IMPIEGO DEI COLONY STIMULATING FACTORS COME POSSIBILI AGENTI TERAPEUTICI

U. TESTA

Laboratorio di Ematologia ed Oncologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto. - In questo breve lavoro vengono passate in rassegna recenti acquisizioni relative ad un possibile impiego in terapia dei colony stimulating factors (CSF). Le evidenze finora acquisite hanno chiaramente mostrato come il GM-CSF ed il G-CSF mostrino una significativa attività terapeutica in condizioni nelle quali viene richiesta una stimolazione o un sostegno attivo della mielopoiesi: ripristino di una mielopoiesi normale dopo chemioterapia anti-tumorale; stimolazione della mielopoiesi in condizioni di anemia aplastica o di neutropenia ciclica.

Summary (Clinical applications of colony stimulating factors). - The first clinical trials have already indicated that long-term administration of recombinant hemopoietic growth factors can be a clinically effective procedure for correcting abnormalities in blood cell formation. Thus, the colony stimulating factors (CSFs) have proved to be highly effective agents in stimulating the formation of granulocytes, monocytes and eosinophils both in animals and man, and in enhancing resistance to otherwise lethal infections. They offer the bright prospect of use in any clinical situation in which the formation or function of these cells is abnormally low (due to the reduced production of myeloid elements such as occurring in aplastic anemias or to the killing of myeloid progenitors and precursors caused by anti-tumor chemotherapy) and causes a real risk of life-threatening infections. From initial clinical trials the CSFs, particularly GM-CSF and G-CSF, can be anticipated to perform effectively in offering the clinician the possibility of active intervention in sustaining myelopoiesis.

Introduzione

Recentemente è stato introdotto in terapia l'impiego di molecole biologicamente attive sintetizzate *in vitro* tramite ingegneria genetica (da sonde di DNA) e che appartengono all'ampia categoria dei *biological response modifiers*. Di notevole interesse risultano i primi risultati ottenuti in clinica con l'impiego dei *colony stimula-*

ting factors (CSF), cioè di quelle molecole che inducono *in vitro* ed *in vivo* la proliferazione e differenziazione dei progenitori delle cellule emopoietiche. In effetti la scoperta dei vari CSF è legata alla dimostrazione che queste molecole sono in grado di consentire la formazione di determinati tipi di colonie di cellule emopoietiche *in vitro*.

In pratica, questa famiglia di molecole regola lo svolgimento dei due processi fondamentali che assicurano l'emopoiesi: a) l'automantenimento (*self-generation*) di un pool midollare di cellule staminali; b) il differenziamento di una parte di queste cellule staminali verso gli elementi cellulari più maturi presenti nel midollo osseo e nel sangue periferico.

Sulla base delle differenti azioni biologiche, proprietà chimico-fisiche e della specificità dei bersagli cellulari, fino ad ora sono stati identificati e clonati quattro tipi di CSF: M-CSF (il CSF dei monociti-macrofagi); G-CSF (il CSF dei granulociti); GM-CSF (il CSF dei granulociti e monociti) e l'interleuchina-3 (IL-3, che agisce sulle cellule pluripotenti staminali) (Tab. 1). Differenti strategie sono state impiegate per giungere al clonaggio e poi alla produzione *in vitro* dei vari tipi di CSF. In tal senso va detto che sono state usate essenzialmente tre strategie per la produzione *in vitro* di molecole ricombinanti dei vari CSF. Una prima consiste nel sintetizzare le molecole di CSF in un sistema di cellule di mammifero; in questo caso la molecola sintetizzata subisce un processo di glicosilazione simile, ma non identico, a quello della proteina naturale. L'eritropoietina è il solo fattore di crescita emopoietico che richiede di essere glicosilato per avere attività biologica sia *in vitro* che *in vivo*. Una seconda strategia di produzione, alternativa alla prima, prevede la sintesi dei CSF in cellule di lievito; tale sistema permette la produzione di proteine allo stato nativo, ma glicosilate secondo modalità specifiche delle cellule di lievito. Il terzo sistema di produzione prevede la sintesi dei CSF in batteri (*Escherichia coli*); questo sistema ha il vantaggio di permettere la produzione di proteine ricombinanti con una notevole efficienza, ma al tempo stesso presenta l'inconveniente che le proteine così prodotte sono spesso in forma dena-

Tabella 1. - *Caratteristiche biologiche essenziali dei CSF umani*

Nome	Peso molecolare (kDa)	Aminoacidi	Peso molecolare mRNA (kb)	Localizzazione cromosomica	Fonti cellulari	Cellule emopoietiche presenti nelle colonie
G-CSF	18-22	177	2,0	17	Fibroblasti Monociti Cellule endoteliali	Neutrofili
GM-CSF	14-35	127	1,0	5q	Cellule T Monociti Cellule endoteliali Fibroblasti	Neutrofili, Monociti, Eosinofili, Eritroblasti, Megacariociti
IL-3 (o multi CSF)	14-28	133	1,0	5q	Cellule T	Neutrofili, Monociti, Eosinofili, Eritroblasti, Basofili, Megacariociti
M-CSF	35-45 18-26	224	4,0 2,8	5	Fibroblasti Monociti Cellule endoteliali	Monociti-macrofagi

turata e richiedono un accurato processo di rinaturazione. Nell'ambito della problematica della produzione *in vitro* dei CSF va anche segnalato che sono in corso studi di mutagenesi *in vitro* nel tentativo di produrre molecole di CSF biologicamente più attive o con proprietà biologiche particolari.

Il GM-CSF, che è stato il primo CSF ad essere clonato fra i vari tipi di CSF, ha di recente trovato delle interessanti applicazioni in campo clinico. Innanzitutto, prima di descrivere i vari tipi di possibili applicazioni cliniche di tale molecola, vale la pena di ricordare che il GM-CSF ricombinante (cioè prodotto *in vitro* tramite tecniche di biotecnologia) è una molecola che presenta una notevole eterogeneità di peso molecolare (14-35 kDa), in conseguenza di una componente molto variabile di glicosilazione.

Il GM-CSF stimola *in vitro* la formazione di colonie di cellule granulocitarie, monocitarie e miste granulocitarie. Tale CSF è inoltre anche un potente attivatore di neutrofili, eosinofili e monociti-maturi di cui incrementa le capacità di adesione alla matrice extracellulare e di fagocitosi dei batteri, potenzia notevolmente l'attività citotossica anti-tumorale ed inibisce la migrazione in risposta a stimoli chemiotattici.

c-DNA specifici per il G-CSF umano sono stati clonati a partire da una linea di carcinoma vescicale (5637) e da una linea di carcinoma squamoso (CHU-2), entrambi codificanti per una proteina di circa 18 kDa. Questa proteina ha la caratteristica peculiare, rispetto agli altri CSF, di non essere glicosilata a livello dei residui di asparagina; pertanto, la proteina ottenuta in forma ricombinante in *Escherichia coli* è di dimensioni omogenee. L'azione biologica principale del G-CSF si esplica favorendo la proliferazione e differenziazione di progenitori emopoietici granulocitari. Così come il GM-CSF, anche il G-CSF agisce da potente attivatore di molte

funzioni biologiche dei neutrofili (fagocitosi, chemiotassi, attività citotossica anticorpo-dipendente e produzione di radicali dell'ossigeno).

Va segnalato che il GM-CSF, oltre ad avere le azioni già riportate sui progenitori e sulle cellule mature della linea granulo-monocitaria, agisce anche sui progenitori immaturi della serie eritroide (BFU-E) e, in presenza di eritropoietina, ne permette la differenziazione nei precursori della serie eritroide.

Studi clinici sperimentali con i CSF

I CSF sono già stati utilizzati in protocolli clinici sperimentali.

Le principali aree di uso clinico per le quali risulta importante valutare la possibile efficacia terapeutica dei CSF sono riportate in Tab. 2. Tali differenti applicazioni cliniche vengono intraprese nella duplice ottica di trarre beneficio terapeutico dalla stimolazione dei precursori emopoietici midollari e dall'attivazione di alcune funzioni biologiche delle cellule differenziate (ad es. potere battericida) mediata dai CSF. Studi di fase I e II sono già disponibili per il G-CSF e per il GM-CSF, con risultati che possono essere considerati abbastanza incoraggianti. Prima di passare brevemente in rassegna gli studi clinici finora effettuati con tali molecole è bene riassumere alcuni dati di carattere generale che sono emersi riguardo agli effetti mediati *in vivo* dai CSF.

Innanzitutto va sottolineato che, a differenza di altri *biological response modifiers*, nel caso dei CSF è possibile monitorare *in vivo* l'effetto farmacologico effettuando una semplice conta del numero dei granulociti e monociti presenti nel sangue periferico. Infatti i dati finora disponibili hanno chiaramente indicato che il G-CSF ed il GM-CSF inducono un significativo incre-

Tabella 2. - Possibili applicazioni terapeutiche dei CSF

Malattie infettive	Aumento del potere battericida dei neutrofili e monociti
Tumori	Incremento del potere tumoricida dei neutrofili, eosinofili e monociti
Emocitopenie acquisite o spontanee (dopo chemioterapia mielotossica o dopo trapianto di midollo)	Stimolazione della proliferazione e differenziazione di CFU-GM con conseguente aumentata produzione di precursori mieloidi e granulo-monociti
Terapia trasfusionale	Aumento della sopravvivenza dei neutrofili trasfusi
Difetti congeniti dell'emopoiesi	Stimolazione dell'emopoiesi difettiva

mento del numero dei neutrofili, eosinofili e monociti circolanti (l'azione del G-CSF è più selettiva sul numero dei neutrofili); tale incremento diviene evidente a partire da due giorni dall'inizio della terapia con CSF. In uno studio con uso di G-CSF è stato monitorato anche il livello di neutrofili nei minuti che fanno seguito all'infusione di G-CSF; tale studio ha indicato che 5 min dopo un'infusione a *bolus* di G-CSF si verifica una netta diminuzione del numero dei neutrofili fino a raggiungere valori minori di $0,1 \times 10^9$ cellule/l, per poi ritornare ai valori di partenza a 240-360 min. L'incremento nel numero dei neutrofili, eosinofili e monociti indotto da GM-CSF e G-CSF dipende da una stimolazione dei progenitori mieloidi (CFU-GM) presenti nel midollo osseo.

In tal senso, studi condotti presso la Clinica Medica A di Torino [1] hanno mostrato che l'infusione di GM-CSF determina un netto incremento *in vivo* della percentuale di progenitori emopoietici in fase S: ad esempio, la percentuale di BFU-E in fase S sale dal 29% all'85%, così come quella delle CFU-GM dal 42% all'87%.

Questi studi, pertanto, indicano che il GM-CSF stimola la mielopoiesi *in vivo* spingendo praticamente tutti i progenitori midollari mieloidi in ciclo. Infine, un ultimo dato emerso è che la somministrazione dei vari CSF è associata ad una modesta tossicità e viene quindi ben tollerata anche a dosaggi elevati.

Una serie di sperimentazioni cliniche con GM-CSF sono state effettuate in pazienti affetti da sindromi mielodisplastiche. Le sindromi mielodisplastiche rappresentano un eterogeneo gruppo di condizioni pre-leucemiche caratterizzate da ematopoiesi inefficace e da citopenia (anemia, neutropenia e piastrinopenia) refrattarie ad ogni forma di terapia. I pazienti affetti da tali sindromi necessitano di trasfusioni continue e con elevata frequenza evolvono verso una condizione di leucemia acuta. GM-CSF è stato somministrato a tali pazienti nel tentativo di migliorare la condizione di citopenia multipla [2]. Tutti i pazienti trattati hanno presentato un significativo incremento del numero dei neutrofili circolanti; ugualmente il numero dei monociti, eosinofili e linfociti è aumentato in tutti i pazienti, ma in maniera meno spiccata rispetto all'incremento di neutrofili; 3 pazienti su 8 hanno presentato un significativo incremento degli eritrociti e delle piastrine a tal punto da non richiedere

più trasfusioni di tali elementi cellulari. Inoltre, in tutti i pazienti veniva riscontrato un aumento della cellularità midollare associata ad una diminuzione della percentuale degli elementi blastici midollari. In conclusione, questo studio indica chiaramente che il GM-CSF è un potente stimolatore dell'emopoiesi in pazienti affetti da sindromi mielodisplastiche e provoca un miglioramento del quadro ematologico presente in tali sindromi. Tuttavia, non è ancora noto se tale tipo di trattamenti sia di beneficio nel prolungare la sopravvivenza o nel ritardare l'insorgenza di una leucemia acuta.

In un secondo studio in corso di svolgimento in Germania (Mertelsmann e collaboratori, Università di Mainz) è emerso che il GM-CSF va somministrato con cautela a pazienti affetti da sindromi mielodisplastiche che presentano una percentuale superiore al 20% di blasti leucemici a livello midollare. Infatti, in alcuni di tali pazienti il GM-CSF avrebbe indotto un incremento del numero dei blasti midollari.

Un ulteriore campo di applicazione in terapia del GM-CSF è stato sperimentato in pazienti affetti da sindrome d'immunodeficienza acquisita (AIDS) con neutropenia [3]. La somministrazione di GM-CSF a tali pazienti ha indotto un netto incremento del numero dei neutrofili, eosinofili e monociti; viceversa, a livello dei linfociti è stato riscontrato solo un lieve incremento di tali cellule senza nessuna modifica del rapporto T *helper*/T *suppressor*. La logica di questo tipo di intervento terapeutico è quello di riportare il numero dei neutrofili a livelli fisiologici nella speranza che ciò possa ridurre il pericolo e la gravità delle infezioni cui vanno di frequente soggetti i pazienti con AIDS. Questi parametri sono in corso di valutazione in tali pazienti sottoposti a vari cicli di terapia con GM-CSF. D'altro canto va anche segnalato che studi *in vitro* hanno indicato che il GM-CSF così come l'interferone- γ sono in grado d'inibire la replicazione del virus HIV all'interno di cellule monocitarie che sembrerebbero fungere da serbatoi di virus durante la storia naturale dell'infezione da AIDS.

La mielosoppressione è una delle più gravi complicanze della chemioterapia anti-tumorale ad elevate dosi dovuta alla mancanza di specificità dei chemioterapici nei confronti delle cellule tumorali. Una delle cause principali di morte dei pazienti cancerosi trattati con chemioterapici è rappresentata dallo sviluppo di infezioni; infatti, in tali pazienti lo sviluppo di infezioni batteriche

o fungine sembra essere dipendente dalla gravità e dalla durata della neutropenia indotta dal trattamento chemioterapico. Onde limitare la mortalità legata a tali schemi di trattamento chemioterapico è stato sviluppato uno schema terapeutico che prevede alla fine del ciclo di chemioterapia l'infusione di cellule midollari autologhe (prelevate prima dell'inizio del trattamento e criopreservate), onde realizzare un più rapido ripristino dell'emopoiesi post-chemioterapia. Nonostante l'impiego di infusioni di cellule midollari autologhe, la morbilità e la mortalità rimangono elevate durante le tre settimane necessarie ad ottenere l'attecchimento del tessuto emopoietico autologo trapiantato e la ricostituzione emopoietica. Recenti sperimentazioni cliniche hanno indicato che la somministrazione di GM-CSF nei giorni che fanno seguito all'infusione di cellule emopoietiche autologhe accelera in modo significativo il ripristino della granulomonocitopoiesi e riduce quindi in maniera significativa la morbilità e la mortalità osservate in tali pazienti [4]. Inoltre, l'infusione di GM-CSF è ben tollerata dai pazienti e solo ad elevate dosi (maggiore a 16 µg/kg di peso corporeo/die) causa degli effetti secondari rappresentati da mialgie, edema ed ipotensione.

In un secondo studio è stato mostrato che in pazienti affetti da sarcoma metastatico la somministrazione di GM-CSF prima o dopo la chemioterapia protegge in maniera significativa dalla neutropenia indotta dalla chemioterapia stessa [5]. Tale effetto del GM-CSF si manifesta in una riduzione lieve, ma significativa, del numero minimo di neutrofili post-chemioterapia ed in una risalita più rapida di quest'ultimi a livelli fisiologici [5]. Tali effetti mieloprotettivi sono risultati essere dose-dipendenti e sono particolarmente evidenti nei gruppi di ammalati trattati con le dosi più elevate di GM-CSF.

In parallelo sono state realizzate delle sperimentazioni cliniche pilota rivolte a valutare l'efficacia del G-CSF nel ridurre l'entità o prevenire del tutto l'insorgenza di neutropenia in pazienti sottoposti a chemioterapia anti-tumorale ad elevato regime. In uno di tali studi è stato valutato l'effetto della somministrazione *in vivo* di G-CSF ad un gruppo di pazienti con neoplasie di varia natura (carcinoma del colon, delle ovaie, dei polmoni, del rene, dello stomaco, melanoma e mieloma) e sottoposti a chemioterapia con melfalan ad elevate dosi, un agente che ha uno spiccato effetto mielosoppressivo [6]. Il ciclo terapeutico prevedeva la somministrazione di G-CSF (a varie dosi da 1 µg/kg a 60 µg/kg di peso corporeo), un'unica infusione di melfalan nel giorno 8° di terapia e un nuovo ciclo d'infusione di G-CSF dal giorno 9° al giorno 18° del ciclo terapeutico. I risultati di tale sperimentazione hanno indicato che il G-CSF secondo modalità dose-dipendenti ha nettamente ridotto la durata così come gli effetti collaterali dipendenti dalla neutropenia indotta dal melfalan. In maniera del tutto analoga un secondo studio clinico è stato effettuato in un gruppo di pazienti affetti da carcinoma dell'uretere e sottoposti a trattamento multi-chemioterapico (con metotrexate, vinblastina, doxorubicina e cisplatino) ed ha indicato che la somministrazione di G-CSF a tali pa-

zienti ha significativamente ridotto la neutropenia e l'insorgenza di mucosite generalizzata che rappresentano due effetti collaterali costanti di tale trattamento [7]. E' di un certo interesse anche sottolineare che, mentre un'elevata percentuale di pazienti del gruppo di controllo non ricevuti G-CSF non ha potuto sottoporsi ai successivi cicli terapeutici previsti dal protocollo terapeutico, i pazienti trattati con dosi ottimali di G-CSF hanno potuto rispettare i vari cicli di chemioterapia previsti dal protocollo [7].

Va segnalato che l'azione benefica del GM-CSF e G-CSF nell'ambito della terapia anti-tumorale non si limita soltanto alla loro capacità di ridurre o inibire la neutropenia indotta dai chemioterapici, ma anche all'azione che tali CSF hanno sulle cellule mature della linea granulomonocitaria. Infatti studi *in vitro* hanno indicato che il GM-CSF aumenta in modo significativo la citotossicità anticorpo-dipendente di neutrofili ed eosinofili nei confronti di cellule tumorali [8], così come stimola i monociti a divenire citotossici nei confronti delle cellule di melanoma A375 [8]. Pertanto, sulla base di tali osservazioni è del tutto ragionevole ritenere che il GM-CSF ed il G-CSF possano incrementare anche *in vivo* l'attività tumoricida dei granulociti e dei monociti.

Un ulteriore campo di applicazione dei CSF è emerso da studi recenti condotti in pazienti affetti da anemia aplastica [9] o da neutropenia ciclica, idiopatica [10]. Infatti in un primo studio è stato documentato che la somministrazione di GM-CSF ed elevate dosi (60-500 µg/m² di superficie corporea) è in grado di indurre: a) un incremento del numero di neutrofili, eosinofili e monociti circolanti; b) una stimolazione dell'attività battericida e della produzione di H₂O₂ da parte dei granulociti circolanti; c) un aumento della cellularità midollare mieloidale [9]. Nonostante l'incremento del numero di elementi della serie mieloidale, la concentrazione dei progenitori mieloidi non si modificava in seguito a trattamento con GM-CSF. Questi risultati indicano che il GM-CSF può essere utilizzato nel trattamento dell'anemia aplastica, particolarmente in quei pazienti con citopenia molto accentuata e resistenti a tutte le terapie convenzionali. In un secondo studio è stato riportato l'effetto della somministrazione di G-CSF ad un paziente affetto da neutropenia idiopatica ciclica [10]. In seguito a somministrazione di G-CSF (1 µg/kg di peso corporeo) il paziente ha manifestato un netto incremento del numero dei neutrofili circolanti fino a raggiungere dopo 15-20 giorni di terapia un livello di neutrofili compreso nella norma; tale netto incremento dei neutrofili circolanti si è associato ad un ancora più marcato aumento della cellularità midollare ed in particolare dei precursori mieloidi midollari. Un dato ancora più significativo emerso da tale studio è rappresentato dall'osservazione che il paziente in questione ha presentato un netto miglioramento sul piano clinico: assenza di infezioni batteriche senza terapia antibiotica; guarigione di ulcere necrotiche a livello del palato o delle gengive [10]. In base a tale osservazione, il G-CSF può essere proposto quale trattamento d'elezione della neutropenia ciclica idiopatica.

Per un certo periodo di tempo si è ritenuto che le forme molecolari del GM-CSF altamente glicosilate e non-glicosilate fossero biologicamente attive. La molecola del GM-CSF ha due residui di asparagina che possono rappresentare la sede di impianto di catene oligosaccaridiche di tipo complesso (N-glicosilazione): le specie molecolari di GM-CSF altamente glicosilate hanno entrambe i due residui di asparagina occupati da catene oligosaccaridiche, le forme intermedie hanno uno solo dei residui di asparagina glicosilati e le forme non glicosilate nessuno dei due. Le molecole di GM-CSF ricombinanti prodotte in cellule di ovaio di hamster cinese presentano anche dei processi di O-glicosilazione, il che rende ancora più complessa la loro struttura molecolare.

Recentemente sono stati realizzati una serie di esperimenti condotti presso i centri di ricerca della Sandoz, onde valutare *in vivo* l'effetto delle forme glicosilate e non glicosilate di GM-CSF ricombinante. Infatti si è potuto dimostrare che sia GM-CSF ricombinante glicosilato (prodotto in cellule di ovaio di hamster cinese) che GM-CSF ricombinante non-glicosilato (prodotto in *Escherichia coli*) sono attivi *in vivo* quando vengono inoculati a scimmie. In particolare, entrambe le forme potenziano la granulomonocitopoiesi *in vivo* così come stimolano molte funzioni dei granulociti (fagocitosi, potere battericida e produzione di ioni superossidi) [11]. Questo tipo di informazione riveste un certo interesse in quanto da un punto di vista dell'industria biotecnologica

è possibile produrre grandi quantità di GM-CSF non-glicosilato ed a costi inferiori rispetto alla forma glicosilata.

Inoltre, studi condotti *in vitro* hanno indicato che la porzione glicidica della molecola del GM-CSF interferisce con la sua attività di fattore di crescita: infatti il GM-CSF altamente glicosilato ha un'attività specifica di 1/10 rispetto alla forma non glicosilata [8]. Vi è evidenza che il livello di glicosilazione della molecola del GM-CSF possa avere un'influenza sulla cinetica di rimozione *in vivo* del GM-CSF; infatti le varie forme di GM-CSF hanno mostrato nel ratto un'uguale velocità di clearance renale, ma radicalmente diverse velocità di scomparsa dal circolo: il GM-CSF non glicosilato scompare rapidamente dal circolo (emivita di circa 4-5 min), mentre la forma fortemente glicosilata presenta una più lenta cinetica di scomparsa dal circolo (emivita di 65 min). Questi risultati suggeriscono che il GM-CSF non glicosilato sia in grado di diffondersi più rapidamente *in vivo* ai vari tessuti.

In conclusione, i risultati derivanti dalle prime sperimentazioni cliniche che fanno uso dei CSF sono decisamente incoraggianti e suggeriscono che tali molecole possano trovare in futuro un impiego di routine in determinate condizioni patologiche. Inoltre, tali sperimentazioni *in vivo* offrono l'opportunità di valutare alcuni aspetti importanti della biologia dei CSF nell'uomo.

Ricevuto il 28 luglio 1988.

Accettato il 7 settembre 1988.

BIBLIOGRAFIA

1. AGLIETTA, M., PIACIBELLO, W., SANAVIO, F. *et al.* 1989. Kinetics of human hemopoietins cells after *in vivo* administration of granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *J. Clin. Invest.* (in press).
2. VADHAN-RAJ, S., KEATING, M., LeMAISTRE, A. *et al.* 1987. Effects of granulocyte-macrophage colony stimulating factor in patients with myelodysplastic syndromes. *N. Engl. J. Med.* **317**: 1545-1552.
3. GROOPMAN, J.E., MITSYASU, R.T., DELCO, M.J. *et al.* 1987. Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on myelopoiesis in the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* **317**: 593-598.
4. BRANDT, S.J., PETERS, W.P., ATWARTER, S.K. *et al.* 1988. Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor on hematopoietic reconstitution after high dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.* **318**: 869-876.
5. ANTMAN, K.S., GRIFFIN, J.D., ELIAS, A. *et al.* 1988. Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor on chemotherapy-induced myelosuppression. *N. Engl. J. Med.* **319**: 593-598.
6. MORSTYN, G., SOUZA, L.M., KEECH, J. *et al.* 1988. Effect of granulocyte colony stimulating factor on neutropenia induced by cytotoxic chemotherapy. *Lancet* **I** 667-672.
7. GABRILOVE, J.L., JAKUBOWSKI, A., SCHER, H. *et al.* 1988. Effect of granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia and associated morbidity due to chemotherapy for transitional carcinoma of the urothelium. *N. Engl. J. Med.* **318**: 1414-1422.
8. CLARK, S.C. & KAMEN, R. 1987. The human hemopoietic colony stimulating factors. *Science* **236**: 1229-1237.
9. VADHAN-RAJ, S., BUESCHER, S., BROXMEYER, H.E. *et al.* 1988. Stimulation of myelopoiesis in patients with aplastic anemia by recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *N. Engl. J. Med.* **319**: 1628-1634.
10. JAKUBOWSKI, A., SOUZA, L., KELLY, F. *et al.* 1989. Effects of human colony-stimulating factor in a patient with idiopathic neutropenia. *N. Engl. J. Med.* **320**: 38-42.
11. MAYER, P., LAM, C., OBENAU, H., LIEHLI, H. & BESEMER, J. 1987. Efficiency of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in Rhesus monkeys. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **511**: 17-29.