

# Применение инфузий Т-клеток памяти с целью профилактики вирусных инфекций у пациентов с гемобластозами, перенесших аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток с деплецией $\alpha/\beta$ -Т-лимфоцитов

С.Л. Благов, Л.Н. Шелихова, Е.Ю. Осипова, В.В. Киселева, А.С. Казаченко, Ж.Б. Шеховцова, А.А. Богоявленская, Г.А. Новичкова, А.А. Масчан, М.А. Масчан

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Вирусные инфекции – частое осложнение у реципиентов аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) с  $TCR\alpha\beta$  и CD19-деплецией трансплантата. Согласно нашей гипотезе, адаптивная клеточная терапия может помочь в обеспечении терапевтического контроля над вирусными инфекциями. В работе представлены данные ретроспективного анализа безопасности применения инфузий CD45RA-деплетированных донорских лимфоцитов. Проанализированы данные 80 пациентов; медиана кратности введения клеточного продукта для каждого больного – 3 (от 1 до 4) инфузии; медиана наблюдения для живых пациентов – 18 (от 8 до 44) мес. Аллергических реакций, септических осложнений после инфузии донорских лимфоцитов (ИДЛ) не отмечено. Кумулятивная вероятность *de novo* острой реакции «трансплантат против хозяина» (oPTPH) после ИДЛ составила 5% (95%-й ДИ: 2–13). У 51 (64%) пациента выявлен цитомегаловирус (ЦМВ) в крови. Случаев резистентной ЦМВ-болезни на фоне лекарственной терапии не было. Среди пациентов, получивших ИДЛ, у 56 (70%) документировано появление вирус-специфичных лимфоцитов в периферической крови. Таким образом, введение Т-клеток памяти после приживления трансплантата в дозе  $25\text{--}100 \times 10^3/\text{кг}$  массы тела реципиента по CD3+ в случае ТГСК от гаплоидентичного донора и  $100\text{--}300 \times 10^3/\text{кг}$  для неродственной совместимой ТГСК с  $TCR\alpha\beta$  и CD19-деплецией – безопасный и потенциально эффективный способ обеспечения защиты от вирусных инфекций.

**Ключевые слова:** Т-клетки памяти,  $TCR\alpha\beta$ -деплегия, аллогенная ТГСК.

## Low dose donor memory T-cell infusion after TCR alpha/beta depleted stem cell transplantation for patients with malignant disorders

S.L. Blagov, L.N. Shelikhova, E.Y. Osipova, V.V. Kiseleva, A.S. Kazachenok, Z.B. Shekhovtsova, A.A. Bogoyavlenskaya, G.A. Novichkova, A.A. Maschan, M.A. Maschan

Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

Viral infections are frequent complications in the recipients of the HSCT with  $TCR\alpha\beta$  and CD19-graft depletion. Adoptive transfer of memory T cells may improve immune response to common pathogens. The work reflects the retrospective safety analysis of using the infusions of CD45RA-depleted donor lymphocytes. Data from 80 patients were analyzed. Up to 3 doses of donor lymphocytes were administered at monthly intervals, escalating to  $100 \times 10^3/\text{kg}$  in haploidentical transplants and  $300 \times 10^3/\text{kg}$  in MUD transplants. Median follow-up for alive patients was 18 (8–44) months. We did not observe any allergic reactions, septic complications after infusion of donor lymphocytes (DLI). The cumulative incidence of a *de novo* acute GVHD after DLI was 5% (95% CI: 2–13). In 64% patients ( $n = 51$ ) was detected CMV in the blood. There were no cases of resistant CMV disease on the background of drug therapy. In patients who received DLI, 70% ( $n = 56$ ) had documented appearance of virus-specific lymphocytes in peripheral blood (Elispot assay). Thus, the introduction of memory T cells at a dose of  $25\text{--}100 \times 10^3/\text{kg}$  body weight of the recipient for CD3+ in the case of HSCT from a haploidentical donor and  $100\text{--}300 \times 10^3/\text{kg}$  for an unrelated HSCT. Infusions of low dose memory T-lymphocytes after transplant engraftment are safe, potentially effective and constitute a simple measure to prevent infections in the setting of alpha/beta T-cell-depleted transplantation.

**Key words:** memory T-cells, graft  $TCR\alpha\beta$  depletion, allogeneic HSCT.

### Контактная информация:

Благов Сергей Львович, врач-гематолог отделения ТГСК №1 НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России. Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1. E-mail: sblagov89@gmail.com

DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-2-9-20

### Correspondence:

Sergei L. Blagov, MD, Department of optimization treatment and prevention of complications of hematopoietic stem cell transplantation, Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation. Address: Russia 117997, Moscow, Samory Mashela st., 1. E-mail: sblagov89@gmail.com

Реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) – одна из ведущих причин неудачных исходов трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) от неродственных и частично совместимых (гаплоидентичных) родственных доноров [1]. Один из наиболее эффективных методов профилактики РТПХ – деплеция  $\alpha/\beta$ -Т-лимфоцитов [1–3]. Данная технология обеспечивает быстрое и стабильное приживление, а также достижение иммунореаконституции в более короткий срок по сравнению с другими способами деплеции Т-клеток [4–6]. Одно из наиболее серьезных негативных последствий удаления Т-лимфоцитов из трансплантата – медленное восстановление функции адаптивного иммунитета [7]. Конечный состав трансплантата после деплеции  $\alpha/\beta$ -Т-лимфоцитов включал в себя натуральные киллеры (НК-клетки) и  $\gamma\delta$ -Т-лимфоциты [1, 2]. Эти субпопуляции эффекторов врожденного иммунитета обладают существенной противовирусной активностью, обеспечивая дополнительный контроль над вирусными инфекциями на ранних сроках после ТГСК [8]. Однако в профильной литературе продемонстрированы данные о высокой вероятности реактивации цитомегаловируса (ЦМВ) у реципиентов TCR $\alpha\beta$ -деплецированных трансплантаций – не менее 50% при медиане реактивации около 35 дней после трансплантации [9]. Кумулятивная вероятность реактивации ЦМВ-виремии у пациентов, перенесших аллогенную ТГСК с TCR $\alpha\beta$ -деплецией по поводу заболеваний злокачественной природы, по данным, опубликованным НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, составляет 58% [10]. Очевиден негативный характер возможных последствий персистенции ЦМВ-инфекции, а также прочих вирусных патогенов для пациента с индуцированным дефицитом Т-клеточного звена иммунитета. Следствием отсроченной иммунореаконституции является высокий риск развития тяжелых (вплоть до фатальных) проявлений вирусных инфекций [6, 10]. Контроль таких инфекций требует больших затрат и резко ограничивает эффективность использования коечного фонда отделений ТГСК.

Опубликованы данные о применении достаточно затратной и технически сложной методики адаптивного трансфера патоген-специфичного иммунитета посредством *ex vivo* стимуляции или селекции вирус-специфичных донорских лимфоцитов против конкретных возбудителей с последующей их трансфузией реципиентам [11–14]. Альтернатива переносу вирус-специфичных лимфоцитов – использование фракции Т-лимфоцитов памяти, полученной в результате иммуномагнитной деплеции CD45RA-положительной фракции. Продукт CD45RA-

деплеции обладает сниженной аллореактивностью и сохраняет реактивность по отношению к наиболее распространенным вирусным патогенам, таким как ЦМВ, аденовирус (АДВ) и вирус Эпштейна–Барр (ЭБВ). Инфузии данного клеточного продукта в раннем посттрансплантационном периоде реципиентам TCR $\alpha\beta$  и CD19-деплецированных ТГСК могут послужить более эффективным инструментом переноса иммунной памяти против широкого комплекса патогенов, осуществить ускорение иммунореаконституции и обеспечить необходимый контроль над вирусными инфекциями на период вторичного посттрансплантационного иммунодефицита [15–20].

В НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России было инициировано пилотное исследование, результаты которого подтвердили гипотезу о безопасности инфузий донорских лимфоцитов памяти. В настоящей работе отражены результаты ретроспективного анализа безопасности и потенциальной эффективности данного метода при применении в расширенной группе пациентов со злокачественными новообразованиями гемопоэтической и лимфоидной тканей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проанализированы данные 80 пациентов, перенесших аллогенную ТГСК с процессингом трансплантата посредством технологии TCR $\alpha\beta$  и CD19-деплеции от полностью совместимых неродственных ( $n = 17$ ) и гаплоидентичных ( $n = 63$ ) доноров. Обязательными критериями включения пациентов в исследование, помимо факта проведенной деплецированной ТГСК по поводу заболевания крови злокачественной природы, были документированное приживление трансплантата (гемограмма, общий донорский химеризм в костном мозге), ЦМВ-серопозитивный статус пары «донор–реципиент», а также отсутствие активных признаков РТПХ, течения сепсиса или иной неконтролируемой инфекции.

За период с 27.02.2014 по 17.03.2017 инфузию CD45RA-деплецированных донорских лимфоцитов получили 103 пациента с гемобластомами. Из анализа были исключены 23 больных, получивших первое введение Т-клеток памяти в первые две недели после ТГСК, до регистрации приживления трансплантата. Средний возраст пациентов составил 10 лет (от 1 до 25). Все пациенты были трансплантированы по поводу заболеваний злокачественной природы: острый лимфобластный лейкоз ( $n = 30$ ), острый миелобластный лейкоз ( $n = 40$ ), другие лейкомии ( $n = 6$ ), лимфомы ( $n = 4$ ). Характеристика пациентов, доноров, нозологические формы заболеваний, а также состав трансплантата представлены в *таблице 1*.

Таблица 1

**Характеристика реципиентов, доноров. Состав трансплантата**

Пациенты, n = 80	
Пол, м : ж	47 : 33
Возраст на момент ТГСК, лет	10 (1–25)
Диагноз	
ОМЛ (вне ремиссии), n	40 (11)
ОЛЛ, n	30
Другие (ЮММЛ, ОБЛ, МДС)	6
Лимфомы	4
Доноры	
Гаплоидентичные, n	63
Совместимые неродственные (родственные), n	16 (1)
Возраст, лет	33 (3–55)
Пол, м : ж	36 : 44
Состав трансплантата	
CD34+ × 10 <sup>6</sup> /кг	9 (3,2–12,9)
TCRαβ+ × 10 <sup>3</sup> /кг	16,3 (0,8–266)

Примечание: ОМЛ – острый миелобластный лейкоз; ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз; ОБЛ – острый билинейный лейкоз; ЮММЛ – ювенильный миеломоноцитарный лейкоз; МДС – миелодиспластический синдром.

**Режимы кондиционирования и профилактика РТПХ.** В качестве базового алкилирующего агента применяли тиофосфамид (n = 2) или треосульфан в дозе 42 г/м<sup>2</sup> (n = 54) в комбинации с мельфаланом – 140 мг/м<sup>2</sup> (n = 26), тиофосфамидом – 10 мг/кг (n = 25) или циклофосфамидом – 120 мг/кг (n = 1).

Часть пациентов с острым лимфобластным лейкозом (n = 22) и пациенты с острым миелобластным лейкозом, для которых ТГСК была повторной (n = 2), получили курс тотального облучения тела в курсовой дозе 12 Гр и этопозид в суммарной дозе 60 мг/кг. В качестве серотерапии применяли кроличий антиtimoцитарный глобулин (*Thymoglobulin, Genzyme*) в курсовой дозе 5 мг/кг (n = 58).

Иммуносупрессивную профилактику РТПХ бортезомибом получили 65 пациентов в дозе 1,3 мг/м<sup>2</sup> в -5, -2, +2 и +5-й дни. Пациентам с рефрактерными лейкозами для сохранения эффекта «трансплантат против опухоли» вместо антиtimoцитарного глобулина применяли комбинацию иммуносупрессивных препаратов в составе: тоцилизумаб – 8 мг/кг в -1-й день и абатацепт – 10 мг/кг в -1, +7, +14, +28-й дни (n = 22). Профилактику РТПХ такролимусом с -1 до +30-х суток после ТГСК проводили 4 пациентам. Все пациенты в составе кондиционирования

Таблица 2

**Режимы кондиционирования. Профилактика РТПХ**

Режим кондиционирования	Кол-во пациентов
Треосульфан/флударабин	2
Треосульфан/флударабин/циклофосфамид	1
Треосульфан/флударабин/мельфалан	26
Треосульфан/флударабин/тиофосфамид	27
TBI* 12 Гр тиофосфамид/флударабин	14
TBI 12 Гр этопозид/флударабин	10
Серотерапия	
Тимоглобулин	58
Посттрансплантационная профилактика РТПХ	
Такролимус	4
Бортезомиб	45
Бортезомиб + абатацепт + тоцилизумаб	22
Без профилактики	9

\* TBI – тотальное облучение тела.

получили флударабин в дозе 150 мг/м<sup>2</sup> – с -6 по -2-е сутки и ритуксимаб – 100 мг/м<sup>2</sup> за день до инфузии периферических стволовых клеток крови (ПСКК) с целью дополнительного удаления донорских и реципиентских В-клеток и снижения рисков возникновения посттрансплантационного лимфопролиферативного заболевания и РТПХ. Дополнительно данные по кондиционированию пациентов и профилактике РТПХ представлены в таблице 2.

**Процессинг трансплантата.** В качестве субстрата для трансплантации у пациентов были использованы донорские периферические стволовые клетки крови, стимулированные перед аферезом посредством гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ). Трансплантат подвергался процедуре процессинга с удалением α/β-T-лимфоцитов, а также В-лимфоцитов (CD19+) с помощью аппарата *CliniMACS Plus (Miltenyi Biotec, Германия)*. Медиана эффективности деплеции для α/β-T- и В-лимфоцитов составляла 4,4 (от 3,1 до 5,7) log и 2,5 (от 1,3 до 3,4) log соответственно; медиана дозы α/β-T-лимфоцитов в трансплантате – 16,3 × 10<sup>3</sup>/кг (от 0,8 до 266); В-клеток – 169 × 10<sup>3</sup>/кг (от 24,7 до 3864); CD34+ клеток – 8,8 × 10<sup>6</sup>/кг (от 3,2 до 12,9).

Заготовка фракции донорских лимфоцитов памяти. У 69 (86%) пациентов в качестве субстрата для производства донорских лимфоцитов памяти применяли продукт афереза Г-КСФ-стимулированных доноров. Продукт лейкоцитафереза от нестимулированных доноров получили 7 (9%) больных, а для 4 (5%) пациентов Т-клетки памяти получены из цельной донорской крови. Для всех пациентов ( $n = 80$ ) проводили процессинг с удалением CD45RA+ фракции клеток из исходного материала, содержавшего от 2 до  $5 \times 10^9$  моноклеаров (MNC) с применением технологии иммуномагнитной сортировки на платформе *CliniMACS Plus, Depletion 2.0* или *CliniMACS Prodigy*. Дозу иммуномагнитного реагента выверяли пропорционально объему инкубации. Полученный продукт вводили как «свежим», так и после разморозки. Медиана эффективности деплеции для CD3+CD45RA+ фракции составила 3,8 log (от 1,8 до 5,2), а «выход» CD3+CD45RO+ – 43% (от 9 до 93). Замороженные аликвоты впоследствии ретроспективно оценивали на предмет содержания ЭБВ, ЦМВ и АДВ-специфичных лимфоцитов посредством методики IFN- $\gamma$  ELISPOT.

Режимы введения инфузий донорских лимфоцитов (ИДЛ). На +30-е сутки после Т-деплезированной ТГСК при отсутствии признаков ОРТПХ, после констатации факта приживления трансплантата пациенты планово получали заранее заготовленный CD45RA-деплементированный клеточный продукт от тех же доноров. Дозу ИДЛ определяли в зависимости от индивидуальных характеристик пары «донор–реципиент». В первый раз Т-клетки памяти вводили в количестве (расчет на CD3+)  $25 \times 10^3$ /кг (для реципиентов гаплоидентичных трансплантаций) или

$100 \times 10^3$ /кг (для реципиентов полностью совместимых неродственных ТГСК). Далее пациентам продолжали вводить CD45RA-деплементированные донорские лимфоциты с интервалом в 1 месяц и последующей эскалацией дозы до максимума –  $100 \times 10^3$ /кг при гаплоидентичных ТГСК и  $300 \times 10^3$ /кг при ТГСК от неродственных доноров. Коррекция дозы допускалась индивидуально, по согласованию с руководителем протокола, и зависела от контекста клинической ситуации. Изменение плана введения Т-клеток памяти (снижение дозы) осуществляли в случае предшествующих накануне клинических проявлений ОРТПХ. При нарастании вирусной нагрузки (ЦМВ, АДВ-инфекция), плохо контролируемой стандартными лекарственными препаратами, а также в случае развития молекулярного рецидива дозу вводимых лимфоцитов увеличивали. Состав и тайминг инфузий CD45RA-деплементированных донорских лимфоцитов представлены в таблице 3.

Лабораторный мониторинг. ЦМВ или ЭБВ-вирусемии диагностировали при наличии более 500 копий вирусной ДНК на 1 мл цельной венозной крови. Положительный результат ПЦР после двух последовательных еженедельных отрицательных значений расценивался как реактивация. ЦМВ, АДВ или ЭБВ-болезнь констатировали в случае обнаружения вирусной ДНК, либо иммуногистохимической детекцией вирусного антигена в соответствующем образце ткани с клиническими признаками повреждения органа (независимо от наличия вирусной ДНК в крови). Ни фоскарнет, ни ганцикловир в качестве плановой лекарственной противовирусной профилактики не применяли. Мониторинг ЦМВ и ЭБВ проводили еженедельно с помощью количественной ПЦР плазмы

Таблица 3

**Состав и тайминг инфузий CD45RA-деплементированных донорских лимфоцитов**

Показатель		ИДЛ № 1 n = 80	ИДЛ № 2 n = 72	ИДЛ № 3 n = 60
День ИДЛ*		37 (17–56)	75 (4–189)	105 (64–274)
CD3 (CD45RO) доза, $10^3$ /кг	**Гапло n = 63	<b>25 (n = 60)*</b> 50 (n = 2) 100 (n = 1)	25 (n = 5) <b>50 (n = 47)</b> 100 (n = 5)	25 (n = 1) 50 (n = 18) <b>100 (n = 29)</b>
	***Совместимые n = 17	25 (n = 3) 50 (n = 1) <b>100 (n = 13)</b>	50 (n = 2) 100 (n = 1) <b>200 (n = 12)</b>	50 (n = 2) 200 (n = 1) <b>300 (n = 9)</b>
CD45RA $\times 10^3$ /кг		0	0	0
ЦМВ-Т/кг (медиана)		61 (0–13458)	104 (0–26916)	208 (8–40374)
Адено-Т/кг (медиана)		15 (0–12037)	33 (0–24075)	52 (0–22329)
ЭБВ-Т/кг (медиана)		33 (0–21472)	70 (0–42944)	75 (0–33620)

\* Донорская инфузия лимфоцитов; \*\* реципиенты гаплоидентичных ТГСК; \*\*\* реципиенты ТГСК от совместимых неродственных (родственных) доноров.

крови – со дня ТГСК до +30 суток после последней ИДЛ, а затем в зависимости от проводимой иммуносупрессивной терапии, полученных ранее данных о вирусной реактивации и восстановлении иммунитета.

После первого обнаружения ДНК ЦМВ (более 500 копий на 1 мл крови) назначали лекарственную терапию препаратами ганцикловир или фоскарнет. Обнаружение ЦМВ-специфичных Т-клеток проводили по методике IFN- $\gamma$  ELISPOT перед первым и каждым последующим ИДЛ, ELISPOT 1 месяц после последней ИДЛ и через 1 год после ТГСК. Титр ЭБВ- и АДВ-специфических донорских лимфоцитов у пациентов также контролировали с помощью анализа IFN- $\gamma$  ELISPOT. Степень РТПХ оценивали в соответствии со стандартными критериями [21].

**Методика IFN- $\gamma$  ELISPOT.** Мононуклеарные клетки выделяли из свежей цельной крови с использованием специализированной среды (Cedarlane Laboratories Limited). Далее происходила их разморозка с последующим помещением в водяную баню при температуре 37 °С. После промывки в стерильном натрий-фосфатном буферном растворе клетки подсчитывали на цитометре и ресуспендировали в бессывороточных тестируемых средах CTL-TestTM (Cellular Technology Limited – CTL). Для исследования использовали антигены: PepTivator CMV pp65-premium grade, PepTivator Adv5, Hexon-premium и PepTivator, EBV Consensus-premium grade (Miltenyi Biotec, Бергш-Гладбах, Германия) в концентрации 0,6 нмоль/мл. Вирус-специфичные Т-клетки были обнаружены при помощи анализа ELISPOT с использованием набора IFN- $\gamma$  ELISPOT (CTL). Фитогемагглютинин использовали в качестве неспецифического стимулятора для положительного контроля в конечной концентрации 100 мкг/мл. Все манипуляции с клетками и разведения антигена проводили в бессывороточной среде. Антиген-индуцированную продукцию IFN- $\gamma$  измеряли в трех повторных лунках на автоматизированном считывателе Elispot ImmunoSpot Series 5 UV Analyzer (C.T.L., Cleveland, OH) с использованием автоматизированного программного обеспечения.

**Дизайн исследования и статистический анализ.** Ведущая исследуемая проблема данного ретроспективного анализа – определение кумулятивной вероятности возникновения оРТПХ после ИДЛ. Смерть от любой причины без признаков РТПХ, рецидива лейкемии считалась конкурирующим событием. Исследовали также динамику иммунного ответа к ЦМВ, оценивали темпы иммунореконституции и основные клинические исходы, включая общую выживаемость, смертность, связанную с трансплантацией, кумулятивную вероятность возникновения хронической РТПХ, а также кумулятивную вероятность развития рецидива основного заболевания. Для сравнения групп использовали тест Манна–Уитни и точный кри-

терий Фишера. Общую выживаемость рассчитывали по Каплану–Майеру. В качестве конкурирующего события по отношению к смертности, связанной с трансплантацией, был определен рецидив злокачественного заболевания. Для анализа общей и бес-событийной выживаемости живые пациенты были цензурированы 01.11.2017. Все участники исследования (либо их законные опекуны) предоставили информированное согласие на участие в проекте. Пилотный протокол был зарегистрирован под номером NCT02337595 на сайте [www.ClinicalTrials.gov](http://www.ClinicalTrials.gov).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе исследования 80 пациентов получили 234 инфузии CD45RA-деплетированных донорских лимфоцитов; медиана кратности введений клеточного продукта – 3 (от 1 до 4) инфузии для каждого больного. В ИДЛ содержалось различное количество вирус-специфичных Т-клеток (см. табл. 3). Медиана наблюдения живых пациентов составила на момент написания данной работы 18 (от 8 до 44) месяцев.

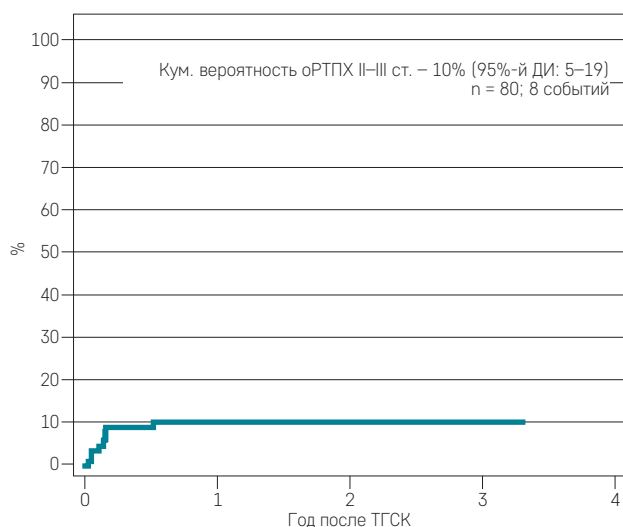
**Статус пациентов на момент первой инфузии клеток памяти.** У 4 пациентов до ИДЛ № 1 были выявлены первые признаки оРТПХ II–III стадии. На момент первой инфузии Т-клеток памяти 78 пациентов не получали иммуносупрессивную терапию. Один пациент получал глюкокортикостероиды в дозе 0,3 мг/кг с лечебной целью. Одному пациенту первое введение CD45RA-деплетированных донорских лимфоцитов выполнено вне активных признаков РТПХ, однако на фоне двухкомпонентной иммуносупрессивной терапии (преднизолон – 1 мг/кг, такролимус) в связи с напряженным инфекционным статусом: АДВ-инфекция (локусы: кровь, стул) и ЦМВ-виремия, плохо контролируемые лекарственной терапией.

**Безопасность (реакция «трансплантат против хозяина»).** Ни одна из инфузий клеток памяти не была осложнена аллергическими реакциями или сопряжена с присоединением септического процесса. Признаки оРТПХ II–III стадии развили 7 пациентов (4 – *de novo*; 3 – реактивация). У 2 больных активация РТПХ произошла после ИДЛ № 1 (через 15 и 20 дней); у одного – после ИДЛ № 2 (через 18 дней) и у 3 пациентов после 3-й инфузии клеток памяти (через 19, 33, 90 дней). У одного пациента манифестация РТПХ совпала с днем ИДЛ № 1.

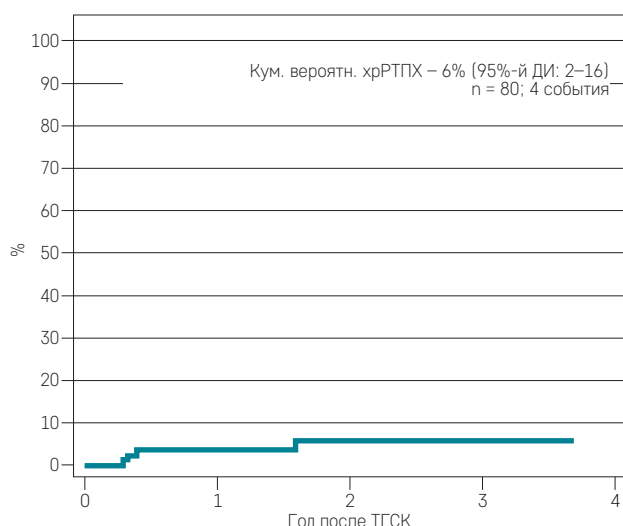
У 8 пациентов из всех ( $n = 80$ ) возникали признаки оРТПХ на любом этапе наблюдения (до либо после инфузии клеток памяти). Таким образом, кумулятивная вероятность возникновения оРТПХ для всей группы пациентов составила 10% (95%-й ДИ: 5–19) (рис. 1). У 2 пациентов возникла оРТПХ III стадии. Ни у одного больного не было проявлений оРТПХ IV стадии. У 4 пациентов оРТПХ II–III стадии возникла

**Рисунок 1**

Кумулятивная вероятность возникновения острой РТПХ II–III стадии для всей исследуемой группы пациентов

**Рисунок 3**

Кумулятивная вероятность возникновения хронической РТПХ у всей группы пациентов

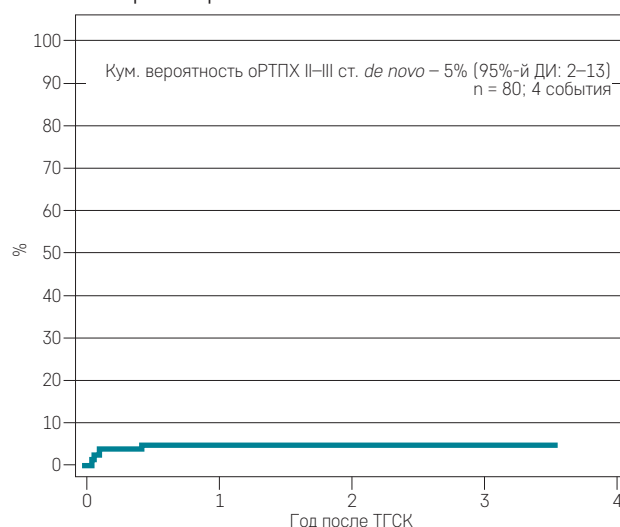


*de novo* после инфузии клеточного продукта. Таким образом, кумулятивная вероятность *de novo* о.РТПХ после ИДЛ составила 5% (95%-й ДИ: 2–13) (рис. 2).

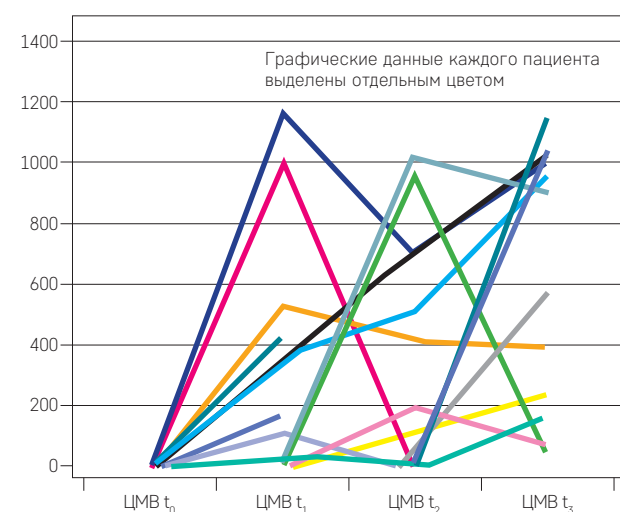
Среди 7 пациентов, развивших о.РТПХ после ИДЛ, один ответил на стандартную иммуносупрессивную терапию. Хроническая РТПХ (хр.РТПХ) развилась у 4 пациентов, все они живы на момент анализа данных этого исследования; один пациент в настоящее время продолжает терапию РТПХ. Ни у одного из пациентов не развилась *de novo* хр.РТПХ. Кумулятивная вероятность возникновения хр.РТПХ составила 6% (95%-й ДИ: 2–16) (рис. 3). Два пациента, у которых произошла активация о.РТПХ *de novo*, умерли (у одного – рецидив основного заболевания; у другого – геморрагический инсульт).

**Рисунок 2**

Кумулятивная вероятность возникновения острой РТПХ II–III стадии после введения клеточного продукта у пациентов, не имевших ранее признаков оРТПХ

**Рисунок 4**

Динамика экспансии ЦМВ-реактивных Т-лимфоцитов после инфузии CD45RA-деплетированных донорских лимфоцитов у пациентов, не имевших ЦМВ-специфичных клеток до 1-й инфузии

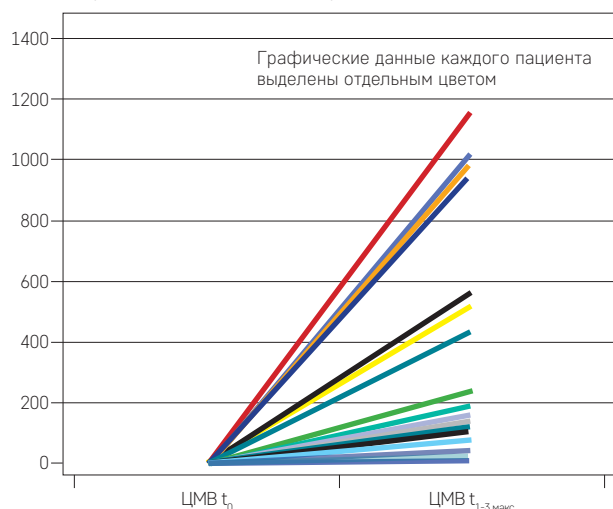


Примечание: ЦМВ  $t_0$ , ЦМВ  $t_1$ , ЦМВ  $t_2$ , ЦМВ  $t_3$  – контрольные точки после ТГСК, в которых исследовали ЦМВ-реактивность (клеток/300 тыс. мононуклеарных клеток крови) методом *Elispot*.

**Вирусные инфекции.** У 51 (64%) пациента документирована ЦМВ-виремия. У 43 (54%) пациентов ЦМВ-виремия была зарегистрирована до или в течение 1-й недели после первой ИДЛ; медиана срока реактивации – 4 (от 1 до 31) дня до 1-й инфузии. У 8 (10%) пациентов ЦМВ-реактивация произошла после начала профилактических ИДЛ. Упреждающую фармакологическую противовирусную терапию получили 45 пациентов. Медиана продолжительности ЦМВ-позитивности составила 4 (от 1 до 26) нед., медиана количества реактиваций – 1 (от 1 до 2); медиана длительности лекарственной противовирусной терапии (ганцикловир, фоскарнет) – 5 (от 2 до 28) недель. ЦМВ-болезнь развилась у 11 пациентов (22% общего числа пациентов с ЦМВ-виремией и

**Рисунок 5**

Динамика максимального прироста ЦМВ-специфичных Т-лимфоцитов (клеток/300 тыс. мононуклеарных клеток крови) от момента точки  $t_0$  (до ИДЛ № 1) до точки  $t_3$  (+1 мес. после ИДЛ № 3)



14% всех пациентов) с присоединением ЦМВ-хориоретинита ( $n = 4$ ), поражением цитомегаловирусом различных отделов желудочно-кишечного тракта ( $n = 3$ ), ЦМВ-пневмонии ( $n = 1$ ), ЦМВ-энцефалита ( $n = 1$ ). У одного пациента выявлено мультиорганное поражение цитомегаловирусной этиологии: пневмония, хориоретинит, колит. Медиана манифестации ЦМВ-болезни — 5-я неделя (от 0 до 22) от первого обнаружения ЦМВ в крови. Пациентам с ЦМВ-хориоретинитом проводили еженедельные интравитреальные введения фармакологических противовирусных препаратов с детекцией ДНК ЦМВ в глазной жидкости (ПЦР). У одного пациента, перенесшего ЦМВ-хориоретинит, впоследствии диагностирована отслойка сетчатки обоих глаз. Резистентного течения ЦМВ-болезни на фоне лекарственной терапии, а также случаев смертельного исхода, непосредственной причиной которого стала неконтролируемая ЦМВ-инфекция, зарегистрировано не было. Течение ЦМВ-болезни у пациентов подробно представлено в таблице 4. ЭБВ-инфекция, требовавшая лекарственной коррекции, не зарегистрирована ни у одного пациента. У 3 пациентов выявлена аденовирусная инфекция в крови и кале, в связи с чем провели терапию сидововирусом с эффектом. Одна пациентка с текущей системной АДВ-инфекцией с поражением легких и кишечника на фоне о.РТПХ умерла от острого нарушения мозгового кровообращения (геморрагический инсульт).

**Мониторинг противовирусного иммунного ответа.** У 26 пациентов ЦМВ-реактивные Т-клетки были обнаружены до ИДЛ № 1 (табл. 5); у 4 пациентов нет достоверных результатов анализа ELISPOT во всех необходимых временных периодах, поэтому только 50 пациентов можно было оценить на пред-

мет влияния инфузий Т-клеток памяти как фактора, потенциально способствующего восстановлению ЦМВ-специфического иммунного ответа.

У 12 из 50 пациентов из группы ЦМВ-негативных на момент  $t_0$  (непосредственно перед ИДЛ № 1) были обнаружены ЦМВ-реактивные клетки в момент времени  $t_1$  (непосредственно перед ИДЛ № 2). Еще у 13 пациентов ЦМВ-реактивные Т-клетки выявлены в момент времени  $t_2$  (перед ИДЛ № 3) и у 5 пациентов в момент  $t_3$  (через 30 дней после ИДЛ № 3) (рис. 4). В целом восстановление ЦМВ-специфического иммунитета после ИДЛ было зарегистрировано у 30 (60%) пациентов; медиана максимального количества ЦМВ-реактивных Т-лимфоцитов между  $t_0$  и  $t_{\max 1-3}$  составляла у них 110 (от 5 до 1165) клеток на 300 тыс. МНС крови (рис. 5).

Анализ показал, что из 30 пациентов с детектируемым иммунным ответом к ЦМВ у 25 (83%) имелась ЦМВ-виремия, а среди пациентов без ЦМВ-реактивности — у 3 (16%). Таким образом, обнаружение ДНК ЦМВ в крови достоверно связано с восстановлением ЦМВ-специфического иммунитета ( $p < 0,0001$ , точный критерий Фишера). Значимой корреляции между количеством ЦМВ-специфических лимфоцитов в ИДЛ и ЦМВ-Т-реактивностью у больных исследуемой группы получено не было: у пациентов с ЦМВ-Т-реактивностью медиана дозы ЦМВ-специфичных Т-лимфоцитов в ИДЛ составляла 49 клеток/кг (от 0 до 2720), против 41 клетки/кг (от 2 до 13458) у пациентов, в крови которых ЦМВ-специфические лимфоциты обнаружены не были ( $p = 0,4$ , тест Манна-Уитни). Исследуемые факторы, способные оказать влияние на появление ЦМВ-специфичных Т-клеток, представлены в таблице 6.

На момент  $t_4$  (через 1 год после трансплантации) наблюдались 46 пациентов; у 36 (78%) из них имелась ЦМВ-реактивность (рис. 6). Становление ЦМВ-специфичного клеточного иммунного ответа (на примере одного из пациентов исследуемой группы) показано на рисунке 7. По данным ELISPOT-исследования крови пациента в контрольных точках, отмечено появление постоянной ЦМВ-Т-реактивности со 2-й контрольной точки.

**Общая иммунореконституция.** Темп количественного восстановления основных субпопуляций лимфоцитов у группы пациентов, исследуемой в настоящей работе, при сравнении с другой когортой больных, также перенесших аллогенную ТГСК с деплецией  $\alpha/\beta$ -Т-лимфоцитов, не имел значимых отличий [6, 7].

**Клинические исходы.** Три пациента умерли по причинам, не связанным с прогрессией основного заболевания, через 130 (от 71 до 295) дней после ТГСК и 129 (от 61 до 274) дней после ИДЛ № 1. Кумулятивная вероятность трансплантационной

Таблица 4

**Характеристика пациентов с ЦМВ-болезнью (n = 11)**

МИС ID	Диагноз	Тип ТГСК	РТПХ	ИСТ после ИСТ <sup>3</sup>	Время ЦМВ-болезни от виремии, нед. <sup>4</sup>	Время ЦМВ-болезни от ДЛ, номер/нед. <sup>5</sup>	Длительность лечения ЦМВ, нед.	Органное поражение ЦМВ	Исход ЦМВ-болезни на момент анализа 01.11.2017
25659	ОМП	Неродств. <sup>1</sup>	Нет	Нет	1	1/1	6	Колит	Реконвалесцент
36495	ОЛП	Гапло <sup>2</sup>	Нет	Нет	2	1/2	6	Гастрит	Реконвалесцент
38450	ОМП	Гапло	Нет	Нет	22	3/11	8	Ретинит	Реконвалесцент
38767	ОЛП	Гапло	Нет	Нет	1	1/0	6	Пневмония	Реконвалесцент
31640	ОМП	Гапло	Да	Нет	14	2/5	8	Колит Ретинит Пневмония	Реконвалесцент Отслойка сетчатки обоих глаз
1732	ОЛП	Гапло	Да	Да	0	1/0	4	Пневмония	Реконвалесцент Смерть от ОНМК
14023	ОЛП	Гапло	Да	Да	14	2/5	6	Ретинит	Реконвалесцент
42769	ОЛП	Гапло	Да	Нет	–	2/24	6	Энцефалит	Реконвалесцент
18153	ОМП	Гапло	Нет	Нет	18	3/8	4	Колит	Реконвалесцент
35522	ОЛП	Гапло	Нет	Нет	0	1/1	8	Ретинит	Реконвалесцент
17588	ОМП	Гапло	Да	Да	7	3/1	28	Ретинит	Реконвалесцент

<sup>1</sup> Аллогенная ТГСК от HLA-совместимого неродственного донора.<sup>2</sup> Аллогенная ТГСК от гаплоидентичного донора.<sup>3</sup> Инфузия донорских лимфоцитов.<sup>4</sup> Время манифестации ЦМВ-болезни после появления ЦМВ-виремии, нед.<sup>5</sup> Время манифестации ЦМВ-болезни от предшествующей ИДЛ: номер инфузии/время после инфузии, нед.

Таблица 5

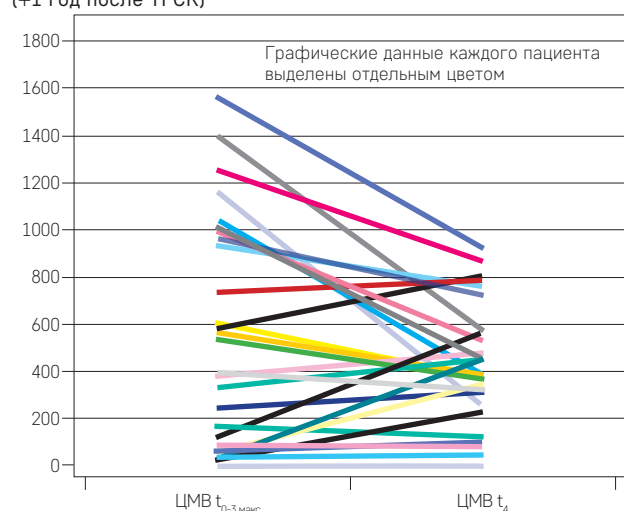
**Общие данные мониторинга патоген-специфической реактивности в динамике**

Показатель	Точка t <sub>0</sub>	Точка t <sub>1</sub>	Точка t <sub>2</sub>	Точка t <sub>3</sub>	Точка t <sub>4</sub>
День анализа после ТГСК (медиана)	+32 (17–61)	+61 (41–97)	+94 (62–132)	+125 (86–204)	+369 (305–469)
Элиспот к ЦМВ, н	76	72	66	58	43
<sup>†</sup> ЦМВ-Т пол., н (%)	26 (34)	28 (39)	38 (57)	44 (76)	34 (79)
<sup>§</sup> ЦМВ-Т отр., н (%)	50 (66)	44 (61)	28 (43)	14 (23)	9 (21)
ЦМВ-Т кл./3 × 10 <sup>5</sup> MNC (медиана)	0 (0–574)	0 (0–1165)	15 (0–1403)	90 (0–1559)	234 (0–932)
γδ-Т-лф., кл./мл (медиана)	61 (0–1127)	93 (0–2046)	103 (3–1450)	135 (5–2236)	157 (5–1276)
**Наивные Т-клетки, кл./мкл	–	1 (0–45)	4 (0–35)	9 (0–128)	310 (2–2975)
Элиспот к АДВ, н	70	69	63	59	45
АДВ-Т пол., н (%)	2 (3)	11 (16)	14 (23)	22 (64)	30 (67)
АДВ-Т кл./3 × 10 <sup>5</sup> MNC (медиана)	0 (0–38)	0 (0–58)	0 (0–243)	1 (0–210)	17 (0–586)
Элиспот к ЭБВ, н	73	70	64	60	44
ЭБВ-Т пол., н (%)	2 (3)	5 (7)	6 (9)	8 (13)	15 (34)
ЭБВ-Т кл./3 × 10 <sup>5</sup> MNC (медиана)	0 (0–32)	0 (0–68)	0 (0–81)	0 (0–172)	1 (0–845)

Примечание: t<sub>0</sub> – точка перед ИДЛ № 1; t<sub>1</sub> – перед ИДЛ № 2; t<sub>2</sub> – перед ИДЛ № 3; t<sub>3</sub> – 30 дней после ИДЛ № 3; t<sub>4</sub> – +1 год после ТГСК; <sup>†</sup>ЦМВ (АДВ, ЭБВ)-Т пол. – уровень > 5 спотов/300 тыс. MNC, по данным ELISPOT; <sup>§</sup>ЦМВ (АДВ, ЭБВ)-Тотр. – уровень 0–5 спотов/300 тыс. MNC, по данным ELISPOT; \*\* CD3+CD45RA+CD197+; MNC – мононуклеарные клетки крови.

**Рисунок 6**

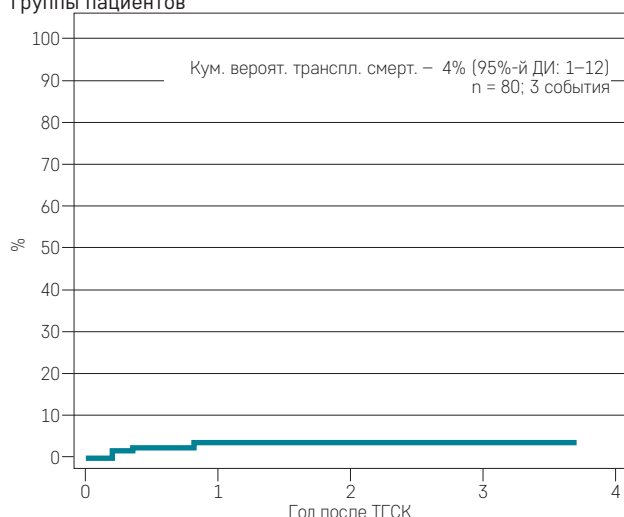
Персистенция ЦМВ-реактивных Т-лимфоцитов на момент  $t_4$  (+1 год после ТГСК)



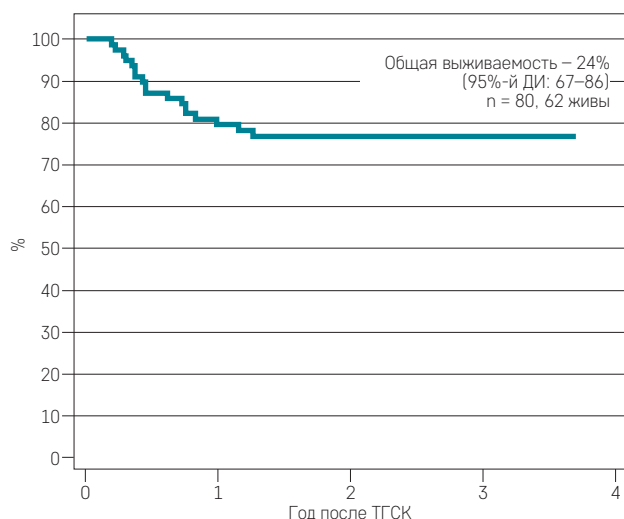
Примечание: ЦМВ  $t_{0-3 \text{ макс}}$  – максимальное значение ЦМВ-специфических Т-лимфоцитов (кл./300 тыс мононуклеарных клеток крови) за период наблюдения до точки  $t_3$  включительно (+120 после ТГСК). ЦМВ  $t_4$  – число ЦМВ-специфических Т-лимфоцитов на момент точки  $t_4$  (+1 год после ТГСК).

**Рисунок 8**

Кумулятивная вероятность трансплантационной смертности (не связанной с прогрессией основного заболевания) у всей группы пациентов

**Рисунок 10**

Общая выживаемость во всей группе пациентов

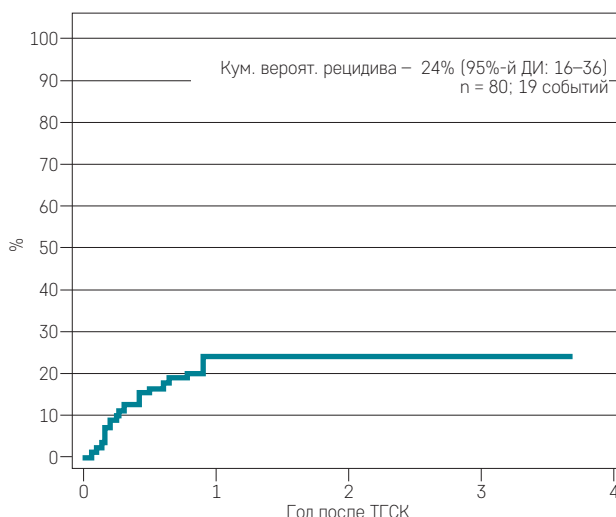
**Рисунок 7**

Становление патоген-специфического иммунного ответа на примере пациента, у которого отмечен позитивный титр ЦМВ-специфических лимфоцитов с точки  $t_1$  (после ИДЛ № 1) и в дальнейшие декретизируемые дни исследования вплоть до +1 года после ТГСК

Пациент 9346	$t_0$ 30.09.2014	$t_1$ 10.11.2014	$t_2$ 15.12.2014	$t_3$ 15.12.2015	$t_4$ 15.12.2015
ЦМВ					
ЦМВ					
ЦМВ					
Положительный контроль					
Отрицательный контроль					

**Рисунок 9**

Кумулятивная вероятность возникновения рецидива основного заболевания у всей группы пациентов

**Рисунок 11**

Бессобытийная выживаемость во всей группе пациентов (событие – рецидив основного заболевания и смерть от любой причины)

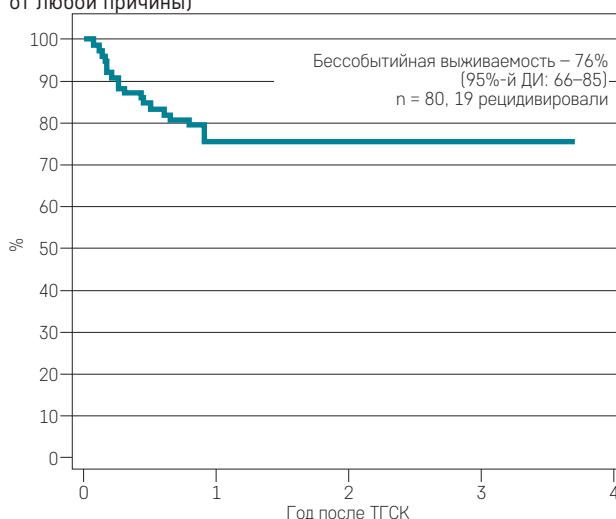


Таблица 6

**Факторы, способные оказать влияние на появление ЦМВ-специфичных Т-клеток до точки  $t_3$  у когорты пациентов, не имевших ЦМВ-реактивности, по данным *Elispot* в точке 0 ( $n = 50$ )**

Показатель	Пациенты с ЦМВ-реактивностью $n = 30$	Пациенты без ЦМВ-реактивности $n = 20$	$p$
			Критерий Манна–Уитни
Доза ЦМВ-Т в ИДЛ, кл./кг (медиана)	49 (0–2720)	41 (2–13458)	0,4
Доза $\alpha\beta$ -Т в трансплантате $\times 10^3$ /кг (медиана)	19 (1–266)	23 (1–116)	0,875
$\gamma\delta$ CD3 количество перед ИДЛ № 1, кл./мкл (медиана)	45 (0–1227)	54 (0–233)	0,85
$\gamma\delta$ CD3 количество перед ИДЛ № 2, кл./мкл (медиана)	81 (0–300)	17 (4–328)	0,42
Возраст донора, лет (медиана)	32 (10–51)	32 (18–45)	0,86
Возраст пациента, лет (медиана)	10 (1–25)	12 (2–18)	0,75
			Точный тест Фишера
ЦМВ-виремия, $n$ (%)	25 (81)	3 (16)	<b>0,0001</b>
Тип донора (гапло : совместимые)	22 : 9	15 : 4	0,74
Пол донора, м : ж	15 : 16	6 : 13	0,38
Источник ИДЛ, G-CSF+ : другие	28 : 3	19 : 0	<b>0,08</b>
Иммуносупрессия после ИДЛ, да : нет	2 : 29	3 : 16	0,35

смертности составила 4% (95%-й ДИ: 1–12) (рис. 8). Одна пациентка с текущей системной АДВ и ЦМВ-инфекцией на фоне оРТПХ умерла от геморрагического инсульта, в двух других случаях ведущей причиной смерти была полиорганная недостаточность в исходе сепсиса. Кумулятивная вероятность развития рецидива основного заболевания составила 24% (95%-й ДИ: 16–36) (рис. 9). Общая выживаемость на сроке 1 год после ТГСК для всей группы составила 77% (95%-й ДИ: 68–86) (рис. 10). Бессобытийная выживаемость на сроке 1 год после ТГСК – 76% (95%-й ДИ: 66–85) (рис. 11).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ полученных данных позволяет оценить безопасность и потенциальную эффективность введения низких доз донорских Т-лимфоцитов, лишенных пула наивных CD45RA+ клеток. Несмотря на то что потенциал аллореактивности фракции Т-клеток памяти был значительно снижен, по данным нескольких исследований [17, 19], перекрестная реактивность репертуара Т-клеток памяти в отношении аллогенных антигенов системы HLA – известный феномен [22–25]. До настоящего времени потенциал Т-кле-

ток памяти в плане индукции РТПХ в клинической практике остается неизученным. Опубликованный клинический опыт свидетельствует о том, что удаление пула наивных Т-клеток не отменяет риск РТПХ [15, 16, 26], хотя и снижает риск развития тяжелых ее форм. По нашим данным, дополнительные инфузии Т-клеток памяти в дозе до  $100 \times 10^3$ /кг для реципиентов гаплоидентичных ТГСК и до  $300 \times 10^3$ /кг в случае трансплантаций от неродственных совместимых доноров связаны с низким риском возникновением РТПХ *de novo*.

Мониторинг ЦМВ-реактивных Т-клеток указывает, что при стимуляции антигеном титр соответствующих реактивных Т-клеток интенсивно нарастает. Возможные источники восстановления ЦМВ-специфичных клонов: остаточные ЦМВ-специфичные клетки памяти в первичном трансплантате; ЦМВ-специфичные Т-лимфоциты памяти в ИДЛ; наивные донорские Т-клетки, продуцированные *de novo*, и Т-лимфоциты реципиента у пациентов со смешанным Т-клеточным химеризмом. Наш анализ показал, что появление наивных Т-клеток, так же как и сохранение реципиентских Т-клеток, практически не коррелирует с эффективной регенерацией клеточного иммунного ответа против ЦМВ. Хотя и

невозможно полностью дифференцировать источник появления анти-ЦМВ иммунного ответа между клетками, полученными из первичного трансплантата и перенесенными посредством дополнительных инфузий Т-клеток памяти, косвенные данные свидетельствуют о том, что роль ИДЛ значительно превалирует. О клинически значимой генерации противовирусного иммунного ответа можно судить при наличии не менее 10 патоген-реактивных клеток на 300 тыс. мононуклеаров крови. У 6 пациентов, реактивировавших ЦМВ максимально до 5 тыс. копий/мл, имевших удовлетворительную ЦМВ-реактивность по данным *ELISPOT* (не менее 100 ЦМВ-специфичных лимфоцитов), не получавших иммуносупрессивную терапию, не имевших признаков ЦМВ-болезни, ЦМВ-виремия была купирована в течение 2 недель без применения лекарственной противовирусной терапии. Передача донорского репертуара иммунной памяти может быть успешно использована в контексте гаплоидентичной трансплантации, при которой общность патогенов внутри семьи позволяет переносить иммунный ответ к определенным штаммам возбудителей. Мы полагаем, что инфузии Т-клеток памяти – надежная и легкая в применении технология для обеспечения защиты от распространенных инфекций до восстановления широкого репертуара Т-лимфоцитов.

В целом наши данные свидетельствуют, что после приживления трансплантата введение донорских лимфоцитов памяти безопасно при диапазоне доз  $25\text{--}100 \times 10^3/\text{кг}$  массы тела реципиента по CD3+ в случае гаплоидентичной ТГСК и  $100\text{--}300 \times 10^3/\text{кг}$  в случае неродственной совместимой ТГСК с TCR $\alpha\beta$ -деплецией. Полученные данные по оценке риска прогрессии рецидива основного заболевания ( $n = 80$ ), составившего 24% (95%-й ДИ: 16–36), представленные на рисунке 5, позволяют рассчитывать на роль CD45RA-деплетированных донорских лимфоцитов как более безопасной, относительно нативной ИДЛ,

терапевтической опции для потенцирования эффекта «трансплантат против опухоли». По данным, полученным в ходе анализа, общая и бессобытийная выживаемость у пациентов исследуемой группы практически не отличаются, что подтверждает отсутствие дальнейших куративных опций у больных со злокачественной патологией кроветворной системы, рецидивировавших после аллогенной ТГСК. Для эффективного использования в качестве профилактической меры необходимо проводить инфузии Т-лимфоцитов памяти рано, предпочтительно как часть первичного трансплантата при условии минимального количества иммуносупрессивной терапии после трансплантации, включая все виды поликлональной серотерапии и других препаратов, способствующих гибели Т-клеток. Если профилактическое введение CD45RA-деплетированных донорских лимфоцитов продемонстрирует эффективность в сравнительных испытаниях, включая рандомизированное исследование NCT02942173, инициированное нашей группой, этот подход может стать экономически выгодным, учитывая стоимость фармакологической терапии для контроля вирусных инфекций после ТГСК [27].

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

#### ORCID

**С.Л. Благов** <http://orcid.org/0000-0001-8754-1376>  
**Л.Н. Шелихова** <http://orcid.org/0000-0003-0520-5630>  
**Е.Ю. Осипова** <http://orcid.org/0000-0002-1873-3486>  
**В.В. Киселева** <http://orcid.org/0000-0002-3001-4820>  
**А.С. Казаченок** <http://orcid.org/0000-0003-0497-9175>  
**Ж.Б. Шеховцова** <http://orcid.org/0000-0002-9912-6572>  
**А.А. Богоявленская** <http://orcid.org/0000-0002-9282-6883>  
**Г.Н. Новичкова** <http://orcid.org/0000-0003-4911-0553>  
**А.А. Масчан** <http://orcid.org/0000-0002-0016-6698>  
**М.А. Масчан** <http://orcid.org/0000-0003-1735-0093>

## Литература

- Chaleff S., Otto M., Barfield R.C., Leimig T., Iyengar R., Martin J., et al. A large-scale method for the selective depletion of alphabeta T lymphocytes from PBSC for allogeneic transplantation. *Cytotherapy* 2007; 9 (8): 746–54.
- Handgretinger R. Negative depletion of CD3(+) and TcRalphabeta(+) T-cells. *Curr Opin Hematol* 2012; 19 (6): 434–9.
- Schumm M., Lang P., Bethge W., Faul C., Feuchtinger T., Pfeiffer M., et al. Depletion of T-cell receptor alpha/beta and CD19 positive cells from apheresis products with the CliniMACS device. *Cytotherapy* 2013; 15 (10): 1253–8.
- Bertaina A., Merli P., Rutella S., Pagliara D., Bernardo M.E., Masetti R., et al. HLA-haploidentical stem cell transplantation after removal of alphabeta+ T and B cells in children with nonmalignant disorders. *Blood* 2014; 124 (5): 822–6.
- Balashov D., Shcherbina A., Maschan M., Trakhtman P., Skvortsova Y., Shelikhova L., et al. Single-Center Experience of Unrelated and Haploidentical Stem Cell Transplantation with TCRalphabeta and CD19 Depletion in Children with Primary Immunodeficiency Syndromes. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; 21 (11): 1955–62.
- Maschan M., Shelikhova L., Ilushina M., Kurnikova E., Boyakova E., Balashov D., et al. TCR-alpha/beta and CD19 depletion and treosulfan-based conditioning regimen in unrelated and haploidentical transplantation in children with acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2016; 51 (5): 668–74.

7. Zvyagin I.V., Mamedov I.Z., Tatarinova O.V., Komech E.A., Kurnikova E.E., Boyakova E.V., et al. Tracking T-cell immune reconstitution after TCRalphabeta/CD19-depleted hematopoietic cells transplantation in children. *Leukemia* 2016; 31: 1145–53.
8. Airoidi I., Bertaina A., Prigione I., Zorzoli A., Pagliara D., Cocco C., et al. gammadelta T-cell reconstitution after HLA-haploidentical hematopoietic transplantation depleted of TCR-alphabeta+/CD19+ lymphocytes. *Blood* 2015; 125: 2349–58.
9. Богоявленская А.А., Лаберко А.Л., Шелихова Л.Н., Шеховцова Ж.Б., Балашов Д.Н., Воронин К.А. и др. Герпес-вирусные инфекции у реципиентов аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток с TCR $\alpha\beta$  и CD19-деплецией: факторы риска и прогноз. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2017; 16 (1): 10–21.
10. Laberko A., Bogoyavlenskaya A., Sheliukhova L., Shekhovtsova Z., Balashov D., Voronin K., et al. Risk Factors for and the Clinical Impact of Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus Infections in Pediatric Recipients of TCR-alpha/beta- and CD19-Depleted Grafts. *Biol Blood Marrow Transplant* 2016; 23: 489–90.
11. Heslop H.E., Ng C.Y., Li C., Smith C.A., Loftin S.K., Krance R.A., et al. Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nat Med* 1996; 2 (5): 551–5.
12. Papadopoulou A., Gerdemann U., Katari U.L., Tzannou I., Liu H., Martinez C., et al. Activity of broad-spectrum T-cells as treatment for AdV, EBV, CMV, BKV, and HHV6 infections after HSCT. *Sci Transl Med* 2014; 6 (242): 242–83.
13. Peggs K.S., Verfuerth S., Pizzey A., Khan N., Guiver M., Moss P.A., et al. Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines. *Lancet* 2003; 362 (9393): 1375–7.
14. Schmitt A., Tonn T., Busch D.H., Grigoleit G.U., Einsele H., Odendahl M., et al. Adoptive transfer and selective reconstitution of streptamer-selected cytomegalovirus-specific CD8+ T-cells leads to virus clearance in patients after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Transfusion* 2011; 51 (3): 591–9.
15. Bleakley M., Heimfeld S., Loeb K.R., Jones L.A., Chaney C., Seropian S., et al. Outcomes of acute leukemia patients transplanted with naive T cell-depleted stem cell grafts. *J Clin Invest* 2015; 125 (7): 2677–89.
16. Shook D.R., Triplett B.M., Eldridge P.W., Kang G., Srinivasan A., Leung W. Haploidentical stem cell transplantation augmented by CD45RA negative lymphocytes provides rapid engraftment and excellent tolerability. *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62 (4): 666–73.
17. Teschner D., Distler E., Wehler D., Frey M., Marandiuc D., Langeveld K., et al. Depletion of naive T cells using clinical grade magnetic CD45RA beads: a new approach for GVHD prophylaxis. *Bone Marrow Transplant* 2014; 49 (1): 138–44.
18. Touzot F., Neven B., Dal-Cortivo L., Gabrion A., Moshous D., Cros G., et al. CD45RA depletion in HLA-mismatched allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for primary combined immunodeficiency: A preliminary study. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135 (5): 1303–19 e1301–3.
19. Bleakley M., Heimfeld S., Jones L.A., Turtle C., Krause D., Riddell S.R., et al. Engineering human peripheral blood stem cell grafts that are depleted of naive T-cells and retain functional pathogen-specific memory T cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014; 20 (5): 705–16.
20. Brodzski N., Turkiewicz D., Toporski J., Truedsson L., Dykes J. Novel treatment of severe combined immunodeficiency utilizing ex-vivo T-cell depleted haploidentical hematopoietic stem cell transplantation and CD45RA+ depleted donor lymphocyte infusions. *Orphanet J Rare Dis* 2016; 11: 5.
21. Przepiorka D., Weisdorf D., Martin P., Klingemann H.G., Beatty P., Hows J., et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15 (6): 825–8.
22. Melenhorst J.J., Leen A.M., Bollard C.M., Quigley M.F., Price D.A., Rooney C.M., et al. Allogeneic virus-specific T-cells with HLA alloreactivity do not produce GVHD in human subjects. *Blood* 2010; 116 (22): 4700–2.
23. Melenhorst J.J., Scheinberg P., Williams A., Ambrozak D.R., Keyvanfar K., Smith M., et al. Alloreactivity across HLA barriers is mediated by both naive and antigen-experienced T cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17 (6): 800–9.
24. D'Orsogna L.J., Roelen D.L., Doxiadis I.I., Claas F.H. Alloreactivity from human viral specific memory T-cells. *Transpl Immunol* 2010; 23 (4): 149–55.
25. D'Orsogna L.J., van der Meer-Prins E.M., Zoet Y.M., Roelen D.L., Doxiadis I.I., Claas F.H. Detection of allo-HLA cross-reactivity by virus-specific memory T-cell clones using single HLA-transfected K562 cells. *Methods Mol Biol* 2012; 882: 339–49.
26. Triplett B.M., Shook D.R., Eldridge P., Li Y., Kang G., Dallas M., et al. Rapid memory T-cell reconstitution recapitulating CD45RA-depleted haploidentical transplant graft content in patients with hematologic malignancies. *Bone Marrow Transplant* 2015; 50 (7): 968–77.
27. Jain N.A., Lu K., Ito S., Muranski P., Hourigan C.S., Haggerty J., et al. The clinical and financial burden of pre-emptive management of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation-implications for preventative treatment approaches. *Cytotherapy* 2014; 16 (7): 927–33.