

Na świecie obecnie prowadzi się 54 programy kliniczne „samobójczej terapii genowej” nowotworów, które obejmują łącznie 555 chorych. Próby te dotyczą najczęściej guzów mózgu i czerniaka złośliwego i wykorzystują w większości gen kodujący enzym – kinazę tymidynową wirusa opryszczki pospolitej typu 1 (HSV 1-Tk). Po podaniu gancyklowiru (GCV) zniszczeniu ulegają komórki, do których wprowadzono gen HSV 1-Tk oraz komórki sąsiadujące (bystander effect). Bardzo ważną rolę w eliminacji guza odgrywają również mechanizmy odpornościowe. W pracy tej podjęto próbę zwiększenia efektywności terapii samobójczej czerniaka złośliwego poprzez (i) podniesienie wydajności bystander effect przy użyciu genu kodującego IL-6 oraz (ii) skojarzenie efektu samobójczego z immunostymulacją wykorzystując geny HSV 1-Tk i GM-CSF. W tym celu do wektora retrowirusowego MSCV wklonowano gen fuzyjny Hy-Tk. Do tego samego wektora wklonowano gen dwucistronowy IL-6-IRES-Neo, GM-CSF-IRES-Neo lub GM-CSF-IRES-HyTk. Uzyskanymi rekombinowanymi retrowirusami transdukowano komórki mysiego czerniaka B-78-H1. Aktywność biologiczną Tk *in vitro* badano poprzez dodanie GCV do hodowli komórek B-78-HyTk i B-78-GM-CSF/HyTk. Myszom C57Bl/6 x C3H podano s.c. 5×10^6 komórek B-78-HyTk. Po 7 dniach i. p. podawano GCV (15, 75, i 150 mg/kg). W kolejnej serii doświadczeń myszom podawano komórki B-78-HyTk lub B-78-IL-6 zmieszane 1:1 z komórkami B-78-H1 oraz mieszankę 1:1 B-78-HyTk z B-78-IL-6. Po 7 dniach myszom podawano i.p. GCV (75 mg/kg). W ostatniej serii doświadczeń myszom podawano s. c. komórki B-78-H1, B-78-GM-CSF oraz B-78-GM-CSF/HyTk, a po 7 dniach GCV (75 mg/kg). Po raz pierwszy wykazaliśmy, że wprowadzenie genu IL-6 równoległe z genem Tk do tkanki nowotworowej z następującą aktywacją mechanizmów samobójczych zwiększa w synergistyczny sposób bystander effect. Ponadto, połączenie Tk z GM-CSF całkowicie hamowało formowanie guzów nisko-immunogennego czerniaka mysiego B-78, podczas gdy użycie każdego z tych genów oddzielnie miało tylko połowiczny efekt. Potwierdzono wcześniejsze obserwacje, że zastosowanie genów dwucistronowych zapewnia wysoką ekspresję genu terapeutycznego w systemie retrowirusowym. Dodatkowo wykazano, że zastosowanie genu fuzyjnego (HyTk) pozwala na jednoczesne wprowadzenie dwóch genów terapeutycznych do komórki nowotworowej.

Słowa kluczowe: samobójcza terapia genowa, kinaza tymidynowa, IL-6, GM-CSF, geny dwucistronowe, wektory retrowirusowe

Wzmocnienie efektu samobójczego genu kinazy tymidynowej wirusa opryszczki przez geny IL-6 i GM-CSF

Enhancement of suicide effect of herpes simplex thymidine kinase gene by IL-6 and GM-CSF genes

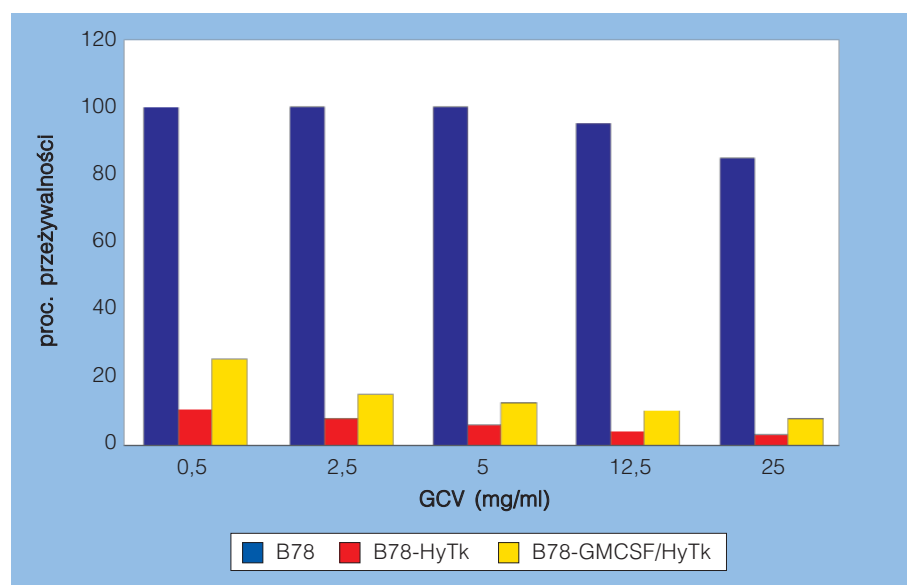
Małgorzata Kapcińska, Piotr Wysocki,
Maciej Wiznerowicz, Andrzej Mackiewicz

Zakład Immunologii Nowotworów Akademii Medycznej w Wielkopolskim Centrum Onkologii, Poznań

WSTĘP

Jedną ze strategii terapii genowej nowotworów jest użycie tzw. „genów samobójczych”. Są to geny, które nie występują w komórkach ssaków, a ich produkty mają zdolność metabolizowania nietoksycznych substratów (proleków) w toksyczne metabolity [1]. Na świecie obecnie prowadzi się w oparciu o ww. strategię 54 programy kliniczne, które obejmują 555 chorych (www.wiley.com), a jeden z programów badawczych jest w III fazie prób klinicznych. Próby te dotyczą różnych typów nowotworów, najczęściej guzów mózgu i czerniaka złośliwego. Najczęściej dotychczas stosowanym genem samobójczym jest gen kodujący enzym kinazę tymidynową wirusa opryszczki pospolitej typu 1 (HSV 1-Tk), który fosforyluje analogi nukleozydowe tymidyny, będące jednocześnie lekami przeciwwirusowymi, acyklowir czy gan-

cyklowir (GCV) do trifosforanów będących inhibitorami polimeraz DNA, co w rezultacie prowadzi do śmierci komórki dzielącej się. Zniszczeniu ulegają komórki w trakcie podziału, do których wprowadzono gen samobójczy oraz sąsiadujące dzielące się komórki, do których produkt genu przenika poprzez połączenia międzykomórkowe. Zjawisko to określa się jako *bystander effect*. Teoretycznie więc wystarcza mała frakcja komórek, do których wprowadza się gen samobójczy, aby zniszczyć cały guz. Okazuje się jednak, że bardzo ważną rolę w eliminacji guza odgrywają mechanizmy odpornościowe [2-5]. Już w pierwszych doświadczeniach wykazano, że tylko te szczury ze wszczepionym guzem mózgu, które poddano genowej terapii samobójczej i rozwinęły ogólnoustrojową swoistą odpowiedź immunologiczną przeciw wszczepionym komórkom nowotworowym były w stanie całkowicie wy-



Ryc. 1. Efekt samobójczy genu HSV1-Tk przy użyciu różnych dawek gancyklowiru *in vitro*

54 clinical trials of cancer suicide gene therapy comprising 555 patients are currently carried out all over the world. These trials mostly target brain tumors and malignant melanoma, and apply herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene (HSV-1 Tk) as a suicide gene. Following ganciclovir (GCV) administration Tk transduced cancer cells and non-transduced neighboring cancer cells are eliminated (bystander effect). Very important role in tumor eradication plays also antitumor immune response. The aim of the study was the enhancement of the suicide gene therapy of melanoma by (i) increase of the bystander effect by IL-6, (ii) combination of suicide gene therapy and immunostimulation using Tk and GM-CSF genes. For this purpose the HyTk fusion gene was inserted into MSCV retroviral vector. Into the same vector bicistronic genes IL-6-IRES-Neo, GM-CSF-IRES-Neo or GM-CSF-IRES-HyTk were cloned. Obtained recombinant retroviruses were used for transduction of B-78-H1 murine melanoma cells. In vitro biological activity of Tk was studied by adding of GCV into culture of B-78-HyTk or B-78-GM-CSF/HyTk. In vivo activity of Tk was studied by s. c. inoculation of C57Bl/6 x C3H mice with 5×10^5 B-78-HyTk followed by i.p. GCV (15, 75, 150 mg/kg) administration after 7 days. In another set of experiments mice were inoculated with B-78-HyTk or B-78-IL-6 mixed 1:1 with B-78-H1 cells or B-78-HyTk/B-IL-6 1:1 mixture. After 7 days mice received 75 mg/kg of GCV. In the last series of experiments mice were inoculated s.c. with B-78-H1, B-78-GM-CSF or B-78-GM-CSF/HyTk and after 7 days GCV (75 mg/kg) was applied i.p. We have for the first time demonstrated that IL-6 in the synergistic manner enhanced Tk bystander effect. Moreover, combination of Tk with GM-CSF completely inhibited tumor formation by low-immunogenic murine melanoma B-78-H1, while application of each of the factors separately had only limited effect. We have confirmed earlier observations that bicistronic genes provide high expression of therapeutic gene in retroviral expression system. In addition application of fusion gene (HyTk) allows insertion of two therapeutic genes into cancer cell.

Key words: suicide gene therapy, thymidine kinase, IL-6, GM-CSF, bicistronic genes, retroviral vectors

eliminować guz i przeżyć doświadczenie [2]. Z kolei szczury traktowane w identyczny sposób, które nie były w stanie takiej odpowiedzi rozwinąć, padły z powodu rozrostu guza w miejscu wszczepienia. Ostatnio wykazano również, że na skutek reakcji immunologicznych zachodzących w obrębie guza i związanej z tym produkcją cytokin, głównie interleukiny (IL)-1 i -IL-6, a nie INF γ , IL-2 czy IL-4, wzrasta efektywność *bystander effect* [6].

Kilkuletnie doświadczenia stosowania powyższej strategii zarówno w modelach doświadczalnych, jak i badaniach klinicznych u ludzi, wykazały jednak jej względnie ograniczoną skuteczność terapeutyczną. Główną przyczyną niepowodzeń są nadal niedoskonałe metody dostarczania genów bezpośrednio do guza. Oryginalna strategia polegała na doguzowym podaniu komórek produkujących rekombinowane retrowirusy niosące gen HSV 1-Tk. Później próbowano podawać oczyszczone wektory retrowirusowe. Wirusy te wprowadzają geny (transdukują) do komórek dzielących się, więc „atakują” tylko komórki nowotworowe oraz ewentualnie komórki śródbłonka naczyń zaopatrujących w krew komórki guza. Jest to więc bardzo korzystne zjawisko, gdyż omija komórki prawidłowe. Jednak frakcja komórek dzielących się w obrębie guza jest ograniczona i tylko w niektórych nowotworach sięga 20 proc. Wydajność tej metody nie przekracza więc od 1 do 5 proc. komórek transdukowanych. Od pewnego czasu próbuje się stosować rekombinowane adenowirusy, które wprowadzają geny również do komórek nie dzielących się i wykazują znacznie wyższą wydajność transdukcji niż wektory retrowirusowe [7].

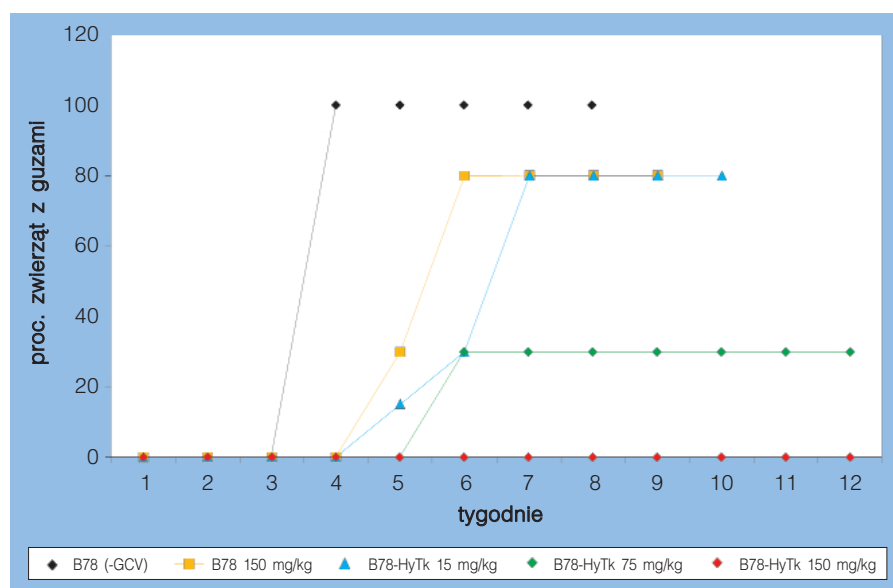
Na podstawie zgromadzonych danych można sądzić, że efektywność terapii samobójczej zależy głównie od 3 czynników, a mianowicie: wydajności transdukcji genu samobójczego, poziomu *bystander effect* i odpowiedzi immunologicznej. W związku z tym prowadzone obecnie badania ogniskują się głównie na tych zagadnieniach. W naszych poprzednich badaniach wykazaliśmy, że zastosowanie genu dwucistronowego zawiera-

jącego gen znacznikowy (LacZ) połączony sekwencją IRES z genem oporności na neomycynę (Neo) w wektorze retrowirusowym, zapewnia wysoką ekspresję genu samobójczego w komórkach pakujące [8], a podanie tych komórek do guza mózgu u szczurów, prowadzi do transdukcji genu do ponad 3 proc. komórek nowotworowych [9]. Wykazaliśmy również, że gen dwucistronowy zawierający gen HSV 1-Tk połączony sekwencją IRES a genem Neo w wektorze retrowirusowym zapewnia wysoką ekspresję genu samobójczego w komórkach mysiego czerniaka B-78-H1 i jego funkcję *in vivo* [10]. W niniejszej pracy przedstawiamy wyniki badań nad zwiększeniem efektywności terapii samobójczej czerniaka złośliwego poprzez podniesienie wydajności *bystander effect* przy użyciu genu kodującego IL-6 oraz skojarzenie efektu samobójczego z immunostymulacją wykorzystując geny HSV 1-Tk i granulocyta-makrofagowego czynnika stymulującego powstawanie kolonii (GM-CSF).

MATERIAŁ I METODY

Wektory retrowirusowe i transdukcja komórek mysiego czerniaka – B-78-H1

Do komórki retrowirusowego opartego na murine stem cell virus (MSCV) po wycięciu kasety *pgk-Neo* (genu oporności na neomycynę z egzogennym promotorem) w miejsca XhoI i SalI wklonowano gen fuzyjny złożony z genu HSV 1-Tk i genu selekcyjnego – oporności na hygromycynę (Hy) (pozyskany dzięki uprzejmości Dr R. G. Hawley, Toronto, Kanada). Uzyskany wektor oznaczono symbolem MSCV-HyTk. Do tego samego wektora (MSCV) po wycięciu kasety jw. w miejsca Bgl II i BamH I wklonowano gen dwucistronowy zawierający cDNA ludzkiej IL-6 połączonej sekwencją IRES z genem Neo (symbol wektora – MINV-IL-6). W podobny sposób, poprzez wklonowanie genu dwucistronowego zawierającego cDNA mysiego GM-CSF połączonego sekwencją IRES z genem Neo w miejsca Bgl II i BamH I MSCV, uzyskano wektor



Ryc. 2. Wpływ dawki gancycloviru na tworzenie guzów w mysich komórkach czerniaka, do których wprowadzono gen samobójczy (HSV1-Tk)

MINV-GM-cSF. W analogiczny sposób skonstruowano wektor MINV-GM-CSF/HyTk, w którym gen mysiego GM-CSF połączono sekwencją IRES z genem fuzyjnym HyTk. cDNA ludzkiej IL-6 oraz mysiego GM-CSF uzyskano dzięki uprzejmości Dr S. Rose-John, Mainz, Niemcy. Uzyskane wektory elektroporowano do komórek pakujących PA317, jak opisano wcześniej [8]. Po elektroporacji wektorów MSCV-Hy-Tk oraz MINV-GM-CSF/HyTk komórki pakujące selekcjonowano przez 3 tygodnie w obecności antybiotyku hygromycyny, a pozostałych wektorów w obecności G418. Następnie uzyskanymi rekombinowanymi retrowirusami transdukowano komórki mysiego czerniaka B-78-H1. W skrócie, nadsącz z odpowiednich komórek pakujących zawierający wirusy dodawano do hodowli komórek B-78-H1 na 48 h w obecności Polybrenu. Następnie pożywkę zmieniano, a transdukowane komórki selekcjonowano w odpowiednim antybiotyku. Komórki hodowano do uzyskania konfluencji bez pozyskiwania klonów. Ekspresję Tk, IL-6 i GM-CSF w komórkach pakujących oraz B-78-H1 oceniano na poziomie mRNA przy pomocy metody Northern blot. Syntezę IL-6 i GM-CSF przez komórki B-78-IL-6 oraz B-78-GM-CSF i B-78-GM-CSF/HyTk badano przy użyciu metody ELISA (odpowiednio Genzyme i R&D, USA). Stwierdzono, że komórki B-78-IL-6 wytwarzają $100 \text{ ng}/10^6/24 \text{ h}$, a komórki B-78-GM-CSF i B-78-GM-CSF/HyTk odpowiednio 9 i $5 \text{ ng}/10^6/24 \text{ h}$. Aktywność biologiczną Tk *in vitro* badano poprzez dodanie GCV we wzrastających dawkach do hodowli komórek B-78-HyTk i B-78-GM-CSF/HyTk i cenę ich żywotności stosując test MTT.

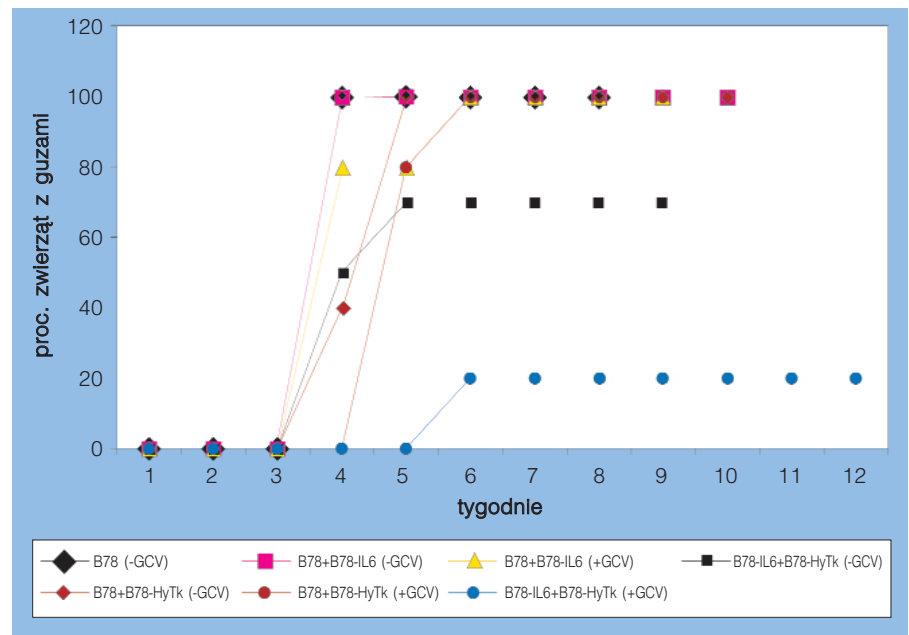
Badania *in vivo*

We wszystkich doświadczeniach stosowano myszy C57Bl/6 x C3H w wieku 6-10 tygodni pochodzące z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej (Wrocław). W pierwszej serii doświadczeń myszom podawano podskórnie (s.c.) 5×10^5 komórek B-78-HyTk. Po 7 dniach przez kolejnych 7 dni co 12 godz. myszom dootrzewnowo (i.p.) podawano GCV w dawkach całkowitych 15, 75, i 150 mg/kg. W kolejnej serii doświadczeń myszom podawano komórki B-78-HyTk lub B-78-IL-6 zmieszane 1:1 z komórkami B-78-H1 oraz mieszaninę 1:1 B-78-HyTk z B-78-IL-6 w ilości całkowitej jw. Po 7 dniach myszom podawano i.p. GCV w dawce 75 mg/kg w sposób jak opisano wyżej. W ostatniej serii doświadczeń myszom podawano s.c. komórki B-78-H1, B-78-GM-CSF oraz B-78-GM-CSF/HyTk w ilości jw. Również po 7 dniach myszom podawano GCV w dawce 75 mg/kg w sposób jw.

WYNIKI

Aktywność Tk *in vitro* przedstawiono na ryc. 1. Jak wynika z wykresu wektor MSCV-HyTk zapewnia nieco wyższą aktywność Tk *in vitro* niż MINV-GM-CSF/HyTk.

Wyniki zależności zahamowania wzrostu guza od dawki GCV przedstawiono na ryc. 2. Zastosowanie GCV w dawce 150 mg/kg całkowicie zniszczyło komórki nowotworowe, które nie uformowały guzów. Natomiast GCV w dawce 15 mg/kg miało bardzo niską wydajność. Dawka pośrednia hamowała wzrost



Ryc. 3. Synergistyczny efekt Tk i IL-6 na formowanie guzów u myszy

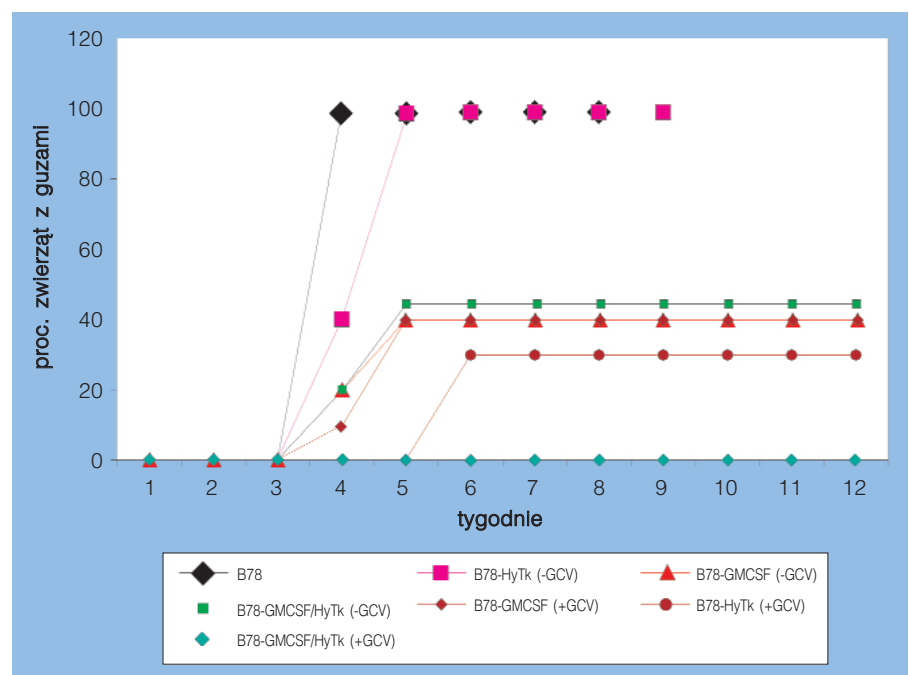
guzów u ponad połowy zwierząt. W związku z tym, do badań *bystander effect* zastosowano dawkę 75 mg/kg. W tej serii doświadczeń, aby stwierdzić wpływ Tk na komórki sąsiadujące, komórki transdukowane Tk mieszano z komórkami wyjściowymi lub transdukowanymi IL-6. Na ryc. 3. przedstawiono wyniki powyższego doświadczenia. Stwierdzono, że komórki B-78-IL-6 zmieszane z B-78 podane s.c. myszom we wszystkich przypadkach tworzą guzy, podobnie jak B-78-HyTk. Podanie GCV w dawce jw. powodowało tylko (głównie w przypadku B-78-HyTk) opóźnienie pojawienia się guzów oraz zwolnienie ich wzrostu. Natomiast w przypadku zmieszania komórek B-78-IL-6 z B-78-HyTk i podania GCV tylko 20 proc. zwierząt rozwinęło guzy.

U 40 proc. myszy, którym podano B-78-

GM-CSF lub B-78-GM-CSF/HyTk i u wszystkich, którym podano B-78-HyTk stwierdzono formowanie guzów (ryc. 4.). Padanie GCV w dawce 75 mg/kg nieznacznie opóźniło formowanie guzów B-78-GM-CSF, spowodowało formowanie guzów z komórek B-78-HyTk u około 30 proc. zwierząt oraz całkowicie zahamowało formowanie guzów z komórek B-78-GM-CSF/HyTk.

DYSKUSJA

Oporność wielu nowotworów na chemio-, radio- czy immunoterapię, będących w fazie rozsiewu stymuluje do poszukiwań nowych metod ich leczenia. W genoterapii już od kilku lat pokłada się nadzieje, iż będzie skutecznie zwalczać tę chorobę. Obecnie prowadzi się próby kliniczne terapii genowej no-



Ryc. 4. Synergistyczny efekt Tk i GM-CSF na formowanie guzów u myszy

wotworów oparte na kilku podstawowych strategiach [11]. Obejmują one immunoterapię genową, gdzie dominują tzw. genetycznie modyfikowane rakowe szczepionki komórkowe (*gene modified tumor vaccines* – GMTV), a ostatnio modyfikację komórek dendrytycznych – prezentujących antygen, terapię antyangiogenną, dyskutowaną w niniejszej pracy terapię samobójczą, naprawę uszkodzonych genów supresorowych lub usunięcie onkogenów, czy ochronę szpiku przed chemioterapią wysokodawkową poprzez wprowadzenie do nich genów oporności wielolekowej. Po fali olbrzymiego optymizmu spowodowanego bardzo obiecującymi wynikami badań przedklinicznych nadszedł okres ich weryfikacji w próbach klinicznych. Okazało się, że wyniki uzyskane w wysublimowanych modelach zwierzęcych nie zawsze przekładają się na konkretne sytuacje kliniczne. Oryginalne obserwacje wykazały zależność efektu samobójczego od odpowiedzi immunologicznej [2]. Ostatnio wykazano, że komórki nowotworowe w wyniku terapii samobójczej eliminowane są raczej poprzez martwicę niż na drodze apoptozy, a odpowiedź immunologiczna spolaryzowana jest w kierunku Th1 [3]. Ostatnio zwrócono również uwagę, że mediatory reakcji odpornościowych mogą wpływać na *bystander effect* [6]. W związku z tym próbuje się łączyć ze sobą niektóre strategie. Ponadto, próbuje się ulepszać nośniki genów w taki sposób, aby mogły zapewnić jednoczesną ekspresję kilku wprowadzanych genów.

W tej pracy po raz pierwszy wykazaliśmy, że wprowadzenie genu IL-6 równoległe z genem Tk do tkanki nowotworowej z następującą aktywacją mechanizmów samobójczych, zwiększa w synergistyczny sposób *bystander effect*. Mechanizmy molekularne leżące u podłoża tego zjawiska wymagają dalszych analiz, szczególnie badań *in vitro*, które pozwolą ostatecznie osądzić czy mamy faktycznie do czynienia ze wzmocnieniem *bystander effect*, czy ze współaktywacją przeciwnowotworowych mechanizmów obronnych *in vivo*, które z kolei prowadzą do eliminacji guza. Skojarzenie obu metod poszerza jednak znacznie możliwości terapii samobójczej. Jak wcześniej wspomniano, Freeman i wsp. [6] dopatrywali się związku między wzmocnieniem *bystander effect* i ekspresją IL-6. Inna grupa jednak nie stwierdziła wyższego efektu terapeutycznego w wyniku transdukcji guzów przy pomocy wektorów adenowirusowych genem Tk i IL-6, ponad transdukcją samym genem Tk [12].

W ciągu 3 ostatnich lat ukazała się seria publikacji, w których próbuje się łączyć terapię samobójczą z immunoterapią, głównie poprzez jednoczesne wprowadzenie do komórek guza genów kodujących cytokiny czy powierzchniowe cząsteczki kostymulujące [13-16]. Lista obejmuje IL-2, TNF α , GM-CSF czy FGF2 (*basic fibroblast growth factor*). We wszystkich przypadkach, z jednym wyjątkiem [12], stwierdzono wzmocnienie efektu terapeutycznego Tk przez omawiane cytokiny. Forma reakcji była jednak różna w zależności od użytej cytokiny, np. IL-2 bardziej niż inne czynniki hamowała miejscowy wzrost guza,

poprzez aktywację nieswoistych mechanizmów przeciwnowotworowych, natomiast GM-CSF najbardziej aktywował pamięć immunologiczną, tym samym odpowiedź ogólnoustrojową. W naszych badaniach wykazaliśmy, że połączenie Tk z GM-CSF całkowicie hamowało formowanie guzów nisko-immunogennego czerniaka mysiego B-78, podczas gdy użycie każdego z tych genów oddzielnie miało tylko połowiczny efekt. Obserwowana w tej pracy wydajność terapii znacznie przekracza wydajność Tk + GM-CSF prezentowaną przez innych [15-16]. Prawdopodobnie spowodowane to jest faktem, że teoretycznie wszystkie komórki nowotworowe stosowane w naszych doświadczeniach transdukowane są oboma genami. Inni natomiast wprowadzali geny do uformowanych wcześniej guzów, transdukując tylko frakcję komórek nowotworowych. Mechanizm, na drodze którego dochodzi do współdziałania Tk i GM-CSF najprawdopodobniej polega na tym, że GM-CSF aktywuje komórki dendrytyczne, które prezentują antygeny uwalniane z komórek nowotworowych w wyniku działania genu samobójczego. Uzyskane wyniki sugerują, że połączenie trzech elementów strategii „samobójczej”, tzn. genu samobójczego (Tk), wzmocnienia *bystander effect* (IL-6) oraz immunostymulacji (GM-CSF) może jeszcze bardziej podnieść jej efektywność.

Nasze poprzednie badania [8-10] oraz dane publikowane przez inne grupy [13, 14] wskazują na to, że zastosowanie genów dwucistronowych w różnych nośnikach znacznie podnosi efektywność dostarczania kilku genów do jednej komórki, a w przypadku wektorów retrowirusowych podnosi miano rekombinowanych wirusów. Również w tej pracy wykazaliśmy wysoką wydajność omawianego systemu. Ponadto, poprzez użycie genu fuzyjnego (HyTk), obejmującego również gen selekcyjny byliśmy w stanie wykorzystać trzy geny, z których ten ostatni nie jest genem terapeutycznym, a genem zapewniającym selekcję komórek pakujących w systemie rekombinowanych retrowirusów. Po kilku latach doświadczeń okazuje się jednak, że wektory retrowirusowe, pomimo ich wielu zalet, nie będą nośnikiem z wyboru w terapii samobójczej nowotworów. Na obecnym etapie rozwoju wektorologii zaczynają wypierać je nośniki adenowirusowe [7]. Szczególnie obiecujące są wektory trzeciej generacji, tzw. *helper dependent*, które mają zdolność przenoszenia informacji wielkości ok. 30 000 par zasad i zapewniają względnie długą ekspresję genów w komórkach docelowych, gdyż nie są eliminowane na drodze immunologicznej [17]. Podsumowując, zastosowanie genów wielocistronowych stanowi znaczny postęp w rozwoju genowej terapii samobójczej, natomiast nośniki retrowirusowe będą zastępowane innymi.

PIŚMIENNICTWO

1. Moolten FL. *Cancer Gene Ther* 1994; 1, 279-87.
2. Vile RG, Nelson JA, Castleden S, Chong H, Hart IR. *Cancer Res* 1994; 54, 6228-34.
3. Vile RG, Castleden S, Marshall J, Camplejohn R, Upton C, Chong H. *Int. J Cancer* 1997; 2, 267-74.
4. Bernstein M, Adris S, Ledda F, Wolfmann C, Medina J, Bravo A, Mordoh J, Chernajovsky Y, Podhaj-

- cer OL. *Cancer Gene Ther* 1999; 4, 358-66.
5. Todryk S, Melcher AA, Hardwick N, Linardakis E, Bateman A, Colombo MP, Stoppacciaro A, Vile RG. *J Immunol* 1999; 3, 1398-408.
6. Freeman SM, Ramesh R, Shastri M, Munshi A, Jensen AK, Marrogi AJ. *Cancer Lett* 1995; 8, 167-74.
7. Wludner O, Marris JC, Vahanian NN, Ford H Jr., Ramsey WJ, Blease RM. *Gene Ther* 1999; 6, 57-62.
8. Wiznerowicz M, Fong A, Mackiewicz A, Hawley RG. *Gene Ther* 1997; 4, 1061-8.
9. Kapcińska M, Wiznerowicz M, Szklarczyk A, Nowak S, Szymański J, Nawrocki S, Kaczmarek L, Mackiewicz A. *Konstrukcja dwucistronowego wektora retrowirusowego dla celów samobójczej terapii genowej guzów mózgu*. W: *Problemy współczesnej diagnostyki i terapii w neurochirurgii*, Nowak S, Żukiel R. (red.). PTPN Poznań 1998; 135-40.
10. Kapcińska M, Nawrocki S, Wiznerowicz M, Mackiewicz A. *Współcz Onkol* 1998; 2, 197-9.
11. Nawrocki S, Mackiewicz A. *Cancer Thre Rev* 1999; 25, 29-46.
12. Felzmann T, Ramsey WJ, Blaese RM. *Gene Ther* 1997; 4, 1322-9.
13. Pizato M, Franchin E, Calvi, Boschetto R, Colombo M, Ferini S, Palu G. *Gene Ther* 1998; 5, 1003-7.
14. Castleden SA, Chong H, Garcia-Ribas I, Melcher AA, Hutchinson G, Roberts B, Hart IR, Vile RG. *Hum Gene Ther* 1997; 8, 2087-102.
15. Bonnekoh B, Greenhalgh DA, Chen SH, Block A, Rich SS, Krieg T, Woo SL, Roop DR. *J Invest Dermatol* 1998; 110, 867-71.
16. Rancourt C, Rogers BE, Sosnowski BA, Wang M, Piche A, Pierce GF, Alvarez RD, Siegal GP, Douglas JT, Curiel DT. *Clin Cancer Res* 1998; 4, 2455-61.
17. Morsy MA, Gu M, Motzel Sh, Zhao J, Lin J, Su Q, Allen H, Franklin L, Parks RJ, Graham FL, Kochanek S, Bett AJ, Caskey Th. *Proc Antl Acad Sci USA* 1998; 95, 7866-71.

ADRES DO KORESPONDENCJI

prof. zw. dr hab. med. **Andrzej Mackiewicz**
Zakład Immunologii Nowotworów
Akademia Medyczna
Wielkopolskie Centrum Onkologii
ul. Garbary 15
61-866 Poznań

Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych i Fundację na Rzecz Nauki Polskiej