKOVSKAIA S, SHOGAN J, LOTZE MT, BARKSDALE EM JR. Neuroblastoma-derived gangliosides inhibit dendritic cell generation and function. *Cancer Res* 2001; **61**: 363–369.
[57] SIAPATI KE, BARKER S, KINNON C, MICHALSKI A, ANDERSON R, BRICKELL P, THRASHER AJ, HART SL. Improved antitumour immunity in murine neuroblastoma using a combination of IL-2 and IL-12. *Br J Cancer* 2003; **88**: 1641–1648.
[58] SIEDLECKI JA. Zastosowanie diagnostyki genetycznej w chorobach nowotworowych. *Post Biol Kom* 2000; **27**; supl. 15: 79–89.
[59] SIVORI S, PAROLINI S, MARCENARO E, CASTRICONI R, PENDE D, MILLO R, MORETTA A. Involvement of natural cytotoxicity receptors in human natural killer cell-mediated lysis of neuroblastoma and glioblastoma cell lines. *J Neuroimmunol* 2000; **107**: 220–225.
[60] SMYTH MJ, GODFREY DI, TRAPANI JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2001; **2**: 293–299.
[61] SPIERINGS DC, AGSTERIBBE E, WILSCHUT J, HUCKRIEDE A. Characterization of antigen-presenting properties of tumour cells using virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Br J Cancer* 2000; **82**: 1474–1479.
[62] STERBA J. Contemporary therapeutic options for children with high risk neuroblastoma. *Neoplasma* 2002; **49**: 133–140.
[63] THOMAS PB, DELATTE SJ, SUTPHIN A, FRANKEL AE, TAGGE EP. Effective targeted cytotoxicity of neuroblastoma cells. *J Pediatr Surg* 2002; **37**: 539–544.
[64] TODO T, MARTUZA RL, RABKIN SD, JOHNSON PA. Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 6396–6401.
[65] TONINI GP, ROMANI M. Genetic and epigenetic alterations in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2003; **197**: 69–73.
[66] TUR MK, SASSE S, STOCKER M, DJABELKHIR K, HUHN M, MATTHEY B, GOTTSTEIN C, PFITZNER T, ENGERT A, BARTH S. An anti-GD2 single chain Fv selected by phage display and fused to *Pseudomonas* exotoxin A develops specific cytotoxic activity against neuroblastoma derived cell lines. *Int J Mol Med* 2001; **8**: 579–584.

[67] VALTEAU-COUANET D, LEBOULAIRE C, MAINCENT K, TOURNIER M, HARTMANN O, BENARD J, BEAUJEAN F, BOCCACCIO C, ZITVOGEL L, ANGEVIN E. Dendritic cells for NK/LAK activation: rationale for multicellular immunotherapy in neuroblastoma patients. *Blood* 2002; **100**: 2554–2561.
[68] WÖLFL M, JUNGBLUTH AA, GARRIDO F, CABRERA T, MEYEN-SOUTHARD S, SPITZ R, ERNESTUS K, BERTHOLD F. Expression of MHC class I, MHC class II,and cancer germline antigens in neuroblastoma. *Cancer Immunol Immunother* 2004 (praca w druku).
[69] YAN X, JOHNSON BD, ORENTAS RJ. Murine CD8 lymphocyte expansion *in vitro* by artificial antigen-presenting cells expressing CD137L (4-1BBL) is superior to CD28,and CD137L expressed on neuroblastoma expands CD8 tumour-reactive effector cells *in vivo. Immunology* 2004; **112**: 105–116.
[70] YANIK GA, LEVINE JE, MATTHAY KK, SISSON JC, SHULKIN BL, SHAPIRO B, HUBERS D, SPALDING S, BRAUN T, FERRARA JL, HUTCHINSON RJ. Pilot study of iodine-131-metaiodobenzylguanidine in combination with myeloablative chemotherapy and autologous stem-cell support for the treatment of neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2002; **20**: 2142–2149.
[71] YAZAWA T, ITO T, KAMMA H, SUZUKI T, OKUDELA K, HAYASHI H, HORIGUCHI H, OGATA T, MITSUI H, IKEDA M, KITAMURA H. Complicated mechanisms of class II transactivator transcription deficiency in small cell lung cancer and neuroblastoma. *Am J Pathol* 2002; **161**: 291–300.
[72] ZEYTIN HE, TRIPATHI PK, BHATTACHARYA-CHATTERJEE M, FOON KA, CHATTERJEE SK. Construction and characterization of DNA vaccines encoding the single-chain variable fragment of the anti-idiotype antibody 1A7 mimicking the tumor-associated antigen disialoganglioside GD2. *Cancer Gene Ther* 2000; **7**: 1426–1436.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 02.10.2004 r.
Przyjęto: 10.12.2004 r.
Adres autora: ul. Gronostajowa 7, Kraków, 30-387