

PREVENCE REAKCE ŠTĚPU PROTI HOSTITELI U PACIENTŮ PODSTUPUJÍCÍCH ALOGENNÍ TRANSPLANTACI HEMATOPOETICKÝCH KMENOVÝCH BUNĚK POMOCÍ ANTI-CD25 IMUNOTOXINU

PREVENTION OF GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE IN PATIENTS UNDERGOING ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION USING AN ANTI-CD25 IMMUNOTOXIN

MICHÁLEK J.^{1,2}, COLLINS R. H.³, VITETTA E. S.¹

¹ CANCER IMMUNOBIOLOGY CENTER, UNIVERSITY OF TEXAS SOUTHWESTERN MEDICAL CENTER, DALLAS, TEXAS, USA;

² 1. DĚTSKÁ KLINIKA, MASARYKOVA UNIVERZITA, BRNO;

³ BONE MARROW TRANSPLANTATION PROGRAM, DEPT. OF INTERNAL MEDICINE, UNIVERSITY OF TEXAS SOUTHWESTERN MEDICAL CENTER, DALLAS, TEXAS, USA.

Souhrn: Reakce štěpu proti hostiteli (GVH) je obávanou komplikací alogenní transplantace kostní dřeně. Hlavní roli hrají T lymfocyty dárce, které v konečném důsledku vedou k poškození tkání hostitele, především kůže, jater a gastrointestinálního traktu. Deplece alogenních T lymfocytů vede ke snížení rizika GVH nemoci, avšak současně narůstá riziko oportunních infekcí, relapsu základního onemocnění a odvrhnutí štěpu. Selektivní deplece pomocí anti-CD25 imunotoxinu vede k eliminaci nežádoucích aloreaktivních T lymfocytů a uchování ostatních žádoucích T lymfocytů dárce, které si zachovávají protileukemickou a protibakteriální reaktivitu. Tento přehledový článek shrnuje poznatky autorů z preklinického testování anti-CD25 imunotoxinu a podává rovněž obecnou charakteristiku imunotoxinů a možnosti jejich využití v protinádorové terapii.

Klíčová slova: T lymfocyt, reakce štěpu proti hostiteli, imunotoxin, transplantace

Summary: Graft-versus-host disease (GVHD) is a severe complication of allogeneic stem cell transplantation. Donor T cells play major role in GVHD leading to the host tissue damage, mainly of the skin, liver, and gastrointestinal tract. T cell depletion leads to a decreasing risk of GVHD but also to an increasing risk of opportunistic infections, a relapse of the underlying disease, and a graft rejection. The selective depletion using an anti-CD25 immunotoxin can eliminate harmful alloreactive T cells while preserving other donor T cells with antileukemic and antibacterial reactivity. This review summarizes preclinical testing of the anti-CD25 immunotoxin performed by the authors and presents general characteristics of immunotoxins in anticancer therapy.

Key words: T cell, graft-versus-host disease, immunotoxin, transplantation

Úvod

Alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk (HSCT) představuje účinnou léčbu mnoha hematologických maligních i nemaligních onemocnění, která by jinak byla nevléčitelná (1). V současné době se uplatňuje názor, že léčebný potenciál HSCT spočívá zejména v uplatnění protinádorové aktivity dárce (alogenních) T lymfocytů schopných navodit reakci štěpu proti leukémii/nádoru (GVL=graft-versus-leukemia; GVT=graft-versus-tumor) (2). Alogenní T lymfocyty však často současně vedle žádoucího GVL efektu způsobují reakci štěpu proti hostiteli (GVH=graft-versus-host), která je jednou z hlavních příčin morbidit a mortality transplantovaných pacientů (1,3). Akutní GVH nemoc je zprostředkována alogenními T lymfocyty, které jsou stimulovány antigeny hlavního a vedlejšího histokompatibilního systému (HLA; mHA) příjemce transplantátu. Tyto aktivované T lymfocyty, charakterizované přítomností α receptoru pro interleukin IL-2 (CD25⁺) 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 traktu (3,4). Protože GVH reakce je způsobena T lymfocyty, jejich odstranění by mělo zabránit vzniku GVH nemoci. V klinických studiích s HLA-identickými příbuznými dárči bylo ověřeno, že při depleci dárce T lymfocytů pod 10⁵/kg hmotnosti příjemce zpravidla nedochází k život ohrožující GVH nemo-

ci (5). V případě HLA-identických nepřibuzných dárců a HLA-neidentických příbuzných dárců musí být deplece T lymfocytů ještě o jeden řád větší. Deplece dárce T lymfocytů však přináší nové problémy spojené s velmi opožděnou rekonstitucí imunitního systému po transplantaci: vysoké riziko oportunních infekcí, relaps základního onemocnění a rejekce transplantátu (6).

Jako ideální se tedy jeví přístup, který by eliminoval pouze ty dárce T lymfocyty, které jsou zodpovědné za GVH reaktivitu, avšak ponechal T lymfocyty s protinádorovou a protiinfekční reaktivitou. Realizace této myšlenky spočívá na předpokladu, že GVH a GVL jsou zprostředkovány různými klony T lymfocytů, a tedy je lze od sebe oddělit (2). Jeden ze způsobů jak eliminovat GVH-reaktivní klon dárce T lymfocytů spočívá v jejich aktivaci nenádorovými buňkami příjemce a následné eliminaci aktivovaných lymfocytů. Nenádorové buňky (izolované z periferní krve) příjemce jsou většinou snadno dostupné před transplantací. T lymfocyty dárce jsou pak *in vitro* vystaveny ozářeným nenádorovým leukocytům příjemce v tzv. smíšené lymfocytární reakci (MLR = mixed lymphocyte reaction). Klony dárce T lymfocytů, které rozpoznávají příjemcovy buňky jako cizorodé, se aktivují a exprimují CD25 molekuly na svém povrchu. Již dříve jsme popsali (7), že takto aktivované CD25⁺ T lymfocyty lze eliminovat pomocí vysoce specifického anti-CD25 imunotoxinu (8), aniž by byla výrazně poškozena zbývající populace dárce T lymfo-

cytů, která si zachovává antileukemickou a antimikrobiální reaktivitu (7,9). Pro detailní pochopení funkce anti-CD25 imunotoxinu je v následujících sekcích pojednáno o aktivaci T lymfocytů a obecně o přípravě imunotoxinů. Závěrečná sekce pak shrnuje naše preklinické a klinické poznatky využívající anti-CD25 imunotoxin k prevenci GVH nemoci.

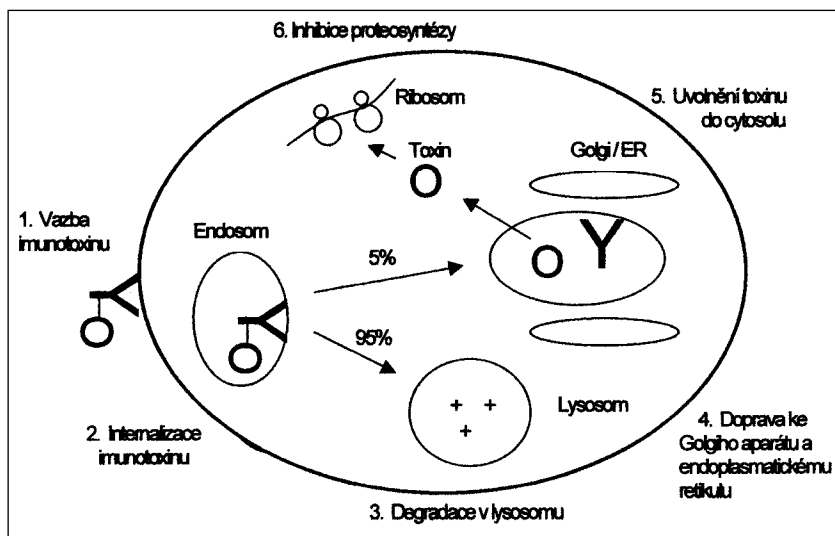
Aktivace T lymfocytů

Naivní T lymfocyty mohou setrvat po mnoho let v klidovém stavu bez dělení (10). Jejich proliferace a diferenciace záleží na stimulaci růstovým faktorem, kterým je cytokin produkovaný aktivovanými T lymfocyty – interleukin IL-2 (10). Iniciální signál přichází od specifického antigenu, který je T lymfocytům předkládán společně s molekulou hlavního histokompatibilního komplexu antigen prezentujícími buňkami (makrofágy, dendritickými buňkami, B lymfocyty). Pokud T lymfocyt dostane další kostimulační signál (zprostředkovaný CD28, CD40L) vstupuje klidová T buňka do fáze G₁ buněčného cyklu a současně je indukována tvorba IL-2 a α řetězce IL-2 receptoru (IL-2R). IL-2R má tři řetězce: α, β a γ. Řetězce α a γ jsou exprimovány klidovými T lymfocyty a jeví nízkou afinitu vůči IL-2. Připojením α řetězce, označovaného jako molekula CD25, vzniká receptor s mnohonásobně vyšší afinitou k IL-2, který umožňuje aktivaci T lymfocytů již při velmi nízkých koncentracích IL-2. Během několika dnů pak dojde k aktivaci a expanzi klonu T buněk specifických vůči původně předkládanému antigenu (10).

Charakteristika imunotoxinů

Jako imunotoxiny označujeme hybridní molekuly vzniklé navázáním účinného toxinu na molekulu monoklonální protilátky (MAB = monoclonal antibody) (11). Používané toxiny jsou zpravidla vysoce čištěné látky proteinové povahy získávané z rostlin, plísní nebo bakterií. Toxin je spojen s MAB a po jejím navázání na specifické struktury na povrchu cílové buňky je internalizován do cytosolu. Aby toxin mohl splnit svou funkci, musí být dopraven k ribosomálnímu komplexu, kde blokuje proteosyntézu a vede k zániku cílové buňky. Ke zničení cílové buňky stačí velmi malé množství imunotoxinu ve srovnání s použitím samotných nekonjugovaných MAB. V pokusech *in vitro* byly zaznamenány klinické odpovědi po podání miligramových dávek nekonjugovaných MAB, zatímco imunotoxiny byly vysoce účinné i při koncentracích minimálně o tři řády niž-

Obr. 1: Mechanismus působení imunotoxinu (popis v textu).



ších (11, 12). Teoreticky lze za letální dávku pro cílovou buňku považovat jedinou molekulu imunotoxinu, která je po internalizaci do cytosolu dopravena k ribosomálnímu komplexu. Výhodou imunotoxinů je rovněž schopnost působit na klidové i dělicí se buňky. Působení imunotoxinů není vázáno na buněčný cyklus a nádorové buňky nacházející se ve fázi Go jsou rovněž zasaženy (12).

Imunotoxiny byly poprvé popsány počátkem 80. let. Od té doby byla izolována celá řada toxinů z různých rostlin, plísní a bakterií. Přehled nejpoužívanějších toxinů ukazuje Tab. 1 (12). V současné době nejvíce používanými jsou A řetězec ricinu, pseudomonádový exotoxin a difterický toxin. Mechanismus účinku imunotoxinů je následující (viz Obr. 1) (12):

1. Navázání imunotoxinové monoklonální protilátky na specifické antigenní místo na povrchu cílové buňky.
2. Internalizace imunotoxinu do cytosolu endocytózou.
3. Většina (95%) imunotoxinu je degradována v lysosomech.
4. Část imunotoxinu (5%) je dopravena v endosomu ke Golgiho aparátu a endoplasmatickému retikulu.
5. Odštěpení toxinu od MAB a jeho vyplavení do cytosolu.
6. Volný toxin enzymaticky inhibuje proteosyntézu inaktivací elongačního faktoru 2 (EF2) nebo 28s ribozomální podjednotky.

Toxiny

Rostlinné toxiny (13) můžeme rozdělit podle struktury do dvou skupin. První skupina zahrnuje toxiny s jedním enzymaticky aktivovatelným proteinem, zatímco druhá skupina obsahuje proteiny se dvěma proteinovými řetězci A a B. Řetězec A má enzymatickou aktivitu a řetězec B odpovídá za vazbu a vstup do buňky. Řetězec B obsahuje galaktózu vázající domény, které se váží na všechny galaktózu obsahující glykoproteiny a glykolipidy, tedy se váží v různé míře na všechny savčí buňky. Proto je nutné, při používání druhé skupiny toxinů, řetězec B odstranit nebo pozměnit. Toto je případ často používaného ricinu, u kterého je využíván pouze řetězec A, zatímco řetězec B je odstraněn (8). Pro obě skupiny rostlinných toxinů je charakteristické rozštěpení 28s podjednotky ribozomální RNA, což znemožňuje interakci s elongačním faktorem EF2 (13). Bakteriální toxiny (pseudomonádový exotoxin a difterický toxin) sestávají z jednoho polypeptidového řetězce, který obsahuje různé domény pro enzymatickou funkci, vazbu a vstup do buňky. Difterický toxin i pseudomonádový exotoxin působí inhibiči proteosyntézy prostřednictvím inaktivace EF2 (14). Mitogillin, alfa-sakrin a restriktocin jsou plísněvé proteiny s ribonukleázovou aktivitou. Mají malou molekulu (17 kDa) a sdílí vysoký stupeň homologie aminokyselin. Mitogillin

Tab. 1: Přehled nejpoužívanějších imunotoxinů.

Zdroj	Toxin	Místo působení
Rostliny	Saporin* Gelonin* Momordin* Trichosantin* Abrin** Ricin** Viscumin**	28s podjednotka rRNA
Bakterie	Difterický toxin Pseudomonádový exotoxin	Elongační faktor EF2
Plísně	Alfa-sakrin Mitogillin Restriktocin	28s podjednotka rRNA

* rostlinný toxin jednořetězcový, ** dvouřetězcový.

a restriktocin byly připraveny rekombinantně a v pokusech na myších se jevíly výhodně, neboť byly pouze slabě imunogenní a měly pouze nízkou nespecifickou toxicitu. Bohužel jejich inhibiční účinek na proteosyntézu byl pouze 20-40% ve srovnání s A řetězcem ricinu (12).

Vazba mezi toxinem a monoklonální protilátkou

Spojení toxinu s MAB musí zůstat neporušeno extracelulárně, ale musí být labilní intracelulárně tak, aby mohl být samotný toxin uvolněn do cytosolu cílové buňky (8). Tohoto požadavku je zpravidla dosahováno disulfidovou vazbou mezi toxinem a MAB (12). Vazba toxinu k MAB musí být vzhledem k *in vivo* terapii stabilní v krvi a tkáních. Vzhledem k tomu, že krev i tkáň obsahují thiolové skupiny, které mohou narušovat disulfidové vazby, byla vyvinuta speciální strategie spočívající v navázání objemných skupin kolem disulfidové vazby (8,12). Tímto mechanismem je značně ztíženo narušení disulfidové vazby a je tak zaručena vyšší stabilita imunotoxinů v krvi a ve tkáních.

Cílové antigeny

Nejdůležitější vlastností cílového antigenu na povrchu buňky je schopnost zajistit internalizaci molekuly imunotoxinu do cytosolu. Aby byl tento mechanismus účinný, nesmí se imunotoxin dostat pouze do lyzozomu, kde je zničen (14). Proto je nutné najít takové struktury na povrchu buňky, které jsou nejenom internalizovány cestou lyzozomů, ale také mechanismem endocytózy. Tímto způsobem jsou například internalizovány receptory pro růstové hormony, které slouží jako výborné terče pro imunotoxiny (12). Z pohledu internalizace imunotoxinu je také důležité umístění vazebného místa na extracelulární části proteinu v cytoplasmatické membráně. Pokud se cílová struktura, na kterou se váže MAB imunotoxinu, nachází na extracelulární části membránového proteinu blíže cytoplasmatické membrány, je zajištěna lepší internalizace imunotoxinu, než v případě, kdy se vazebné místo nachází na distálním konci extracelulární části tohoto proteinu (12). Je nezbytné, aby se cílový antigen nacházel výhradně na buňkách určených k likvidaci imunotoxinem a nebyl přítomen na ostatních buňkách.

Nežádoucí účinky imunotoxinů

Použití imunotoxinů *in vivo* v klinické praxi je omezeno jejich imunogenicitou a toxicitou. Imunogenicita je problémem myších monoklonálních protilátek a také samotných toxinů. Bezprostředně po aplikaci se může objevit hypersenzitivní reakce (horečka, třesavka, vyrážka, anafylaktický šok), zejména po opakovaném podání. Během 1-3 měsíců vznikají HAMA (human anti-mouse antibodies = lidské protilátky proti myším MAB) a další terapie imunotoxiny přestává být účinná. Potlačení hypersenzitivní reakce je možné pomocí imunosupresiv. Zabránění tvorby HAMA bylo dosaženo tzv. humanizací MAB, která spočívá v náhradě molekuly myšího imunoglobulinu lidským, s výjimkou hypervariabilní části obsahující vazebné místo pro cílovou antigenní strukturu, která zůstává myší

Protilátky proti toxinům vznikají u 30-100% pacientů a jejich dlouhodobé opakované podání je potom minimálně účinné nebo zcela neúčinné. Nejlépe je tato situace prostudována u A řetězce ricinu, kde se tyto protilátky označují jako HARA (human anti-ricin antibodies). Jejich vzniku nelze zabránit, neboť po odstranění imunogenní části toxinu se ztrácí i jeho účinnost při blokadě proteosyntézy cílové buňky.

Limitujícím faktorem imunotoxinů je jejich vysoká toxicita, která má zpravidla uniformní charakter. V klinických studiích fáze I byl hlavním faktorem limitujícím eskalaci dávky tzv. vascular leak syndrome (VLS) a hepatotoxicita. VLS je charakterizován zvýšenou propustností kapiolár s únikem tekutin a bílkovin. Klinická manifestace VLS zahrnuje hypoalbuminemii, edém plic, periferní otoky, perikardiální výpotek, hypotenzi,

váhový přírůstek a může vyústit v kardiopulmonální selhání. Příčinou VLS je poškození endotelu cév toxinem. Například A řetězec ricinu reaguje s humánním alfa-2 makroglobulinem a fibronektinem v cévní stěně a vede k její destrukci. Na myších modelech k VLS téměř nedochází, a proto se tato nepředvídatelná toxicita, která limituje eskalaci dávky imunotoxinu, projevila až během klinických zkoušek fáze I. Na druhou stranu mírný VLS je žádoucí, vzhledem k dopravě imunotoxinu až na povrch nádorové buňky v nádorové tkáni. Hepatotoxicita s elevací jaterních enzymů je zpravidla reverzibilní, je častá zejména při použití pseudomonádového exotoxinu, který se váže na jaterní buňky a vede k jejich poškození.

Klinické aplikace imunotoxinů

Klinické testování imunotoxinů bylo zahájeno koncem 80. let. Použití rekombinantních imunotoxinů v klinických studiích fáze I se objevuje v průběhu 90. let. Zatím nejlepších výsledků bylo dosaženo u hematologických malignit při likvidaci reziduální populace leukemických nebo lymfomových buněk (15-17). Léčba solidních nádorů s velkou nádorovou masou pomocí imunotoxinů nebyla příliš úspěšná. Je to způsobeno špatnou penetrací imunotoxinů do ložiska nádoru, systémovou toxicitou limitující zvyšování dávky a vznikem HAMA a HARA (12). Další cestou může být kombinace imunotoxinů s konvenční protinádorovou terapií. V současné době jsou k dispozici preklinické i klinické studie, které prokazují synergní účinek a bezpečnost kombinovaného podání imunotoxinů s chemoterapií, převážně u hematologických malignit (15-17).

Vzhledem k výrazné toxicitě *in vivo* (15-17) byly v posledních letech hledány způsoby využití imunotoxinů *in vitro*. Transplantace hematopoetických kmenových buněk představuje jeden z příkladů *in vitro* aplikace imunotoxinů. Čištění transplantátu od nádorových buněk může najít uplatnění v případě autologní transplantace u akutní lymfoblastické leukemie, non-hodgkinského lymfomu, mnohočetného myelomu (anti-CD19, anti-CD22 imunotoxiny) a akutní myeloidní leukemie (anti-CD33 imunotoxin). Jak bylo zmíněno v úvodu, anti-CD25 imunotoxin může být využit pro selektivní depleci aloreaktivních T lymfocytů při alogenní HSCT, o čemž podrobněji pojednává následující sekce.

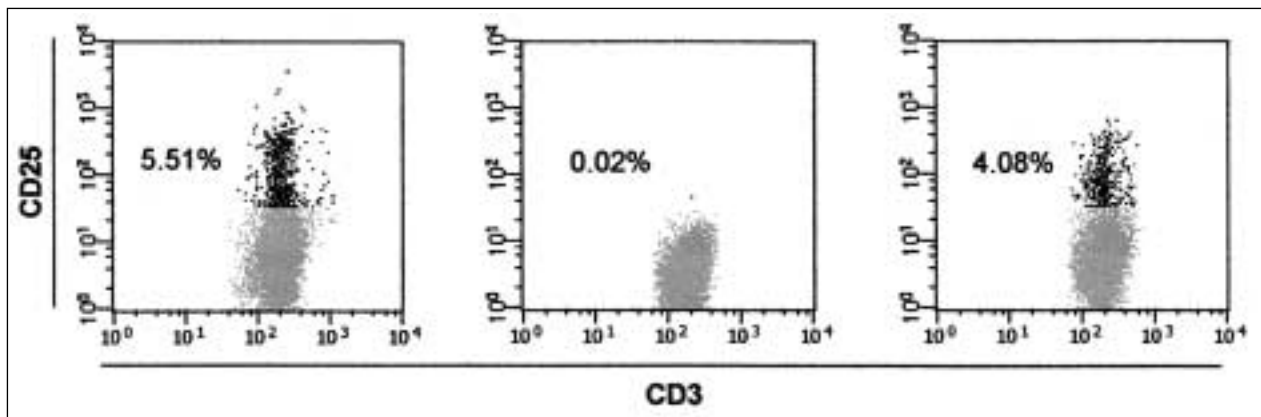
Selektivní deplece aloreaktivních T lymfocytů

Vysoká specifita anti-CD25 imunotoxinu (IT) umožňuje cílenou likvidaci aloreaktivních T lymfocytů *in vitro* (7). Tímto způsobem se lze vyhnout toxicitě imunotoxinu spojené s jeho podáním *in vivo*. Na základě našich předchozích experimentů se zdravými HLA-neidentickými dobrovolníky v malém měřítku (10^6 dárcovských T lymfocytů v MLR) jsme byli schopni definovat optimální podmínky působení anti-CD25 IT (8). Ukázalo se, že jeho podání má maximální účinek, pokud jsou nejprve inkubovány buňky dárce (RC=responder cells) a ozářené buňky příjemce (SC=stimulator cells) 24 hodin bez IT a poté je na dalších 24 hodin přidán IT v koncentraci 10^{-8} M. Tímto způsobem lze dosáhnout deplece až 90% aloreaktivních lymfocytů. Při použití vyšší koncentrace imunotoxinu dochází k nespecifické eliminaci ostatních T lymfocytů. Pokud se společně s IT podá chlorid amonný 10-20mM, který potencuje účinek IT, lze eliminovat až 99% aloreaktivních buněk. Podání samotného chloridu amonného v koncentraci ≤ 10 mM nemá žádný efekt na viabilitu buněk; >10 mM koncentrace vede ke snížení viability buněk (8).

Na základě těchto poznatků jsme přistoupili k testování ve „střední“ MLR s 10^8 RC za stejných podmínek jako v „malé“ MLR. Podání 10^{-8} M IT společně s 10mM chloridem amonným vedlo k depleci 99,3 % aloreaktivních lymfocytů, viabilita však poklesla na 66%. Další optimalizací experimentů v 5 „středních“ MLR bylo dosaženo nejlepších výsledků při použití dvou 24 hodinových inkubací: první s 10^{-8} M IT a 6mM NH_4Cl , druhé s $0,5 \times 10^{-8}$ M IT a 6mM NH_4Cl . Po první 24hodi-

Obr. 2: Eliminace aloreaktivních T lymfocytů se zachováním protileukemického efektu.

PBMC HLA-identického příbuzného dárce byly 3 dny *in vitro* stimulovány ozářenými neleukemickými PBMC pacienta s akutní myeloidní leukémií, který podstoupil allogenní HSCT (levý panel). Po aplikaci anti-CD25 IT a NH_4Cl došlo k > 2log depleci aloreaktivních T lymfocytů (střední panel), které si po 3-denní stimulaci pacientovými leukemickými buňkami zachovávají protileukemickou aktivitu (pravý panel). Všechny panely znázorňují populaci živých dárcovských $\text{CD}3^+$ T lymfocytů. Aktivované $\text{CD}25^+$ T lymfocyty jsou znázorněny černě. Výsledky u druhého páru dárce/pacient se významně nelišily od znázorněného.



nové inkubaci došlo k průměrné depleci 99,2 % (98,6-99,7 %) aloreaktivních lymfocytů, po druhé inkubaci byla zaznamenána průměrná deplece 99,9 % (99,7-100 %) aloreaktivních lymfocytů při zachování více než 70% vitality buněk a více než 85 % reaktivitě vůči aloantigenům od jiného nepřibuzného dárce. Obdobných výsledků bylo dosaženo s použitím 1/5 SC pro stimulaci RC, což má praktický význam pro klinickou studii s anti-CD25 IT u pacientů podstupujících allogenní HSCT, kdy lze použít pouze pětinu PBMC příjemce ke stimulaci dárcovských buněk.

Pro účely klinické studie by bylo racionální použít 10^7 alodepletovaných dárcovských T lymfocytů /kg hmotnosti příjemce, neboť populace zbývajících aloreaktivních buněk bude $<10^5$ /kg hmotnosti příjemce, což je dávka zpravidla nezpůsobující těžkou GVH nemoc u HLA-identických příbuzných allogenních HSCT (5,18). Proto jsme testovali „velkou“ MLR s celkovým počtem 10^9 RC za optimalizovaných podmínek nalezených ve „střední“ MLR na třech párech zdravých HLA-identických dobrovolníků a dvou párech leukemických pacientů (jeden pacient s akutní myeloidní leukémií, jeden pacient s akutní lymfoblastickou leukémií) a jejich HLA-identických

dárců. Výsledky ukázaly průměrnou depleci 99,6 % (99,1-99,9 %) aloreaktivních T lymfocytů, průměrnou viabilitu 74,6 % (68,2-89,7 %) dárcovských buněk a zachování 89,2 % (72,6-98,3 %) reaktivity vůči allogenním PBMC od jiného nepřibuzného dárce nebo vůči leukemickým buňkám, v případě dvou párů pacientů a jejich dárců (viz Obr. 2). Výsledky těchto experimentů ukazují, že anti-CD25 imunotoxin je schopen specificky eliminovat aloreaktivní $\text{CD}25^+$ lymfocyty v klinickém měřítku minimálně o 2log *in vitro* při zachování viability dárcovských buněk a jejich reaktivity vůči jiným aloantigenům. Tyto experimenty budou sloužit jako podklad pro klinickou studii fáze I zahajovanou počátkem roku 2003 na Texaské Univerzitě v Dallasu, USA.

Závěr

Uplatnění imunotoxinů jako vysoce specifické protinádorové imunoterapie je limitováno především jejich toxicitou *in vivo*. Nové uplatnění anti-CD25 imunotoxinu *in vitro* u pacientů podstupujících allogenní HSCT se jeví jako velmi slibná a účinná metoda pro eliminaci aloreaktivních T lymfocytů a prevenci GVH nemoci při zachování žádoucí GVL/GVT reaktivity.

Literatura

- 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.
- Mavroudis DA, Dermime S, Mouldrem 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.
- Ferrara JL, Levy R, Chao NJ. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 1999; 5: 347-356.
- Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, et al. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* 1997; 90: 3204-3213.
- Marmont AM, Horowitz MM, Gale RP, et al. T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood* 1991; 78: 2120-2130.
- 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.
- Michálek J, Collins RH, Vitetta ES. The effect of different enhancers on the ability of an anti-CD25 ricin α chain immunotoxin to deplete cells which are activated in an MLR. *Blood* 2000; 96: 312b.
- Engert A, Martin G, Amlot P, et al. Immunotoxins constructed with anti-CD25 monoclonal antibodies and deglycosylated ricin A-chain have potent anti-tumour effect against human Hodgkin cells in vitro and solid Hodgkin tumours in mice. *Int J Cancer* 1991; 94: 450-456.
- Montagna D, Yvon E, Calcatera 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.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD (eds.). *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 4-th ed. Garland Publishing, New York 1999.
- Multani PS, Grossbard ML. Monoclonal antibody-based therapies for hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 1998, 16: 3691-3710.
- Farah RA, Clinchy B, Herrera L, et al. The development of monoclonal antibodies for the therapy of cancer. *Crit Rev Eucaryot Gene Express* 1998; 8: 321-356.
- Barbieri L, Battelli MG, Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochem Biophys Acta* 1993; 154: 237-243.
- Pastan I, Chaudhary V, Fitzgerald DJ. Recombinant toxins as novel therapeutic agents. *Annu Rev Biochem* 1992; 61: 331-342.
- Schnell R, et al. Clinical trials with an anti-CD25 ricin A-chain experimental and immunotoxin (RFT5-SMPT-dgA) in Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1998, 30: 525-537.
- Kreitman RJ, et al. Responses in refractory hairy cell leukemia to a recombinant immunotoxin. *Blood* 1999, 94: 3340-3348.
- LeMaistre CF, et al. Phase I trial of a fusion-protein (DAB₃₈₉IL-2) in lymphomas expressing the receptor for interleukin-2. *Blood* 1998, 91: 399-405.
- 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.