PRACE POGLĄDOWE

Adv. Clin. Exp. Med. 2004, **13**, 1, 125–130
ISSN 1230-025X

AGATA KOSMACZEWSKA, LIDIA CISZAK

Wpływ blokady supresorowego antygenu CTLA-4 na przeciwnowotworową odpowiedź limfocytów T

The Effect of the Blockade of Suppressory CTLA-4 Molecule on T Cell-Mediated Anti-Tumor Response

Laboratorium Immunopatologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu

Streszczenie

Zablokowanie funkcji immunosupresorowego antygenu CTLA-4 prowadzi do zwiększenia reaktywności limfocytów T na stymulację w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Zablokowanie funkcji antygenu CTLA-4 za pomocą swoistego przeciwciała sprzyja regresji guzów nowotworowych indukowanych eksperymentalnie na modelu zwierzęcym. Efektywność tej blokady koreluje z immunogennością nowotworu. Leczenie skojarzone z wykorzystaniem przeciwciała anty-CTLA-4 oraz różnych form terapii genowej, przy jednoczesnym podawaniu małych dawek leków cytostatycznych, znacznie poprawia skuteczność leczenia słabo immunogennych nowotworów mysich. Zachęcające wyniki badań eksperymentalnych budzą nadzieję na wprowadzenie tej formy immunoterapii w leczeniu schorzeń nowotworowych u ludzi (**Adv. Clin. Exp. Med. 2004, 13, 1, 125–130**).

Słowa kluczowe: blokada CTLA-4, choroba nowotworowa.

Abstract

The blockade of immunosuppressive CTLA-4 molecule leads to improvement of T cell response *in vitro* and *in vivo*. The inhibition of CTLA-4 function using b1ocking monoclonal antibody results in regression of experimentally induced tumors in mice. Effectiveness of CTLA-4 blockade correlates with tumor immunogeneicity. Combination strategies using anti-CTLA-4 with various methods of gene therapy, and low-dose chemotherapy, improves the efficacy of treatment of low-immunogeneic tumors in mice. Promising results in experimental models suggest the use of this form of immunotherapy in humans (**Adv. Clin. Exp. Med. 2004, 13, 1, 125–130**).

Key words: CTLA-4 blockade, neoplastic diseases.

Od około stu lat powszechnie wiadomo, że układ odpornościowy odgrywa decydującą rolę w zwalczaniu komórek nowotworowych w organizmie. Proliferujące w niekontrolowany sposób komórki nowotworowe mogą prezentować na swojej powierzchni antygeny, mające potencjalną zdolność indukowania odpowiedzi limfocytów T. Większość zidentyfikowanych dotąd antygenów prezentowanych przez ludzkie komórki nowotworowe to antygeny różnicowania swoiste tkankowo, które są obecne również na powierzchni komórek prawidłowych pochodzących z tkanki, z której wywodzi się nowotwór [1]. Wydaje się więc, że mechanizmy kierujące reaktywnością limfocytów T na komórki nowotworowe mogą mieć wiele punktów wspólnych z mechanizmami, leżącymi u podłoża tolerancji własnych antygenów obecnych na powierzchni komórek zdrowych [2]. Dotychczasowe badania nad immunogennością nowotworów dowodzą, że odpowiedź komórkowa organizmu, w którym rozwija się nowotwór jest zwykle nieefektywna.

Wśród przyczyn słabej immunogenności nowotworów wymienia się również brak cząsteczek kostymulujących na powierzchni komórek nowo-

Praca sponsorowana przez grant KBN nr 4PO5B 136 18.

tworowych. Znaczenie kostymulacji w indukcji odpowiedzi przeciwnowotworowej zależnej od limfocytów T zostało dowiedzione w badaniach doświadczalnych na modelu mysim, polegających na transfekowaniu komórek guza genami kodującymi cząsteczki kostymulujące B. 7, co skutkowało nie tylko regresją nowotworu, ale też indukcją odporności na ponowną ekspozycję na komórki rakowe [3]. Dotychczasowe badania nad skuteczną odpowiedzią przeciwnowotworową skupiały się na zwiększeniu immunogenności samych komórek nowotworowych przez indukcję ekspresji cząsteczek B.7 z następowym wzmocnieniem aktywności kostymulującej samych komórek nowotworowych [3]. Podejmowano również próby nasilenia funkcji komórek prezentujących antygen (APC – antigen presenting cells) dzięki transfekowaniu ich genem czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów GM-CSF (granulocyte/macrophage-colony stimulating factor) [4, 5], który sprzyja wzrostowi, różnicowaniu i aktywacji komórek APC, szczególnie komórek dendrytycznych. Dokonywano ponadto prób zwiększenia efektywności prezentacji antygenów nowotworowych przez komórki w wyniku nasilenia ekspresji cząsteczek MHC klasy II na ich powierzchni [6, 7].

Rola antygenu CTLA-4 w manipulowaniu odpowiedzią limfocytów T na stymulację

Poza pracami zmierzającymi do wzmocnienia sygnału kostymulującego limfocyt T, w ostatnich latach pojawiły się także badania skoncentrowane na zmniejszeniu siły sygnałów hamujących komórkę T. Antygen CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) jest uważany za główną molekułę hamującą zarówno wczesne, jak i późne etapy aktywacji limfocytów T. Dane literaturowe na temat struktury i biologii tego receptora przedstawiono szczegółowo w pracy poglądowej [8].

Stwierdzenie objawów choroby limfoproliferacyjnej u myszy z wyłączonym genem kodującym CTLA-4 (CTLA-4–/–) stanowiło pierwszy bezpośredni dowód na udział antygenu CTLA-4 w hamowaniu aktywacji limfocytów T i indukcji tolerancji obwodowej [9, 10]. Myszy te ginęły w 2–3 tygodniu życia z powodu masywnej limfoproliferacji, z tworzeniem nacieków w narządach wewnętrznych i szybko postępującym zaburzeniem funkcji. Wykazano, że komórki T CTLA-4–/– dużo szybciej i bardziej efektywnie reagują na stymulację antygenową oraz do pełnej aktywacji wymagają zdecydowanie słabszej kostymulacji w porównaniu do komórek T CTLA-4+/+ [11], co wynika z wpływu antygenu CTLA-4 na zmiany ilościowe i aktywność białek kontrolujących cykl komórkowy. Obniżenie stężenia inhibitorowego białka p27, wzrost aktywności kinazy cdk2 oraz hiperfosforylacja białka Rb, wiodąca do aktywacji czynników transkrypcyjnych cytokin, sprzyja wchodzeniu komórek T CTLA-4–/– w fazę S cyklu komórkowego z następową niekontrolowaną proliferacją [12].

Odkrycie udziału antygenu CTLA-4 w procesie indukcji tolerancji obwodowej zapoczątkowało wiele badań, polegających na próbach manipulacji odpowiedzią limfocytów T na stymulację poprzez różnego rodzaju oddziaływania na antygen CTLA-4 zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* [13–23].

Wykazano, że stymulacja receptora CTLA-4 w warunkach *in vitro* prowadzi do zahamowania progresji cyklu komórkowego w fazie G0/Gl, osłabienia sekrecji cytokin oraz zahamowania proliferacji limfocytów T w hodowlach komórkowych [22]. Zablokowanie jego funkcji za pomocą rozpuszczalnego przeciwciała monoklonalnego anty-CTLA-4 sprzyja natomiast aktywacji komórek T oraz ich obwodowej ekspansji [17]. Eksperymenty przeprowadzone na mysim modelu doświadczalnym dowodzą, że jednoczesne parenteralne wprowadzenie blokującego przeciwciała anty-CTLA-4 wraz ze słabo immunogennym antygenem prowadzi do indukcji klonu komórek T reagujących swoiście z tym antygenem, co wskazuje na udział antygenu CTLA-4 w tworzeniu progu dla aktywacji limfocytów T [19, 21]. Blokada u myszy z eksperymentalnie indukowanym alergicznym zapaleniem mózgu i rdzenia kręgowego EAE (experimental autoimmune encephalitis) prowadzi natomiast do zaostrzenia objawów tej choroby [14, 16]. Dodatkowo wykazano, ze zablokowanie funkcji receptora CTLA-4 sprzyja zwiększeniu odporności na zarażenia pasożytnicze [13, 18, 20]. Powyższe wyniki badań *in vivo* dowodzą udziału antygenu CTLA-4 w wielu aspektach odpowiedzi odpornościowej.

Blokada antygenu CTLA-4 a odpowiedź przeciwnowotworowa limfocytów T

Bardzo wiele emocji wzbudzają, jak dotąd, próby manipulacji przeciwnowotworową odpowiedzią komórkową zależną od limfocytów T związanych z funkcją immunosupresorowego antygenu CTLA-4 [7, 15, 23–26]. Liczne przykłady nasilenia odpowiedzi limfocytów T na stymulację przez zablokowanie jego funkcji sugerowały możliwość wzmocnienia w tych komórkach reakcji przeciw-

nowotworowej, co jako pierwsi stwierdzili Leach et al. w 1996 [7]. Prace te dowiodły, że słaba i nieefektywna odpowiedź przeciwnowotworowa komórek T indukowana przez nowotwór może być wyraźnie i skutecznie wzmocniona w wyniku zablokowania inhibitorowego antygenu CTLA-4 na ich powierzchni. Wnioski z tych badań zasugerowały po raz pierwszy uczestnictwo antygenu CTLA-4 w rozwoju schorzeń nowotworowych.

Patomechanizm immunosupresyjnego działania CTLA-4 sprzyjającego rozwojowi nowotworu nie jest całkowicie poznany. Paradis et al. [27] na podstawie badań na modelu mysim dowiedli, że zablokowanie antygenu CTLA-4 na powierzchni limfocytów T prowadzi do zwiększonego wydzielania IFN-γ, co przyczynia się do nasilenia ekspresji cząsteczek MHC klasy I przez komórki nowotworowe, nasilenia apoptozy komórek guza oraz hamowania procesu angiogenezy w ognisku nowotworowym.

Dowiedziono dotychczas, że blokada CTLA-4 prowadzi do skutecznego odrzucenia licznych immunogennych guzów nowotworowych wszczepionych eksperymentalnie myszom, jak: rak okrężnicy, nerki, chłoniak, włókniakomięsak [23, 26, 28, 29]. Wykazano również, że podanie przeciwciała blokującego antygen CTLA-4 wiodło do regresji guza, nawet jeśli leczenie to wdrożono dopiero po kilku tygodniach od implantacji nowotworu, który w tym czasie osiągnął duże rozmiary i stał się wyczuwalny w badaniu palpacyjnym [7]. W innym modelu doświadczalnym wykazano skuteczność tej terapii tylko w początkowych stadiach zaawansowania klinicznego [23].

Powyższe badania dowiodły, ponad wszelką wątpliwość, znaczenia blokady CTLA-4 w immunoterapii nowotworów. Pojawiło się jednak pytanie, czy efektywność leczenia nowotworów indukowanych eksperymentalnie u myszy z wykorzystaniem przeciwciała blokującego antygen CTLA-4 jest jednakowa we wszystkich typach nowotworów. Okazało się, że skuteczność tej formy terapii korelowała z immunogennością nowotworu [28]. Guzy nowotworowe zbudowane z komórek mających relatywnie silne właściwości immunogenne (jak włókniakomięsak, rak nerki, prostaty) ulegały całkowitej regresji po podaniu przeciwciała anty-CTLA-4. Dynamika wzrostu słabo immunogennych nowotworów, takich jak czerniak złośliwy czy rak sutka, była po zablokowaniu CTLA-4 tylko w niewielkim stopniu zmniejszona [7, 24]. Wyniki te zapoczątkowały wiele badań mających na celu poszukiwanie czynników, które działając synergicznie z CTLA-4 znacznie wzmocniłyby efekt immunoterapii słabo immunogennych nowotworów. Badanie van Elsas et al. [30] dowiodło, że skuteczność terapii czerniaka złośliwego linii B16 u myszy wyraźnie wzrasta w wyniku leczenia polegającego na kombinacji blokady antygenu CTLA-4 ze szczepionką przeciwnowotworową zawierającą napromieniane komórki guza, które w wyniku transfekcji genem GM-CSF uzyskały zdolność do jego wytwarzania [4]. Wyniki tych badań zostały potwierdzone przez innych badaczy [30].

Interesujące, że przeciwnowotworowy efekt tej terapii utrzymywał się nawet przez 4 miesiące i uodparniał myszy na ponowną inokulację komórek guza. Uważa się, że wytwarzanie GM-CSF przez genetycznie modyfikowane w tym celu komórki nowotworowe zawarte w szczepionce, nasila chemotaksję komórek APC gospodarza i znacznie poprawia ich funkcję kostymulującą limfocyty T *in vivo*, co w połączeniu z blokadą supresorowego antygenu CTLA-4 znacznie wzmacniało odpowiedź przeciwnowotworową limfocytów T skierowaną przeciwko komórkom mysiego czerniaka B16 i raka sutka SM1 [15, 30].

Również terapia skojarzona z wykorzystaniem przeciwciała anty-CTLA-4 i szczepionki wytwarzającej czynnik GM-CSF wyraźnie opóźniała rozwój i łagodziła kliniczny przebieg choroby w mysim transgenicznym modelu raka gruczołu krokowego [31]. Zaobserwowano ponadto wycofywanie się przerzutów naciekanych przez komórki jednojądrzaste. Przeciwciało blokujące anty-CTLA-4 było skutecznie wykorzystywane także w leczeniu chłoniaka T-komórkowego u myszy transfekowanych podwójnie genem lFN-γ i B.7 [32].

Wykorzystanie blokady CTLA-4 w terapiach skojarzonych nie ograniczało się tylko do klasycznych immunomodulatorów. Przeciwciało anty-CTLA-4 może także działać synergicznie z małymi dawkami leków chemioterapeutycznych w skutecznym leczeniu nowotworów w mysim modelu doświadczalnym [25]. Zastosowanie blokady CTLA-4 po chirurgicznej resekcji ogniska pierwotnego, wszczepionego wcześniej raka gruczołu krokowego, ogranicza ponadto tworzenie przerzutów w węzłach chłonnych [33].

Najsilniejszy efekt przeciwnowotworowy uzyskano w terapii po zablokowaniu antygenu CTLA-4 na subpopulacjach $CD8^+$ i NK^+ [30, 34]. Wykazano natomiast, że skuteczność profilaktyki przeciwnowotworowej zależy od blokady CTLA-4, głównie na komórkach $CD4^+$ [34].

Zjawisko autoimmunizacji jako efekt zablokowania funkcji antygenu CTLA-4

Interesującym zjawiskiem towarzyszącym stosowaniu blokady CTLA-4 w transgenicznym modelu doświadczalnym czerniaka złośliwego

B16 i raka gruczołu krokowego linii TRAMP jest rozwój swoistej tkankowo autoimmunizacji [30, 31, 34]. Wyniki świadczące o autoimmunizacji rozwijającej się w przebiegu blokady antygenu CTLA-4 wskazują wyraźnie, że nasilenie odpowiedzi przeciwnowotworowej w tej formie immunoterapii jest w większym stopniu skutkiem indukcji odporności komórkowej skierowanej przeciwko antygenom, które są normalnymi produktami genów swoistych tkankowo. Myszy, u których obserwowano regresję czerniaka złośliwego rozwijały progresywną depigmentację skóry będącą wynikiem eliminacji prawidłowych melanocytów. Depigmentacja natomiast nigdy nie pojawiała się u myszy leczonych wyłącznie szczepionką zawierającą komórki linii B16 wytwarzające GM-CSF, co dowodzi, że depigmentacja jest efektem blokady antygenu CTLA-4 [30, 34]. Dowiedziono, że głównym celem odpowiedzi komórek $CD8^+$ w mysim czerniaku B16 jest 9-aminokwasowy peptyd stanowiący w istocie fragment normalnego, niezmutowanego białka będącego produktem genu TRP-2 (tyrosine-related protein) [34]. Białko TRP-2 jest antygenem różnicowania melanocytów i jest spotykane zarówno w prawidłowych, jak i nowotworowych komórkach barwnikowych skóry. Podobny efekt w postaci autoimmunizacji obserwowano u myszy immunizowanych szczepionką komórek linii TRAMP raka gruczołu krokowego (również wytwarzających czynnik GM-CSF) w połączeniu z blokadą CTLA-4. Myszy te rozwinęły autoimmunologiczne zapalenie gruczołu krokowego [31].

Terapia genowa z wykorzystaniem rybozymu anty-CTLA-4

Ekspansywnie rozwijająca się w ostatnich latach inżynieria genetyczna proponuje coraz nowsze możliwości terapeutyczne również w zakresie oddziaływania na ekspresję genu *CTLA-4* z wykorzystaniem rybozymów. Rybozymy są małymi cząsteczkami RNA, które mają dwie szczególne cechy wykorzystywane w biologii molekularnej: zdolność swoistego rozpoznawania określonej sekwencji RNA oraz katalityczną aktywność endonukleaz, która prowadzi do rozcięcia ściśle określonego wiązania w docelowej cząsteczce RNA. Właściwości te znajdują coraz częściej zastosowanie w terapii genowej polegającej na hamowaniu ekspresji genów o znanej sekwencji nukleotydowej [35, 36].

Cepero et al. [37] wprowadzili do mysich limfocytów T (linia EL-4.51) rybozym o strukturze „spinki do włosów" (hairpin rybozyme) zawierający ramię antysensowe w stosunku do fragmentu genu kodującego antygen CTLA-4. W wyniku tej transfekcji ilość mRNA dla CTLA-4 w tych komórkach została zmniejszona o 90%, a ekspresja białka spadła do poziomu niewykrywalnego metodą cytometrii przepływowej. Wydaje się, że wyniki te stwarzają podwaliny pod nowy kierunek działań opartych na terapii genowej, mających na celu ograniczenie supresyjnej funkcji antygenu CTLA-4 w procesie wzmacniania przeciwnowotworowej odpowiedzi komórek T .

Podsumowanie

Powyższe wyniki, wykazujące bezsprzecznie skuteczność blokady antygenu CTLA-4 w zwiększaniu efektywności leczenia nowotworów w warunkach eksperymentalnych z jednej strony są potwierdzeniem udziału antygenu CTLA-4 w rozwoju chorób nowotworowych, z drugiej zaś oferują bardzo ciekawą możliwość zastosowania wiedzy podstawowej o regulacji kostymulacji w konkretną i skuteczną strategię terapii nowotworów.

Nadzieję na wykorzystanie przeciwciała monoklonalnego anty-CTLA-4 w leczeniu pacjentów na chorobę nowotworową budzi wstępne doniesienie o jego zastosowaniu po raz pierwszy w I fazie prób klinicznych w terapii skojarzonej czerniaka złośliwego u chorych w III-IV stadium zaawansowania klinicznego [38].

Piśmiennictwo

[1] Boon T., Old L. J.: Tumor antigens. Curr. Opin. Immunol. 1997, 9, 681–683.

[2] Nanda N. K., Sercarz E. E.: Induction of anti-self-immunity to cure cancer. Cell 1995, 82, 13–17.

[3] Ał1ison J. P., Hurwitz A. A., Leach D. R.: Manipulation of costimulatory signals to enhance antitumor T cell responses. Curr. Opin. Immunol. 1995, 7, 682–686.

[4] Dranoff G., Jaffee E., Lazenby A., Golumbek P., Levitsky H., Brose K., Jackson V ., Hamada H., Pardoł D., Mułligan R. C.: Vaccination with irradiated tumor cells engeneered to secrete GM-CSF stimulates potent, specific and long lasting anti-tumor-immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90, 3539–3543.

[5] Levitsky H. I., Lazenby A., Hayashi R. J., Pardoł D. M.: *In vivo* priming of two distinct antitumor effector populations: the role of MHC class I expression. J. Exp. Med. 1994, 179, 1215–1224.

[6] Baskar S., Glimcher L., Nabavi N., Jones R. T.: Major histocompatibility complex class $II^+B7–1^+$ tumor cells are potent vaccines for stimulating tumor rejection in tumor-bearing mice. l. Exp. Med. 1995, 181, 619.

[7] Leach D. R., Krummel M. F., Ał1ison J. P.: Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. Science 1996, 271,1734–1736.
[8] Kosmaczewska A., Ciszk L., Boćko D., Frydecka I.: Expression and functional significance of CTLA-4, a negative regulator of T cell activation. Arch. Immunol. Ther. Exp. 2001, 49, 39–46.
[9] Tivol E. A., Boyd S. D., McKeon S., Borriello F., Nickerson P., Strom T. B., Sharpe A. H.: CTLA-4Ig prevents lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction in CTLA-4-deficient mice. l. Immunol. 1997, 158, 5091–5094.
[10] Waterhouse P., Penninger J. M., Timms E., Wakeham A., Shahinian A., Lee K. P ., Thompson C. B., Greisser H., Mak T. W.: Lymphoproliferative disorders with early lathality in mice deficient in CTLA-4. Science 1995, 270, 985–988.
[11] Gajewski T. F., Fallarino F., Fields P. E., Rivas F., Alegre M. L.: Absence of CTLA-4 lowers the activation threshold of primed CD8(+) TCR-transgenic T cells: lack of correlation with Src homology domain 2-containing protein tyrosine phosphatase. J. Immunol. 2001, 166, 3900–3907.
[12] Greenwald R. J., Boussiotis V. A., Lersbach R. B., Abbas A. K., Sharpe A. H.: CTLA-4 regulates of anergy *in vivo*. Immunity 2001, 14, 145–155.
[13] Gomes N. A., Barreto-Desouza V., Wilson M. E., Dosreis G. A.: Unresponsiveness $CD4^+$ T lymphocytes from *Leishmania Chigashi*-infected mice increase cytokine production and mediate parasite killing after blockade of B7/CTLA-4 molecular pathway. J. Infect. Dis. 1998, 178, 1847–1851.
[14] Hurwitz A. A., Sullivan T. J., Krummel M. F., Sobel R. A., Allison J. P.: Specific blockade of CTLA-4/B7 interactions results in exacebated clinical and histologic disease in an actively-induced model of experimental allergic encephalomyelitis. J. Neuroimmunol. 1997, 73, 57–62.
[15] Hurwitz A. A., Yu T. F., Leach D. R., Al1ison J. P.: CTLA-4 blockade synergizes with tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of an experimental mammary carcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95, 10067–10071.
[16] Karandikar N. J., Vanderlugt C. L., Walunas T. L., Miller S. D., Bluestone J. A.: CTLA-4, a negative regulator of autoimmune disease. J. Exp. Med. 1996, 184, 783–788.
[17] Krummel M. F., Sullivan T. J., Allison J. P.: Superantigen responses and costimulation: CD28 and CTLA-4 have opposing effects on T cell expansion *in vitro* and *in vivo*. Int. Immunol. 1996,8,519–523.
[18] McCoy K., Cambires M., Gros G. L.: Protective immunity to nematode infection is induced by CTLA-4 blockade. J. Exp. Med. 1997, 186, 183–187.
[19] Perez V. L., van Parijs L., Biuckians A., Zheng X. X., Strorn T. B., Abbas A. K.: Induction of peripheral T cell tolerance *in vivo* requires CTLA-4 engagements. Immunity 1997, 6, 411–417.
[20] Pietrella D., Perito S., Bistoni F., Vecchiarelli A.: Cytotoxic T lymphocyte antigen costimulation influences T cell activation in response to *Cryptococcus neoformans*. Infect. Immun. 2001, 69, 1508–1514.
[21] Samoilova E. B., Horton J. L., Zhang H., Khoury S. J., Weiner H. L., Chen Y.: CTLA-4 is required for the induction of high dose oral tolerance. Int. Immunol. 1998, 10, 491–498.
[22] Walunas T. L., Bakker C. Y., Bluestone J. A.: CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. J. Exp. Med. 1996, 183, 2541–2550.
[23] Yang Y., Zou J., Mu J., Wijesurija R., Ono S., Walunas T., Bluestone J., Fujiwara H., Hamada T.: Enhanced induction of antitumor T cell responses by cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 blockade: the effect is manifested only at the restricted tumo-bearing stages. Cancer Res. 1997, 57, 4036–4041.
[24] Kwon E. D., Foster B. A., Hurwitz A. A., Madias C., Allison J. P., Greenberg N. M., Burg M. B.: Elimination of residual metastatic prostate cancer following surgery and adjunctive CTLA-4 blockade immunotherapy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96, 15074–15079.
[25] Mokyr M. B., Kalinichenko T., Gorelik L., Bluestone J. A.: Realization of the therapeutic potential of CTLA-4 blockade in low-dose chemotherapy-treated tumor-bearing mice. Cancer Res. 1998, 58, 5301–5304.
[26] Sotomayor E. M., Borrello I., Tubb E., Allison J. P., Levitsky H. I.: *In vivo* blockade of CTLA-4 enhances the priming of responsive T cells but fails to prevent the induction of tumor antigen-specific tolerance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96, 11476–11481.
[27] Paradis T. J., Floyd E., Burkwit J., Cole S. H., Brunson B., Elliott E., Gilman S., Glaudue R. P.: The antitumor activity of anti-CTLA-4 is mediated through its induction of IFN-gamma. Cancer Immunol. Immunother. 2001,50, 125–133.
[28] Hurwitz A. A., van Elsas A., Leach D., Ziskin J., Villasener J., Truong T., Allison J. P.: Manipulation of T cell activation to generate antitumor CTLs. In: Cytotxic Cells: Basic Mechanisms and Medical Application. Eds.: Sitovky M. Y., Henkart P A: Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 385–393.
[29] Shrikant P ., Khoruts A., Mescher M. F.: CTLA-4 blockade reverses $CD8^+$ T cell tolerance to tumor by a $CD4^+$ T cell and IL-2 dependent mechanism. Immunity 1999, 11, 483–493.
[30] van Eisas A, Hurwitz A. A., Allison J. P.: Combination Immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. J. Exp. Med. 1999, 190, 355–366.
[31] Hurwitz A. A., Foster B. A., Kwon E. D., Trong T., Choi E. M., Greenberg N. M., Burg M. B., Allison J. P.: Combination immunotherapy of primary prostate cancer in a transgenic model using CTLA-4 blockade. Cancer Res. 2000,60, 2444–2448.
[32] van Ginderachter J. A., Liu Y., Geldhof A. B., Brijs L., Thielemans K., De Baetselier P., Raes G.: B7-1,

IFN-gamma and anti-CTLA-4 co-operate to prevent T cell tolerization during immunotherapy against a murine T lymphoma. Int. J. Cancer. 2000, 87, 539–547.

[33] K,von E. D., Foster B. A., Hurwitz A. A., Madias C., Allison J. P., Greenberg N. M., Burg M. B.: Elimination of residual metastatic prostate cancer following surgery and adjunctive CTLA-4 blockade immunotherapy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96, 15074–15079.

[34] van Elsas A., Sutmuller R. P. M., Hurwitz A. A., Ziskin J., Villasenor J., Mederna J. P., Overijk W. W., Restifo N. P., Melief C. J. M., Offringa R., Allison J. P.: Elucidating the autoimmune and antitumor effectro mechanisms of a treatment based on cytotoxic T lymphocyte antigen-4 blockade in combination with a B16 melanoma vaccine: comparison of prophylaxis and therapy. J. Exp. Med. 2001, 194, 481–489.

[35] Muorti A. R., Da Veiga Pereire L., Dos Reis Vasques L., Menck C. F.: Ribozymes and the antigene therap how a catalytic RNA can be used to inhibit gene function. Gene 1999, 237, 303–310.

[36] Shippy R., Lockner R., Frausworth M., Hampeł A.: The hairpin ribozyme. Discovery, mechanism, and development for gene therapy. Mol. Biotechnol. 1999, 12, 117–129.

[37] Cepero E., Hnatyszyn H. J., Kraus G., Lichtenfeld M. G.: Potent inhibition of CTLA-4 expression by an anti-CTLA-4 ribozyme. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998, 247,838–843.

[38] Dredge K., Marriott J. B., Todryk S. M., Dalgleish A. G.: Adjuvants and the promotion of Th1-type cytokines in tumor immunotherapy. Cancer Immunol. Immunother. 2002, 51, 521–531.

Adres do korespondencji:

Agata Kosmaczewska
Laboratorium Immunopatologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN
ul. Weigla 12
53-114 Wrocław

Praca wpłynęła do Redakcji: 23.06.2003 r.
Po recenzji: 3.11.2003 r.
Zaakceptowano do druku: 3.11.2003 r.

Received: 23.06.2003
Revised: 3.11.2003
Accepted: 3.11.2003