

동종조혈모세포이식 후 거대세포바이러스 감염을 방지하기 위한 입양면역치료에 대한 최신 지견

충남대학교 의과대학 소아과학교실, 충남대학교 암공동연구소

박 경 덕

Recent Advances of Adoptive Immunotherapy to Prevent CMV Disease after Allogeneic Stem-cell Transplantation

Kyung Duk Park, M.D.

Department of Pediatrics, Cancer Research Institute, College of Medicine,
Chungnam National University, Daejeon, Korea

서 론

거대세포바이러스(cytomegalovirus, CMV)는 human herpes virus로 전체 인구 중 50-100%에 잠복하고 체내에서는 CD34 양성 세포, 수지상세포(dendritic cells, DCs), 골수모양세포(myeloid cells), 그리고 단핵구에 존재한다¹⁻³. CMV 감염은 임상에서 흔히 접하게 되는 질환은 아니지만 최근 장기이식과 면역억제제의 사용빈도가 증가하면서 비교적 자주 접하게 되었다. 특히 동종조혈모세포이식(allogeneic stem cell transplantation, allo-SCT) 후 첫 3-4개월에 약 2/3의 환자가 CMV에 대한 방어력이 있는 CD8 양성 T 림프구 반응을 만들지 못하게 되고 이런 환자에서 결국 CMV 재활성화의 위험에 노출되어 치명적인 폐렴, 위장관염, 망막염, 척수염, 골수억제(myelosuppression) 등을 일으키고 심지어 생착실패(graft failure)의 원인이 된다⁴. 수혜자의 CMV 혈청학적 양성, 기증자의 CMV 혈청학적 음성, T세포 제거 이식, 비혈연간 기증자(unrelated donors), 혈연간 부분 불일치 기증자(haploidentical donor) 등은 모두 CMV 감염의 발병 가능성을 높인다^{5,6}. 효과적인 항바이러스제가 개발되기 전에는 CMV 재활성화로 인한 사망률이 20%에 달했었고, 아직도 여전히 allo-SCT 후 감염으로 인한 사망의 가장 흔한 원인 중의 하나이다.

Gancyclovir와 foscarnet는 CMV 감염병을 예방하고 치료하기 위해 가장 흔히 사용되는 약제로 특히 gancyclovir는 정맥면역글로불린주사와 병용 투여하여 CMV 폐렴의 예후를 현저히 상승시켰다⁷. 그러나 이러한 항바이러스제를 이용한 치료가 위험성이 없는 것이 아니다. Gancyclovir의 경우 화학적 예방 또는 선제요법(pre-emptive therapy)으로 CMV 감염 발생을 감

소시키지만 조혈모세포기능의 억제로 인한 호중구 감소증이 생겨 세균, 진균감염이 증가하게 하는 것이 문제점을 지적되고 있다. 또한 계속적인 항바이러스제의 사용은 약물의 내성을 유발하고 CMV 특이 면역의 회복을 지연시킬 수 있다^{8,9}. 이러한 이유로 이식 후 100일이 지나서 발생하는 지연발생 또는 지속적인 CMV 감염이 T세포 제거술을 사용하지 않는 센터에서는 가장 빈발하는 것으로 알려져 있다¹⁰.

이러한 이유로 CMV disease를 치료하기 위한 다른 더 좋은 방법을 찾는 노력이 있었고 그 중 하나가 입양세포면역치료(adoptive cellular immunotherapy)이다. 건강한 CMV 혈청학적 양성인 개인에게서 CMV 특이 세포독성 T 림프구(Cytotoxic T lymphocyte; CTL)이 1/5000-1/20000인 빈도로 유지되면 CMV 재활성화가 예방되는데 이런 CTL 반응이 allo-SCT 후 즉시 없어지며 면역반응이 돌아오는 것은 수개월이 걸릴 수 있다¹¹.

여러 연구에서 allo-SCT 후 CMV-specific CTL을 만드는 능력과 치명적인 폐렴의 경과와 상관관계가 있다는 것을 시사해 주었고 이런 소견에서 기증자의 CMV-specific CTL을 방어력을 가지는 정도의 세포를 환자에게 전해주면 allo-SCT 후 CMV 재활성화를 예방할 수 있겠다는 아이디어를 주었다^{12,13}. 이러한 원리를 이용하여 Walter와 Riddell이 donor의 말초혈액에서 채취하여 *in vitro*에서 만들어진 CMV-specific CD8+ T-cell clones이 CMV에 대한 세포면역성을 회복하고 바이러스의 재활성화를 막아준다는 것을 보여주었다¹⁴. 비록 T-cell clone을 만드는 접근방법이 노동집약적이고(labor-intensive) 널리 일상적으로 사용되기에는 문제가 있지만 이런 선구자적 시도는 CMV에 대한 입양면역치료가 적용되기에 가능하고 안전하다는 것을 알려주었다.

접수 : 2003년 3월 30일, 승인 : 2003년 4월 9일
 책임저자 : 박경덕, 충남대학교 의과대학 소아과학교실
 Tel : 042)220-7249 Fax : 042)255-3158
 E-mail : kdpark@cnuh.co.kr

거대세포바이러스 특이 T 세포 생산에 필요한 조건

CMV-specific CTL의 만드는 것이 통상적으로 임상에서 적용이 되기 위해서는 좋은 환경에서 수일 내에 만들어져야하고 만드는 과정에 활동성 바이러스나 이중 단백질인 fetal calf serum 등이 사용되지 말아야한다. 더욱이 CMV항체 양성 기증자의 경우에서만 아니라 CMV음성 기증의 경우에서도 CMV-specific CTL을 만드는 것이 필요하게 될 것이다.

그리고 최종적으로 CTL은 allo-reactivity를 나타내지 말아야한다.

이렇게 CMV특이 T 세포를 생산하기 위한 시스템의 중요한 변수에는 ① 항원전달세포(Ag-presenting cells, APC)의 형태, ② 사용되는 항원의 종류, ③ 임상 사용 가능한 충분한 양의 CMV-specific CTL을 유도하고 증폭시키는 방법, ④ 동종반응 T 세포를 제거하고 CMV 특이 T 세포를 유지하는 선별과정 등이 있다.

1. 항원전달세포(APC)의 형태

APC로 사용될 수 있는 세포에는 섬유모세포, CD40L ligated B 림프구, EBV immortalized B 림프구, 단핵구, DCs 등이 있다. CMV-infected fibroblast는 HLA-Class II가 없어 전문적인 APC로서 역할을 하기 위해서는 costimulatory molecule과 accessory molecule이 필요하다. Fibroblasts는 CMV음성기증자로부터 초기면역반응을 자극하는데 사용될 수 없고 CD4+ 세포도 배양할 수 없다. CMV-specific CD4+ 세포가 CMV-specific CD8+ 세포의 빈도를 유지하는데 필수적이기 때문에 APC로서 적절한 것은 MHC Class I과 Class II 모두를 통해 CMV Ag을 전달하는 APC인 B 세포, 단핵구, DCs 등이다^{15, 16)}.

2. 사용되는 항원의 종류

allo-SCT 수혜자에서 CMV에 대한 주 CTL 반응(dominant CTL response)은 structural viral protein에 대해 일어난다. 이 단백질은 CMV-감염세포에 의해 처리되고 전달되는데 endogenous replication이나 gene expression이 필요하지는 않다¹²⁾. 최근의 연구에서 골수이식 수혜자나 건강한 CMV 혈청학적 양성인 정상인에서 viral matrix phosphoprotein인 pp65가 세포독성 T 세포반응 그리고 helper T 세포 반응의 주요 표적으로 규명되었다^{12, 17)}. 더욱이 pp65 단백질에 대한 반응성은 HLA에 독립적인 것으로 보여지고 이것은 이 단백질이 수많은 immunogenic epitopes를 갖고 있다는 것을 시사한다. 최근 HLA*0201, HLA*2402, HLA*0101, HLA*0301, HLA*1101, HLA B*0702, HLA B*3801/02, HLA*3801/2, HLA*B3502, HLA*A69801/2, HLA A*B44xx, HLA DR3, DR11 등에 대한 epitope의 fine mapping이 truncated pp65 sequence와 pp65 recombinant protein을 담고 있는 vaccinia viruses를 가지고 수행되었다

¹⁸⁻²⁰⁾. 그리고 pp65 matrix protein이 가장 강력하고 광범위하게 반응을 보이는 항원 중의 하나로 CMV 항원에 대해 세포면역반응을 나타내어 protective CMV immunity에 필수적이므로 pp65 peptides가 CMV-specific T cell lines의 생산에 이상적이다.

그 외 다른 CMV Ag의 source로 상품화된 CMV-infected fibroblast lysates, crude 또는 semi-purified, recombinant pp65 proteins 등이 있다. CD4+와 CD8+ 반응을 생산하는 다른 방법은 CD34+ 유도 DCs(CD34-driven DCs)에 pp65 gene을 retroviral transfer를 하는 것이다. Retroviruses는 단지 분열중인 세포에만 intergration되어 transduction은 stem cell factor와 GM-CSF를 사용하여 분열 중이 CD34+-selected cells에서 시행되었다²¹⁾. 더욱 최근에는 Keever 등이 adeno-virus-pp65 vector를 이용하여 mature non-dividing CD14+-derived DCs에 episomal expression을 시켰다²²⁾. Viral transfer의 주요 관건은 실험실에서 좋은 생산 공정이 유지되어야 한다는 것이다.

1) Non-peptide Ag system

CMV specific CTLs은 immature, donor monocyte-derived DCs를 human CMV-infected fibroblast나 human embryonic lung fibroblast monolayer로부터 만든 lysate로 된 crude, inactivated CMV Ag으로 pulsing하여 만들어 왔다²³⁾. 10개의 배양하여 5개에서만 E:T ration 20:1에서 autologous CMV-infected fibroblast나 DCs를 죽일 수 있었다. 또한 면역표현형검사를 하였을 때 어떤 culture는 주로 CD4+ cell로 구성되어 있었다. 그리고 이런 것이 보여주는 정보에서는 광범위한 T cell repertorie가 있어 allo-reactive cell이 충분히 제거되지 못했을 가능성이 있어 보인다. 이런 whole lysate를 사용하는 것의 또 다른 단점은 이 whole CMV lysate가 Ag processing과 presentation을 방해하여 culture의 결과 충분한 세포가 얻어지지 않을 수 있다는 것이다^{24, 25)}. 하지만 뚜렷한 장점은 이 방법이 어떤 한 HLA element에 국한된 것이 아니기 때문에 Th 세포(helper cell)와 Tc 세포(cytotoxic cell)가 같이 제공되고 이것은 결국 T 세포의 수명을 증가시킨다는 것이다²⁶⁾. 좀더 고안하면 CMV-specific T cell을 유도하기 위해 lysate의 대체하여 pp65로 pulse를 할 수 있을 것이다. 하지만 pp65 protein은 아직 상업적으로 얻을 수 없고, 실험실에서 합성되는 pp65는 large hydrophobic epitope가 있어 문제를 가지고 있다. 현재 이를 극복하기 위해 Santiago 등²⁷⁾은 pp65의 solubility를 높힌 pp65-intermediate early-1(IE-1)을 합성하였다.

2) Peptide Ag system

Whole protein이 가진 문제를 peptide를 사용함으로 극복하려는 시도인데, pp65 같은 CMV Ag을 proteosomes로 process하여 peptide로 만들고 이를 최종적으로 endoplasmic reticulum으로 transport하여 HLA Class I molecule과 assembly를 만들고 후에 세포표면에 전달하게 된다. 많은 연구가 HLA-A*0201 restricted peptide pp65495-503에 초점이 맞추어져 있는데 그

이유는 HLA-A*0201 phenotype이 immunodominant peptide로서의 인지도와 높은 빈도 때문이다^{28, 29)}.

3. T 세포 증식의 방법

실제적인 방법은 기증자로부터 CMV-specific T cell line을 체외에서 만드는 것이다. Virus-specific or protein specific T-cell lines은 CD8+와 CD4+ cell을 둘 다 가지는 이점을 가지고 있다. EBV-transformed B 림프구(LCLs)가 stimulator cell로서 virus-specific cell lines을 키우는데 사용되어 왔다. EBV-specific T-cell line은 이미 체외 시험관내에서 성공적으로 키워져 동종조혈모세포이식 후 EBV-induced lymphoproliferative disorder를 가진 환자들에게 수혈되었다¹⁵⁾.

EBV-specific CTLs의 입양면역치료로는 이미 아주 효과적인 것으로 증명되었고, 바이러스에 재도전 받았을 때 반응하는 능력을 가진 gene-marked CTLs가 장기간 유지되는 것은 gene marking을 통해 보여주었다¹⁶⁾. LCLs은 HLA Class I과 II molecules, 그리고 많은 accessory molecules를 발현하고 있어 아주 효과적으로 면역반응을 자극하고 이를 통해 EBV-specific T cell line의 생산에 이용되었다. 최근의 한 연구에서 pp65 gene을 가지는 retrovirus로 transduce된 EBV-specific CTL을 사용하여 autologous LCLs를 modify해 CMV와 EBV Ag에 대해 presentation 시키고 polyclonal, bispecific CTLs를 만들어 내려 하였다²⁸⁾. 그러나 이 방법은 CMV 항체음성인 기증자로부터 반응을 유발하는 데는 성공하지 못하였는데, 이는 항원에 대해 처음으로 반응을 시작하기 위해서는 professional APC로써 DCs가 필요로 하기 때문일 것이다³⁰⁾. 그 외 비슷한 시도가 있었는데 adenovirus나 lentivirus를 이용하였었다³⁰⁾. LCLs는 높은 증식률을 가지고 있고 retrovirus로 modification 하는데 이 상적이다.

4. 성공적인 증식 후 Ag specific T cell의 선별

Ag에 대한 Ab의 affinity와 달리 단일 HLA molecule에 의해 presentation되는 peptide 대한 T cell receptor의 affinity는 낮다. 하지만 relevant peptide로 결합되어 있는 HLA Class I molecule의 tetramers는 훨씬 높은 binding affinity를 보여 Ag-specific T cell을 식별하고 선별하는데 사용될 수 있다³¹⁾.

Tetramers는 4개의 HLA Class I molecule로 이루어져 있고 각각 restricted peptide ligand 주위로 집혀져 있고 biotin-streptavidin이 결합되어 있다. Fluochrome labelling하여 flow cytometry로 Ag-specific CTLs를 시각화 할 수 있다. Tetramer technology는 influenza, HIV, simian immune deficiency virus, human T-cell lymphotropic 바이러스, lymphocytic choriomeningitis 바이러스에 대해 특이한 CTL을 특화하여 분리하는데 사용되어 왔다³²⁻³⁶⁾.

Tetramer technology를 이용하여 HLA molecule/peptide 복합체로 label된 Ag-specific T cells는 anti-PE Ab로 coating

되거나, 또는 HLA molecule/peptide 복합체에 직접 coating된 immunomagnetic bead로 capture될 수 있다. 그러므로 CMV peptide-HLA Class I tetramer를 가지고 leukapheresis product로부터 CMV-specific T cells를 직접 분리해내는 것이 가능하다³⁷⁾.

하지만 개인적으로 CMV-specific T cell의 수치에 차이가 있고 CMV seronegative donor의 경우 circulating CMV-specific T cell이 적어 *in vitro* expansion step을 사용하는 것이 유리할 것이다.

또한 연구 중인 선별의 다른 방법으로는 CMV에 의해 자극되어 IFN-gamma를 생성하는 CTL을 골라내기 위해 anti-IFN-gamma magnetic bead를 사용하는 것이다.

CMV에 대한 입양면역치료의 미래

아직까지 CMV항체음성 기증자로부터 CTL을 유도 증식하는데 어려움이 있어 이 부분에 대한 더 많은 연구가 필요하고 앞으로 환자를 CMV 감염병으로부터 보호하는 것 뿐만 아니라 임상적으로 이식 후 문제를 일으키는 varicella zoster virus, herpes simplex virus, adenovirus, 그 외 출혈성 방광염을 일으키는 바이러스 등에 대해서도 특이 T 세포를 증식 및 선별하여 적용될 수 있을 것이고 또한 중앙특이 T 세포를 생산하기 위해 방법을 개발하는 모델로서 사용될 수 있다. 도움이 되는 중앙특이항원을 찾아내는 것이 여전히 문제로 남아있지만 원칙적으로 CMV 특이 T 세포를 생산하면서 습득한 교훈은 널리 활용될 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

- 1) Gerberderling JL. Incidence and prevalence of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus, and cytomegalovirus among health care personnel at risk for blood exposure: final report from a longitudinal study. J Infect Dis 1994;170:1410-17.
- 2) Bolovan-Fritts C, Mocarski ES, Wiedeman JA. Peripheral blood CD14+ cells from healthy subjects carry a circular conformation of latent cytomegalovirus genome. Blood 1999; 93:394-8.
- 3) Hahn G, Jores R, Mocarski ES. Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:3937-42.
- 4) Reusser P, Riddell SR, Meyers JD, Greenberg PD. Cytotoxic T lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. Blood 1991;78:1373-80.
- 5) Meyers JD, Flournoy N, Thomas ED. Risk factors after human bone marrow transplantation. J Infect Dis 1986;153: 478-88.
- 6) Enright H, Haake R, Weisdorf D, McGlave P, Kersey J,

- Thomas W, et al. Cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation: risk factors and response to therapy. *Transplantation* 1993;55:1339-46.
- 7) Goodrich JM, Mori M, Gleaves CA, Du Mond C, Cays M, Ebeling DF, et al. Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1991;325:1601-7.
 - 8) Boeckh M, Gooley TA, Myerson D, Cunningham T, Schoch G, Bowden RA. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment: a randomized double-blind study. *Blood* 1996;88:4063-71.
 - 9) Salzberger B, Bowden RA, Hackman RC, Davis C, Boeckh M. Neutropenia in allogeneic marrow transplant recipients receiving ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease: risk factors and outcome. *Blood* 1997;90:2502-8.
 - 10) Reusser P, Cordonnier C, Einsele H, Engelhard D, Link D, Locasciulli A, et al. For the infectious disease working party of the European group for blood and marrow transplantation(EBMT). European Survey of herpes virus resistance to antiviral drugs in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 1996;17:813-19.
 - 11) Borysiewicz LK, Graham S, Hickling JK, Mason PD, Sissons JG. Human cytomegalovirus-specific T-cytotoxic T cells: their precursor frequency and stage specificity. *Eur J Immunol* 1988;18:269-75.
 - 12) Li CR, Greenberg PD, Gilbert MJ, Goodrich JM, Riddell SR. Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus(CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood* 1994;83:1971-9.
 - 13) Quinnan GV Jr, Kirmani N, Rook AH, Manischewitz JF, Jackson L, Moreschi G, et al. Cytotoxic T cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone marrow transplant recipients. *N Engl J Med* 1982;307:7-13.
 - 14) Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, Finch RJ, Watanabe KS, Thomas ED, et al. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1995;333:1038-44.
 - 15) Rooney CM, Smith CA, Ng CY, Loftin S, Li C, Krance RA, et al. Use of gene modified virus specific T lymphocytes to control Epstein-Barr virus related lymphoproliferation. *Lancet* 1995;345:9-13.
 - 16) Heslop HE, Ng CY, Li C, Smith CA, Loftin SK, Krance RA, et al. Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nat Med* 1996;2:551-5.
 - 17) Weekes MP, Carmichael AJ, Wills MR, Mynard K, Sissons JG. Human CD28-CD8+ T cells contain greatly expanded functional virus-specific memory CTL clones. *J Immunol* 1999;162:7569-77.
 - 18) Weekes MP, Wills MR, Mynard K, Carmichael AJ, Sissons JG. The memory cytotoxic T-lymphocyte(CTL) response to human cytomegalovirus infection contains individual peptide-specific CTL clones that have undergone extensive expansion in vivo. *J Virol* 1999;73:2099-108.
 - 19) Diamond DJ, York J, Sun JY, Wright CL, Forman SJ. Development of a candidate HLA A*0201 restricted peptide-based vaccine against human cytomegalovirus infection. *Blood* 1997;90:1751-67.
 - 20) Solache A, Morgan CL, Dodi AI, Morte C, Scott I, Baboonian C, et al. Identification of three HLA-A*0201-restricted cytotoxic T cell epitopes in the cytomegalovirus protein pp65 that are conserved between eight strains of the virus. *J Immunol* 1999;163:5512-8.
 - 21) Reeves ME, Royal RE, Lam JS, Rosenberg SA, Hwu P. Retroviral transduction of human dendritic cells with a tumor-associated antigen gene. *Cancer Res* 1996;56:5672-7.
 - 22) Keever-Taylor CA, Margolis D, Konings S, Sandford GR, Nicolette CA, Lawendowski C, et al. Cytomegalovirus-specific cytolytic T-cell lines and clones generated against adenovirus-pp65-infected dendritic cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001;7:247-56.
 - 23) Peggs K, Verfuenh S, Mackinnon S. Induction of cytomegalovirus(CMV)-specific T-cell responses using dendritic cells pulsed with CMV antigen: a novel culture system free of live CMV virions. *Blood* 2001;97:994-1000.
 - 24) Ahn K, Angulo A, Ghazal P, Peterson PA, Yang Y, Fruh K. Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10990-5.
 - 25) Koszinowski UH, Reddehase MJ, Del Val M. Principles of cytomegalovirus antigen presentation in vitro and in vivo. *Semin Immunol* 1992;4:71-9.
 - 26) Kern F, Surel IP, Faulhaber N, Frommel C, Schneider-Mergener J, Schonemann C, et al. Target structures of the CD8(+)-T-cell response to human cytomegalovirus: the 72-kilodalton major immediate-early protein revisited. *J Virol* 1999;73:8179-84.
 - 27) Vaz-Santiago J, Lule J, Rohrlisch P, Kravtsoff R, Le Roy E, Davignon JL, et al. IE1-pp65 recombinant protein from human CMV combined with a nanoparticulate carrier, SMBV, as a potential source for the development of anti-human CMV adoptive immunotherapy. *Cytotherapy* 2002;4:11-9.
 - 28) Sun Q, Pollok KE, Burton RL, Dai LJ, Britt W, Emanuel DJ, et al. Simultaneous ex vivo expansion of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes using B-lymphoblastoid cell lines expressing cytomegalovirus pp65. *Blood* 1999;94:3242-50.
 - 29) Ellis JM, Henson V, Slack R, Ng J, Hartzman RJ, Katoch Hurlley C. Frequencies of HLA-A2 alleles in five U.S. population groups. Predominance Of A*02011 and identification of HLA-A*0231. *Hum Immunol* 2000;61:334-40.
 - 30) Regn S, Raffegerst S, Chen X, Schendel D, Kolb HJ, Roskrow M. Ex vivo generation of cytotoxic T lymphocytes specific for one or two distinct viruses for the prophylaxis of patients receiving an allogeneic bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant* 2001;27:53-64.
 - 31) Corr M, Slanetz AE, Boyd LF, Jelonek MT, Khilko S, al-Ramadi BK, et al. T cell receptor-MHC class I peptide interactions: affinity, kinetics, and specificity. *Science* 1994; 265:946-9.
 - 32) Dunbar PR, Ogg GS, Chen J, Rust N, van der Bruggen P, Cerundolo V. Direct isolation, phenotyping and cloning of low-frequency antigen-specific cytotoxic T lymphocytes

- from peripheral blood. *Curr Biol* 1998;8:413-6.
- 33) Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, Dunbar PR, Nowak MA, Monard S, et al. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* 1998;279:2103-6.
- 34) Kuroda MJ, Schmitz JE, Barouch DH, Craiu A, Allen TM, Sette A, et al. Analysis of Gag-specific cytotoxic T lymphocytes in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys by cell staining with a tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complex. *J Exp Med* 1998;187:1373-81.
- 35) Bieganowska K, Hollsberg P, Buckle GJ, Lim DG, Greten TF, Schneck J, et al. Direct analysis of viral-specific CD8+ T cells with soluble HLA-A2/Tax11-19 tetramer complexes in patients with human T cell lymphotropic virus-associated myelopathy. *J Immunol* 1999;162:1765-71.
- 36) Gallimore A, Glithero A, Godkin A, Tissot AC, Pluckthun A, Elliott T, et al. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J Exp Med* 1998;187:1383-93.
- 37) Luxembourg AT, Borrow P, Teyton L, Brunmark AB, Peterson PA, Jackson MR. Biomagnetic isolation of antigen-specific CD8+ T cells usable in immunotherapy. *Nat Biotechnol* 1998;16:281-5.
-