

SELEKTIVNÍ DEPLECE ALOREAKTIVNÍCH T LYMFOCYTŮ A STUDIUM PROTINÁDOROVÉ AKTIVITY SPECIFICKÝCH KLONŮ T LYMFOCYTŮ U PACIENTŮ S LEUKÉMIÍ

SELECTIVE DEPLETION OF ALLOREACTIVE T CELLS AND STUDY OF ANTI-TUMOR ACTIVITY OF SPECIFIC T CELL CLONES IN PATIENTS WITH LEUKEMIA

MATĚJKOVÁ E.¹, OČADLÍKOVÁ D.¹, SMEJKALOVÁ J.¹, MUŽÍKOVÁ J.¹, RAIDA L.², TOUŠOVSKÁ K.³, PACASOVÁ R.⁴, NENIČKOVÁ M.⁴, TESAŘOVÁ E.⁴, ŠTĚRBA J.³, INDRÁK K.², MICHÁLEK J.^{1,5}

¹UNIVERZITNÍ CENTRUM BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE, MASARYKOVA UNIVERZITA, BRNO

²HEMATO-ONKOLOGICKÁ KLINIKA, FAKULTNÍ NEMOCNICE, OLOMOUC

³KLINIKA DĚTSKÉ ONKOLOGIE, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO, BRNO

⁴TRANSFÚZNÍ ODDĚLENÍ A KREVNI BANKA, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO, BRNO

⁵1. DĚTSKÁ INTERNÍ KLINIKA, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO, BRNO

Souhrn

Východiska: Reakce štěpu proti hostiteli (graft versus host, GVH) je obávanou komplikací alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk. Hlavní roli hrají T lymfocyty dárce, které v konečném důsledku mohou vést k těžkému poškození tkání hostitele, především kůže, jater a gastrointestinálního traktu. Selektivní deplece pomocí anti-CD25 imunotoxinu (IT) vede k eliminaci nežádoucích aloreaktivních T lymfocytů a uchování žádoucích T lymfocytů dárce, které vykazují protileukemickou a protiinfekční reaktivitu. **Soubor pacientů a metody:** Celkem bylo provedeno 15 smíšených lymfocytárních reakcí se vzorky klinického materiálu od 12 pacientů s různými typy leukémie (7x AML, 3x ALL, 1x CML, 1x CLL) a PBMC od 15 zdravých dárců z Transfúzní stanice FN Brno Bohunice. **Výsledky:** V našich experimentech bylo prokázáno, že protileukemický (GVL) efekt dárcovských, především CD4⁺, T lymfocytů byl dobře zachován (7,46%), zatímco nežádoucí aloreaktivní (GVH) reakce dárcovských buněk byla zcela potlačena, protože nedošlo k reaktivaci aloreaktivních T lymfocytů ani po opakované restimulaci ozářenými neleukemickými buňkami pacienta. **Závěr:** Ukázali jsme, že anti-CD25 imunotoxin (IT), RFT5-SMPT-dgA, namířený proti α řetězci receptoru pro lidský interleukin 2 (IL-2), vede k dlouhodobé selektivní depleci aloreaktivních klonů T lymfocytů dárce při uchování jejich protileukemického potenciálu. Na základě našich výsledků byla připravena klinická studie, která byla zahájena v roce 2007 ve třech klinických centrech v České republice.

Klíčová slova: selektivní deplece, reakce štěpu proti hostiteli, imunoterapie, transplantace krvetvorných buněk

Summary

Background: Graft-versus-host disease (GVHD) is a severe complication of allogeneic transplantation of hematopoietic stem cells. Donor T cells play a major role in GVHD leading to the host tissue damage, mainly the skin, liver, and gastrointestinal tract. A selective depletion using an anti-CD25 immunotoxin can eliminate harmful alloreactive T cells while preserving other donor T cells with antileukemic and antiinfectious reactivity. **Patients and Methods:** We performed 15 mixed lymphocyte reactions with clinical specimens from 12 patients with various types of leukemia (7x AML, 3x ALL, 1x CML, 1x CLL) and PBMC from 15 healthy volunteers from Transfusive station FN Brno Bohunice. **Results:** In our experiments we have demonstrated, that antileukemic (GVL) effect of donor, especially CD4⁺ T cells was well preserved (7.46%), while unfavourable alloreactive (GVH) reaction of donor T cells was completely removed. The graft-versus-host (GVH) reactivation of donor cells was negligible ever after repeated stimulation with irradiated patient's PBMC. **Conclusion:** We have shown that anti-CD25 immunotoxin (IT), RFT5-SMPT-dgA, launched against α chain for human interleukin 2 (IL-2), led to long-term selective depletion of alloreactive donor T cell clones while their antileukemic activity was well preserved. Based on our results the clinical phase I/II study was designed. This study was initiated in year 2007 in three clinical centers in Czech Republic.

Key words: lymphocyte depletion, graft-versus-host disease, immunotherapy, hematopoietic stem cell transplantation

Úvod

Alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk (HSCT – hematopoietic stem cell transplantation) představuje účinnou léčbu mnoha nádorových i nenádoro-

vých onemocnění, která by jinak byla nevyléčitelná (1). V současné době se uplatňuje názor, že léčebný potenciál HSCT spočívá zejména v uplatnění protinádorové aktivity dárcovských (alogenních) T lymfocytů schopných navo-

dit reakci štěpu proti leukémii (GVL - graft-versus-leukemia) (2). Nejpersvědčivější klinický důkaz o existenci GVL efektu byl podán u pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML) relabujících po HSCT, kteří byli léčeni dárcovskými lymfocytárními infúzemi (DLI - donor lymphocyte infusion). Kompletní remise byly pozorovány u 70-80% pacientů s CML v chronické fázi relapsu léčebných DLI (3). Kompletní remise po DLI byly pozorovány u mnoha dalších nádorových onemocnění a klinická pozorování ukazují, že GVT/GVL odpovědi mohou být přítomny zejména u pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML), mnohočetným myelomem (MM) a renálním karcinomem (2-5). Regrese nádorového bujení byla pozorována také u pacientů s dalšími nádorovými onemocněními (5).

I přes obrovský pokrok v péči o transplantované pacienty v posledních 20 letech, zůstává největším problémem alogenních HSCT nežádoucí reakce štěpu proti hostiteli (GVH - graft-versus-host), která je jednou z hlavních příčin morbidit a mortality v potransplantačním období (1,6). Akutní GVH nemoc (GVHD - GVH disease) je zprostředkována zejména alogenními T lymfocyty (6). Tyto aktivované T lymfocyty, charakterizované mimo jiné přítomností receptoru pro IL-2 (CD 25+) na svém povrchu, rekrutují efektorové populace buněk, které cestou dysregulované produkce cytokinů vedou v konečném důsledku k poškození příjemcových tkání, zejména kůže, jater a gastrointestinálního systému (6). Protože GVH reakce je způsobena především T lymfocyty dárce, jejich odstranění by mělo zabránit vzniku GVHD. V klinických studiích s HLA-identickými příbuznými dárce bylo ověřeno, že při snížení počtu dárcovských T lymfocytů pod $10^5/\text{kg}$ hmotnosti příjemce zpravidla nedochází k život ohrožující GVHD (7). V případě HLA-identických nepříbuzných dárce a HLA-neidentických příbuzných dárce musí být deplece T lymfocytů ještě o jeden řád větší.

Deplece dárcovských T lymfocytů však přináší nové problémy s velmi opožděnou rekonstitucí imunitního systému po transplantaci: vysoké riziko oportunních infekcí, relaps základního onemocnění a rejekce transplantátu (8,9).

Jako ideální se tedy jeví přístup, který by eliminoval pouze ty dárcovské T lymfocyty, které jsou zodpovědné za GVH reaktivitu, avšak ponechal T lymfocyty s GVL/GVT reaktivitou. Realizace této myšlenky je založena na předpokladu, že GVH a GVL/GVT jsou zprostředkovány různými klony dárcovských T lymfocytů, které lze od sebe oddělit (2,10). Jeden ze způsobů jak eliminovat GVH-reaktivní klony dárcovských T lymfocytů spočívá v jejich aktivaci ozářenými nenádorovými buňkami příjemce v tzv. smíšené lymfocytární reakci (mixed leukocyte reaction, MLR). Klony dárcovských T lymfocytů, které rozpoznávají příjemcovy nenádorové buňky jako cizorodé, se aktivují a exprimují na svém povrchu CD25 molekuly. Již dříve jsme ukázali, že takto aktivované CD25⁺ T lymfocyty lze velmi efektivně a specificky eliminovat pomocí anti-CD25 imunotoxinu (IT), aniž by byla výrazně poškozena zbývající populace dárcovských T lymfocytů, která si zachovává protileukemickou a protimikrobiální reaktivitu (10-13). IT je konstruován jako anti-CD25 monoklonální protilátka spojená s molekulou účinného toxinu A-řetězce ricinu (13).

V tomto článku předkládáme naše výsledky preklinických pokusů využívající anti-CD25 imunotoxin k prevenci GVH nemoci s perspektivou jejich následného využití v rámci klinické studie fáze I/II.

Materiál a metody

Soubor pacientů

Pro naše experimenty byly použity mononukleární buňky z periferní krve (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) pacientů s leukémií ve věku 5 – 63 a HLA neidentických nepřibuzných dárce ve věku 18 – 50 let.

Jednalo se o pacienty s diagnózou 7x akutní myeloidní leukémie (AML), 3x akutní lymfoblastická leukémie (ALL), 1x chronická myeloidní leukémie (CML), 1x chronická lymfatická leukémie (CLL) diagnostikované ve Fakultních nemocnicích v Olomouci a Brně.

Vstupní zpracování materiálu

V době stanovení diagnózy (9 pacientů) nebo relapsu (2 pacienti) leukémie a za podmínky minimálně 70% leukemických blastů v periferní krvi bylo pacientům na základě podepsaného informovaného souhlasu odebráno 40ml heparinizované krve. Z té pak byly gradientovou centrifugací separovány leukemické buňky, které byly řízeně zamrazeny a uchovány při -196°C do doby zpracování. Pacientům, kteří byli léčbou uvedeni do hematologické remise ($<1\%$ blastů v periferní krvi), bylo pak odebráno 40ml heparinizované krve s následnou separací PBMC. Leukemické buňky i neleukemické PBMC téhož pacienta byly použity v našich experimentech jako antigen při stimulaci GVL a GVH reaktivity dárcovských lymfocytů. PBMC zdravých dárce byly získány gradientovou centrifugací z leukocytární frakce získané z Transfúzního oddělení od zdravých dárce krve po podepsání informovaného souhlasu.

Primární smíšená lymfocytární reakce

Na začátku každého pokusu vstupovalo do pokusu 100×10^6 PBMC zdravého dárce.

Nejdříve byly v primární MLR smíchány ozářené (30Gy) neleukemické PBMC pacienta s lymfocyty zdravého dárce v poměru 1:2. Buňky byly 24 hodin kultivovány v kompletním médiu (X-VIVO 15, které obsahuje L-glutamin a 10% tepelně inaktivovaného lidského AB séra) při buňčnosti $5 \times 10^6/\text{ml}$ dárcovských PBMC. V této reakci dochází k aktivaci dárcovských klonů T-lymfocytů, které na svém povrchu exprimují molekulu CD25.

V následujících 24 hodinách bylo do MLR přidáno 10^{-8}M anti-CD25 imunotoxinu sestávajícího z molekuly monoklonální protilátky anti-CD25 a vysoce potentního A-řetězce ricinu (12), který selektivně depletoval tyto aloreaktivní klony dárcovských lymfocytů. Společně s IT byl podán 10mM chlorid amonný, který potencuje účinek IT (11,12). Podání samotného chloridu amonného v koncentraci $\leq 10\text{mM}$ přitom nemá žádný efekt na viabilitu buněk (8, 12). Pro maximální potenciaci efektu selektivní deplece CD25⁺ aloreaktivních lymfocytů dárce bylo po 24 hodinách inkubace znovu přidáno $0,5 \times 10^{-8}\text{M}$ IT. V průběhu experimentu bylo průběžně prováděno cytometrické vyšetření exprese znaku CD25 na CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytech.

Sekundární smíšená lymfocytární reakce

Čtvrtý den kultivace byly selektivně depletované dárcovské lymfocyty sklizeny a tato kultura byla rozdělena na dvě stejné části. První kultura buněk byla smíchána s ozářenými (30Gy) leukemickými buňkami pacienta. V této MLR pak docházelo k aktivaci GVL-specifických klonů T lymfocytů dárce, které by již měly postrádat nežádoucí GVH-reaktivitu. Reaktivace ozářenými leukemickými buňkami pacienta byla 2x opakována v týdenních intervalech, tj. 10. a 17. den kultivace. Druhá kultura byla smíchána s ozářenými (30Gy) neleukemickými buňkami pacienta tak, aby bylo možné prokázat případnou zbytkovou aloreaktivitu selektivně depletovaných dárcovských lymfocytů. Reaktivace ozářenými neleukemickými buňkami pacienta byla rovněž opakována v týdenních intervalech, tj. 10. a 17. den kultivace.

Pomocí průtokové cytometrie pak byly charakterizovány dárcovské lymfocyty pomocí znaků CD3, CD4, CD8, CD25.

Kontrolní smíšená lymfocytární reakce

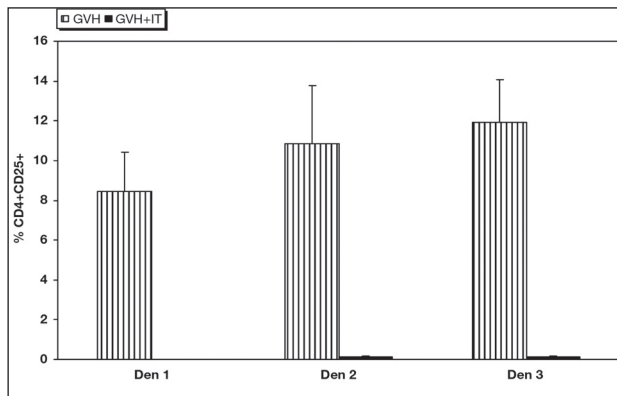
Jako kontrolní experiment mapující aktivaci aloreaktivních lymfocytů dárce byla prováděna MLR bez selektivní deplece anti-CD25 imunotoxinem. V primární MLR byly smíchány ozářené (30Gy) neleukemické PBMC pacienta s lymfocyty zdravého dárce v poměru 1:2. Buňky byly kultivovány v kompletním médiu při buněčnosti $5 \times 10^6/\text{ml}$ dárcovských PBMC a následně 3x reaktivovány (tj. 4., 10. a 17. den kultivace) ozářenými neleukemickými PBMC pacienta. Tímto způsobem byla sledována GVH reaktivita dárcovských lymfocytů. V průběhu experimentu bylo rovněž prováděno cytometrické vyšetření exprese znaku CD25 na CD4^+ a CD8^+ T lymfocytech.

Výsledky:

Celkem bylo provedeno 15 smíšených lymfocytárních reakcí se vzorky klinického materiálu od 12 pacientů s různými typy leukémie (7x AML, 3x ALL, 1x CML, 1x CLL) a PBMC od 15 zdravých dárců z TS FN Brno Bohunice. První den byla založena kultura MLR, ve které byly smíchány dárcovské PBMC s ozářenými neleukemickými PBMC pacienta s leukémií tak, aby došlo k aktivaci aloreaktivních dárcovských lymfocytů. Po 24-hodinové kultivaci v inkubátoru byla cytometricky změřena produkce znaku CD25 na CD4^+ T lymfocytech v kultuře GVH, která dosahovala 6,77 – 11,02% (medián 8,46%), na CD8^+ T lymfocytech pak exprese znaku CD25 dosahovala 0,76 – 3,5%, (medián 1,55%). Pro navození selektivní deplece aloreaktivní byl k MLR přidán anti-CD25 IT. Již po 24 hodinách kultivace s IT došlo k prudkému poklesu aloreaktivních lymfocytů dárce na 0,08 – 0,18% (medián 0,14%) u CD4^+ T lymfocytů a 0 – 0,31% (medián 0,14%) u CD8^+ T buněk ve srovnání s kontrolní MLR bez přidání IT: 7,87 – 12,57% (medián 10,87%) na CD4^+ T lymfocytech, na CD8^+ pak 1,8 – 6,7% (medián 3,64%).

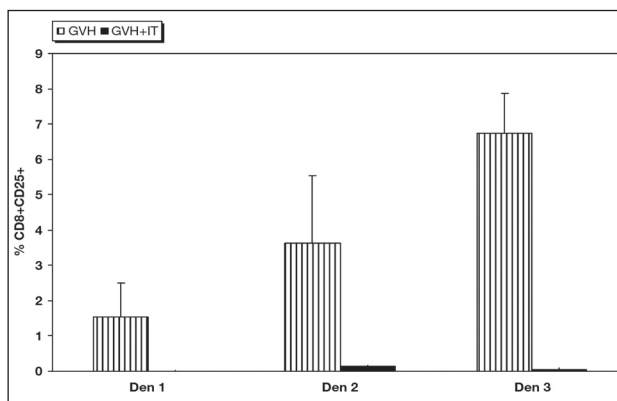
Inkubace dalších 24 hodin s čerstvě přidáním IT ještě prohloubila efekt selektivní deplece aloreaktivní dárcovských lymfocytů na 0 – 0,14% (medián 0,12%) u CD4^+ T lymfocytů, na CD8^+ 0 – 0,10% (medián 0,05%), zatímco v kontrolní MLR došlo k dalšímu nárůstu pro-

centuálního zastoupení aloreaktivních klonů dárcovských $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T lymfocytů na 10,75 – 16,03% (medián 11,91%), u $\text{CD8}^+\text{CD25}^+$ T lymfocytů na 4,6 – 11,9% (medián 6,73%), viz Obr. 1 a Obr. 2. Na Obr. 3 je znázorněna reprezentativní flow cytometrická analýza primární MLR u jednoho dárce.



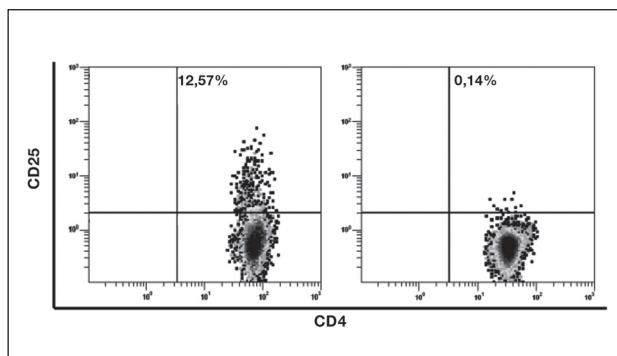
Obrázek č. 1: Průběh primární MLR na $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T lymfocytech (medián)

GVH – kontrolní MLR bez imunotoxinu;
GVH+IT – MLR s imunotoxinem.



Obrázek č. 2: Průběh primární MLR na $\text{CD8}^+\text{CD25}^+$ T lymfocytech (medián)

GVH – kontrolní MLR bez imunotoxinu;
GVH+IT – MLR s imunotoxinem.



Obrázek č. 3: Flow cytometrická analýza $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T lymfocytů v primární MLR

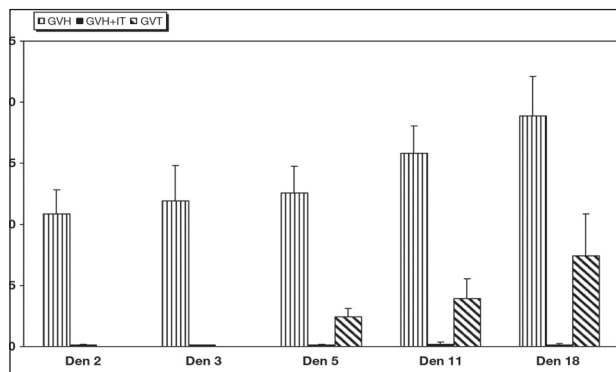
Příklad aktivace aloreaktivních CD3^+ T lymfocytů v MLR bez imunotoxinu (levý panel) a po inkubaci s imunotoxinem, kdy jsou selektivně depletovány aloreaktivní lymfocyty dárce (pravý panel).

Čtvrtý den od počátku kultivace byla MLR sklizena, promyta a rozdělena na dvě části obsahující stejný počet selektivně depletovaných dárcovských lymfocytů. První část byla následně stimulována ozářenými neleukemickými buňkami (kultura rGVH+IT) pro zjištění zbytkové reaktivity aloreaktivních klonů dárcovských lymfocytů. Druhá část byla stimulována ozářenými leukemickými buňkami stejného pacienta (kultura GVL) tak, aby byla navozena aktivace leukemie-specifických klonů T lymfocytů. 24 hodin po reaktivaci byla změřena produkce znaku CD25 v obou kulturách. V GVL kultuře dosahovala exprese znaku CD25 na CD4⁺ lymfocytech 0 – 7,5% (medián 2,45%), zatímco v kultuře buněk rGVH+IT 0 – 0,58% (medián 0,15%). Na CD8⁺ lymfocytech byla pozorována exprese znaku CD25 v 0 – 0,4% (medián 0,1%) u GVL a v rGVH+IT 0 – 0,19% (medián 0,11%). V kontrolní MLR došlo po reaktivaci k nárůstu populace CD4⁺CD25⁺ T lymfocytů: 10,4 – 16,4% (medián 12,58%), zvýšení exprese znaku CD25 bylo pozorováno i u CD8⁺ T lymfocytů: 6,5 – 13,1% (medián 8,19%).

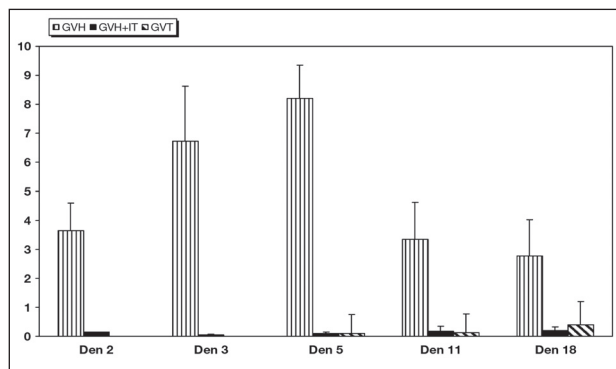
Desátý den proběhla další reaktivace obou kultur a po 24hod kultivaci následné měření na CD4⁺ T buňkách ukázalo, že v reaktivované GVL kultuře dochází podle očekávání k vyšší expresi znaku CD25 0,11 – 23,0% (medián 3,92%), kdežto v reaktivované rGVH+IT kultuře k výskytu CD25⁺ buněk nedochází téměř vůbec 0,14 – 0,34% (medián 0,17%). V GVL populaci CD8⁺ T lymfocytů dosáhlo procentuální zastoupení CD25⁺ buněk hodnot: 0,06 – 1,7% (medián 0,13%). Kontrolní reaktivovaná MLR vykázala hodnoty v CD4⁺CD25⁺ populaci T lymfocytů 8,79 – 21,2% (medián 15,81%), u CD8⁺CD25⁺ T lymfocytů pak došlo k poklesu hodnot: 2,8 – 5,9% (medián 3,35%), avšak v porovnání s buňkami v rGVH+IT 0 – 1,2% (medián 0,17%) byla exprese znaku CD25 stále významně vyšší.

Obdobných výsledků bylo dosaženo i po třetí reaktivaci, která proběhla v den 17. V reaktivované GVL kultuře bylo v den 18 naměřeno 1,1 – 9,6% (medián 7,46%) CD4⁺CD25⁺ T lymfocytů, v reaktivované GVH+IT kultuře pouze 0 – 0,23% (medián 0,14%). Kontrolní reaktivovaná MLR vykázala hodnoty u CD4⁺CD25⁺ T buněk 15,64 – 27,1% (medián 18,78%). V populaci CD8⁺ T lymfocytů byly naměřeny tyto procentuální zastoupení aktivovaných CD25⁺ lymfocytů: v GVL kultuře 0 – 1,3% (medián 0,4%), v rGVH+IT kultuře 0 – 1,1% (medián 0,21%) a v kontrolní GVH kultuře 1,6 – 5,4% (medián 2,77%).

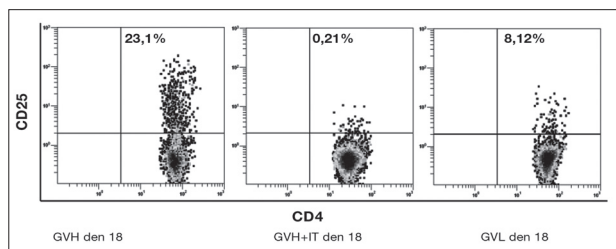
Mediány naměřených hodnot shrnují Obr. 4 a Obr. 5. Na Obr. 6 je znázorněna reprezentativní flow cytometrická analýza jednotlivých MLR u jednoho dárce. Můžeme tedy shrnout, že protileukemický (GVL) efekt dárcovských především CD4⁺ T lymfocytů byl dobře zachován (7,46%), zatímco nežádoucí aloreaktivní (GVH) reakce dárcovských buněk byla zcela potlačena, protože nedošlo k reaktivaci aloreaktivních T lymfocytů ani po opakované restimulaci ozářenými neleukemickými buňkami pacienta.



Obrázek č. 4: Průběh MLR – srovnání exprese znaku CD25⁺ na CD4⁺ T lymfocytech v jednotlivých reakcích (medián)
GVH – kontrolní MLR bez imunotoxinu a opakovanou stimulací neleukemickými buňkami pacienta;
GVH+IT – MLR s imunotoxinem a následnou stimulací neleukemickými buňkami pacienta;
GVL – MLR s imunotoxinem (pro navození selektivní deplece aloreaktivity) a následnou opakovanou stimulací leukemickými buňkami téhož pacienta.



Obrázek č. 5: Průběh MLR – srovnání exprese znaku CD25⁺ na CD8⁺ T-lymfocytech v jednotlivých reakcích (medián);
GVH – kontrolní MLR bez imunotoxinu a opakovanou stimulací neleukemickými buňkami pacienta;
GVH+IT – MLR s imunotoxinem a následnou stimulací neleukemickými buňkami pacienta;
GVL – MLR s imunotoxinem (pro navození selektivní deplece aloreaktivity) a následnou opakovanou stimulací leukemickými buňkami téhož pacienta



Obrázek č. 6: Příklad flow cytometrické analýzy CD4⁺CD25⁺ T-lymfocytů v sekundární MLR v den 18
GVH – kontrolní MLR bez imunotoxinu a opakovanou stimulací neleukemickými buňkami pacienta;
GVH+IT – MLR s imunotoxinem a následnou stimulací neleukemickými buňkami pacienta;
GVL – MLR s imunotoxinem (pro navození selektivní deplece aloreaktivity) a následnou opakovanou stimulací leukemickými buňkami téhož pacienta.

Literatura

1. Horowitz MM. Uses and growth of hematopoietic cell transplantation. In: Hematopoietic Cell Transplantation. 2 ed. Thomas ED, Blume KG, Forman SJ, eds. Blackwell Science, Inc., Maiden, MA, 2000: 8-15.
2. Mavroudis DA, Dermime S, Molldrem J, et al. Specific depletion of alloreactive T cells in HLA-identical siblings: a method for separating graft-versus-host and graft-versus-leukemia reactions. *Br J Haematol* 1998; 101: 565-570.
3. Collins RH Jr, Schpilberg 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.
4. Childs R., Chernoff A., Contentin N. et al. Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation. *The New England Journal of Medicine* 2000; 343 (11):750-758
5. Kolb HJ, Schmid C, Barrett AJ, Schendel DJ. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood* 2004; 103: 767-776.
6. Ferrara JL, Levy R, Chao NJ. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 1999; 5: 347-356.
7. Marmont AM, Horowitz MM, Gale RP, et al. T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood* 1991; 78: 2120-2130.
8. de Gast GC, Gratama JW, Verdonck LF, et al. The influence of T cell depletion on recovery of T cell proliferation to herpesviruses and Candida after allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 1989; 48: 111-115.
9. Barrett AJ, Mavroudis D, Tisdale J et al. T cell-depleted bone marrow transplantation and delayed T cell add-back to control acute GVHD and conserve a graft-versusleukemia effect. *Bone Marrow Transplant*. 1998;21:543-551.
10. Amrolia PJ, Muccioli-Casadei G, Huls H et al. Adoptive immunotherapy with allodepleted donor T-cells improves immune reconstitution after haploidentical stem cell transplantation. *Blood* 2006;108:1797-1808.
11. Vaclavkova P, Cao Y, Wu LK, Michalek J, Vitetta ES. A comparison of an anti-CD25 immunotoxin, Ontak and anti-CD25 microbeads for their ability to deplete alloreactive T cells in vitro. *Bone Marrow Transplant*. 2006;37:559-567.
12. Chen BJ, Cui X, Liu C, Chao NJ. Prevention of graft-versus-host disease while preserving graft-versus-leukemia effect after selective depletion of host-reactive T cells by photodynamic cell purging process. *Blood* 2002;99:3083-3088.
13. Ho VT, Soiffer RJ. The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2001; 98: 3192-3204.
14. Michálek J., Collins R.H., Durrani H.P., Václavková P., Ruff L.E., Douek D.C., Vitetta E.S.: Definitive separation of graft-versus-leukemia and graft-versus-host specific CD4+ T cell clones by virtue of their T cell receptor beta locus sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 1180-4.
15. Michálek J, Collins RH, Vitetta ES. The effect of chain immunotoxin different enhancers on the ability of an anti-CD25 ricin a to deplete cells which are activated in an MLR. *Blood* 2000; 96: 312b.
16. Michálek J., Collins R.H., Vitetta E.S.: Clinical-scale selective depletion of alloreactive T cells using an anti-CD25 immunotoxin. *Neoplasma* 2003; 50: 296-9.
17. Montagna D, Yvon E, Calcaterra V, et al. Depletion of alloreactive T cells by a specific anti-interleukin-2 receptor p55 chain immunotoxin does not impair in vitro antileukemia and antiviral activity. *Blood* 1999; 93: 3550-3557.

Korespondenční adresa:

Mgr. Eva Matějková

Univerzitní centrum buněčné imunoterapie, Masarykova univerzita, Brno

ILBIT, Pávilon A3, Kamenice 5, Brno, 625 00

ematej@med.muni.cz

549 498 448, 777 263 780

Došlo / Submitted: 31. 3. 2008

Přijato / Accepted: 20. 4. 2008

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.