

AUTOLOGNÍ TRANSPLANTACE S PODÁNÍM INTERLEUKINEM 2 AKTIVOVANÉHO ŠTĚPU PERIFERNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK NEMOCNÝM S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMIÍ

AUTOLOGOUS TRANSPLANTATION USING INTERLEUKIN 2 ACTIVATED PERIPHERAL BLOOD STEM CELL GRAFT IN CHRONICAL MYELOID LEUKEMIA PATIENTS

^{1,3}HÁJEK R., ¹ŽÁČKOVÁ D., ³PENKA M., ¹KRAHULCOVÁ E., ^{1,2}KOŘÍSTEK Z., ²VINKLÁRKOVÁ J., ²ADLER J.,
²JANOVSKÁ E., ⁴INDRÁK K., ⁴FABER E., ¹DOUBEK M., ¹KLABUSAY M., ⁵OLTOVÁ A., ⁶KUČLÍK P.,
¹DVOŘÁKOVÁ D., ³BOURKOVÁ L., ⁷DUŠEK L., ^{3,7}MAREŠCHOVÁ I., ¹MAYER J., ¹VORLÍČEK J.

¹INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA FN BRNO

²TKAŇOVÁ BANKA FN BRNO

³ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE FN BRNO

⁴HEMATO-ONKOLOGICKÁ KLINIKA FN OLOMOUC, ČR

⁵ODDĚLENÍ LÉKAŘSKÉ GENETIKY FN BRNO

⁶KATEDRA GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA MASARYKOVY UNIVERZITY
BRNO

⁷UNIVERZITNÍ ONKOLOGICKÉ CENTRUM LÉKAŘSKÉ FAKULTY MASARYKOVY UNIVERZITY BRNO

Souhrn: Úvod: V letech 1997 a 1998 jsme připravili ke klinickému použití protokol buněčné imunoterapie - aktivaci autologního transplantátu periferních kmenových buněk (PKB) interleukinem 2 (IL-2) využíjící "ex vivo" nespecifickou stimulaci imunokompetentních buněk (NK a T buněk štěpu). Interleukin 2 (IL-2) je jedním ze základních imunomodulačních cytokinů. IL-2 stimuluje proliferaci T buněk a NK buněk (Natural Killer) in vitro i in vivo. Jeho klinický přínos u hematologických malignit zatím nebyl zcela ujasněn. Pro klinickou experimentální práci jsme vybrali diagnózu CML, u které lze léčebný účinek velmi přesně monitorovat a imunoterapie zde má zásadní význam. Metody a nemocní: Ke dni 31.5.1999 bylo 8 nemocným s CML v chronické či akcelerované fázi

podán IL-2 aktivovaný autologní štěp ve fázi I/II klinické studie. Sběr PKB byl proveden po podání mobilizačního chemoterapeutického režimu mini ICE (idarubicin, cytosin-arabinosid, etoposid) s následnou transplantací s využitím busulfanu 12-16 mg/m², jako přípravné vysokodávkované chemoterapie. Po podání IL-2 aktivovaného štěpu následovala měsíční imunoterapie (IL-2 0,5 x 10⁶ IU/m²/den a GM-CSF 75g/m²/den, vše s.c.) a nejméně 6-ti měsíční léčba interferonem alfa. Z 8 zařazených nemocných podstoupilo 5 transplantaci a 3 nemocným byl podán aktivovaný štěp bez busulfanu, pro nemožnost získat štěp periferních kmenových buněk. Výsledky: Časná peritransplantační mortalita byla 0 % (0/5), sběr štěpu úspěšný u 71 % nemocných (5/7), doba do sběru štěpu s mediánem 22,0 dne (19-25), doba do přijetí štěpu s mediánem 15 dní (11-18), ale u jednoho nemocného musel být podán záložní štěp (přijetí den +95). Tolerance transplantační procedury i následné imunoterapie byla velmi dobrá. U 5 z 8 nemocných došlo ke zlepšení stavu onemocnění. U všech nemocných ve fázi akcelerace došlo k přesunu do chronické fáze. U dvou nemocných bylo pozorované zlepšení cytogenetického nálezu. Závěr: Vybraný vysokodávkovaný chemoterapeutický režim i následná imunoterapie byly dobře tolerovány. Přijetí štěpu může být problematické u výrazně předlčených nemocných. Zvolený léčebný postup nevedl k navození kompletní cytogenetické remise, ale u nemocných došlo ke zlepšení a stabilizaci onemocnění na úrovni chronické fáze nejméně po dobu 6 měsíců po provedení transplantace. Nelze rozhodnout, zda hlavním přínosem bylo provedení autologní transplantace, podání imunoterapie nebo jejich kombinace.

Klíčová slova: CML, IL-2, imunoterapie, transplantace

Abstract: Efficacy of a protocol of adoptive immunotherapy using IL-2 activated autologous graft followed with IL-2 and GM-CSF immunotherapy was investigated. Interleukin 2 (IL-2) can generate non-specific cytotoxic effectors like Natural Killer (NK) cells. Protocol was activated in patients with chronic myeloid leukemia, in which treatment response can be monitored on molecular level and immunotherapy plays fundamental role in the treatment. Methods and Patients: 8 patients (pts.) with late chronic phase (CP) or accelerated phase (AP) of CML received IL-2 activated graft. Mini ICE (idarubicin, Ara-C, etoposid) was used before PBSC collection, busulphan 12-16 mg/m² was used as myeloablative regimen. One-month immunotherapy (IL-2 0,5 x 10⁶ IU/m²/day/s.c/days 2-28; GM-CSF 75g/m²/day/s.c/days 7-28) was followed 6-months interferon alpha therapy (3x3MU/wk). 3 pts. received IL-2 activated back-up only due to insufficient PBSC collection. Results: Early transplant related mortality was 0 % (0/5), collection of autologous graft was successful in 71 % pts., median of the time to graft collection was 22,0 days (19-25), neutrophil engraftment occurred on day 15 (median) (range 11-18) in 4 pats. One pt. required back-up infusion with engraftment on day +95. Toxicity of chemotherapy (mini-ICE, busulphan) was acceptable; toxicity of immunotherapy was minimal. 5 of 8 patients improved their disease (from AP to CP), two cytogenetic responses (1/1; major/minor) were observed. Conclusion: Autologous transplantation followed with low dose immunotherapy had acceptable toxicity and stabilized disease in chronic phase in patients with late chronic phase or accelerated phase of CML. Engraftment and graft collection could be problems in these patients. Based on these results we can not decide if more important for improvement of patients is responsible transplantation procedure or immunotherapy.

Key words: CML, IL-2, immunotherapy, transplantation

Úvod

Jediným léčebným postupem s možností kompletního vyléčení nemocných s chronickou myeloidní leukémií (CML) je v současnosti alogenní transplantace kostní dřeně (TKD) nebo

převod alogenních periferních kmenových buněk (PKB) (1). Přibližně v 75 % indikací není nalezen vhodný dárce nebo je alogenní transplantace kontraindikovaná z jiných důvodů. Vlastní provedení alogenní transplantace je poměrně rizikovou

procedurou s vyšší mortalitou ve skupině nepřibuzenských dárků (2, 3). Zkouší se řada experimentálních léčebných postupů s cílem najít léčebnou strategii s kurativním potenciálem a případně nižší toxicitou. Perspektivní se zdají metody modulující reakci štepů proti hostiteli (graft versus host disease - GVHD), protokoly využívající nemyeloablativní režimy (4). Léčebná účinnost autologní TKD nebo autologního převodu PKB je limitovaná kontaminací štepů nádorovými progenitory a především nepřítomností reakce štepů proti nádoru. Výsledky doposud publikovaných nerandomizovaných studií naznačují, že časné zařazení autologní TKD by mohlo být přínosem oproti standardní léčbě (5). Bohužel má ale většina přežívajících nemocných známky relapsu onemocnění (6). Prodloužení života bude způsobeno především snížením nádorové masy vysokodávkovanou léčbou a následným zpomalením přirozeného vývoje onemocnění. Ke kompletní eliminaci nádorových buněk, kterou je v některých případech vidět po alogenní transplantaci, však nedochází. Existuje řada prací snažících se o snížení nebo odstranění nádorových progenitorů ze štepů u nemocných s CML podstupujících autologní TKD. Postupy "in vivo" čištění štepů (předtransplantační indukční a mobilizační chemoterapie) i manipulace se štěpem „ex vivo“, by měly vést k získání maximálně čistého štepů při udržení dostatečné kvality štepů pro časné a kvalitní přilhojení transplantátu. Smysluplnost takového úsilí není jasná a neexistuje žádná randomizovaná studie prokazující přínos takového postupu pro zlepšení výsledků transplantační léčby (6, 7, 8). Je téměř jisté, že vysokodávkovaná chemoterapie není schopna kompletně eradikovat nádorové hematopoetické kmenové buňky. Autologní TKD však může vytvořit dobrou startovací pozici pro zesílení léčebného efektu imunoterapie tím, že uvádí chorobu do stavu minimální zbytkové choroby. Tato situace se dnes obecně považuje za stav, při kterém může mít nemocný podstupující autologní transplantaci největší užitek z imunoterapie vzhledem k limitované schopnosti imunitního systému eradikovat nádor. Nepřímým důkazem je pozorování obnovy citlivosti CML na INF po provedení autologní TKD a zpravidla použití nižší dávky INF po autologní TKD, než při zahájení léčby (6). Existuje dostatečné množství vědeckých podkladů pro tvrzení, že CML je nádorovým onemocněním, kde má reakce štepů proti leukémii (graft versus leukemia effect - GVL) klíčovou roli v léčbě onemocnění (9) a kde má reakce GVL na léčebné odpovědi větší podíl než vysokodávkovaná chemoterapie, podaná v rámci transplantačního režimu. Stimulace autologní GVHD, respektive autologního GVL efektu, je dnes ověřenou skutečností na zvířecích modelech i v klinických studiích u různých experimentálních nádorů, včetně leukémie. Autologní efekt GVHD lze vyvolat cyklosporinem (10), IL-2 (11), aktivací LAK (lymfokiny aktivovaní zabíječi) buněk pomocí IL-2 (12), převodem autologního štepů kultivovaného s cytokiny (13). Klinické studie probíhají. Přínos takového postupu není zatím v klinické praxi jasně prokázán. Je prokázána cytotoxická aktivita aktivovaných NK buněk u CML (14). O specifických T lymfocytech, schopných cíleně ničit buňky CML mechanismem omezeným na HLA komplex, jsou rozporuplné informace (15). Byla prokázána specifická aktivita T lymfocytů proti proteinu p210. Využití aktivovaných autologních T lymfocytů proto může mít své opodstatnění (16). Je ověřené, že peptidy připravené z povrchu leukemických buněk mohou sloužit jako specifické antigeny pro stimulaci specifické protinádorové T-buněčné léčebné odpovědi (17). V této době běží klinické studie s INF nebo s INF a IL-2 jako udržovací léčbou u CML po provedení autologní TKD, studie zkoušející vyvolat autologní reakci štepů proti leukémii pomocí aktivovaných LAK a NK buněk získaných z periferní krve (8, 18). Interleukin 2 je zkoušen v léčbě řady hematologických malignit a v proběhlých klinických studiích nebyl prokázán jeho zásadní léčebný efekt (19, 20). V této práci popisujeme naše výsledky fáze I/II klinické studie,

ve které jsme u nemocných s CML využili kombinace autologní transplantace IL-2 aktivovaným štěpem PKB s okamžitou krátkodobou jednoměsíční imunoterapií pomocí GM-CSF a IL-2 a následnou udržovací léčbou INF. Onemocnění CML bylo vybráno záměrně jako vhodný model pro sledování účinnosti experimentální léčby ze tří důvodů: (1) imunitní mechanismy u této choroby hrají významnou roli, jak lze pozorovat z léčebného účinku alogenní reakce štepů proti leukémii po převodu dárčových T buněk; (2) CML je onemocněním s možností velmi přesného hodnocení účinnosti léčby a dynamiky onemocnění. Díky charakteristické chromosomální translokaci t (9;22), vedoucí ke tvorbě chimerického genu bcr-abl, je CML ideálním modelovým nádorovým onemocněním pro testování experimentální léčby s možností monitorování zbytkového nádorového onemocnění (21); (3) autologní TKD je dnes intenzivně zkoušenou metodou i u této diagnózy a její kombinace s imunoterapií by mohla být dalším přínosem pro léčbu nemocných s CML, kteří nemají vhodného dárce.

METODY A NEMOCNÍ

Výběr nemocných: Z 10 nemocných s CML v chronické fázi nebo ve fázi akcelerace byli vyřazeni dva nemocní pro rozvoj blastického zvratu. Z následujících 8 nemocných prošlo celým protokolem 5 nemocných. Těm nemocným byl podán záložní aktivovaný štep kostní dřevě bez myeloablativní chemoterapie z důvodu nemožnosti sběru dostatečného štepů PKB. Základní

Tabulka 1: Charakteristika nemocných ve studii a průběhu stimulačního režimu

Nemocný	Doba do mobilizace (M)	Předělá léčba	Stádium (CHF/AF)	Dny do zahájení sběru	Dny sběru	Léčebná odpověď	Ph (%) ve štěpu
1	24	HU, INF, ARA-C	AF	23	3	AF	40,6%
2	30	HU	AF	19	2	CHF	100%
3	66	HU, INF	AF	*	*	CHF	100%
4	57	Busulfan, HU, INF	CHF	22	5	CHF	64,20%
5	39	HU, INF, ARA-C, Mitoxantron, Daunorubicin	CHF	21	2	AF	47,60%
6	40	HU, INF	CHF	25	6	PHR	+
7	66	INF, ARA-C, IDA, Mitoxantron	AF	*	*	AF	+
8	41	HU, INF	CHF	*	*	CHF	+

* sběr štepů nezahájen, + nezhodnoceno

AF = fáze akcelerace, CHF = fáze chronická, PHR = parciální hematologická remise, HU = hydroxyurea, INF = interferon

data o těchto nemocných včetně reakce na stimulační léčbu jsou uvedena v tabulce 1. K mobilizaci byl použit režim mini ICE (idarubicin 8mg/m² den 1-3; cytosin-arabinosid 800mg/m² den 1-3; etoposid 150mg/m² den 1-3) a G-CSF. U 5 nemocných s dostatečným štěpem PKB a s využitím přípravného režimu busulfanem 12 mg/m² pro nemocné v AF a busulfanem 16 mg/m² ve fázi chronické byla provedena autologní transplantace. U jednoho nemocného byla vzhledem k preexistujícímu poškození jater použita dávka 8mg/m² busulfanu. U všech 8 nemocných byl podán IL-2 aktivovaný štep s následnou měsíční imunoterapií IL-2 0,5 x 10⁶ IU/m²/den ode dne +1 do dne +28. Standardní dávka GM-CSF byla 1 amp. á 400 µg/den ode dne +7, do přilhojení štepů a následně GM-CSF 75µg/m²/den do dne +28. Před podáním IL-2 aktivovaného štepů byla vedle standardního postupu při podávání transplantátu použita profylaxe paracetamolem (paralen), antihistaminikem (dithiaden) a dolsinem. V průběhu imunoterapie IL-2 byl podáván paralen. Po měsíční imunoterapii IL-2 + GM-CSF následovala 6 měsíční imunoterapie interferonem alfa 5 x 3 MU týdně podkožně, umožnil-li to krevní obraz. Poté byli nemocní převedeni na léčbu

podávanou před vstupem do studie asrovnávali jsme dávkování hydroxyurey (litalir) s původní dávkou dostačující ke stabilizaci onemocnění.

Kultivace autologního štěpu s IL-2: Veškeré manipulace (mimo rozmrazování, přepouštění a centrifugace) se standardně provádějí za aseptických podmínek v laminárním boxu (Flow box CLEAR AIR II B). Zamrazovací vak (dále jen ZV) s koncentrátem kostní dřeně (KD) nebo PKB, kryoprezervovaný v roztoku obsahujícím 10 % DMSO, je rozmražen ve vodní lázni o 40 °C. Obsah ZV je promíchán s promývacím roztokem (50 ml 20 % lidského albuminu, 250 ml Hanksova roztoku, DNase v koncentraci 1000 IU/ml a 3 ml heparinu) po dobu 3-5 min. Centrifugace (JOUAN GR4 22) probíhá při teplotě 4 °C, 530g, 15 min. Vak je po centrifugaci umístěn do plazmaextraktoru a je odtáženo maximum plazmy. Postup se opakuje podruhé s použitím promývacího roztoku stejného složení, ale již při vyšší teplotě (centrifugace: 20 °C, 530g, 15 min.). Vždy byly změřeny ztráty buněk v odtáženém supernatantu. Postup krátkodobé kultivace buněk s IL-2 je modifikací publikované metodiky (22). Sediment buněk je smíchán se 100 ml kultivačního media (X-VIVOTM 10, Bio Whittaker, Maryland, USA) a buněčná suspenze je rovnoměrně rozdělena do připravených kultivačních vaků (LIFECCELL, Tissue Culture Flask BAXTER) v koncentraci $2,5 \times 10^6$ leukocytů/ml média pro štěp kostní dřeně nebo 10×10^6 leukocytů/ml média pro štěp periferních kmenových buněk. Kultivační vaky obsahují X-VIVO 10 médium a následné reagenty: L-glutamin v koncentraci 4,4 mmol/100 ml (L-glutamin 200 mmol/l) (SIGMA CHEMICAL Co), heparin v koncentraci 50 UI/ml (HEPARIN 10 ml, 5000 UI/ml, LÉČIVA) a DNase v koncentraci 1000 IU/ml štěpu (pro preklinické účely DNase I, Boehringer Mannheim; pro klinické použití rekombinantní DNase PULMOZYME 2,5 mg; Hoffmann - La Roche LTD). Interleukin 2 (PROLEUKIN^R 18 x 10⁶ IU rh IL 2/1,2 ml, CHIRON B.V.) je přidán v koncentraci 6 000 IU/ml roztoku. Vaky jsou důkladně promíchány a uloženy na 24 hodin do inkubátoru s teplotou 37 °C a 5 % CO₂ (CO₂ inkubátor CELLSTAR model QWJ 700 SVBA; QÜEUE Systems Inc. USA). Za 24 hodin jsou odebrané předepsané bezpečnostní kontrolní odběry. Obsah kultivačních vaků je přepuštěn do 600 ml transfer vaků (maximálně 500 ml na jeden transfer vak) s následnou centrifugací (20 °C, 530g, 15min.). Postupně je ze všech zcentrifugovaných transfer vaků v plazmaextraktoru odtážen supernatant. Sediment ze všech transfer vaků je resuspendován ve 150 ml Hanksova roztoku a suspenze buněk je po zhodnocení bezpečnostních odběrů neprodleně podána. Ze všech kultivačních vaků jsou provedeny v den -1 (před přidáním IL-2) a za 24 hodin tyto odběry: krevní obraz včetně automatického diferenciálního rozpočtu leukocytů (Analyzátor ABBOT CELL-DYN 3500 systém, ABBOTT DIAGNOSTICS), koncentrace CFU – GM kultivačně, odběr na flowcytometrické vyšetření, mikrobiologické vyšetření (hemokultura OXOID), vyšetření vitality a cytogenetické vyšetření. Ze všech kultivačních vaků je před zkoncentrováním buněk provedeno mikrobiologické mikroskopické vyšetření (barvení dle Gramma). Po zkoncentrování je ověřena ztráta buněk v supernatantu.

Flowcytometrické vyšetření štěpu pro zjištění kontaminace buňkami CML: K analýze kmenových buněk u CML jsme použili kombinaci značených monoklonálních protilátek anti-CD34 PE (Becton-Dickinson, U.S.A.) a anti-HLA-DR FITC (Caltag, U.S.A.). Stanovujeme subpopulace CD34⁺HLA-DR⁺ a CD34⁺HLA-DR⁻. V subpopulaci CD34⁺HLA-DR⁺ dle literatury převládají Ph pozitivní buňky (23).

Flowcytometrické vyšetření aktivovaného štěpu: Postup zpracování vzorků je totožný s výše uvedenou metodikou. Použili jsme protilátky anti-CD3 FITC, CD25 PE, CD38 PE, CD69 PE a HLA-DR PE (Caltag, U.S.A.). Stanovujeme expresi znaků aktivace na CD3⁺ na lymfocytech v kombinacích: CD3⁺25⁺, CD3⁺38⁺, CD3⁺69⁺, CD3⁺HLA-DR⁺.

Flowcytometrická analýza typů imunokompetentních buněk ve štěpu: Postup při zpracování vzorků je identický s postupem uvedeným v úvodní metodice. Použili jsme monoklonální protilátky anti-CD3 FITC, CD4 PE, CD8 FITC, CD56 PE (Caltag, U.S.A.). Hodnotili jsme následující subpopulace: T lymfocyty CD3⁺, T pomocné CD3⁺4⁺, T cytotoxické CD3⁺8⁺, NK buňky CD3⁺CD56⁺ (24).

Flowcytometrická analýza progenitorových buněk ve štěpu: Metodika zpracování vzorků je shodná. Ke značení jsme použili monoklonální protilátku anti-CD34 PE (Becton-Dickinson, U.S.A.) a hodnocení jsme prováděli dle Milánského protokolu (25).

Cytogenetické vyšetření a vyšetření metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH): Materiál pro cytogenetické vyšetření nemocných s CML byl získán standardní aspirací kostní dřeně a vzorek autologního štěpu byl odebrán ze štěpu před kultivací s IL-2. Buňky jsou kultivované v médiu RPMI 1640 (Sigma) s 30 % fetálního telecího séra při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Na poslední hodinu kultivace je přidán kolcemid. Fixace mitotických preparátů je provedena standardním způsobem: suspenze buněk je vystavena hypotonii 0,075 M KCl po dobu 15 minut s následnou fixací směsí metanol-ledová kyselina octová. Fixace se opakuje 3x. Technika FISH byla prováděna pomocí dvoubarevných LSI bcr/abl DNA sond firmy VYSIS značených fluorochrómami SpectrumGreen/SpectrumOrange dle firemního protokolu. Hybridizační signály byly hodnoceny u 200 interfázních buněk a analyzovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX60, doplněného Č/B integrující CCD kamerou (COHU 9410). Fluorescenční obrazy byly snímány a zpracovány pomocí software LUCIA-FISH-4.21 (Laboratory Imaging, s.r.o. Praha).

Metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) k detekci

CML buněk: Sekvenci bcr/abl genu lze využít jako leukemického markeru k odlišení maligních CML buněk od zdravé populace leukocytů na úrovni DNA. Ze vzorků 2×10^6 buněk štěpu aktivovaného IL-2 nebo vzorku kontrolního (bez aktivace IL-2) byla nejprve izolována celková RNA pomocí afinitního systému QiaGen (QiaGen, U.S.A.) a po extrakci transkribována reverzní transkriptázou MuLV (Perkin-Elmer). Pro sledování kvantitativních změn v expresi fúzního genu bcr/abl po inkubaci s IL-2 byla použita modifikovaná semikvantitativní metoda PCR (sQ-RT-PCR), která vychází z metody komparativní PCR, kde je současně s translokovaným úsekem sledovaného genu bcr/abl, amplifikován i endogenní interní standard, kterým je část exonu 2 sekvence abl genu lokalizována mimo zlomové místo. Znamená to, že jsme jako cílovou sekvenci pro PCR použili rozdílnou sekvenci stejného genu abl se stejným vazebným místem pro jeden primer ze dvou použitých párů primerů a s rozdílnou délkou amplifikovaného úseku. Amplifikace s Taq-DNA polymerázou probíhala v 30 cyklech v cyklu Perkin-Elmer 9600 a produkty byly hodnoceny elektroforeticky v 8 % polyakrylamidovém gelu po obarvení ethidium bromidem. Kvantifikace byla prováděna denzitometricky pomocí dokumentačního a analyzačního systému KS- 4000 (Ultra-Lum, Inc., U.S.A.).

Kultivace CFU-GM (colony-forming unit- granulocyte, macrophage) byla prováděna na oddělení klinické hematologie na imobilizačním médiu 0,33 % agaru (Gibco). Kompletní médium tvoří Iscova modifikace Dulbeccova média (SIGMA), 20 % fetální telecí sérum, 2 % penicilin, streptomycin a jako zdroj růstových faktorů slouží 5 % kondicionované médium 5637. Nasadili jsme 2×10^5 leukocytů na miskou (Falcon 35 mm) a z jednoho vzorku jsou kultivovány 3 misky. CFU-GM jsme hodnotili po 14-denní inkubaci v řízené atmosféře (5 % CO₂, 37C, inkubátor JUAN IG 150) pomocí inverzního mikroskopu (Olympus CK 2). Klony obsahující více jak 40 buněk jsme počítali jako kolonie.

Bioptické vyšetření kůže bylo prováděno pro případ subklinických GVHD změn v den +14.

Klinické monitorování a hodnocení

Úspěšné přihojení štěpu bylo definováno jako dosažení $\text{Gran} > 0,5 \times 10^9/\text{L}$ a trombocytů $> 50 \times 10^9/\text{L}$. Dostatečná kvalita autologního štěpu byla definována následujícími kritérii: štěp bez makroskopických sraženin nebo lze mikrosraženinu odfiltrovat; negativní mikrobiologická kultivace v den -1 aktivace; negativní výsledek barvení dle Gramma v den 0; ztráty buněčnosti po koncentraci štěpu menší než 2 %; vitalita buněk před koncentrací štěpu větší než 85 %; hodnota CD34^+ buněk v den 0 z vaku $> 2,0 \times 10^6/\text{kg}$; hodnota CFU-GM před zamražením je $> 5,0 \times 10^4/\text{kg}$ a hodnota CFU-GM po rozmražení $> 1,0 \times 10^4/\text{kg}$. V případě, že nedošlo k přihojení štěpu do dne +21 s parametry přihojení $\text{Leu} > 1,0 \times 10^9/\text{l}$ a trombocytů $> 20 \times 10^9/\text{l}$ bez nutnosti substituce, byl podán záložní štěp.

Hodnocené parametry studie byly: přihojení štěpu, toxicita transplantační léčby dle kritérií SWOG, imunogenní potenciál aktivovaného štěpu hodnocený (1) klinicky vývojem manifestní autologní GVHD, (2) laboratorně pak dle flowcytometrických známek aktivace štěpu a aktivace imunokompetentních buněk organismu a (3) u vybraných nemocných byly odebrané a zamražené vzorky pro cytotoxické testy s radioaktivním chrómem ^{51}Cr . Pro případ subklinické manifestace GVHD byla v den +14 nemocným provedena biopsie kůže. Výsledné hodnocení bylo zaměřeno na dosaženou léčebnou účinnost hodnocenou srovnáním stavu onemocnění před vstupem do studie, provedením mobilizace, transplantace a v pravidelných intervalech po ukončení imunoterapie. Byla porovnávána též intenzita potřebné cytoredukční léčby před vstupem do studie a po 6 měsíční léčbě interferonem, po které byli nemocní užívací před vstupem do studie hydroxyureu (6x) převedeni zpět na tento lék.

Kritéria pro stanovení léčebné odpovědi byla:

Pro definici fází onemocnění byla užitá obecně platná kritéria – chronická fáze (26, 27), akcelerovaná fáze (28, 29) a blastický zvrst (30). Léčebná odpověď pak byla definována jako kompletní hematologická remise (CHR) v případě, že leukocyty byly pod $10 \times 10^9/\text{l}$, trombocyty v rozmezí 150 až $450 \times 10^9/\text{l}$, v diferenciálním krevním obraze nebyly přítomny žádné granulocytární prekursor, buněčnost kostní dřeně byla redukována a všechny klinické symptomy včetně splenomegalie regredovaly. Pro označení léčebné odpovědi jako parciální hematologické remise (PHR) bylo nutno, aby počet leukocytů nepřesáhl $20 \times 10^9/\text{l}$, či aby jejich počet klesl pod 50 % výchozí hodnoty, aby došlo k redukcí trombocytózy a splenomegalie o 50 % a v případě perzistující splenomegalie byl krevní obraz ve fyziologickém rozmezí. V případě nesplnění kritérií kompletní či parciální hematologické remise nebylo dosaženo žádné léčebné odpovědi (31). Jako kompletní cytogenetická remise byl hodnocen stav, kdy došlo ke ztrátě Ph pozitivních metafází, jako velká cytogenetická remise stav, kdy zůstalo 1-34 % Ph pozitivních metafází, v případě malé cytogenetické remise 35-65 % Ph pozitivních metafází, v případě minimální cytogenetické remise 66-95 % Ph pozitivních metafází a jako žádná cytogenetická odpověď byla hodnocena přítomnost 96-100 % Ph pozitivních metafází (32).

Statistická analýza dat

K celkové prezentaci výsledků byly použity běžné sumární statistiky vyjadřující tvar rozložení hodnocených parametrů (aritmetický průměr, medián, rozptyl). Prezentované statistické údaje byly získány souhrnem dat ze všech kultivovaných štěpů u 8 nemocných s CML. Analýza dat zahrnuje základní popisné zpracování flow-cytometrických dat. Kromě parametrů získaných v periferní krvi jsou analyzována data ze sternální punkce. Hodnoty v grafu 1. představují průměrné odhady doplněné směrodatnými odchylkami získané po zpětné transformaci z původně transformovaných procentických hodnot (transformace funkcí arcsin). I přes značnou variabilitu odhadů, způsobenou především malou velikostí vzorku, je zřetelná tendence většiny

Cd markerů k nárůstu hodnot v různých fázích monitorovaného časového vývoje. Statistická významnost pozorovaných změn je vyjádřena označením písmenem – varianty označené a nebo b se od sebe statisticky významně liší (ANOVA test s následujícím testováním kontrastů).

Výsledky

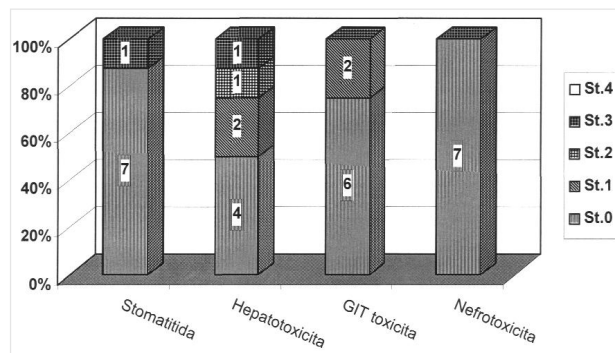
Ke dni 31. 9. 1999 bylo vyhodnoceno 8 nemocných, z nichž 5 nemocných podstoupilo kompletní léčbu dle protokolu studie a 3 nemocným (s nemožností získat kvalitní štěp) byl podán IL-2 aktivovaný štěp po neúspěšné mobilizaci (2 nemocní), respektive po podání ne-mobilizačního režimu mini ICE (1 nemocný).

Získání autologního štěpu PKB, toxicita a účinnost stimulačního režimu: Základní data o výtěžnosti štěpu jsou uvedena v tabulce 2. Doba od stanovení diagnózy do provedení mobilizace byla u všech nemocných delší než 2 roky (medián 40,5 měsíce; rozptyl 24-66 mēs.), čemuž odpovídala

Tabulka 2: Parametry štěpu před zamražením

	průměr	rozptyl
$\text{CD34}^+ \times 10^6/\text{kg}$	14,6	3,05–49,45
$\text{CFU-GM} \times 10^4/\text{kg}$	54	12,46–117,03
Pozitivita Ph (%)	63	41–100
Úspěšnost sběru 71% (5/7)		

Tabulka 3: Toxicita stimulačního režimu (SWOG kritéria)



i předléčenost nemocných. Přesto byla úspěšnost sběru 71 % (5/7). Časový interval do zahájení sběru štěpu byl 22,0 dne (medián; rozptyl 19-25 dnů) s délkou sběru štěpu od 2 do 6 dnů. Tato část protokolu byla z hlediska organizačního i zátěže pro nemocného nejobtížnější. Přesto u 2 nemocných (č. 2, 6) proběhlo toto období bez komplikací. Přehled pozorovaných nežádoucích účinků hodnocených podle kritérií SWOG (South West Oncology Group) nepřesáhl stupeň III (tabulka 3). Kontaminace štěpu byla i přes použití režimu mini ICE značná (průměr 63 %; rozptyl 41-100 %). U třech nemocných došlo ke zlepšení stavu onemocnění po chemoterapii mini-ICE (z AP do chronické fáze), u jednoho nemocného bylo dosaženo parciální hematologické remise.

Ex vivo manipulace se štěpem: Flowcytometrická analýza štěpů před i po manipulaci byla podobná jako u štěpů KD vyšetřovaných v přípravné preklinické fázi protokolu (8). V tabulce 4 jsou srovnání vybraných parametrů štěpu ze dne -1 a dne 0 (24 hodin po zahájení kultivace) s návratností CD34^+ buněk v 82,5 % a CFU-GM v 51 %.

Průběh a účinnost transplantační léčby s využitím IL-2 aktivovaného štěpu s následným blokem imunoterapie IL-2 + GM-CSF: V průběhu klinické studie žádný z nemocných nezemřel. V tabulce 5 jsou základní údaje o průběhu transplantace a léčebné účinnosti hodnocené 1 měsíc po provedení transplantace. Doba do přihojení štěpu byla 15,0 dne

Tabulka 4: Parametry štetu před a po kultivaci s IL-2

Medián (n=5)	Ly+Mo/kg (x 10 ⁸)	CD34 ⁺ /kg (x 10 ⁶)	CFU-GM/kg (x 10 ⁴)	Vitalita buněk
Den -1 (rozptyl)	1.57 (0,18–0,42)	3,12 (0,66–8,91)	83 % (0,37–54,27)	(80–95)
Den 0 (rozptyl)	0.24 (0,10–0,27)	1.29 (0,23–2,44)	1,60 (0,15–12,37)	96 % ^P (95–98)
Návratnost	103,9 %	82,5 %	51,3 %	–

p = p < 0, 05, Ly = lymfocyty, Mo = monocyty

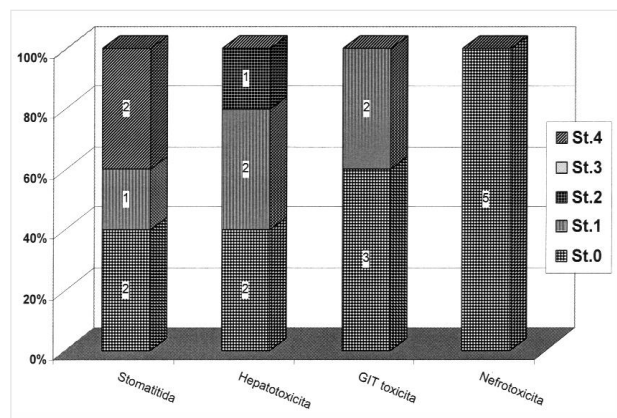
Tabulka 5: Hodnocení průběhu transplantace a imunoterapie (IL-2 + GM-CSF)

Nemocný	Doba do přijetí štetu (dnů)	Počet dnů v leukopenii < 1.0	Komplikace	Horečky nad 38 °C (dnů)	Léčebná odpověď	Spotřeba krevních derivátů ERY/TR
1	95	53	mukositida I, febrilní neutropenie	14	CHF	25/7
2	18	8	febrilní neutropenie	2	CHF	2/3
3	*	*	bez komplikací	0	CHF	0/0
4	11	0	febrilní neutropenie	4	CHF	0/2
5	14	6	kožní reakce po s.c. podání IL2, febrilní neutropenie	7	CHF	5/1
6	16	5	mukositida IV, kanylová sepse	2	CHF	6/8
7	*	*	febrilní neutropenie	2	AF	2/2
8	*	*	febrilní neutropenie, zánětlivé morfy na kůži	4	CHF	0/4

* štep podán bez Busulfanu

AF = fáze akcelerace, CHF=chronická fáze

Tabulka 6: Toxicita Busulfanu (SWOG kritéria)



(medián; rozptyl 11-18 dní). Data nemocného č. 1 nebyla do hodnocení zahrnuta vzhledem k malému počtu transplantací a době do přijetí 95 dnů, s nutností podání záložního štetu kostní dřeně. Tolerance transplantace byla velmi dobrá. Jen u dvou nemocných se objevila mukositida IV. stupně dle SWOG kritérií. Četnost všech monitorovaných toxicit je obsahem tabulky č. 6. Reakce na léčbu byla hodnocena po ukončení měsíčního bloku imunoterapie (IL-2+GM-CSF), která kromě ojedinělých teplot do 38 st.C (2/8) a lokální kožní reakce s bolestivostí (1/8) při aplikaci IL-2, byla nemocnými snášena zcela bez potíží.

Vyhodnocení parametrů aktivace: Ve shodě s námi dříve již provedenými srovnávacími měřeními aktivace štetu na podkladě flowcytometrické analýzy, jsme nezjistili signifikantní změny při aktivaci štetu pomocí IL-2 (data nejsou

ukázána). Vliv na tyto výsledky může mít krátkodobost kultivace. V grafu 1 je analyzován vývoj vybraných flowcytometrických parametrů v potransplantačním průběhu (den +14 až 6 měsíců). Hodnocení markerů aktivace (CD25, CD69, HLA-DR) monitorovaných na CD3⁺ buňkách bylo problematické. Jen pro hodnoty CD25⁺ a CD3⁺CD25⁺ byly nalezeny významné změny s vrcholem v den +28, tj. v době ukončení měsíční potransplantační imunoterapie. Dynamika vzestupu podtypů T lymfocytů měla časovou závislost s maximem vzestupu pomocných (CD4⁺) T lymfocytů v den +14 a +28 a maximem vzestupu cytotoxických (CD8⁺) T lymfocytů v den +60 a +90. Dynamika NK buněk (CD3⁺CD56⁺) měla charakteristický vývoj při použití IL-2 s dosažením maximálního zvýšení počtu NK buněk v 3. měsíci od provedení transplantace (den +90). Hodnoty CD34⁺HLA-DR⁺ buněk měly klesající tendenci, která nebyla vzhledem k velkým rozptylům statisticky významná. Opačný trend měly hodnoty CD34 buněk. Testy cytotoxicity nebyly hodnoceny, respektive pro tento test nebylo možno získat při použití zamražených vzorků reprodukovatelné výsledky.

Průběh, účinnost a tolerance léčby interferonem alfa:

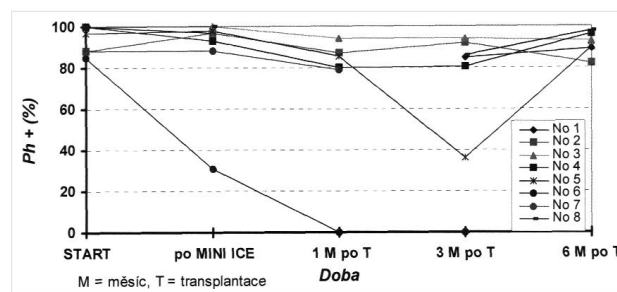
Zahájení 6-ti měsíční imunoterapie interferonem bylo možné zahájit do 1 měsíce po ukončení bloku IL-2/GM-CSF u 4 z 8 nemocných, u dvou nemocných bylo možné zvýšit dávku na 5x3 MU týdně a u 1 nemocného byla dávka redukována na 2x3 MU týdně pro trombocytopenii. V průběhu studie jeden nemocný na vlastní žádost přerušil na 2 měsíce léčbu. U dvou nemocných nebylo až do 4. měsíce možné zahájit léčbu IFN pro přetrvávající trombocytopenii, respektive leukopenii. Celkové hodnocení účinnosti léčby je shrnuto v tabulce 7. Pozorovali jsme snížení Ph pozitivitu v průměru 95 % (rozptyl 85 % - 100 %) před zahájením studie na 65 % (rozptyl 0 % - 94 %) při hodnocení ve 3. měsíci po podání aktivovaného štetu. Dynamiku vývoje Ph pozitivitu u jednotlivých nemocných je znázorněna v grafu 2. U 5 z 8 nemocných došlo ke zlepšení stavu onemocnění a vždy se jednalo o konverzi AF do fáze chronické. U jednoho nemocného došlo k dosažení malé

Tabulka 7: Celkový přehled léčebné odpovědi

Číslo pacienta	Před S (vstup)	Před T (po S)	1 M po T	3 M po T	6 M po T
1	AF	AF	CHF	CHF	CHF
2	AF	CHF	CHF	CHF	CHF
3	AF	CHF	CHF	CHF	CHF
4	CHF	CHF	CHF	CHF	CHF
5	AF	AF	CH	MCR	CHF
6	CHF	PHR	CR	CR	X
7	AF	AF	AF	CHF	X
8	HF	CHF	CHF	X	PHR

S = stimulace, T = transplantace, M = měsíc, X = nezhodnoceno, AF = fáze akcelerace, CHF = fáze chronická, PHR = parciální hematologická remise, (M)CR = (malá) kompletní cytogenetická remise

Graf 2: Vývoj pozitivitu PH chromozomu v průběhu léčby



cytogenetické remise a u jednoho nemocného ke kompletní cytogenetické remisi. Nemocní se vstupní CHF zůstali v této fázi nadále. Ze srovnání dávky hydroxyurey potřebné k udržení srovnatelného počtu leukocytů u zatím 3 zhodnocených nemocných vyplývá, že došlo ke snížení potřebné dávky hydroxyurey (z 1500 g na 500 mg; 1300 mg na 600 mg; 500 mg na 0; počítány průměrné dávky na den v průběhu 3 měsíců), což je v souladu se zklidněním onemocnění podle laboratorních ukazatelů.

Diskuse

Interleukin 2 patří mezi standardní imunomodulační látky a aktivace LAK buněk je klinicky testována po dvě desetiletí. Zatímco v *in vitro* experimentu nebo na zvířecím modelu, byl efekt IL-2 nebo LAK buněk pozorován, klinický efekt u hematologických malignit nebyl doposud jednoznačně prokázán a IL-2 našel své indikační místo v současnosti jen v léčbě maligního melanomu a renálního karcinomu (33). Aktivace štetu s IL-2 je zkoušena od začátku 90-tých let a její přínos není přesně stanoven (20). Klinické studie probíhají. Cílem této klinické studie bylo využití vhodného klinického modelu, který umožňuje změřením i minimální léčebné odpovědi na úrovni zbytkového nádorového onemocnění pomocí cytogenetického vyšetření, případně PCR vyšetření.

S ohledem k limitacím statistických závěrů, z důvodu malých čísel, nedokážeme u nemocných s CML jasně definovat parametry bezpečného štetu. Z klinického hlediska považujeme za rizikovou skupinu pro nedostatečné přihojení štetu skupinu nemocných s CML, s delší dobu trvající akcelerací choroby, neboť marker CD34⁺ může být přítomen i na populaci nádorových buněk (23) a podobně tomu může být i při hodnocení CFU-GM (34). U dlouhodobě léčených nemocných s CML bude s postupem času nedostatečné množství progenitorových buněk a standardní parametry kvality štetu PKB (CD34⁺ a CFU-GM) mohou selhat právě proto, že řada leukemických buněk bude zahrnutá do výpočtu celkového množství. Proto byl u každého nemocného vyžadován sběr záložního štetu. Optimální je odběr štetu časné po stanovení diagnózy. Tam, kde byl štep odebrán časné po diagnóze a u nemocných dobře reagujících na léčbu, lze očekávat i bezproblémové použití aktivovaného štetu, třebaže při následné manipulaci se štetem dochází k redukci CD34⁺ buněk i CFU-GM. O výše uvedeném nás přesvědčilo i pozorování u druhého nemocného s klinickým použitím štetu, jehož hodnoty CD34⁺ buněk po aktivaci ($0,3 \times 10^6/\text{kg}$), byly hluboko pod hranici našich bezpečnostních pravidel (počet CD34⁺ buněk $> 2,0 \times 10^6/\text{kg}$; CFU-GM $> 5 \times 10^4/\text{kg}$ nemocného), a přesto došlo k rychlému a nekomplikovanému přihojení štetu. V průběhu kultivace může změnit povrchový membránový CD34⁺ protein svou expresi, aniž by se jednalo o poškození a zmenšení počtu progenitorových buněk. Naše výsledky týkající se kvality kultivovaného štetu považujeme za srovnatelné s jinými pracovišti (35- 38) a umožnily nám zahájit klinickou část programu.

Třebaže vlastní aktivace pomocí IL-2 kvalitu štetu zásadně neovlivňuje, v řadě novějších protokolů je okamžité podání IL-2 po podání štetu odkládáno až na dobu, kdy je štep přihojen, a to především z bezpečnostních důvodů. Kumulace vlastních nežádoucích účinků IL-2 a obecných komplikací souvisejících s provedením transplantace, může být pro nemocného velmi nebezpečná (22). V našem klinickém protokolu bylo použito nízké imunomodulační dávky IL-2 v kombinaci s nízkou dávkou GM-CSF (Leucomax, Schering-Plough). GM-CSF je dnes považován za velmi perspektivní imunomodulační látku zvyšující expresi antigenu na povrchu nádorových buněk a usnadňující zpracování antigenu imunokompetentními buňkami (39, 40). Až na ojedinělé subfebrilie a mírnou lokální bolestivost po aplikaci IL-2 podkožně, byla tato kombinace tolerována bez jiných vedlejších účinků, třebaže aplikace IL-2 byla zahájena již druhý den po podání aktivovaného

autologního štetu.

Projevy aktivace imunitního systému byly diskrétní. Výjimkou je vzestup hodnot pro receptor IL-2 (CD25⁺) a jeho exprese na CD3⁺ buňkách, jehož dynamika časově souvisí s podáváním IL-2. Podobně došlo k statisticky významnému nárůstu NK buněk s časovým opožděním při podávání imunoterapie a maximem v období druhého a třetího měsíce po transplantaci, tak jak bylo pozorováno v jiných pracích (18). Pozorovanou rozdílnou dynamiku pomocných (CD4⁺) a cytotoxických (CD8⁺) lymfocytů v potransplantačním období a při podávání imunoterapie nemůžeme srovnat s podobnou dynamikou T buněk u kontrolního souboru bez imunoterapie, což je největší limitací pozorovaných nálezů, respektive jakýchkoliv obecnějších závěrů. Je pravděpodobné, že i v tomto případě měla podávaná imunoterapie vliv na vzestup CD8⁺ subpopulace T lymfocytů s maximem v období mezi 2. a 3. měsícem po transplantaci.

U výrazně předlčených nemocných v této studii lze považovat snahu o získání "čistého štetu" po mobilizačním režimu mini ICE za nemožnou, třebaže je tento považován za jeden z nejlepších režimů ke snížení kontaminace. Kontaminace štetu leukemickými progenitory s mediánem 71 %, bez získání čistého štetu, je v souladu s jinými sděleními a předlčeností nemocných delší než 3 roky (41). I když přínos nádorových buněk ve štetu pro relaps onemocnění byl v malém procentu již prokázán (42), považujeme tento problém za okrajový, neboť pro relaps onemocnění je rozhodující zbytkové nádorové onemocnění v organismu, jak lze odvodit od četných relapsů i po alogenních transplantacích.

Statistická analýza dat byla provedena pro 8 autologních štetů (5x PKB, 3x KD). Klinické studii předcházelo srovnání kvality kontrolních a aktivovaných štetů, které potvrdilo publikované údaje o tom, že IL-2 nemá vliv na kvalitu štetu při krátkodobé kultivaci (8, 43, 44). Zhodnocení redukce počtu jednotlivých typů buněk, CD34⁺ markeru a CFU-GM při krátkodobé kultivaci nám umožnilo nastavit orientační cílové vstupní hodnoty pro sběr štetu. Vzhledem k malému počtu měření nemají výsledky prediktivní sílu a nejsme na základě vstupních parametrů štetu schopni potvrdit bezpečnost štetu pro přihojení.

Několik studií již prokázalo rozdílnost v expresi antigenu HLA-DR, což může přispět k rozlišení zdravých primitivních kmenových buněk (CD34⁺ HLA-DR⁻) a bcr/abl pozitivních primitivních kmenových buněk (CD34⁺ HLA-DR⁺) u nemocných s CML (23). V grafu 1 je vidět dynamika CD34⁺ buněk a dle literatury pravděpodobných zdravých primitivních kmenových buněk (CD34⁺ HLA-DR⁻) ve vzorcích z kostní dřeně. V korelační analýze jsme nepotvrdili negativní korelaci CD34⁺ HLA-DR⁻ buněk a Ph pozitivních buněk hodnocených metodou FISH.

Vlastní výsledky týkající se toxicity režimů považujeme za uspokojivé. Tolerance imunoterapie po transplantaci byla výborná. Následné nasazení interferonu bylo tolerováno hůře. Dávku 5×3 MU IFN týdně bylo možno podat jen ve 2 případech, a to jen krátkodobě s následnou redukcí na dávku 3×3 MU IFN týdně. Jeden z nemocných léčbu pro nižší počet trombocytů přerušil. Zlepšení klinického stavu onemocnění, ve srovnání se stavem onemocnění před zahájením léčby, bylo prokazatelně dosaženo u všech nemocných a udržovací dávku hydroxyurey bylo možno snížit u všech ze 3 předběžně hodnocených nemocných. To podporuje tvrzení, že použití vysokodávkované chemoterapie s podporou autologního štetu nemá kurativní potenciál, ale může stabilizovat onemocnění v chronické fázi, vrátit tudíž onemocnění o krok zpět a zpomalit jeho přirozený vývoj do blastické krize (45).

Přínos IL-2 a kombinované imunoterapie (IL-2 + GM-CSF) zůstává problematický. Je pravděpodobné, že za pozorované projevy kožního GVHD při podobných studiích u jiných onkologicky nemocných, může spíše vyšší dávka použitého IL-2, než obecná aktivace imunokompetentních buněk s projevem GVHD. To podporuje i naše pozorování u jiné diagnózy (mnohočetný myelom), kde jsme rovněž nepozorovali žádné

Graf 1: Vývoj vybraných flowcytometrických parametrů v potransplantačním období

Výskyt buněk (%) (průměrné hodnoty doplněné směrodatnými odchylkami)

Časový profil analýz (dny; 6M – 6. měsíc)

projevy GVHD. Iz tohoto důvodu jsme od rutinního provádění kožní biopsie upustili. Zda je větším přínosem použití imunoterapie nebo chemoterapie, jsme v této studii nedokázali zodpovědět z důvodů krátkého časového intervalu mezi podáním myeloablativní léčby a imunoterapie.

Závěr

V průběhu let 1998 - 1999 jsme klinicky testovali jeden z protokolů adoptivní buněčné terapie - aktivaci autologního štěpu hematopoetických buněk pomocí IL-2. Po zvládnutí preklinické metodiky a ověření bezpečnosti štěpu, jsme přešli ke klinickému zkoušení. Vybraný vysokodávkovaný chemoterapeutický režim i následná imunoterapie byly dobře tolerovány. Podání štěpu bylo u všech nemocných, kromě jednoho, bezpečné, s dlouhodobým přihojením štěpu. Přihojení štěpu může být problematické u výrazně předlčených nemocných. Přesto se zdá být u nemocných ve fázi akcelerace provedení autologní TKD s následnou imunoterapií přínosné. Chronickou myeloidní leukémií je možno vyléčit dle současných poznatků jen alogenní transplantací. Autologní TKD se zdá možnou alternativou léčby pro nemocné, kteří

nemohou být alogenně transplantováni. Přínos takového postupu pro nemocné s CML musí potvrdit randomizované studie. Z experimentálních postupů může být perspektivní kombinace intenzivní imunoterapie navazující na autologní TKD. Tato následná krátkodobá imunoterapie byla při nízkých dávkách cytokinů velmi dobře tolerována. Tento léčebný postup vedl ke zlepšení u 5 z 8 nemocných a stabilizaci onemocnění u dalších 2 nemocných. Krátkodobost monitorování (6 měsíců po provedení transplantace) omezuje význam tohoto zjištění. Využití podobných postupů u méně předlčených nemocných s CML, by mohlo přinést další zlepšení léčebné účinnosti a přispělo by k bezpečnosti celé procedury především snížením rizika nedostatečného přihojení štěpu.

Práce byla podpořena granty IGA MZ ČR 4710-2, MŠMT VZ J07/98-141100003, MŠMT J07/98-6700008

Literatura:

1. Mughal T.I., Goldman J.M.: Chronic myeloid leukaemia: A therapeutic challenge. *Ann Oncol.* 1995, 6, s. 637 - 644.
2. Horowitz, M.M., Rowlings, P.A., Passweg, J.R. et al.: Allogeneic bone marrow transplantation for CML: a report from the International bone marrow transplant registry. *Bone Marrow Transplantation*, 17, 1996, 3, s. 5 - 6.
3. Lamparelli, T., van Lint, M.T., Gualandi, F., Occhini, D. et al.: Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia (CML) from unrelated donors and sibling donors: Single center experience. *Bone Marrow Transplant* 1997, 20, s. 1057-1064.
4. Mayer J, Krahulová M., Kořístek Z., Kubešová H., Freiburger T. et al. Alogenní transplantace periferních kmenových krvetvorných buněk po nemýeloablativním režimu. *Čas.Lék. Čes*, 138, 1999, 20, s.624-627.
5. McGlave, P.B., De Fabritiis, A. et al: Autologous transplants for chronic myelogenous leukaemia: Results from eight transplant groups. *The Lancet*, 1994, 343, s. 1486 - 1488.
6. Bhatia R., Verfaillie C.M., Miller J.S. and McGlave P.B.: Autologous transplantation therapy for chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 1997, 89, 8, s. 2623- 2634.
7. Hájek R., Krahulcová E., Penka M., Mayer J.: Autologní transplantace kostní dřeně u nemocných s chronickou myeloidní leukémií. *Klinická Onkologie* (v tisku)
8. Barnett MJ, Eaves CJ, et al.: Autografting with cultured marrow in chronic myeloid leukemia: results of a pilot study. *Blood* 84, 1994, 3, s. 724 -732.
9. Cullis, J.O., Barrett, A.J., Goldman, J.M.: Graft vs. leukaemia reactions in chronic myeloid leukaemia. *Eur J Cancer*, 28A, 1992, 12, s.2069-2074.
10. Jones, R.J., Hess, A.: Autologous graft-versus-host disease. In: Spitzer T., Mazumder A: *Immunotherapy and Bone Marrow Transplantation*. Armonk, NY Futura Publishing, 1995, s. 59 - 69.
11. Massumoto, C., Benyunes M.C., et al.: Close simulation of acute graft-versus host disease by interleukin-2 administered after autologous bone marrow transplantation for hematologic malignancy. *Bone Marrow Transplant*, 1996, 17, s. 351 - 356.
12. Benyunes M, Massumoto C, Higuchi C. et al: Interleukin-2+ - lymphokine-activated killer cells as consolidative immunotherapy after autologous bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia: A preliminary report. *Bone Marrow Transplant*, 1993, 12, s. 159-163.
13. Verma, U.N., Charak B.S., et al.: Interleukin-2 in Bone Marrow Transplantation. In: Buckner D (ed): *Technical and biological components of marrow transplantation*. Kluwer Ac. Publishers, Boston, 1995, s. 315 - 332.
14. Scheffold, C., Brandt, K., et al.: Potential of autologous immunologic effector cell for bone marrow purging in patients with chronic myeloid leukemia. *Bone marrow transplant.*, 1995, 15, s. 33 - 39.
15. Lewalle, P., Hensel, N., et al.: Helper and cytotoxic lymphocyte responses to chronic myeloid leukemia: implications for adoptive immunotherapy with T cells. *Brit J. Hematol.*, 92, 1996, s. 587 - 594.
16. Bocchia M., Koronstvit T., Xu Q. et al.: Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides. *Blood* 1996, 87, s. 3587 -3590.
17. Buzyn A., Kemula M., Connan F., et al.: CML patient in hematologic remission can mount a cytotoxic T cell response in vitro against the natural peptides eluted from his CML cells. *Bone Marrow Transplant* 1998, 21 (Suppl. 1), abstr. 229.
18. Miller, J. S., J. Tessmer-Tuck, et al.: Low dose subcutaneous interleukin-2 after autologous transplantation generates sustained in vivo natural killer cell activity. *Biology of Blood and Marrow Transpl* 3, 1997, s. 34- 44.
19. Faber E. IL-2 v léčbě hematologických malignit Zpravodaj klinické farmakologie a farmacie LFUPa FN Olomouc 10, 1996, 2, s. 23-30.
20. Mazumder A.: Experimental evidence of interleukin-2 activity in bone marrow transplantation. *Cancer Journal From Scientific American*, 3, 1997, Suppl 1, s. 37-42.
21. Miyamura, K., Barrett, A.J., Koder, Y., Saito, H.: Minimal residual disease for bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia and implications for graft-versus-leukemia effect: a review of recent results. *Bone Marrow Transplant*, 14, 1994, s. 201 - 209.
22. Meehen, K.R., Badros A., Frankel S.R., Cahill R. et al.: A pilot study evaluating interleukin-2 activated hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies. *J Hematotherapy* 1997, 6, 457 - 464.
23. Verfaillie C.M., Miller, W.J., Boylan, K. and McGlave PB: Selection of benign primitive hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia on the basis of HLA-DR antigen expression. *Blood*, 79, 1992, s. 1003 - 1010.
24. Lotzová E., Savary C.A., Schachner J.R. et al.: Generation of cytotoxic NK cells in

- peripheral blood and bone marrow of patients with acute myelogenous leukemia after continuous infusion with recombinant interleukin - 2. *Am J Hematology* 37, 1991, s. 88-99.
25. Siena S., Bregni M., DiNicola M., Peccatori E. et al.: Milan protocol for clinical CD34 cell estimation in peripheral blood for autografting in patients with cancer. *Hematopoietic Stem Cells*. The Mulhouse Manual. AlphaMed Press., Dayton, 23-31 (1994).
 26. Galton, D.A.G.: Chemotherapy of chronic myelocytic leukemia. *Semin Hematol* 6, 1969, s. 323-343.
 27. Horowitz, M.M., Gale, R.P., Sondel, P.M. et al.: Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*, 75, 1990, s. 555-562.
 28. Atkinson, The EBMT Data Book, Therapeutic decision making in marrow transplantation for chronic myeloid leukemia, 1998, 73-87
 29. Kantarjian, H.M., Dixon, D., Keating, M.J. et al.: Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukaemia. *Cancer*, 61, 1988, s. 1441-1446.
 30. Larson, R.S., Wolff, S.N., Chronic myelogenous leukemia in: *Wintrobe's Clinical Hematology*, Tenth Edition, 1999, s. 2342.
 31. Kantarjian, H.M., Talpaz, M.: Long-term follow-up results of -interferon therapy in chronic myelogenous leukemia at MD Anderson Cancer Center. *Leuk. Lymphoma*, 11, 1993, s. 169-174.
 32. Talpaz, M., Kantarjian, H.M., Kurzrock, R. et al.: Interferon-alpha produces sustained cytogenetic responses in chronic myelogenous leukemia. *Ann. Intern. Med.*, 114, 1991, s. 532-538.
 33. Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, et al: Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in combination with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 622-632.
 34. Coulombel L., Kalousek DK, Eaves CJ, Gupta CM, Eaves AC: Long-term marrow culture reveals chromosomally normal hematopoietic progenitor cells in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 1983, 308, s. 1493 - 1498.
 35. Areman E.M., Kotula-Rhodes., Rajagopal C. et al.: Effect of 24-hour culture with interleukin 2 (IL-2) on progenitor cells in autologous bone marrow (ABM) and peripheral blood stem cells (PBSC) from patients with hematological malignancies. *Blood* 1996, 88; (Suppl.1), abstr. 437
 36. Beaujean F. et al.: Successful engraftment after autologous transplantation of 10-day cultured bone marrow activated by interleukin-2 patients with acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15, 5: 691-696.
 37. Klingemann HG, Eaves CJ, Barnett MJ et al: Transplantation of patients with high risk acute myeloid leukemia in first remission with autologous marrow cultured in interleukin-2 followed by interleukin-2 administration. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14: 389-396.
 38. Margolin KA, Van Besien K., Wright C. et al.: Immunotherapy of hematological malignancies with autologous bone marrow transplant (AMBT) using in vitro interleukin 2 (IL-2) treated bone marrow (BM). *Blood* 1995, 86 (Suppl 1): abstr. 1541.
 39. Bendall, L.J., Kortelpe K., Gottlieb DJ.: GM-CSF enhances IL-2-activated natural killer lysis of clonogenic AML cells by upregulation target cell expression of ICAM-1. *Leukemia* 9, 1995, s. 677-684.
 40. Cortes J., Kantarjian H, O'Brien S, Kurzrock et al.: GM-CSF can improve the cytogenetic response obtained with interferon-alpha therapy in patients with chronic myelogenous leukemia. *Leukemia*, 12, 1998, s. 860-864.
 41. Verfaillie, C.M., Bhatia, R., Miller, W. et al: BCR/ABL-negative primitive progenitors suitable for transplantation can be selected from marrow of most early-chronic phase but not accelerated-phase chronic myelogenous leukemia patients. *Blood*, 87, 1996, 11, s.4770-4779
 42. Deisseroth A.B., Zhifei Zu, Claxton D. et al.: Genetic marking shows that Ph positive cells present in autologous transplant of chronic myelogenous leukemia (CML) contribute to relapse after autologous bone marrow in CML. *Blood* 1994, 83, s. 3068 - 3076.
 43. Aguila HL, Weissman I: Hematopoietic stem cells are not direct cytotoxic targets of natural killer cells. *Blood* 1996; 87, 4: 1225-1231.
 44. Verma UN, Bagg A., Brown E. and Mazumder A.: Interleukin 2 activation of human bone marrow in long-term cultures: an effective strategy for purging and generation of anti-tumor cytotoxic effectors. *Bone Marrow Transplant* 1994, 13, 115 - 123.
 45. Verfaillie MC, Bhatia R, Steinbuch M, DeFor et al.: Comparative analysis of autografting in chronic myelogenous leukemia: Effects of priming regimen and marrow or blood origin of stem cells. *Blood*, 92, 1998, 5, s 1820-1831.