

BUNĚČNÁ IMUNOTERAPIE NÁDORŮ

CELLULAR IMMUNOTHERAPY OF CANCER

MICHÁLEK J.^{1,2}, SVOBODA M.^{3,4}

¹ DĚTSKÁ KLINIKA, MASARYKOVA UNIVERZITA, BRNO A

² CANCER IMMUNOBIOLOGY CENTER, UNIVERSITY OF TEXAS SOUTHWESTERN MEDICAL CENTER, DALLAS, TEXAS, USA.

³ DEPT. OF ADULT ONCOLOGY, DANA – FARBER CANCER INSTITUTE, BOSTON, MASSACHUSETTS, USA

⁴ DEPT. OF MEDICINE, HARVARD MEDICAL SCHOOL, BOSTON, MASSACHUSETTS, USA.

Souhrn: Důvodem využití buněk imunitního systému k léčbě nádorového onemocnění je imunogenní povaha nádorových buněk. Buňky imunitního systému jsou schopny rozpoznat nádorové buňky a v konečném důsledku je zničit. Cílem tohoto sdělení je ukázat stručný přehled možností a současných klinických zkušeností s tímto novým způsobem protinádorové léčby, zejména pak adoptivní imunoterapie s využitím antigen specifických T lymfocytů.

Klíčová slova: imunoterapie, buňka, nádor

Summary: The rationale for the use of immune system cells to fight cancer is the immunogenicity of tumor cells. Immune system cells are capable to recognize and finally kill the tumor cells. The aim of this article is to review the possibilities and recent clinical experience with this novel anticancer treatment, namely with adoptive immunotherapy using antigen specific T cells.

Key words: immunotherapy, cell, cancer

Úvod

Buněčná imunita hraje klíčovou roli při ochraně organismu proti nádorovému onemocnění. Buněčná imunoterapie spočívá v podání buněk imunitního systému s protinádorovou aktivitou jedinci postiženému nádorovým onemocněním. Úspěch buněčné terapie závisí na typu podaných buněk, jejich schopnosti cíleně zasáhnout nádorovou tkáň a schopnosti obejít toleranci a imunosupresi vyvolanou nádorem (1). Přestože většina studií byla provedena na myších modelech, několik terapeutických přístupů již prokázalo účinnost v klinických studiích. Různé druhy buněk jsou schopny rozpoznat nádor a vést k jeho zničení. Nespecifický protinádorový potenciál byl potvrzen u NK buněk (NK=natural killer=přírozený zabíječ), LAK buněk (lymphokine activated killer=lymfokiny aktivovaný zabíječ) a aktivovaných monocytů/makrofágů. Specifický protinádorový účinek zprostředkovaný antigen-prezentující buňkou (APC) byl prokázán u CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů. Studie využívající dendritických buněk jako vakcíny v imunoterapii nádorů přesahují rozsah tohoto sdělení a nebudou proto zmíněny.

Nespecifická buněčná imunoterapie

Cílem nespecifické buněčné imunoterapie je posílení protinádorové imunity nezávisle na specifických nádorových antigenech. Původní koncept pochází od Coleyho, který popsal regresi solidních nádorů po injekci bakteriálních toxinů s cílem stimulace imunitního systému (2). Obvyklým postupem je kultivace efektorových buněk *ex vivo* s látkami, které aktivují nebo posilují jejich protinádorový účinek. Výhodou nespecifické buněčné terapie je: 1) možný účinek na široké spektrum nádorů; 2) efektorové buňky mohou být aktivovány a expandovány *ex vivo* aktivačními látkami, které jsou jinak příliš toxické *in vivo*; 3) aktivované efektorové buňky jsou injikovány příjemci v době, kdy je předpokládán jejich optimální účinek (např. v době persistence minimální reziduální nemoci po úspěšné indukční protinádorové terapii) (1,3).

LAK buňky

LAK buňky jsou lymfocyty expandované *ex vivo* pomocí inter-

leukinu IL-2. Na myších modelech s B16 melanomem bylo prokázáno prodloužené přežití po infúzi LAK buněk (3). V klinických studiích byla terapie LAK buňkami se současným podáním IL-2 neúspěšnější u melanomu a karcinomu ledviny, avšak tento přístup nepřinesl lepší výsledky než podání samotného IL-2 (4).

NK buňky

NK buňky hrají významnou roli v protinádorové imunitě a odvrhnutí allogenní transplantované tkáně vzhledem ke schopnosti likvidovat buňky s nedostatečnou expresí vlastních antigenů histokompatibilitě (MHC) I. třídy. Studie na myších modelech postrádajících T lymfocyty ukázaly, že NK buňky jsou schopny rejekce primárního nádoru a významně redukovat metastatický potenciál nádorových buněk (5). Novým poznatkem s možným klinickým využitím je zjištění, že aktivované NK buňky dárce mohou inhibovat potransplantační reakci štěpu proti hostiteli po allogenní transplantaci kostní dřeně, a přitom si uchovávají schopnost reakce štěpu proti nádoru (6,7).

Aktivované monocyty/makrofágy

Imunoterapie s využitím monocytů/makrofágů aktivovaných *in vitro* interferonem gama je založena na studiích prokazujících regresi podkožních nádorů na myších modelech (8). Monocyty jsou snadno dostupné, v klinických studiích byly velmi dobře tolerovány. Přestože nebyly dosud doloženy kompletní nebo parciální odpovědi, některé studie prokázaly zastavení nádorového růstu, nekrózu nádorové masy, redukci ascitu a zmírnění chemorezistence nádoru (8-10). Tumor nekrotizující faktor alfa je zřejmě hlavním cytokinem aktivovaných monocytů/makrofágů zodpovědným za protinádorovou aktivitu (5).

Specifická buněčná imunoterapie

Adoptivní imunoterapie s využitím specifického převodu buněk představuje nové možnosti cílené léčby mnoha onemocnění včetně zhoubných nádorů. Převod buněk imunitního

systemu s protinádorovou aktivitou můžeme rozdělit přinejmenším do dvou kategorií: tumor infiltrující lymfocyty (TIL) a antigen-specifické lymfocyty.

Tumor infiltrující lymfocyty

TIL jsou lymfocyty získané přímo z nádorové tkáně a kultivované *in vitro* za přítomnosti IL-2. Na myších modelech s různými typy lidských nádorů (karcinom, melanom, sarkom) byl prokázán nádorově specifický cytotoxický účinek TIL (3), avšak použití TIL v klinických studiích nepřineslo očekávané výsledky. Snahy o kultivaci buněčných linií TIL byly pouze částečně úspěšné, neboť většina těchto linií nebyla dostatečně specifická vůči nádorovým buňkám *in vivo* (11). Pouze pacienti s melanomem a karcinodem ledviny vykazovali zlepšení léčebné odpovědi, pravděpodobně vzhledem k tomu, že tyto nádory jsou více imunogenní (12,13). 34-38% pacientů s metastatickým melanomem vykazovalo objektivní léčebnou odpověď (OR) nezávisle na předchozí chemoterapii. Léčebný efekt přetrvával zpravidla několik měsíců (3,4,11,12). Několik studií dokumentovalo OR u pacientů s karcinodem ledviny. Podle použitého protokolu stimulace TIL interleukinem IL-2 byla OR dosažena u 20% pacientů (13), při použití CD8⁺ TIL až u 43% (14). Další studie testující optimální využití TIL probíhají.

Antigen specifické lymfocyty

Na rozdíl od TIL, jejichž podání je závislé na vysokých dávkách IL-2 s řadou nežádoucích účinků (13), představuje podání lymfocytů, které by byly schopny specificky rozpoznat nádorové antigeny, možnost cíleně zasáhnout nádorové buňky. Níže uvedené preklinické i klinické studie v posledním desetiletí jsou toho důkazem. Spolu se zavedením metod, které umožňují izolaci genů kódujících antigeny rozpoznávané T lymfocyty, bylo vyvinuto několik technologií použitelných k detekci nádorových antigenů. Boon a spol. (15) jako jeden z prvních popsal metodiku identifikace klonů cytotoxických T lymfocytů (CTL) izolovaných od pacientů s nádorovým onemocněním, která spočívá v transfekci autologních buněk sekvencemi z cDNA knihovny vytvořené z RNA z autologních nádorových buněk. CTL byly schopny rozpoznat a cíleně zničit buňky transfekované cDNA kódující nádorový antigen (15). Další způsob, jak určit nádorové antigeny, spočívá v sérologické analýze proteinů připravených z rekombinantních cDNA knihoven (SEREX). Sérum pacientů s nádorem je použito k detekci proteinů exprimovaných bakteriemi transfekovanými nádorovou cDNA (16). Nejnovější technologií úspěšně použitelnou k identifikaci nádorových antigenů představují „DNA čipy“ (pracující s kompletní kódující sekvencí

přírodních genů) a jejich modifikace „microarrays“ (využívající pouze několika oligonukleotidů odvozených z kódující sekvence). Právě jejich pomocí je možno stanovit profil genové exprese nádoru a identifikovat geny kódující potenciální nádorové antigeny (17-19). Cílem je nalézt takový nádorový antigen, který by byl: a) intenzivně exprimován nádorovou buňkou; b) hrál nepostradatelnou úlohu v procesu karcinogeneze, a to nejlépe v časných stádiích; c) obsahoval co nejvíce imunogenních epitopů s vysokou afinitou k HLA systému (existuje řada komerčně i veřejně dostupných databází a programů ke stanovení predikce HLA afinity) (20).

Antigenní epitopy rozpoznávané CTL jsou odvozeny z proteinů tumorigenních virů, mutovaných autologních proteinů, nadměrně exprimovaných proteinů nebo embryonálních proteinů, které jsou normálně přítomny pouze v určité fázi ontogeneze. Přehled vybraných antigenů je uveden v tabulce č. 1. Existuje mnoho přístupů, jak využít nádorové antigeny v klinické praxi. Pacienti mohou být imunizováni DNA, RNA, proteiny nebo peptidy odvozenými z těchto antigenů. Lymfocyty imunizovaných pacientů izolované z periferní krve nebo z lymfatické uzliny drénující místo vakcinace mohou být dále manipulovány a expandovány *in vitro* ve smyslu selekce CTL s vysokou specifitou k danému nádorovému antigenu, případně geneticky modifikovány např. genetickým transferem růstových faktorů (genu pro IL-2) nezbytných pro dlouhodobé přežití CTL po infúzi *in vivo* (23,24).

Přestože bylo nalezeno velké množství nádorových antigenů, které za ideálních *in vitro* podmínek vedou ke vzniku protinádorově reagujících T lymfocytů, nelze očekávat, že všechny budou úspěšné při léčbě nádorů *in vivo*. Existuje mnoho důvodů proč T lymfocyty specificky reaktivované *in vitro* selhávají v protinádorovém efektu *in vivo* (25-27). Některé mechanismy jsou uvedeny v tabulce č. 2. Tyto limitace je nutno brát v potaz při sestavování klinických studií, které v současné době teprve hledají své místo vedle standardních léčebných postupů.

Dosavadní klinické zkušenosti s CTL

Nejllepších klinických výsledků bylo dosaženo v prevenci a léčbě virem-asociovaných nádorových onemocnění. Infekce Epstein-Barrové virem (EBV), kde replikace EBV je kontrolována specifickými CTL, může způsobovat potenciálně letální imunoblastický lymfom u pacientů po alogenní transplantaci kostní dřeně s deplecí dárcovských T lymfocytů (28). Adoptivním převodem anti-EBV specifických dárcovských CTL lze dramaticky snížit incidenci EBV infekce po transplantaci. U 39 dětských pacientů, kteří byli považováni za vel-

Tab. 1: Antigeny stimulující specifickou protinádorovou buněčnou imunitu (21,22).

Vznik/povaha nádorového antigenu	Označení	Typ nádoru
Produkt virového genu u malignit asociovaných s virovou infekcí	HPV E6 a E7 proteiny EBV LMP-1, EBNA-1 proteiny	Karcinom děložního krčku Hodgkinova nemoc, nasofaryngeální karcinom
Mutované geny nebo specifické chromozomální přestavby	p21 ras BCR/ABL PML/RARA ETV6/AML1 Beta katenin, MUM-1 EWS/FLI-1 PAX-3/FKHR	Cca 10% všech nádorů Chronická myeloidní leukémie Akutní promyelocytární leukémie Pre-B akutní lymfoblastická leukémie Maligní melanom Ewingův sarkom Alveolární rhabdomyosarkom
Nadměrně exprimované produkty normálních genů	Telomeráza Her-2/neu n-myc WT-1	Cca 85% všech nádorů Karcinom prsu Neuroblastom Akutní leukémie
Tkáňově specifické produkty normálních genů	Tyrosináza, melan A, gp100, TRP-1, TRP-2	Maligní melanom
Produkty normálních genů, které v dospělosti nejsou exprimovány	MAGE, BAGE, GAGE, RAGE, NY/ESO proteiny	Maligní melanom a další epiteliální nádory
Idiotypové proteiny	Imunoglobulinové řetězce	B non-Hodgkinský lymfom, mnohočetný myelom

Tab. 2.: Možnosti selhání protinádorového efektu specifických T lymfocytů.

Faktory závislé na nádorové buňce a jejím okolí	<ul style="list-style-type: none"> ● Ztráta nádorového antigenu mutací či delecí ● Snížení exprese nádorového antigenu ● Maskování nádorového antigenu jiným proteínem ● Produkce imunosupresivních cytokinů (IL-10, TGF-β*) ● Modulaace nádorové vaskulatury
Faktory závislé na zpracování nádorového antigenu	<ul style="list-style-type: none"> ● Interference při zpracování a prezentaci nádorového antigenu nádorového antigenu APC ● Chybějící kostimulace
Faktory závislé na T lymfocytu	<ul style="list-style-type: none"> ● Navození anergie tumor-reaktovaných T lymfocytů ● Ztráta T lymfocytů exprimujících vysokoafinity TCR**
Jiné faktory	<ul style="list-style-type: none"> ● Navození apoptózy nádorově specifických lymfocytů ● Eliminace nádorově specifických lymfocytů

*TGF-β = transformující růstový faktor beta

**TCR = T-cell receptor (T lymfocytární receptor)

mi rizikové z hlediska indukce potransplantačního EBV lymfomu, byl úspěšně proveden převod dárcovských anti-EBV CTL. Tyto EBV-specifické lymfocyty přežily v těle příjemců až 18 týdnů a zabránily vzniku lymfomu u všech takto léčených pacientů. Navíc dva pacienti s již rozvinutým potransplantačním EBV lymfomem se dostali do kompletní remise po infúzi EBV-specifických CTL (28). Tyto povzbudivé výsledky ukazují, že buněčná terapie využívající EBV-specifické buněčné linie T lymfocytů může být s výhodou použita k léčbě dalších malignit asociovaných s EBV, jako například nasofaryngeální karcinom a EBV-pozitivní Hodgkinův lymfom. Roskow a spol. (29) léčil tři pacienty s rezistentním, několikrát relabovaným, Hodgkinovým lymfomem pomocí autologních EBV-specifických CTL. CTL perzistovaly po více než 13 týdnů po infúzi, potencovaly imunitní odpověď pacienta vůči EBV a uchovaly si silný protivirový efekt *in vivo*.

Dalším úspěchem protivirové buněčné imunoterapie je adoptivní transfer CTL specifických k cytomegaloviru (CMV). Život ohrožující CMV nemoc se objevuje u pacientů po alogenní transplantaci a koreluje s absencí CMV-specifických T lymfocytů (30,31). Adoptivní převod CMV-specifických CTL klonů izolovaných od dárce transplantátu je schopen restaurovat imunitu vůči CMV. Infúze až $10^9/m^2$ CD8⁺ CTL byla podána 14 pacientům s vysokým rizikem potransplantační CMV nemoci. Léčba dárcovskými CTL nebyla spojena s žádnou toxicitou a CMV-specifické CTL perzistovaly déle než 12 týdnů. U žádného z takto léčených pacientů nedošlo k rozvoji CMV infekce po transplantaci (30). Povzbudivé výsledky přinesla také studie s přenosem HIV-1-specifických CTL třem HIV-1 pozitivním pacientům. Podané CTL si uchovaly lytickou funkci, akumulovaly se v lymfatických uzlinách v oblastech přiléhajících k HIV-1 infikovaným buňkám a dočasně snížily hladinu cirkulujících infikovaných CD4⁺ T lymfocytů (32).

Všechny výše zmíněné klinické studie s adoptivním převodem virově-specifické imunity ukazují vysokou efektivitu a specifitu s minimem vedlejších účinků. Mohou sloužit jako příklad pro imunoterapeutické protokoly zaměřené specificky na

nádorové antigeny. CTL mohou být senzitivovány *in vivo* nebo *in vitro* celými nádorovými buňkami, jejich lysáty, nádorově-specifickými proteiny či peptidy. Výběr individuálních klonů T lymfocytů s vysokým stupněm specifity vůči vhodnému nádorovému antigenu může významně zlepšit klinický léčebný výsledek, jak bylo ukázáno v několika preklinických studiích (23,24). Další studie na myších modelech ověřily přesně definované nádorově-specifické antigeny, které lze vybrat pro klinickou studii. Tyto studie také poukázaly na vztah mezi *in vitro* aviditou T lymfocytů k nádorovému antigenu a efektivitou adoptivního transferu *in vivo* (24,33). Dudley a spol. (34) na základě preklinických testů provedl klinickou studii u 13 pacientů s metastatickým melanomem využívající buněčnou linii CTL specifickou vůči peptidu gp100 (viz Tab. 1). Přestože tato studie postrádala významnější klinickou efektivitu u těchto značně předlžených pacientů (jeden pacient dosáhl minoritní odpovědi a jeden pacient dosáhl smíšené odpovědi), ukázala možnost *in vitro* kultivace a následné expanze CTL specifických k jasně definovanému nádorovému antigenu. Infúze CTL nebyla spojena s vážnými vedlejšími účinky. CTL podlely záhy apoptóze, neboť již za dva týdny po infúzi nebyly detekovatelné v těle pacientů, což je několikanásobně kratší doba, než po jakou byly detekovány virus-specifické CTL ve výše zmíněných studiích (28-31). Příprava dostatečného množství tumor-specifických CTL, které budou schopny přežít dostatečně dlouhou dobu v těle hostitele představuje v současné době značnou překážku pro uplatnění této nové léčebné strategie.

Alogenní transplantace kostní dřeně a reakce štěpu proti nádoru

Alogenní transplantace kostní dřeně (TKD), která je používána k léčbě zejména hematologických malignit, představuje značný imunoterapeutický potenciál označovaný jako reakce štěpu proti leukemii/nádoru (GVL/GVT=graft-versus-leukemia/tumor) (35,36). Limitujícím faktorem alogenní TKD je zpravidla reakce štěpu proti hostiteli (GVHD=graft-versus-host disease), která velmi často provází GVL (37). Příkladem existence GVL efektu je úspěšná léčba relapsu (u 70-80 % pacientů) chronické myeloidní leukémie po TKD dárcovskými lymfocyty (38). Podobný efekt byl popsán u pacientů s akutní myeloidní leukémií, chronickou lymfatickou leukémií a některých non-hodgkinových lymfomů (39,40). Současný výzkum je orientován na nalezení linií či klonů dárcovských T lymfocytů zodpovědných za GVL/GVT, které by postrádaly reaktivitu ve smyslu GVHD (40,41).

Závěr

Jak jsme ukázali na několika příkladech, buněčná protinádorová imunoterapie si postupně začíná budovat místo vedle standardních léčebných postupů v onkologii. Přispěly k tomu zejména nové poznatky z oblasti základní imunologie, nádorové imunobiologie, molekulární biologie a rozvoj nových biotechnologií. Podobně jako každá nová metoda, prochází i buněčná imunoterapie dramatickými změnami v metodických přístupech; hlavní cíl však zůstává neměnný: porozumět a vhodně využít potenciál imunitního systému při léčbě zhoubného nádorového onemocnění. Jak vyplývá z textu, hlavní zájem je v současné době věnován antigen specifickým T lymfocytům.

Literatura

1. Ben-Efraim S. Cancer immunotherapy: Hopes and pitfalls: Review. *Anti-cancer research* 1996; 16: 3235-40.
2. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop* 1991; 262: 3-11.

3. Dudley ME. Cell transfer therapy: Basic principles and preclinical studies. In: *Biologic therapy of cancer* 2001: 305-21.
4. Bremers AJA, Parmiani G. Immunology and immunotherapy of human cancer: present concepts and clinical developments. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000; 34: 1-25.
5. Schreiber H. *Tumor immunology*. 2-nd ed., Paul WE ed. 1989: 923-55.

6. Murphy WJ, Longo DL. The potential role of NK cells in the separation of graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Immunol Rev* 1997; 157: 167-76.
7. Ruggeri L, Capanni M, Martelli MF, et al. Cellular therapy: exploiting NK cell alloreactivity in transplantation. *Curr Opin Hematol* 2001; 8: 355-9.
8. Ben-Efraim S. One hundred years of cancer immunotherapy. A critical appraisal. *Tumor Biol* 1999; 20: 1-24.
9. Hennemann B, Beckmann G, Eichelmann A, et al. Phase I trial of adoptive immunotherapy of cancer patients using monocyte-derived macrophages activated with interferon gamma and lipopolysaccharide. *Cancer Immunol Immunother* 1998; 45: 250-6.
10. Bartolleys J, Romet-Lemonne JL, Chokri M, et al. Immune therapy with macrophages: present status and critical requirements for implementation. *Immunobiology* 1996; 195: 550-62.
11. Kammula US, Marincola FM. Cancer immunotherapy: Is there real progress at last? *Biodrugs* 1999; 11: 249-60.
12. Rosenberg SA, Yannelli JR, Yang JC, et al. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2. *J Natl Cancer Inst* 1994, 86: 1159-1166.
13. Weis GR, Margolin KA, Aronson FR, et al. A randomized phase II trial of continuous infusion interleukin-2 or bolus injection interleukin-2 plus lymphokine-activated killer cells for advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 1992; 10: 275-81.
14. Figlin RA, Pierce WC, Kaboo R, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with nephrectomy, interleukin-2 and cytokine-primed or CD8(+) selected tumor infiltrating lymphocytes from primary tumor. *J Urol* 1997; 158: 740-5.
15. Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991, 254: 1643-1647.
16. Sahin U, Tureci O, Schmitt H, et al. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92: 11810-11813.
17. Mathiasen S, Laue ML, Ruhwald M, et al. Tumor-associated antigens identified by mRNA expression profiling induce protective anti-tumor immunity. *Eur. J. Immunology* 2001;31:1239-1246.
18. Wang T, Hopkins D, Reed SG, et al. Identification of genes differentially over-expressed in lung squamous cell carcinoma using of cDNA subtraction and microarrays analysis. *Oncogene* 2000;19:1519-1528.
19. Zammatteo N, Lockman L, Remacle J, et al. DNA microarrays to monitor the expression of MAGE-A genes. *Clinical Chemistry* 2002;48 (1):25-34.
20. Schultze JL, Vonderheide RH. From cancer genomics to cancer immunotherapy: toward second-generation tumor antigens. *Trends in Immunology* 2001;9:516-522.
21. Renkvist N, Chiara C, Paul FR, et al. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother* 2000; 50: 3-15.
22. Van den Eynde BJ, Van den Bruggen P. T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 684-93.
23. Hanson HL, Donermeyer DL, Ikeda H, et al. Eradication of established tumors by CD8+ T cell adoptive immunotherapy. *Immunity* 2000, 13: 265-276.
24. Shilyansky J, Yang JC, Custer MC, et al. Identification of a T-cell receptor from a therapeutic murine T-cell clone. *J Immunother* 1997, 20: 247-55.
25. Theobald M, Ruppert T, Kuckelkorn U, et al. The sequence alteration associated with a mutational hotspot in p53 protects cells from lysis by cytotoxic T lymphocytes specific for a flanking peptide epitope. *J Exp Med* 1998, 188: 1017-1028.
26. Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, et al. Induction of antigen-specific T-cell anergy: an early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95: 1178-1183.
27. Cohen PA, Peng L, Kjaergaard J, et al. T-cell adoptive therapy of tumors: mechanisms of improved therapeutic performance. *Crit Rev Immunol* 2001, 21: 215-248.
28. Rooney CM, Smith CA, Ng CYC, et al. Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* 1998, 92: 1549-1555.
29. Roskow MA, Suzuki N, Gan Y, et al. Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T lymphocytes for the treatment of patients with EBV-positive relapsed Hodgkin's disease. *Blood* 1998, 91: 2925-2934.
30. Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, et al. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* 1995, 333: 1038-1044.
31. Riddell SR, Greenberg PD. T-cell therapy of cytomegalovirus and human immunodeficiency virus infection. *J Antimicrob Chemother* 2000, 45: 35-43.
32. Brodie SJ, Lewinsohn DA, Patterson BK, et al. In vivo migration and function of transferred HIV-1-specific cytotoxic T cells. *Nature Med* 1999, 5: 34-41.
33. Alexander-Miller MA, Leggett GR, Berzofsky JA. Selective expansion of high- or low-avidity cytotoxic T lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93: 4102-4107.
34. Dudley ME, Wunderlich J, Nishimura MI, et al. Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 2001, 24: 363-373.
35. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1991; 75: 555-562.
36. Barrett AJ, Malkovska V. Graft-versus-leukemia: understanding and using the alloimmune response to treat hematological malignancies. *Br J Haematol* 1996; 93: 754-761.
37. Ferrara JLM, Deeg HJ. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 667-674.
38. Collins RH Jr, Shpilberg O, Drobyski WR, et al. Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1997; 15: 433-444.
39. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia. *Blood* 1995; 86: 2041-2050.
40. Van Rhee F, Kolb HJ. Donor leukocyte transfusions for leukemic relapse. *Curr Opin Hematol* 1995; 2: 423-430.
41. Datta AR, Barrett AJ, Jiang YZ, et al. Distinct T cell populations distinguish chronic myeloid leukemia cells from lymphocytes in the same individual: a model for separating GVHD from GVL reactions. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14: 517-524.