

Immunoterapia raka jelita grubego mimo wielu napotkanych niepowodzeń powoli toruje sobie drogę do szerokiego zastosowania. Na przestrzeni lat immunoterapia raka jelita grubego przeszła od nieswoistych czynników immunomodulujących, jak BCG, lewamizol, interleukiny i interferony, do indukcji swoistej odpowiedzi immunologicznej poprzez zastosowanie szczepionek komórkowych, białek szoku cieplnego i swoistej, ukierunkowanej terapii opartej na przeciwciałach monoklonalnych. Obecnie wśród metod immunoterapii raka jelita grubego główne miejsce zajęły przeciwciała monoklonalne: cetuksimab, bewacizumab i panitumumab oraz pierwsza szczepionka Oncovax o udowodnionej skuteczności w terapii raka jelita grubego w II stopniu zaawansowania klinicznego.

Słowa kluczowe: rak jelita grubego, immunoterapia, szczepionki, przeciwciała.

Immunoterapia raka jelita grubego

Immunotherapy of colon cancer

Dariusz W. Kowalczyk

Zakład Immunologii Nowotworów, Wielkopolskie Centrum Onkologii, Katedra Biotechnologii Medycznej, Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Wstęp

Niepowodzenia w zastosowaniu tradycyjnej chemioterapii zmuszają do poszukiwania nowych form leczenia chorób nowotworowych. Obserwacje na modelach zwierzęcych, zapoczątkowane w latach 50. XX w., sugerują możliwość wykorzystania układu immunologicznego lub jego składowych do eliminacji komórek nowotworowych. Musiało jednak minąć blisko 50 lat, by te pierwotne spostrzeżenia móc zastosować w powszechnej praktyce klinicznej. Dopiero w ostatnich latach wprowadzono najnowszą generację leki przeciwnowotworowe, oparte na przeciwciałach monoklonalnych, a ostatnie odkrycia nauk podstawowych owocują licznymi badaniami klinicznymi. Celem artykułu jest przybliżenie problematyki immunoterapii raka jelita grubego, w oparciu głównie o wyniki badań klinicznych.

Typowe leczenie raka jelita grubego obejmuje, zależnie od stopnia zaawansowania choroby, postępowanie operacyjne, chemioterapię adjuwantową lub chemioterapię paliatywną. Do niedawna standardem w leczeniu uzupełniającym było podawanie 5-fluorouracylu w połączeniu z kwasem folinowym. W ostatnich czasach panel leków został rozszerzony o kapecytabinę, irinotekan, oksaliplatynę, cetuksimab i bewacizumab [1]. Mimo intensywnych wysiłków i znaczących nakładów leczenie zaawansowanej postaci raka jelita grubego jest nadal nieskuteczne. Przeżycia 5-letnie wynoszą odpowiednio 60–80 proc. dla raka w II stopniu zaawansowania, 30–55 proc. dla raka w III stopniu i poniżej 3 proc. w stopniu IV [2]. W tej sytuacji immunoterapia raka jelita grubego mimo wielu napotkanych niepowodzeń powoli toruje sobie drogę do szerokiego zastosowania. Na przestrzeni lat immunoterapia raka jelita grubego przeszła od nieswoistych czynników immunomodulujących, jak BCG, lewamizol, interleukiny i interferony, do indukcji swoistej odpowiedzi immunologicznej poprzez zastosowanie odpowiednich szczepionek i swoistej, ukierunkowanej terapii opartej na przeciwciałach monoklonalnych.

Immunoterapie nieswoiste

Nieswoista immunoterapia BCG

Mimo zachęcających początkowych wyników leczenia raka jelita grubego, opartego na nieswoistej immunizacji BCG [3], późniejsze długoletnie obserwacje dużych, liczących ponad tysiąc osób grup chorych nie potwierdziły skuteczności immunoterapii przy użyciu BCG [4–6].

Lewamizol, interferony i IL-2

Odkrycie immunomodulujących właściwości lewamizolu zapoczątkowało intensywną erę badań nad potencjalnym zastosowaniem tego związku w leczeniu chorób nowotworowych. Pierwsze próby z zastosowaniem lewamizolu w monoterapii raka jelita grubego podjęto w 1974 r. Mimo zachęcających początkowo rezultatów, badania kliniczne pod kontrolą *placebo* nie wykazały jego przydatności w takiej formie leczenia [7]. Podobnie badania kliniczne oceniające działanie lewamizolu, m.in. w takich nowotworach, jak zaawansowany rak

Despite many difficulties, immunotherapy of colon cancer becomes more effective and slowly enters into everyday clinical practice. The long way from unspecific immune stimulators such as levamisole, BCG, interleukins and interferons ended up in specific anti-cancer vaccines and precise antibody based therapeutics. Nowadays, among novel anticancer agents used in colon cancer therapy there is a place for vaccines such as OncoVax and monoclonals including cetuximab, bevacizumab and panitumumab.

Key words: colon cancer, immunotherapy, vaccines, antibodies.

piersi, rak płuca czy czerniak, także wykazały na ogół brak działania przeciwnowotworowego [8]. Jedynym wyjątkiem stanowił rak jelita grubego w III stopniu zaawansowania, w którym zastosowanie lewamizolu razem z 5-fluorouracylem stało się obowiązującym standardem leczenia uzupełniającego, do czasu zastąpienia go schematem opartym na 5-fluorouracylu i kwasie folinowym [9, 10].

Wprawdzie przesłanką do zastosowania lewamizolu w leczeniu chorób nowotworowych były jego immunomodulujące właściwości, mechanizm jego działania przeciwnowotworowego w raku jelita grubego w skojarzeniu z 5-fluorouracylem pozostaje nieznany. Co więcej, połączenie 5-fluorouracylu z lewamizolem i kwasem folinowym nie tylko nie podnosi skuteczności, lecz może nasilić toksyczność takiej formy terapii [11–13].

Brak synergizmu obserwuje się także przy próbach łączenia standardowej chemioterapii 5-fluorouracyl/kwas folinowy z interferonem- α . Wczesne, liczne badania kliniczne sugerowały, że interferon może zwiększyć skuteczność terapii opartej na 5-fluorouracylu [14–17]. Niestety, późniejsze badania wieloośrodkowe, w tym badanie NSABP C-05, w którym uczestniczyło 2 176 chorych, nie potwierdziły wcześniejszych obserwacji. W czasie 4-letniego badania nie stwierdzono istotnych różnic co do okresu wolnego od choroby, jak i czasu przeżycia. Dołączenie interferonu prowadziło jedynie do większej toksyczności, bez dodatkowych korzyści terapeutycznych [18].

Podobnie do interferonów, interleukina-2 (IL-2) znajduje się wśród leków o silnie immunomodulujących właściwościach. Stąd też wynikało naturalne zainteresowanie tą cytokiną w próbach włączenia jej do terapii raka jelita grubego. Próba zastosowania IL-2 u chorych opornych na leczenie 5-fluorouracylem wykazała bardzo umiarkowane efekty. Tylko u 3 spośród 25 chorych objętych leczeniem zaobserwowano częściową remisję. Wprawdzie w tym badaniu zauważono statystycznie istotną większą przeżywalność jednoroczną [19], obserwacji tych nie udało się jednak potwierdzić w innym podobnym badaniu klinicznym [20].

Immunoterapie swoiste

W przeciwieństwie do immunoterapii nieswoistej, mającej na celu ogólną mobilizację układu odpornościowego bez względu na rodzaj antygeny, immunoterapia swoista ukierunkowana jest na ściśle określony antygen lub grupę antygenów znajdujących się w komórkach nowotworowych. Immunoterapia swoista może polegać na biernym dostarczeniu do organizmu gotowych czynników efektorowych, np. przeciwciał (immunoterapia bierna) lub też indukować swoistą odpowiedź na określony antygen poprzez odpowiednią immunizację (immunoterapia czynna).

Podstawowym warunkiem swoistej immunoterapii jest znajomość antygeny, z którym mają reagować czynniki efektorowe lub, gdy jest to niemożliwe, obecność tego samego antygeny zarówno w szczepionce, jak i w komórkach nowotworowych. Znajomość antygeny nowotworowego pozwala na przygotowanie gotowych przeciwciał, które rozpoznawałyby komórki nowotworowe i następnie indukowały odpowiednią reakcję. By jednak taki antygen mógł posłużyć jako ewentualny cel dla przeciwciał, muszą być spełnione pewne określone warunki. Idealny antygen powinien ulegać ekspresji tylko na komórkach nowotworowych, co umożliwiłoby na bardzo precyzyjny atak przeciwciał. Kolejnym warunkiem jest jego lokalizacja na powierzchni komórki. Ponieważ na ogół przeciwciała nie mogą penetrować przez błony komórkowe, antygen taki musi być zlokalizowany na powierzchni komórki i być *dostępny* dla przeciwciał. Kolejną pożądaną cechą antygeny nowotworowego jest jego *niezbędność* dla utrzymania *fenotypu nowotworowego* lub pełnienie istotnej funkcji życiowej w komórce. Podczas gdy ukierunkowanie odpowiedzi na *niezbędny* antygen zmniejsza ryzyko powstania opornych komórek nowotworowych w drodze selekcji, to atakowanie antygenów odpowiedzialnych za utrzymanie funkcji życiowych komórki nowotworowej, np. poprzez blokowanie receptorów czynników wzrostowych, znacznie podnosi efektywność tej formy terapii.

Choć antygeny nieulegające ekspresji na powierzchni komórki nowotworowej są generalnie niedostępne dla przeciwciał, mogą jednak stanowić cel dla limfocytów T. Limfocyty T rozpoznają antygeny bez względu na to, czy ich ekspresja zachodzi na powierzchni komórki, czy jest ograniczona wyłącznie do jej wnętrza. Niestety, w przeciwieństwie do przeciwciał, restrykcja MHC uniemożliwia przygotowanie uniwersalnych, gotowych limfocytów T rozpoznających określony antygen u dowolnej osoby. Jednym z najbardziej praktycznych rozwiązań jest tu immunizacja odpowiednią szczepionką, która będzie w stanie wzbudzić odpowiedź limfocytów T.

Przeciwciała

Ostatnie lata związane są z istotnym przełomem w dziedzinie terapeutycznych zastosowań przeciwciał monoklonalnych. Cetuksimab, bewacizumab czy panitumumab są tu znakomitym przykładem, mającym zastosowanie w terapii raka jelita grubego. Ze względu na to, że lekiem tym poświęcono uwagę w innych artykułach niniejszego numeru *Współczesnej Onkologii*, przedstawię tu tylko kilka uwag o charakterze ogólnym. Cetuksimab i panitumumab są przeciwciałami skierowanymi przeciw receptorom naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR). Stymulacja poprzez ten receptor wydaje się jednym z kluczowych elementów koniecznych dla przeżycia komórki nowotworowej, a blokada tego receptora, a nie bezpośrednio działanie cytotoksyczne (choć takowego udziału nie można wykluczyć) wydaje się głównym mechanizmem działania. Takie antagonistyczne w stosunku do czynników wzrostowych działanie tłumaczy obserwowaną małą efektywność kliniczną innych leków opartych na przeciwciałach monoklonalnych (takich jak np. przeciwciało 17.1A), które nie reagują z podobnymi receptorami.

Niestety, przeciwciała mimo swojej *elegancji* w działaniu nie są lekami idealnym. Nadal nie wiemy, od czego zależy ich skuteczność w warunkach *in vivo*. Poziom ekspresji EGFR mierzony tradycyjnymi metodami immunohistochemicznymi nie zawsze koreluje z odpowiedzią kliniczną. W początkowych badaniach klinicznych nie stwierdzono różnicy między odpowiedzią u chorych z wysokim i niskim poziomem ekspresji tej molekuly [21]. Co więcej, wydaje się, że chorzy *negatywni* pod względem obecności EGFR na komórkach nowotworowych mogą także odnieść korzyść z leczenia przeciwciałami przeciw EGFR [22, 23]. Jedne z ostatnich badań przeprowadzonych w trakcie terapii raka jelita grubego cetuksimabem wskazują, że odpowiedź kliniczna jest bardziej uzależniona od poziomu amplifikacji genu EGFR, niż jego ekspresji mierzonej tradycyjnie za pomocą immunohistochemii [24]. Wydaje się zatem, że szczególnie w przypadku tak precyzyjnych, a zarazem drogich metod leczenia, konieczny będzie drobiazgowy dobór chorych oparty na badaniach molekularnych.

Immunizacja komórkami nowotworowymi zmieszanyymi z BCG

Pod koniec lat 70. XX w. Hanna i Peters opracowali model immunoterapii uzupełniającej nowotworów. W modelu tym autorzy ci wskazali na: 1) potencjalną przydatność szczepionki przeciwnowotworowej, składającej się z komórek nowotworowych zmieszanych z *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), 2) następnie ocenili znaczenie odpowiedniego stosunku komórek nowotworowych do BCG, 3) wykazali konieczność użycia

żywych i metabolicznie aktywnych komórek nowotworowych, 4) opracowali optymalny schemat immunizacji [25–29]. Na podstawie powyższych założeń uzyskanych w badaniach przedklinicznych, grupa ta rozpoczęła szereg prób klinicznych mających na celu wykazanie skuteczności tej formy terapii u chorych z rakiem jelita grubego i odbytu w II i III stopniu zaawansowania (B2-C3 wg Duke'a). Chorzy zostali poddani zabiegowi chirurgicznemu, a następnie 3–4 tyg. później rozpoczęli 3 serie śródskórnych szczepień w odstępie tygodniowym. Pierwsze 2 podania szczepionki zawierały 10⁷ autologicznych, napromienionych komórek nowotworowych zmieszanych z 10⁷ bakterii BCG. Ze względu na tworzące się owrzodzenia trzecia szczepionka zawierała tylko komórki nowotworowe bez domieszki BCG. Chorzy z rakiem odbytu po zakończeniu szczepień dodatkowo zostali poddani radioterapii w dawce całkowitej 50 Gy. Pierwotna analiza oparta na badaniu wszystkich 80 zakwalifikowanych chorych przez 6,5 roku nie wykazała żadnych istotnych różnic na korzyść immunoterapii. W grupie chorych z rakiem jelita grubego stwierdzono jednakże istotne wydłużenie przeżyć (p 0,02), jak i okresu wolnego od choroby (p 0,039). Autorzy w swojej pracy spekulują, że brak efektu immunoterapii u chorych z rakiem odbytu mógł być spowodowany zastosowaniem radioterapii w tej grupie, która mogła wywołać efekt immunosupresyjny [30, 31].

Badania belgijskie, w których uczestniczyło 254 chorych w II lub III stopniu zaawansowania leczonych wg podobnego schematu immunoterapii, wykazały 44-proc. zmniejszenie ryzyka wznowy dla wszystkich chorych (p 0,023). Podczas gdy w grupie kontrolnej zaobserwowano łącznie 40 wznów, to u chorych poddanych immunoterapii progresja choroby wystąpiła w 25 przypadkach. Stratyfikacja chorych w zależności od stopnia zaawansowania ujawniła, że w II stopniu zaawansowania immunoterapia istotnie wydłuża okres wolny od choroby (p 0,011), zmniejsza ryzyko wznowy o 61 proc. oraz przejawia tendencję do wydłużenia całkowitego przeżycia. Niestety, nie zaobserwowano żadnego działania w grupie chorych w III stopniu zaawansowania [32].

W wieloośrodkowym badaniu ECOG E5283, obejmującym 412 chorych z rakiem jelita grubego w II stopniu (297 chorych) lub III stopniu (115 chorych) poddanych immunizacji napromienionymi, autologicznymi komórkami nowotworowymi z BCG, nie zaobserwowano istotnych różnic między grupą leczoną i poddaną jedynie obserwacji. Analiza odpowiedzi miejscowej po trzecim podaniu szczepionki wykazała trend w zakresie wydłużenia okresu wolnego od choroby i czasu przeżycia (p równe odpowiednio 0,078 i 0,12), który był skorelowany z nasileniem nacieku zapalnego w miejscu iniekcji. Ponad 5 lat przeżyło 84,6 proc. chorych, u których miejscowy odczyn zapalny na skórze mierzył powyżej 10 mm i tylko 45,0 proc. chorych z odczynem mniejszym niż 5 mm. Interesujące jest, że rozkład miejscowych odczynów zapalnych był niezależny od stopnia zaawansowania choroby, jednakże podobnie jak w poprzednich badaniach, korzystny trend zaobserwowano jedynie u chorych w II stopniu zaawansowania. Autorzy tych badań sugerują, że odpowiedź na immunoterapię może zależeć od co najmniej dwóch czynników: immunogenności komórek nowotworowych i stopnia zaawansowania choroby [33]. Należy zwrócić jednak uwagę, że chorzy w grupie kontrolnej nie otrzymywali żadnej szczepionki, dlatego nie było

możliwości porównania odczynu zapalnego. Nie wiadomo zatem, czy przeprowadzając podobną, opartą na wielkości nacieku zapalnego stratyfikację w nieleczzonej grupie kontrolnej, można by uzyskać podobny trend. Obserwowany odczyn zapalny może odzwierciedlać stan ogólnej immunokompetencji zależny od zaawansowania choroby. Tym samym odczyn miejscowy byłby tylko kolejnym czynnikiem prognostycznym, a nie surogatem odpowiedzi na leczenie.

Podobne zastrzeżenia dotyczą badań, w których podjęto próbę immunoterapii zaawansowanego (IV stopień) raka jelita grubego. Leczenie oparto na immunizacji mieszaniną allogenicznymi komórkami czerniaka i BCG (szczepionka CancerVax). Przesłanką do zastosowania tej formy leczenia był wspólny dla czerniaka i raka jelita grubego antygen TA90 obecny w komórkach szczepionki. Podanie szczepionki związane było z pojawieniem się odczynów skórnych oraz przeciwciał skierowanych przeciw antygenowi TA90. Jednocześnie zauważono, że wysoki poziom przeciwciał anty-TA90 skorelowany był z dłuższym okresem przeżycia [34].

Jedne z ostatnio opublikowanych, wieloośrodkowych badań klinicznych III fazy i oceniających efektywność aktywnej immunoterapii raka jelita grubego za pomocą autologicznej szczepionki OncoVAX (Intracel) wykazały skuteczność tej formy leczenia w II stopniu klinicznego zaawansowania we wszystkich badanych *end-pointach* i obniżenie ryzyka wznowy o 57,1 proc. Niestety, podobnie jak w innych badaniach nie udało się jednak wykazać żadnych korzyści u chorych w III stopniu zaawansowania choroby [35].

Autologiczne szczepionki przeciwnowotworowe mają niestety, wiele wad, które w istotny sposób mogą utrudnić interpretację wyników badań klinicznych. Podstawową wadą tak przygotowywanych leków jest brak możliwości standaryzacji produktu. Każda szczepionka różni się będzie składem antygenowym, obecnością czynników mogących modulować odpowiedź immunologiczną, produkcją cytokin, wartością komórek podścieliska czy żywotnością komórek. Tym samym wg zasad farmakopei każda indywidualna szczepionka powinna być traktowana jako osobny produkt, co czyni porównanie wyników leczenia dość trudnym zadaniem. Niemniej na podstawie dostępnych danych można stwierdzić, że istnieje grupa chorych na raka jelita grubego w II stopniu zaawansowania klinicznego, która może odnieść korzyść z terapii opartej na szczepieniu mieszaniną napromienionych komórek nowotworowych i BCG.

Szczepionki HSP

Blższe standardom farmakopei są autologiczne szczepionki oparte na białkach szoku termicznego. W latach 90. XX w. Pramond Srivastava wykazał na modelu zwierzęcym, że białka szoku cieplnego (HSP od ang. *Heat Shock Protein*), izolowane z guzów nowotworowych, mogą służyć do przygotowania zindywidualizowanej szczepionki przeciwnowotworowej [36, 37]. Białka HSP wykazują co najmniej dwie istotne cechy, które pozwalają im być dobrymi kandydatami na szczepionki, mające zdolność indukcji odpowiedzi limfocytów T cytotoksycznych. Jako białka towarzyszące nazywane także białkami chaperonowymi (ang. *chaperon* – przyzwoitka) wykazują silną zdolność niekowalencyjnego łączenia się z potencjalnie immunogennymi peptydami będącymi w komórce. Dodatkowo kompleksy HSP-peptyd są silnymi aktywatorami komórek den-

drytycznych, które z kolei pełnią centralną rolę w aktywacji swoistej odpowiedzi limfocytów T [38, 39].

Niezwykle obiecujące wyniki badań przedklinicznych doprowadziły do rozpoczęcia badań klinicznych nad tą formą immunoterapii [40–42]. Przeprowadzone dotychczas badania kliniczne I i II fazy oceniały głównie bezpieczeństwo terapii i surogatowe markery odpowiedzi w postaci analizy indukcji swoistych limfocytów T [referencje 43, 44 odnoszą się do doskonałych artykułów przeglądowych w tym zakresie].

W badaniach przeprowadzonych u chorych z rakiem jelita grubego, u 15 z 29 chorych (52 proc.) wykazano mierzalną, swoistą odpowiedź immunologiczną po podaniu 8 dawek szczepionki. Badanie wykazało, że chorzy, u których stwierdzono odpowiedź immunologiczną, mieli na ogół lepsze rokowanie w momencie kwalifikacji do badań, co sugeruje, że stan zaawansowania choroby oraz niekorzystne czynniki prognostyczne będą wpływać na skuteczność tej formy leczenia. Oczywiście wydaje się zatem fakt, że zaobserwowane wykładniki odpowiedzi klinicznej, jak przeżycia i czas wolny od choroby, mierzone w ciągu 2 lat były lepsze u chorych z mierzalną odpowiedzią immunologiczną. Niezależnie jednak od ustalonych wstępnie czynników prognostycznych wykazano, że pojawienie się odpowiedzi immunologicznej związane było z dłuższym przeżyciem ($p=0,0012-0,0003$) [42].

Szczepionki oparte na HSP przygotowuje się indywidualnie dla każdego chorego z lizatu komórek nowotworowych. Zakłada się, że w takim lizacie komórkowym obecne są zmutowane białka, które w istocie mogą być antygenami charakterystycznymi dla konkretnego guza nowotworowego. W przeciwieństwie do wcześniej opisanych autologicznych szczepionek, preparat HSP jest bardziej jednolity w swoim składzie, co daje możliwość lepszej standaryzacji leku i następnie porównania wyników badań klinicznych. Standaryzacja produktu i bardzo zachęcające wyniki badań klinicznych mogą sprawić, że w niedługim czasie leczenie oparte na tej technologii zostanie wprowadzone do kliniki.

Piśmiennictwo

1. Wcisto G, Szczylik C, Szarlej-Wcisto K, Korniluk J. Rak jelita grubego – chemioterapia adjuwantowa i zaawansowanych postaci z zastosowaniem cetuximabu samego i w skojarzeniu z cytostatykami. *Współcz Onkol* 2005, 9: 300-7.
2. Ragnhammar P, Hafstrom L, Nygren L, Glimelius B. A systematic overview of chemotherapy effects in colorectal cancer. *Acta Oncol* 2001; 40: 282-308.
3. Mavligit GM, Gutterman JU, Burgess MA, et al. Prolongation of postoperative disease-free interval and survival in human colorectal cancer by B.C.G. or B.C.G. plus 5-fluorouracil. *Lancet* 1976; 1: 871-6.
4. Panettiere FJ, Goodman PJ, Costanzi JJ, et al. Adjuvant therapy in large bowel adenocarcinoma: long-term results of a Southwest Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 1988; 6: 947-54.
5. Wolmark N, Fisher B, Rockette H, et al. Postoperative adjuvant chemotherapy or BCG for colon cancer: results from NSABP protocol C-01. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 30-6.
6. Smith RE, Colangelo L, Wieand HS, Begovic M, Wolmark N. Randomized trial of adjuvant therapy in colon carcinoma: 10-year results of NSABP protocol C-01. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1128-32.
7. Amery WK, Bruynseels JP. Levamisole, the story and the lessons. *Int J Immunopharmacol* 1992; 14: 481-6.
8. Stevenson HC, Green I, Hamilton JM, Calabro BA, Parkinson DR. Levamisole: known effects on the immune system, clinical results,

- and future applications to the treatment of cancer. *J Clin Oncol* 1991; 9: 2052-66.
9. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, et al. Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N Engl J Med* 1990; 322: 352-8.
 10. Laurie JA, Moertel CG, Fleming TR, et al. Surgical adjuvant therapy of large-bowel carcinoma: an evaluation of levamisole and the combination of levamisole and fluorouracil. The North Central Cancer Treatment Group and the Mayo Clinic. *J Clin Oncol* 1989; 7: 1447-56.
 11. Wolmark N, Rockette H, Mamounas E, et al. Clinical trial to assess the relative efficacy of fluorouracil and leucovorin, fluorouracil and levamisole, and fluorouracil, leucovorin, and levamisole in patients with Dukes' B and C carcinoma of the colon: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-04. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3553-9.
 12. Haller DG, Catalano PJ, Macdonald JS, O'Rourke MA, Frontier MS, Jackson DV, Mayer RJ. Phase III study of fluorouracil, leucovorin, and levamisole in high-risk stage II and III colon cancer: final report of Intergroup 0089. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8671-8.
 13. Poplin EA, Benedetti JK, Estes NC, et al. Phase III Southwest Oncology Group 9415/Intergroup 0153 randomized trial of fluorouracil, leucovorin, and levamisole versus fluorouracil continuous infusion and levamisole for adjuvant treatment of stage III and high-risk stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1819-25.
 14. Buter J, Sinnige HA, Sleijfer DT, de Vries EG, Willemse PH, van der Graaf WT, Verschuuren RC, Mulder NH. 5-Fluorouracil/leucovorin/interferon alpha-2a in patients with advanced colorectal cancer. Effects of maintenance therapy on remission duration. *Cancer* 1995; 75: 1072-6.
 15. Wadler S, Lembersky B, Atkins M, Kirkwood J, Petrelli N. Phase II trial of fluorouracil and recombinant interferon alfa-2a in patients with advanced colorectal carcinoma: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1991; 9: 1806-10.
 16. Bukowski RM, Inoshita G, Yalavarthi P, et al. A phase I trial of 5-fluorouracil, folinic acid, and alpha-2a-interferon in patients with metastatic colorectal carcinoma. *Cancer* 1992; 69: 889-92.
 17. Schmoll HJ, Kohne-Wompner CH, Hiddemann W, et al. Interferon alpha-2b, 5-fluorouracil, and folinic acid combination therapy in advanced colorectal cancer: preliminary results of a phase I/II trial. *Semin Oncol* 1992; 19 (Suppl 3): 191-6.
 18. Wolmark N, Bryant J, Smith R, et al. Adjuvant 5-fluorouracil and leucovorin with or without interferon alfa-2a in colon carcinoma: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol C-05. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1810-6.
 19. Barni S, Lissoni P, Cazzaniga M, et al. A randomized study of low-dose subcutaneous interleukin-2 plus melatonin versus supportive care alone in metastatic colorectal cancer patients progressing under 5-fluorouracil and folates. *Oncology* 1995; 52: 243-5.
 20. Goey SH, Gratama JW, Primrose JN, Ward U, Mertelsmann RH, Osterwalder B, Verweij J, Stoter G. Interleukin 2 and interferon alpha-2a do not improve anti-tumour activity of 5-fluorouracil in advanced colorectal cancer. *Br J Cancer* 1996; 74: 2018-23.
 21. Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ Sr, Needle MN, Kopit J, Mayer RJ. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1201-8.
 22. Shia J, Klimstra DS, Li AR, et al. Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in colorectal carcinoma: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Mod Pathol* 2005; 18:1350-6.
 23. Chung KY, Shia J, Kemeny NE, et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1803-10.
 24. Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, et al. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol* 2005; 6: 279-86.
 25. Hanna MG Jr, Peters LC. Specific immunotherapy of established visceral micrometastases by BCG-tumor cell vaccine alone or as an adjunct to surgery. *Cancer* 1978; 42: 2613-25.
 26. Hanna MG Jr, Brandhorst JS, Peters LC. Active-specific immunotherapy of residual micrometastases: An evaluation of sources, doses and ratios of BCG with tumor cells. *Cancer Immunol Immunother* 1979; 7: 160-73.
 27. Peters LC, Hanna MG Jr. Active-specific immunotherapy of established metastases: Effect of cryopreservation procedures on tumor cell immunogenicity in guinea pigs. *J Natl Cancer Inst* 1980; 64: 1521-5.
 28. Peters LC, Brandhorst JS, Hanna MG Jr. Preparation of immunotherapeutic autologous tumor cell vaccines from solid tumors. *Cancer Res* 1979; 39: 1353-60.
 29. Hoover HC Jr, Peters LC, Brandhorst JS. Therapy of spontaneous metastases by an autologous tumor vaccine. *J Surg Res* 1981; 30: 409-15.
 30. Hoover HC Jr, Surdyke MG, Dangel RB. Prospectively randomized trial of adjuvant active-specific immunotherapy for human colorectal cancer. *Cancer* 1985; 55: 1236-43.
 31. Hoover HC Jr, Brandhorst JS, Peters LC. Adjuvant active specific immunotherapy for human colorectal cancer: 6.follow-up of a phase III prospectively randomized trial. *J Clin Oncol* 1993; 11: 390-9.
 32. Vermorken JB, Claessen AM, van Tinteren H. Active specific immunotherapy for stage II and stage III human colon cancer: a randomized trial. *Lancet* 1999; 353: 345-50.
 33. Harris JE, Ryan L, Hoover HC Jr. Adjuvant active specific immunotherapy for stage II and III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: Eastern Cooperative Oncology Group Study E5283. *J Clin Oncol* 2000; 18: 148-57.
 34. Habal N, Gupta RK, Bilchik AJ, Yee R, Leopoldo Z, Ye W, Elashoff RM, Morton DL. CancerVax, an allogeneic tumor cell vaccine, induces specific humoral and cellular immune responses in advanced colon cancer. *Ann Surg Oncol* 2001; 8: 389-401.
 35. Uyl-de Groot CA, Vermorken JB, Hanna MG Jr, Verboom P, Groot MT, Bonsel GJ, Meijer CJ, Pinedo HM. Immunotherapy with autologous tumor cell-BCG vaccine in patients with colon cancer: a prospective study of medical and economic benefits. *Vaccine* 2005; 23: 2379-87.
 36. Udono H, Srivastava PK. Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *J Exp Med* 1993; 178: 1391-6.
 37. Tamura Y, Peng P, Liu K, Daou M, Srivastava PK. Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science* 1997; 278: 117-20.
 38. Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 2001; 14: 303-13.
 39. Binder RJ, Han DK, Srivastava PK. CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nat Immunol* 2000; 1: 151-5.
 40. Janetzki S, Palla D, Rosenhauer V, Lochs H, Lewis JJ, Srivastava PK. Immunization of cancer patients with autologous cancer-derived heat shock protein gp96 preparations: a pilot study. *Int J Cancer* 2000; 88: 232-8.
 41. Belli F, Testori A, Rivoltini L, et al. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous tumor-derived heat shock protein gp96-peptide complexes: clinical and immunologic findings. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4169-80.
 42. Mazzaferro V, Coppa J, Carrabba MG, et al. Vaccination with autologous tumor-derived heat-shock protein gp96 after liver resection for metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3235-45.
 43. Parmiani G, Testori A, Maio M, et al. Heat shock proteins and their use as anticancer vaccines. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8142-6.
 44. Castelli C, Rivoltini L, Rini F, et al. Heat shock proteins: biological functions and clinical application as personalized vaccines for human cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53: 227-33.

Adres do korespondencji

doc. dr hab. med. **Dariusz W. Kowalczyk**
 Zakład Immunologii Nowotworów
 Wielkopolskie Centrum Onkologii
 ul. Garbary 15
 61-866 Poznań
 tel. +48 61 885 06 67; +48 61 885 06 65
 faks +48 61 852 85 02
 e-mail: dariusz.w.kowalczyk@wco.pl