

VYUŽITÍ TUMOR INFILTRUJÍCÍCH LYMFOCYTŮ U PACIENTŮ S METASTAZUJÍCÍM MELANOMEM

TUMOR INFILTRATING LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH METASTATIC MELANOMA

MICHÁLEK J.¹, MATĚJKOVÁ E.¹, SMEJKALOVÁ J.¹, VIDLÁKOVÁ P.¹, STEJSKALOVÁ A.¹, HANÁK L.², KOCÁK I.², FAIT V.²

¹ CENTRUM BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE, MASARYKOVA UNIVERZITA, BRNO;

² KLINIKA KOMPLEXNÍ ONKOLOGICKÉ PÉČE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO.

Souhrn

Východiska: Tumor infiltrující lymfocyty jsou buňky imunitního systému hostitele přítomné v nádorové tkáni. U pacientů s metastazujícím melanomem mají tyto buňky prokazatelný protinádorový efekt. **Typ studie a soubor:** Cílem této prospektivní studie bylo ověřit postup in vitro přípravy tumor infiltrujících lymfocytů. **Metody a výsledky:** Sedm pacientů s metastazujícím melanomem podstoupilo odběr nádorové tkáně, ze které byly kultivovány tumor infiltrující lymfocyty za přítomnosti vysokých dávek interleukinu 2. Během 6-8 týdnů došlo k více než tisícinásobné expanzi tumor infiltrujících lymfocytů z nádorem infiltrovaných lymfatických uzlin. Tyto lymfocyty si uchovávají specifickou cytotoxicitu vůči autologním nádorovým buňkám a jsou geneticky stabilní. Jejich konečné množství (více než 109 buněk) umožňuje klinické podání s cílem buněčné imunoterapie pacientů s metastazujícím melanomem. Pokud byly tumor infiltrující lymfocyty kultivovány z primárního nádorového ložiska, k jejich expanzi nedošlo. **Závěry:** Expanze tumor infiltrujících lymfocytů na hodnoty použitelné v klinické praxi je reálná z lymfatických uzlin postižených metastázami maligního melanomu.

Klíčová slova: metastazující melanom, tumor infiltrující lymfocyty, imunoterapie.

Summary

Backgrounds: Tumor infiltrating lymphocytes are cells of the host immune system present in the tumor tissue. It has been demonstrated that they show an anti-tumor effect in patients with metastatic melanoma. **Design and Subjects:** The aim of this prospective study was to verify the in vitro preparation procedure of tumor infiltrating lymphocytes. **Methods and Results:** Seven patients with metastatic melanoma underwent tumor tissue biopsy. The tissue biopsy served for the expansion of tumor infiltrating lymphocytes in vitro in the presence of high dose of interleukin 2. During a 6 - 8 week period more than a 1000-fold expansion of tumor infiltrating lymphocytes from tumor-infiltrated lymph nodes has been recorded. Expanded lymphocytes are genetically stable and preserve their specific cytotoxicity to autologous tumor. They were expanded to more than 109 T cells. Such an amount of T cells can have a significant clinical effect when applied as cell immunotherapy. In case of primary tumor tissue culture, no expansion of tumor infiltrating lymphocytes has been observed. **Conclusions:** Expansion of tumor infiltrating lymphocytes to a clinical scale is feasible under sterile conditions from lymph nodes infiltrated with tumor cells from patients with metastatic melanoma.

Key words: metastatic melanoma, tumor-infiltrating lymphocytes, immunotherapy.

Úvod

Maligní melanom ve fázi generalizovaných metastáz je považován za jedno z nejhůře ovlivnitelných nádorových onemocnění. V případě chirurgicky neřešitelné generalizace melanomu není v současných možnostech onkologické léčby dosáhnout kurativního efektu léčby (1). Onemocnění je považováno za chemorezistentní i radiorezistentní. Paliativní chemoterapií můžeme dosáhnout pouze dočasné redukce rozsahu onemocnění s úlevou od symptomů onemocnění. Proto jsou hledány nové postupy, které by umožnily ovlivnit nepříznivý průběh tohoto onemocnění.

Současná léčebná strategie

Mezi léčivé přípravky používané u metastazujícího melanomu (MM) patří dakarbazin, platinová analoga, deriváty nitrosourey, vinka alkaloidy a taxany (1,2). Nejdéle používaným cytostatikem a zlatým standardem je dakarbazin. Dosahuje

asi 14%-20% celkových odpovědí, medián trvání odpovědi je 4-6 měsíců avšak dlouhodobé přežití je velmi nízké, u monoterapie dakarbazinem je šestileté přežití menší než 2% (1,2). Ve snaze zlepšit tyto výsledky byly navrženy kombinace cytostatik. Mezi nejčastěji používané patří kombinace CVD (cisplatina, vinblastin, dakarbazin) dle Leghy a čtyřkombinace DBD/T (dakarbazin, karmustin, cisplatina) + tamoxifen, tzv. Dartmouthův režim (1). CVD kombinace dosahuje až 40% celkových odpovědí se 4% kompletní remisí, medián trvání odpovědi je 9 měsíců. DBD/T dosahuje až 46% celkových odpovědí, medián trvání odpovědi je méně než 7 měsíců. Předpoklad vyšší odpovědi trojkombinované chemoterapie proti monoterapii dakarbazinem však nebyl jednoznačně v randomizované studii potvrzen (2). Relativně dobrých výsledků bylo dosaženo s využitím imunoterapie. Interferon alfa (INF α) v monoterapii má odpověď 15% a dosahuje ve 3%-5% kompletní remisi u pokročilého

onemocnění. Interleukin 2 (IL-2) dosahuje 15-20% celkových odpovědí. Klinicky nejvýznamnějším faktem je, že u 5-7% pacientů bylo dosaženo léčbou s IL-2 dlouhodobé remise a sedmileté přežití bylo 10% (3). IL-2 a INF_γ se staly součástí kombinovaných chemo-imunoterapeutických režimů (4). Stanovení role chemioimunoterapie v léčbě metastazujícího melanomu je úkolem probíhajících klinických studií II. a III. fáze.

Role adoptivní imunoterapie u melanomu s využitím tumor infiltrujících lymfocytů

Melanom je považován za imunogenní nádor (1,5). Stav imunitního systému je intenzivně studován u pacientů s MM po několika desetiletí a v posledních 5 letech se objevují klinické studie využívající adoptivní imunoterapie (5,6). Adoptivní buněčná imunoterapie je definována jako převod buněk imunitního systému s protinádorovou aktivitou, např. tumor-infiltrujících lymfocytů (TIL), pacientovi s cílem dosáhnout léčebné odpovědi. Vědecké zdůvodnění takového postupu se opírá o fakt, že melanomy jsou velmi často infiltrovány cytotoxickými (Tc) nebo pomocnými (Th) lymfocyty, které mají schopnost cíleně rozpoznat nádorově specifické antigeny a eliminovat nádorové buňky. Množství podaných TIL hraje zřejmě kritickou roli při eliminaci nádorových buněk, což bylo dobře zdokumentováno na myších modelech i prvních klinických studiích (5,6). U myších modelů byl protinádorový efekt závislý na podané dávce TIL (1). TIL získané z nádorem infiltrovaných uzlin, rozpoznávají nádorově-specifické antigeny, mohou být expandovány in vitro v prostředí s vysokou dávkou (1000IU/ml) IL-2 a po expanzi vykazují vysoký stupeň specifické cytotoxicity vůči syngennímu nádoru (1,6). Nejlepších výsledků bylo dosahováno tehdy, když TIL byly podány současně s nádorovými buňkami imunokompromitovaným myším (1). Další studie ukázaly, že samotné podání TIL myším s MM nevede k podstatnému terapeutickému efektu. Kombinací podání TIL s chemoterapií cyklofosfamidem a následné podávání IL-2 bylo ve stejném modelu dosaženo synergistického efektu a vedlo k vymizení jaterních a plicních metastáz (1,6,14). Další pokusy na myších modelech vedly ke zmapování pohybu adoptivně podaných TIL myším s lidským nádorem. TIL značené radioaktivním izotopem indium 111 podané intravenózně se převážně koncentrují ve tkáni nádoru. TIL byly rovněž nalezeny v játrech, plicích, ledvinách a slezině, což dokazuje schopnost migrace a přestupu TIL do tkání (14). Tyto studie dokladovaly přímý biologický efekt TIL, jejich schopnost vycestovat z krevního řečiště zejména do ložisek nádorové tkáně a staly se tak důležitým milníkem při testování TIL v klinických studiích.

Lidské TIL byly nejprve kultivovány in vitro, byla studována možnost jejich expanze a uchování specifické protinádorové aktivity. Přibližně u 50% pacientů s melanomem byl prokázán specifický cytotoxický potenciál in vitro expandovaných TIL (14). V rozsáhlé Rosenbergově studii bylo kultivováno 206 biopsií melanomu za účelem expanze TIL v prostředí s vysokým obsahem IL-2 (1000IU/ml). V případě 124 kultur (60%) byla expanze TIL vyšší než 1010 v průběhu 45 dnů, u 89 kultur bylo dokonce dosaženo více než 1011 TIL (14). Cytotoxické testy ukázaly, že v případě testovaných 115 TIL kultur došlo u 43 kultur ke specifické lýze autologních nádorových buněk (14). Následně bylo přistoupeno k prvním klinickým aplikacím expandovaných TIL. U pacientů s MM byla zaznamenána klinická odpověď u 35-50% pacientů po podání TIL v kombinaci s IL-2. Zdá se, že není nutno podávat vysoké dávky IL-2 pro zlepšení dlouhodobého přežití TIL in vivo, ale že podobného efektu lze dosáhnout i malými dávkami IL-2 (500-1000IU) podávaného subkutánně. Jsou tak minimalizovány vedlejší účinky vyplývající z intravenózního podání IL-2 ve vysokých dávkách, navíc nízká dávka je dostatečná k udržení vitálních TIL i po několik týdnů po jejich infúzi (7-9). Přitom expanze TIL na hodnoty s prokazatelným klinickým efektem (10^{10}) netrvá zpravidla déle než 2 měsíce (7-9), expandované TIL si uchovávají vysoký stupeň specifické protinádorové aktivity a nebyly popsány žádné genetické změny v souvislosti s jejich expanzí (7-9,14).

Adoptivní buněčná imunoterapie pomocí TIL vedla ke klinické parciální odpovědi trvající 6-22 měsíců u 6 ze 13 sledovaných pacientů a ke smíšené odpovědi u dalších 4 ze 13 sledovaných pacientů (7). V další studii bylo prokázáno, že tumor-specifické T lymfocyty se přednostně kumulují v nádorové tkáni a perzistují v periferní krvi několik týdnů (8). I přes tyto úspěchy adoptivního transferu T lymfocytů existují četné překážky, které brání likvidaci nádorových buněk in vivo. Je to především snížená exprese tumor-specifického antigenu nádorovou buňkou, produkce tzv. receptorů smrti vedoucích k apoptóze lymfocytů, produkce imunosupresivních cytokinů a nedostatečná kostimulace antigen-prezentujícími buňkami (9). Ukazuje se také, že imunitní systém pacientů s nádorovým onemocněním není schopen dostatečně dobře rozpoznat nádorové buňky a tudíž není schopen je účinně likvidovat. V posledních 5 letech je velká pozornost věnována imunoregulačním T lymfocytům (CD4+CD25+), které mohou být zodpovědné za navození stavu anergie – hyporeaktivity vlastního imunitního systému vůči nádorovým buňkám (10). Stav anergie lze do určité míry zvrátit použitím vysokodávkované chemoterapie, která vede k přechodné imunoablacii, tedy dočasnému poklesu počtu lymfocytů v periferní krvi. Tento postup však rovněž zvyšuje riziko myelotoxicity a přispívá ke zvýšení morbidity a mortality. Z tohoto důvodu se hledají cesty, jak zmírnit myelotoxicitu a přitom zachovat imunoablativní účinek, který eliminuje populaci imunoregulačních lymfocytů. Jedním z možných přístupů je využití analogů purinových nukleosidů (11), např. fludarabinu. Fludarabin je používán k léčbě chronické lymfatické leukémie, je součástí nemeloablativních transplantačních režimů a nově se používá u autoimunitních onemocnění pro potlačení autoreaktivních T lymfocytů (12). Vzhledem k širokému používání fludarabinu existuje dostatečná klinická zkušenost s jeho aplikací, zejména je využívána jeho schopnost imunoablace s minimální myelotoxicitou ve srovnání s jinými cytostatiky (11,12).

Cílem této studie byla optimalizace přípravy TIL in vitro pro klinické použití u pacientů s metastatickým melanomem. Byla také testována kvalita TIL včetně testů cytotoxicity vůči autologním nádorovým buňkám, testů sterility a genetické stability. V tomto sdělení se zabýváme veškerými aspekty přípravy TIL v podmínkách správné laboratorní praxe.

Soubor nemocných a metody

Pro preklinické testování bylo zařazeno 7 pacientů s metastazujícím melanomem (MM) a 5 zdravých dárců ve věku 24-68 let. Všichni jedinci, kteří se účastnili této preklinické studie podepsali Informovaný souhlas schválený Etickou komisí Masarykova onkologického ústavu.

Vstupní zpracování materiálu

Odběr nádorové tkáně pacientů s MM pro účel této studie byl součástí rutinní biopsie pro histopatologické hodnocení. Tkáň

nádorové uzliny či primárního nádorového ložiska byla nastříhána na kousky o velikosti menší než 2mm nůžkami či skalpelem a resuspendována v kultivačním médiu. Pacientům byl rovněž odebírán vzorek periferní krve na cytogenetické vyšetření. V případě zdravých dárců byla odebírána periferní krev pro získání mononukleárních buněk (MNB) bohatých na T lymfocyty metodou gradientové centrifugace (15).

Expanze TIL

Buňky nádorové tkáně byly kultivovány v inkubátoru při 37°C a 5% atmosféře CO₂ po dobu 5-8 týdnů v kompletním kultivačním médiu obsahujícím X-VIVO 15 (Bio Whittaker Europe) a 5% autologního nebo lidského AB séra (Sigma-Aldrich). Expanze T lymfocytů probíhala za iniciálního přídavku 10 µg/ml fytohemaglutininu (Sigma-Aldrich) a pravidelného přísunu 1000 IU/ml IL-2 (Chiron) 3x týdně. Buněčnost a vitality byla sledována obden a byla udržována v rozmezí 0,5–3x10⁶ vitálních buněk na mililitr kompletního média. Každé dva týdny byla provedena výměna média. Po první výměně byly přidávány 1x týdně alogenní ozářené mononukleární buňky zdravého dárce jako tzv. "feeder cells" v poměru 1:1 ke kultivovaným lymfocytům. Posledních 7 dní kultivace byly buňky ponechány bez jakékoliv další manipulace. Expandované lymfocyty byly po dosažení množství 1010 vitálních buněk nebo po dovršení 8 týdnů kultivace podrobně vyšetřeny. Sledované parametry zahrnovaly počet buněk, vitalitu buněk, zastoupení T lymfocytů pomocí průtokové cytometrie (fluorescenčně značenými monoklonálními protilátkami proti CD3, CD4, CD8, CD25, CD16, CD56), vyšetření na přítomnost endotoxinu, mikrobiologické kultivační vyšetření na přítomnost bakteriální kontaminace, mikrobiologické PCR vyšetření na specifický průkaz *Mycoplasma* sp., viru hepatitidy B a C, parvoviru B19, viru lidské imunodeficiency HIV a mykobakterií. U expandovaných lymfocytů posledních 3 pacientů bylo rovněž provedeno cytogenetické vyšetření karyotypu na průkaz genetické stability. Expandované lymfocyty byly řízeně zamrazeny ve směsi DMSO (Wak-Chemie Medical) + autologní sérum či lidské AB sérum v poměru 1:9.

Expanze nádorově-specifických MNB

K simulaci protinádorových klonů T lymfocytů byly použity MNB pěti zdravých dárců. MNB byly nejprve stimulovány ozářenou nádorovou linií ARH 77 mnohočetného myelomu. Nádorově reaktivní T lymfocyty zdravých dárců byly imunomagneticky separovány na základě produkce interferonu gama (15) (Miltenyi Biotec). Takto separované aktivované nádorově reaktivní T lymfocyty sloužily jako model pro studium rychlé expanze T lymfocytů. Expanze probíhala za stejných podmínek jako expanze TIL, pouze celková doba expanze činila 4 týdny.

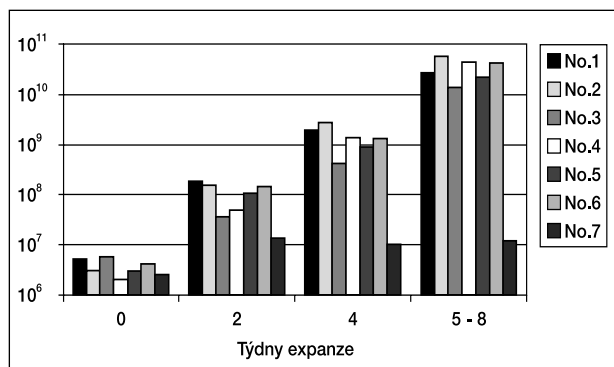
Výsledky:

Nejprve byly prospektivně validovány MNB pěti zdravých dárců. Byla testována možnost rychlé expanze nádorově reaktivních, interferon gama produkujících T lymfocytů získaných opakovanou stimulací myelomovou linií ARH 77, jak jsme popsali dříve (15). Úvodní počet interferon gama pozitivních T buněk činil 0,56_0,13x10⁶. Po čtyřtýdenní expanzi in vitro za přítomnosti fytohemaglutininu, IL-2 a „feeder cells“ bylo dosaženo počtu 214,0 x10⁶±103,4x10⁶ buněk. Expandované T lymfocyty byly zastoupeny po expanzi z 99,5±0,8% a vykazovaly speci-

fickou cytotoxicitu vůči původní nádorové lince ARH 77. Na základě těchto pilotních experimentů, které ukázaly možnost rychlé expanze protinádorových T lymfocytů bylo přistoupeno k expanzi TIL u sedmi pacientů s metastazujícím melanomem. V šesti případech se jednalo o lymfatickou uzlinu postiženou nádorovým procesem a v jednom případě se jednalo o primární ložisko kožního melanomu. Přítomnost nádorových buněk v kultivované tkáni byla potvrzena histopatologicky bezprostředně po chirurgickém zákroku. V případě šesti nádorem infiltrovaných uzlin byla expanze TIL zahajována s počtem buněk 2,9x10⁶-15,8x10⁶ (medián 5,3x10⁶). Po 5-8 týdenní in vitro kultivaci podle postupů navržených v této studii došlo k nárůstu na 2,2–5,6x10¹⁰ buněk. Průběh expanze TIL je znázorněn na Obr. 1. Zcela odlišný byl průběh kultivace lymfocytů z primárního ložiska nádoru. Zde nedošlo prakticky k žádné expanzi, pouze k minimálnímu nárůstu z 2,2x10⁶ na 12,1x10⁶ buněk po 8-týdenní kultivaci.

Obr. 1: Expanze TIL v průběhu kultivace

In vitro expanze TIL z nádorem infiltrovaných lymfatických uzlin (No. 1-6.) a z primárního kožního ložiska (No.7).



Ve všech sedmi případech bylo prováděno vyšetření sterility TIL po ukončení expanze. V šesti případech nedošlo k žádné mikrobiální kontaminaci. U jednoho přípravku TIL došlo k mikrobiální kontaminaci v posledním týdnu kultivace a tento přípravek byl určen k likvidaci. Endotoxinový test prováděný na konci kultivace nepřekročil stanovené limity ani v jednom případě. Vyšetřením metodou patogen-specifické PCR nebyla prokázána přítomnost mykoplasmat, viru hepatitidy B a C, parvoviru B19, viru lidské imunodeficiency HIV a mykobakterií na počátku ani po skončení in vitro expanze TIL. Pro průkaz genetické stability bylo srovnáváno cytogenetické vyšetření periferní krve pacientů s vyšetřením expandovaných TIL. Vyšetření prokázalo normální karyotyp bez chromozomálních aberací u všech vyšetřených pacientů jak v periferní krvi, tak v expandovaných TIL.

Diskuse:

Účinnost adoptivního převodu T lymfocytů při léčbě nádorových onemocnění byla prokázána experimentálně u laboratorních zvířat (1) a v současné době také u pacientů s metastatickým melanomem (2-4). Tumor infiltrující lymfocyty (TIL) nebo lymfocyty aktivované melanom-specifickým antigenem byly úspěšně aplikovány pacientům s metastatickým melanomem. Tito pacienti byli předloženi a progredovali na léčbě chemoterapií nebo chemoimunoterapií (chemoterapie + interleukin 2 nebo interferon alfa). Adoptivní buněčná imunoterapie pomocí TIL vedla k parciální klinic-

ké odpovědi trvající 6-22 měsíců u 6 ze 13 sledovaných pacientů a ke smíšené odpovědi u dalších 4 ze 13 sledovaných pacientů (3). V další studii bylo prokázáno, že tumor-specifické T lymfocyty se přednostně kumulují v nádorové tkáni a perzistují v periferní krvi několik týdnů (4).

Cílem prezentované preklinické studie byla především optimalizace přípravy dostatečného množství TIL ke klinickému použití v podmínkách správné výrobní praxe. V naší studii jsme byli schopni expandovat TIL z nádorem infiltrovaných uzlin více než 10000-násobně, přitom expandované TIL si uchovávají protinádorový potenciál a zůstávají geneticky stabilní. Sterilita biologického přípravku byla monitorována v průběhu celého procesu expanze, v jediném případě, kdy došlo ke kontaminaci na konci kultivace, byl přípravek TIL zlikvidován. Ostatní kultivace TIL probíhaly sterilně a nedošlo k jejich kontaminaci. Z pohledu získávání vhodného biologického materiálu jsme testovali kromě nádorem infiltrovaných uzlin také primární kožní ložisko melanomu. Ověřili jsme, že kultivace primárního ložiska, které je často výrazně fibrotické, nevede k žádoucí expanzi TIL.

Z pohledu plánované klinické studie je třeba rovněž zvážit výhody přípravku TIL a jeho rizika. TIL jsou buňky těla vlastní a jejich podání dosud nepředstavovalo žádné riziko

pro pacienta s MM. Dosud byly popsány autoimunitní reakce ve smyslu vzniku vitiliga, zřejmě vzhledem k rozpoznání melanocytárních antigenů buňkami TIL (3,4). Jiné závažné vedlejší účinky nebyly pozorovány (2-5). Hlavním předpokládaným přínosem je tedy specifický protinádorový účinek expandovaných autologních TIL s celkovou minimální toxicitou a bezpečností podání ve srovnání s jinými zavedenými postupy založenými na chemoterapii nebo kombinované chemoimunoterapii s IL-2 a interferonem alfa, která často dosahuje vysokého stupně toxicity. Lze předpokládat na základě dosavadních studií (1-3), že léčba přípravkem TIL bude přinejmenším stejně účinná nebo účinnější ve srovnání se standardním léčebným postupem a současně kvalita života léčených pacientů bude vyšší.

Závěr

Kultivace TIL in vitro je možná v podmínkách správné výrobní praxe. V průběhu 5-8 týdnů lze z lymfatických uzlin infiltrovaných nádorovými buňkami připravit více než 1010 TIL pro klinické použití u pacientů s metastázujícím melanomem.

Poděkování

Tato práce byla podpořena grantem GAČR 301/04/1389.

Literatura

- Greenberg PD. Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. *Adv Immunol* 1991, 49: 281-9.
- Rosenberg SA. Progress in human tumor immunology and immunotherapy. *Nature* 2001, 411: 380-6.
- Dudley ME, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 2002, 298: 850-4.
- Meidenbauer A, et al. Survival and tumor localization of antibody transferred melan-A-specific T cells in melanoma patients. *J Immunol* 2003, 170: 2161-9.
- Michálek J., Svoboda M.: Buněčná imunoterapie nádorů. *Klinická onkologie*, 2003, 16: 145-148.
- Bach JF. Regulatory T cells under scrutiny. *Nature Rev Immunol* 2003, 3: 189-98.
- Dighiero G. Adverse and beneficial immunological effects of purine nucleoside analogues. *Hematol Cell Ther* 1996, 38, Suppl 2: S75-81.
- Takada K, et al. Lymphocyte depletion with fludarabine in patients with psoriatic arthritis: clinical and immunological effects. *Ann Rheum Dis* 2003, 62: 1112-5.
- Yee C, et al. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99: 16168-73.
- Dreno B, et al. Randomized trial of adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 2002, 51: 539-46.
- NCI CTC verze 2.0, www.eortc.be/services
- Therasse P, et al. Response evaluation criteria in solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 2000, 92: 205-17.
- DeVita VT, et al. *Cancer: Principles and practice of oncology*, 6th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia 2001: 2003-69.
- Kirkwood JM, Agarwala S. Systemic cytotoxic and biologic therapy of melanoma. *PPO Updates* 1993, 7: 1-28.
- Ocadlikova D, et al. Isolation and expansion of allogeneic myeloma-specific interferon-gamma producing T cells for adoptive immunotherapy. *Med Oncol* 2006, 23: 377-84.
- Legha SS, et al. Evaluation of interleukin-2 administered by continuous infusion in patients with metastatic melanoma. *Cancer* 1996, 77: 89-95.
- Sparano JA, et al. Randomised phase III trial of treatment with high-dose interleukin-2 either alone or in combination with interferon-alfa-2a in patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol* 1993, 11: 1969-76.
- Rosenberg SA. *Principles and practice of the biologic therapy of cancer*. 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia 2000: 303-36.

Korespondenční adresa:

Doc. MUDr. Jaroslav Michálek, Ph.D.
Centrum buněčné imunoterapie
Integrované laboratoře biomedicínských technologií, MU
Kamenice 5, Brno 62500
Tel.: 549-495-051
E-mail: jmichalek@fnbrno.cz

Došlo: 30. 11. 2006
Přijato: 15. 2. 2007