

DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-9-21

© 2019 НМИЦ ДГОИ  
Поступила 14.05.2019  
Принята к печати 10.06.2019

# Применение профилактических инфузий CD45RA-деплементированных донорских лимфоцитов у пациентов, перенесших аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток с TCR $\alpha\beta$ - и CD19-деплецией по поводу заболеваний незлокачественной природы

С.Л. Благов, Л.Н. Шелихова, Д.Н. Балашов, Е.Ю. Осипова, М.В. Ефименко, Н.А. Хрипкина, Я.О. Музалевский, М.А. Дунайкина, Б.С. Першин, А.А. Масчан, М.А. Масчан

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

Вирусные инфекции – ведущая причина негативных исходов терапии у реципиентов аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) с TCR $\alpha\beta$ - и CD19-деплецией трансплантата. Мы предположили, что инфузии низких доз CD45RA-деплементированных донорских лимфоцитов (ИДЛ) могут помочь в обеспечении контроля над вирусными инфекциями. Данное исследование поддержано Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НМИЦ ДГОИ. В работе проанализированы результаты применения низких доз ИДЛ в группе пациентов с незлокачественными гематологическими и иммунологическими заболеваниями. Медиана кратности введения клеточного продукта – 3 инфузии; медиана наблюдения для живых пациентов – 30 мес. Аллергических реакций, септических осложнений после ИДЛ не отмечено. Кумулятивная вероятность de novo острой реакции «трансплантат против хозяина» (oPTPH) после ИДЛ составила 10%. У 21 (41%) пациента выявлен цитомегаловирус (ЦМВ) в крови; у 16 (73%) пациентов с ЦМВ-виремией вирус выявлен до 1-го введения клеток памяти. Среди пациентов, получивших ИДЛ, у 27 (53%) документировано появление вирус-специфичных лимфоцитов в периферической крови. Таким образом, введение Т-клеток памяти после приживления трансплантата в дозе 25–100 × 10<sup>3</sup>/кг массы тела реципиента в случае ТГСК от гаплоидентичного донора и 100–300 × 10<sup>3</sup>/кг для неродственной совместимой ТГСК с TCR $\alpha\beta$ - и CD19-деплецией – безопасный и потенциально эффективный способ обеспечения защиты от вирусных инфекций.

**Ключевые слова:** инфузия донорских лимфоцитов, аллогенная ТГСК, TCR $\alpha\beta$ -деплеция, CD45RA-деплеция

Благов С.Л. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2019; 18 (3): 9–21; DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-9-21

**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

## Low-dose infusions of CD45RA depleted donor lymphocytes after TCR $\alpha/\beta$ -depleted transplantation in patients with non-malignant disorders

S.L. Blagov, L.N. Shelikhova, D.N. Balashov, E.Y. Osipova, M.V. Efimenko, N.A. Khripkova, J.O. Muzalevskiy, M.A. Dunaikina, B.S. Pershin, 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 causes of failure among the recipients of the HSCT with graft TCR $\alpha/\beta$  and CD19-depletion. Adoptive transfer of memory T-cells by CD45RA-depleted donor lymphocytes infusions (memory DLI) may be useful in control of viral infections. The study was approved by the Independent Ethics Committee of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology. The work reflects the retrospective data analysis of 51 patients with non-malignant disorders who had received low dose memory DLI after HSCT. Up to 3 doses of donor lymphocytes were administered. Median follow-up for alive patients was 30 (18–49) months. We did not observe any allergic reactions, septic complications after memory DLI. The cumulative incidence of a de novo acute GVHD after DLI was 10% (95% CI: 4–22). Among 41% patients (n = 21) was detected CMV in the blood. In 73% of them (n = 16) CMV was detected before first DLI. Among patients who received DLI, 53% (n = 27) had documented appearance of virus-specific lymphocytes in peripheral blood (ELISPOT assay). Thus, the infusion of memory T-cells at a dose of 25–100 × 10<sup>3</sup>/kg body weight of the recipient for CD3+ in the case of HSCT from a haploidentical donor and 100–300 × 10<sup>3</sup>/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:** donor lymphocytes infusion, allogeneic HSCT, graft TCR- $\alpha/\beta$  depletion

Blagov S.L., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, 2019; 18 (3): 9–21. DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-9-21

© 2019 by NMRC PHOI  
Received 14.05.2019  
Accepted 10.06.2019**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

**А**ллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) – общепризнанный, а зачастую единственно возможный способ излечения ряда тяжелых врожденных и приобретенных незлокачественных заболеваний крови и иммунной системы у детей [1]. Одно из наиболее опасных осложнений аллогенной ТГСК – реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [2]. Существует эффективный метод предотвращения РТПХ: удаление  $\alpha\beta$ -Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов методом иммуномагнитной TCR $\alpha\beta$ - и CD19-деплеции из трансплантата [2–4]. Данная методика позволяет достичь быстрого приживления и ускорить темпы иммуnoreконституции [5–7]. Учитывая более низкий уровень вероятности возникновения РТПХ, данная технология позволяет снизить объемы и длительность необходимой иммуносупрессивной терапии в посттрансплантационном периоде. К числу негативных эффектов после проведения TCR $\alpha\beta$ -деплеции относится отсроченное восстановление функции адаптивного иммунитета, что обуславливает высокую частоту вирусных инфекций до периода окончательного становления иммунитета реципиента [2, 3, 8, 9].

Согласно ранее опубликованным данным анализа опыта НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России (далее – НМИЦ ДГОИ), вероятность реактивации ЦМВ-виремии у пациентов, перенесших аллогенную ТГСК с TCR $\alpha\beta$ -деплецией по поводу заболеваний крови и иммунной системы незлокачественной природы, составляет 39%; медиана реактивации – 1 месяц после ТГСК [10]. Длительная персистенция вирусных патогенов, в частности ЦМВ, у пациентов с индуцированным дефицитом Т-клеточного звена зачастую приводит к тяжелым висцеральным поражениям и может стать ведущей причиной трансплантационной смертности [7, 9, 11, 12]. Контроль таких инфекций требует больших затрат, резко ограничивая возможности трансплантационного ресурса клиники.

Существует технология адаптивного переноса патоген-специфичного иммунитета, базирующаяся на принципах *ex vivo* стимуляции или селекции вирус-специфичных донорских лимфоцитов против конкретных возбудителей с последующей их трансфузией реципиентам, но сложность и высокая стоимость данного метода не способствуют его доступности в рутинной клинической практике [13–16]. Все большее применение находит технология, альтернативная переносу вирус-специфичных лимфоцитов, – инфузия фракции Т-лимфоцитов памяти, полученной в результате иммуномагнитной деплеции наивных Т-лимфоцитов при помощи анти-CD45RA антител. Клеточный продукт, лишенный

наивного компонента (CD45RA-деплецированный), обладает низкой аллореактивностью, при этом несет в себе иммунную память к широкому комплексу патогенов, таких как цитомегаловирус (ЦМВ), аденовирус (АДВ) и вирус Эпштейна–Барр (ЭБВ). Негативные последствия инфицирования вышеописанными агентами наиболее выражены у реципиентов TCR $\alpha\beta$ - и CD19-деплецированных ТГСК, не достигших иммуnoreконституции. Таким образом, применение инфузии данного клеточного продукта в раннем посттрансплантационном периоде пациентам, перенесшим аллогенную ТГСК с деплецией  $\alpha\beta$ -Т-лимфоцитов, может послужить крайне полезным инструментом в ускорении иммуnoreконституции и обеспечении дополнительного контроля над вирусными инфекциями в период вторичного посттрансплантационного иммунодефицита [17–22].

Гипотеза о безопасности инфузий донорских лимфоцитов памяти нашла подтверждение в ранее опубликованных нашей группой результатах пилотного исследования и ретроспективного анализа в расширенной группе пациентов со злокачественными новообразованиями гемопоэтической и лимфоидной ткани на базе НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России [23, 24].

В настоящей работе показаны результаты ретроспективного анализа безопасности и потенциальной эффективности данного метода у когорты пациентов, перенесших аллогенную ТГСК по поводу первичных иммунодефицитных состояний (ПИД) и заболеваний крови незлокачественной природы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное исследование поддержано Независимым этическим комитетом и утверждено решением Ученого совета НМИЦ ДГОИ. Проанализированы данные 51 пациента, перенесшего аллогенную ТГСК с процессингом трансплантата посредством технологии TCR $\alpha\beta$ - и CD19-деплеции от полностью ( $n = 22$ ) либо частично ( $n = 12$ ) совместимых неродственных и гаплоидентичных ( $n = 17$ ) доноров. Обязательными условиями включения пациентов, помимо факта проведенной аллогенной деплетированной ТГСК по поводу заболевания крови незлокачественной природы, были документированное приживление трансплантата (гемограмма, общий донорский химеризм в периферической крови  $> 95\%$ ), ЦМВ-серопозитивный статус пары «донор–реципиент», а также отсутствие активных признаков РТПХ, течения сепсиса или иной неконтролируемой инфекции на момент первого введения клеток памяти.

За период с 26.09.2014 по 18.04.2017 инфузию CD45RA-деплецированных донорских лимфоцитов (ИДЛ) получили 78 пациентов, трансплантированных

по поводу нозологий незлокачественной природы. Из настоящего анализа исключены реципиенты повторных ТГСК ( $n = 5$ ), а также 22 больных, получивших первое введение Т-клеток памяти в первые две недели после ТГСК – до констатации приживления трансплантата, либо позднее 3 мес. с момента ТГСК. Средний возраст пациентов на момент первого введения клеток памяти составил 5 лет (от 0 до 22 лет). Все пациенты были трансплантированы по поводу незлокачественных гематологических либо иммунологических заболеваний: тяжелая приобретенная апластическая анемия ( $n = 12$ ), врожденная костномозговая недостаточность ( $n = 5$ ), гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз ( $n = 5$ ), ПИД ( $n = 29$ ). Характеристика пациентов, доноров, нозологические формы заболеваний, а также состав трансплантата представлены в *таблице 1*.

Таблица 1  
**Характеристика реципентов, доноров.  
Состав трансплантата**

Пациенты	n
Пол, м:ж	38:13
Возраст на момент ТГСК	5 (0–22)
Диагноз	
ПАА	12
ВАА	5
НЛН	5
ПИДС	29
Синдром Вискотта–Олдрича	13
Синдром Ниймеген	5
XLP	3
ХГБ	2
Другие	6
Доноры	
Гаплоидентичные	16
Совместимые неродственные (родственные)	35
Возраст доноров	31 (19–52)
Пол доноров, м:ж	27:24
Состав трансплантата	
CD34+ × 10 <sup>6</sup> /кг	10 (3–20)
TCRαβ+ × 10 <sup>3</sup> /кг	22 (1–461)
CD19+ × 10 <sup>3</sup> /кг	143 (2–2330)

Примечание: ПАА – тяжелая приобретенная апластическая анемия; ВАА – врожденная костномозговая недостаточность; НЛН – гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз; ПИДС – первичный иммунодефицит; XLP – х-сцепленный лимфолифопролиферативный синдром; ХГБ – хроническая гранулематозная болезнь.

**Режимы кондиционирования и профилактика РТПХ.** Пациенты с первичными иммунодефицитными состояниями и гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом в качестве базового алкилирующего агента получали треосульфан в дозе от 36 до 42 г/м<sup>2</sup> в комбинации с мельфаланом – 140 мг/м<sup>2</sup> ( $n = 20$ ) либо тиофосфамидом – 10 мг/кг ( $n = 7$ ). Пациенты с синдромом Ниймеген ( $n = 4$ ) в кондиционировании получили бусульфат – 4 мг/кг и циклофосфамид – 40 мг/кг. Один пациент с синдромом Ниймеген и пациент с тяжелой комбинированной иммунной недостаточностью получили 1 алкилятор – треосульфан в дозе 36 г/м<sup>2</sup>. Один пациент с синдромом Вискотта–Олдрича получил кондиционирование в составе треосульфан в дозе 42 г/м<sup>2</sup> и циклофосфамид – 120 мг/кг. Пациенты с тяжелой приобретенной апластической анемией ( $n = 12$ ) и синдромами врожденной костномозговой недостаточности ( $n = 5$ ) получали циклофосфамид – 100 мг/кг ± тиофосфамид – 10 мг/кг и торакоабдоминальное облучение в дозе от 2 до 6 Гр. В рамках протокола, инициированного в клинике НИИЦ ДГОИ, 11 пациентов с синдромом Вискотта–Олдрича с целью предотвращения тяжелых дисфункций или отторжения трансплантата дополнительно получили плериксафор в дозе 240 мкг/кг (–6–4-й дни).

Серотерапия была представлена кроличьим антиtimoцитарным иммуноглобулином (Тимоглобулин, *Genzyme*) в дозе 5 мг/кг ( $n = 39$ ) или лошадиным антиtimoцитарным иммуноглобулином (АТГАМ, *Pfizer*) – 100 мг/кг ( $n = 12$ ). Одна пациентка с ПИД получила алемтузумаб (*Campath, Genzyme*) в суммарной дозе 1 мг/кг. Все пациенты получали иммуносупрессивную профилактику РТПХ. Режим профилактики РТПХ варьировал в зависимости от диагноза и типа донора. В качестве базового иммуносупрессивного препарата применяли такролимус. С 1-го по +45-й день профилактическое иммуносупрессивное лечение получили 15 (29%) пациентов. На 60-й день такролимус был отменен у 18 (35%) больных. Часть пациентов получила такролимус в сочетании с микофенолата мофетиллом ( $n = 4$ ) или метотрексатом ( $n = 4$ ) – 5 мг/м<sup>2</sup> на +1-й, +3-й, +6-й дни. При отсутствии проявлений у больных острой РТПХ (оРТПХ) отмена иммуносупрессивной профилактики осуществлялась в индивидуальном порядке. Подробные данные о режиме кондиционирования у пациентов и профилактике РТПХ представлены в *таблице 2*.

**Процессинг трансплантата.** Источником трансплантата у пациентов служили донорские периферические стволовые клетки крови, стимулированные перед аферезом гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (Г-КСФ). Процессинг с удалением αβ-T- и В-лимфоцитов (CD19+) проводили

Таблица 2

**Режимы кондиционирования.  
Профилактика РТПХ**

Режим кондиционирования	n
Флударабин/циклофосфамид/тиотепа/ТАО 4 Гр	2
Флударабин/циклофосфамид/тиотепа/ТАО 6 Гр	2
Флударабин/циклофосфамид/бусульфан	4
Флударабин/циклофосфамид/треосульфан	1
Флударабин/циклофосфамид/ТАО 2 Гр	10
Флударабин/циклофосфамид/ТАО 4 Гр	2
Флударабин/циклофосфамид/ТАО 6 Гр	1
Флударабин/треосульфан/мельфалан	20
Флударабин/треосульфан/тиофосфамид	7
Флударабин/треосульфан	2
<b>Серотерапия</b>	
Тимоглобулин	39
АТГ	12
<b>Посттрансплантационная профилактика РТПХ</b>	
Такролимус до +45 дня	15
Такролимус до +60 дня	18
Такролимус до +90 дня и далее	9
Такролимус до +60, микрофенолат до +30 дня	4
Такролимус до +60 дня Метотрексат, 5 мг/м <sup>2</sup> , +1; +3; +6 дни	4
Глюкокортикостероиды	1

Примечание: ТАО – торакоабдоминальное облучение.

Таблица 3

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

Показатель		ИДЛ № 1 n = 51	ИДЛ № 2 n = 46	ИДЛ № 3 n = 34
День ИДЛ*		35 (20–70)	69 (41–219)	116 (60–372)
CD3 (CD45RO) доза, 10 <sup>3</sup> /кг	** Гапло n = 16 Совместим. n = 35	25 (n = 15)* 50 (n = 1)	25 (n = 2) 50 (n = 12) 100 (n = 1)	25 (n = 1) 50 (n = 7) 100 (n = 2)
	*** Совместим. n = 35	25 (n = 17) 50 (n = 2) 100 (n = 16)	25 (n = 1) 50 (n = 14) 100 (n = 1) 200 (n = 15)	50 (n = 3) 100 (n = 11) 200 (n = 1) 300 (n = 9)
CD45RA * 10 <sup>3</sup> /кг		0	0	0
ЦМВ-Т/кг (медиана)		19 (0–1279)	36 (0–2559)	57 (0–3838)
Адено-Т/кг (медиана)		9 (0–79)	17 (0–158)	19 (0–316)
ЭБВ-Т/кг (медиана)		7 (0–236)	14 (0–472)	22 (0–707)

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

на аппарате *CliniMACS Plus* (Miltenyi Biotec, Германия). Медиана эффективности деплеции для  $\alpha\beta$ -Т- и В-лимфоцитов составляла 4,2 (от 3,3 до 6,1) *log* и 3,1 (от 1,4 до 4,2) *log* соответственно. Медиана дозы  $\alpha\beta$ -Т-лимфоцитов в трансплантате –  $16,3 \times 10^3$ /кг (от 1 до  $461 \times 10^3$ /кг); В-клеток –  $170 \times 10^3$ /кг (от 2 до  $2230 \times 10^3$ /кг) и CD34+ клеток –  $10 \times 10^6$ /кг (от 6 до  $13 \times 10^6$ /кг).

**Заготовка фракции донорских лимфоцитов памяти.** У 50 (98%) пациентов в качестве субстрата для получения донорских клеток памяти использовали продукт афереза Г-КСФ-стимулированных доноров. Продукт лейкоцитафереза от нестимулированного донора получила 1 (2%) пациентка. Для всех пациентов (n = 51) провели процессинг с удалением CD45RA+ клеточной фракции из исходного материала, содержавшего от 2 до  $5 \times 10^9$  мононуклеаров (MNC), с применением технологии иммуномагнитной сортировки на платформе *CliniMACS Plus, Depletion 2,0* (n = 10) или *CliniMACS Prodigy* (n = 41). 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 *log*), а «выход» CD3+CD45RO+ – 38% (от 14 до 64%). Замороженные аликвоты впоследствии были ретроспективно оценены на предмет содержания ЭБВ, ЦМВ и АДВ-специфичных лимфоцитов посредством методики IFN- $\gamma$  ELISPOT (таблица 3).

**Режимы введения инфузий донорских лимфоцитов.** После верификации приживления трансплантата, на +30-е сут после аллогенной Т-деплетированной ТГСК, в случае отсутствия признаков острой РТПХ, а также течения активного септического процесса пациенты планово получали заранее заготовленный CD45RA-деплетированный клеточный продукт от инициальных доноров. 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-деплетированные донорские лимфоциты с интервалом 1 месяц и последующей эскалацией дозы – максимум до  $100 \times 10^3$ /кг при гаплоидентичных ТГСК и  $300 \times 10^3$ /кг при ТГСК от неродственных доноров. Коррекция дозы допускалась индивидуально, по согласованию с руководителем протокола, в зависимости от клинической ситуации. План введения Т-клеток памяти меняли (снижение дозы) в случае предшествующих накануне клинических проявлений оРТПХ. При нарастании вирусной нагрузки (ЦМВ, АДВ-инфекция), плохо контролируемой стандартными лекарственными препаратами,

дозу вводимых лимфоцитов увеличивали. Состав и тайминг инфузий CD45RA-деплементированных донорских лимфоцитов представлены в *таблице 3*.

**Лабораторный мониторинг.** ЦМВ, ЭБВ или АДВ-виремию диагностировали при наличии более 500 копий вирусной ДНК на 1 мл цельной венозной крови. Реактивацией считали положительный результат ПЦР после двух последовательных отрицательных еженедельных значений. ЦМВ-, АДВ- или ЭБВ-болезнь констатировали в случае обнаружения вирусной ДНК либо иммуногистохимической детекции вирусного антигена в соответствующем образце ткани с клиническими признаками повреждения органа (независимо от наличия вирусной ДНК в крови). Фоскарнет и ганцикловир не применяли в качестве плановой лекарственной противовирусной профилактики. Мониторинг ЦМВ, ЭБВ и АДВ проводили еженедельно с помощью количественной ПЦР венозной крови – со дня ТГСК до +30-х сут после последней ИДЛ, а затем – в зависимости от проводимой иммуносупрессивной терапии, предшествующих данных вирусной активации и данных восстановления иммунитета.

После первого обнаружения ДНК ЦМВ (> 500 коп./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, через месяц после последнего ИДЛ и через год после ТГСК. Титр ЭБВ- и АДВ-специфических донорских лимфоцитов контролировали у пациентов также с помощью анализа IFN- $\gamma$  ELISPOT. Степень РТПХ оценивали в соответствии со стандартными критериями [24].

**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 на 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-Test™ (*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*, Бергиш-Гладбах, Германия) в концентрации 0,6 нмоль/мл. Вирус-специфичные Т-клетки были обнаружены с помощью 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* (С.Т.Л, Кливленд, Огайо) с использованием автоматизированного программного обеспечения.

#### **Дизайн исследования и статистический анализ.**

Ведущей исследуемой проблемой данного ретроспективного анализа в рамках оценки безопасности метода было определение кумулятивной вероятности возникновения оРТПХ после ИДЛ. Смерть от любой причины без признаков РТПХ, а также отторжение трансплантата считали конкурирующими событиями. Были также исследованы динамика иммунного ответа к ЦМВ, темпы иммунореконституции и основные клинические исходы, включая общую выживаемость, смертность, связанную с трансплантацией, кумулятивную вероятность возникновения хронической РТПХ (хРТПХ). Для сравнения групп использовали тест Манна–Уитни и точный критерий Фишера. Общую выживаемость рассчитывали по методу Каплана–Майера. В качестве конкурирующего события по отношению к смертности, связанной с трансплантацией, было определено отторжение трансплантата.

Для анализа общей и бессобытийной выживаемости живые пациенты были цензурированы 01.09.2018. 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**

За период с сентября 2014 по апрель 2017 года 51 пациент получил 135 инфузий CD45RA-деплементированных донорских лимфоцитов. Медиана кратности введений клеточного продукта – 3 (от 1 до 3) инфузии для каждого больного. В ИДЛ содержались различные уровни вирус-специфичных Т-клеток (*таблица 3*). Медиана наблюдения для живых пациентов на момент написания данной работы составила 30 (18–49) мес.

**Статус пациентов на момент первой инфузии клеток памяти.** У 4 пациентов первые признаки оРТПХ II–III стадии выявили до ИДЛ № 1. На момент первой инфузии Т-клеток памяти активных признаков оРТПХ не было ни у одного больного. Все пациенты получали плановую иммуносупрессивную профилактику.

**Безопасность (реакция «трансплантат против хозяина»).** Ни одна из инфузий клеток памяти не была осложнена аллергическими реакциями или сопряжена с присоединением септического

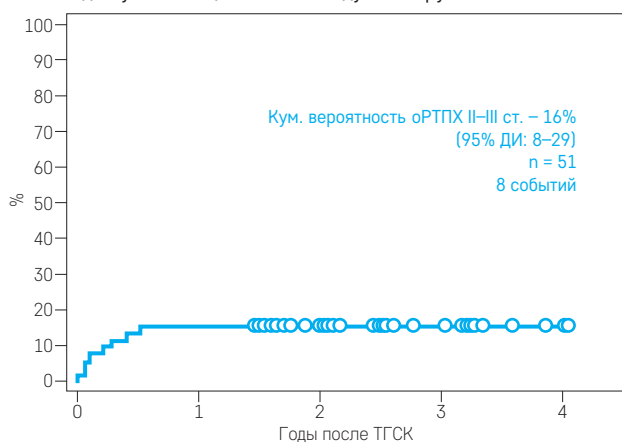
Таблица 4

**Характеристика пациентов, развивших острую либо хроническую реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ) после ИДЛ**

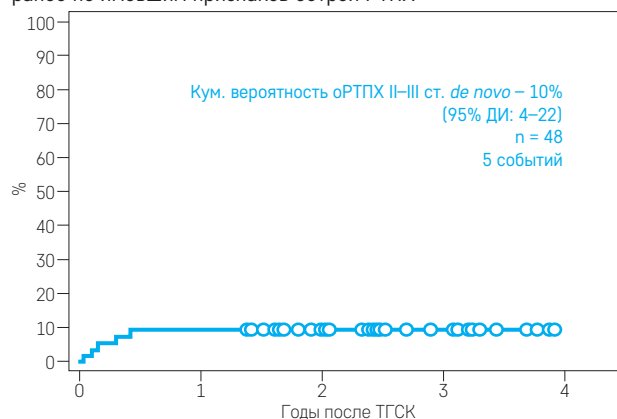
МИС ID	Диагноз	Возраст, лет	Тип ТГСК	oРТПХ II–III ст., день после ТГСК	Стадия oРТПХ	oРТПХ II–III ст. до ИДЛ № 1	oРТПХ II–III ст. после ИДЛ	oРТПХ II–III ст., дни от крайнего ИДЛ	После какой ИДЛ oРТПХ?	Локус oРТПХ	Хронич. РТПХ	Локус xРТПХ	Исход на момент написания работы
29102	ТКИН	1	Гапло	81	II	Нет	Да	27	2	Кожа, ЖКТ	Нет	–	Отторжение трансплантата, умер после повторной ТГСК
32663	ХГБ	1	Неродств. 9/10	148	II	Нет	Да	7	4	ЖКТ	Да	ЖКТ	Реконвалесцент, ИСТ отменена
15709	ПАА	5	Гапло	10	III	Да	Да	2	3	Кожа, ЖКТ	Да	Кожа, ЖКТ	Реконвалесцент, ИСТ отменена
21436	ПАА	13	Неродств.	24	II	Да	Да	19	2	ЖКТ	Нет	–	Реконвалесцент, ИСТ отменена
38963	WAS	1	Гапло	189	II	Нет	Да	90	2	Кожа	Да	Кожа	Реконвалесцент, ИСТ отменена
21097	HLH	1	Неродств.	39	II	Нет	Да	18	1	ЖКТ	Нет	–	Реконвалесцент, ИСТ отменена
38192	WAS	2	Гапло	104	II	Нет	Да	1	2	Кожа	Да	Кожа	Проявлений РТПХ нет, снижение ИСТ
2329	ПАА	13	Неродств. 9/10	–	–	Нет	Нет	–	–	–	Да	Кожа	Реконвалесцент

**Рисунок 1**

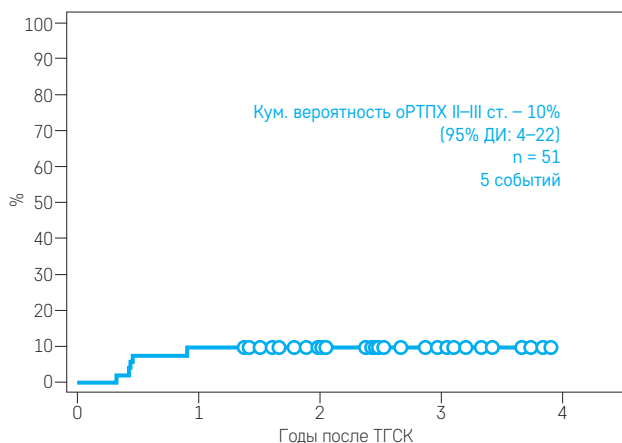
Кумулятивная вероятность возникновения острой РТПХ II–III стадии у всех пациентов исследуемой группы

**Рисунок 2**

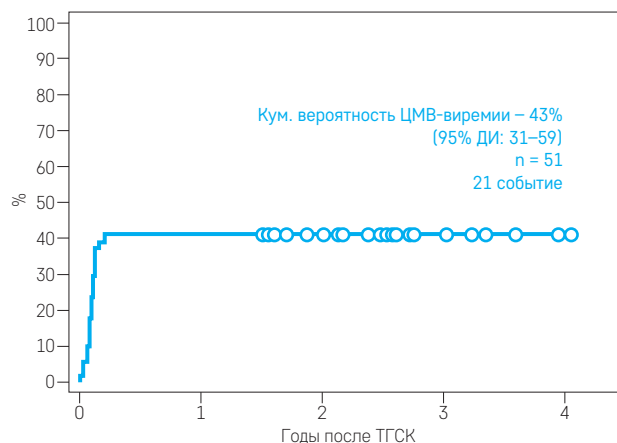
Кумулятивная вероятность возникновения острой РТПХ II–III стадии после введения клеточного продукта пациентам, ранее не имевшим признаков острой РТПХ

**Рисунок 3**

Кумулятивная вероятность возникновения хронической РТПХ у всех пациентов исследуемой группы

**Рисунок 4**

Кумулятивная вероятность ЦМВ-виремии у всех пациентов исследуемой группы



процесса. Признаки оРТПХ II–III стадии после ИДЛ развили 7 пациентов. Активация оРТПХ у одного больного произошла через 18 дней после ИДЛ № 1; у 4 больных – после ИДЛ № 2 (через 1; 19; 27 и 90 дней) и у одного пациента – через 2 дня после ИДЛ № 3. У одного пациента манифестация оРТПХ произошла через 7 дней после 4-й инфузии клеток памяти, выполненной на +141-е сут после ТГСК с целью усиления терапии вирусных инфекций. Признаки оРТПХ на одном из этапов наблюдения (до либо после инфузии клеток памяти) возникли у 8 пациентов. Таким образом, кумулятивная вероятность возникновения оРТПХ для всей группы пациентов ( $n = 51$ ) составила 16% (95% ДИ: 8–29) (рисунки 1). У одного пациента возникла оРТПХ III стадии. Проявлений оРТПХ IV стадии не было ни у одного из больных. У 5 пациентов оРТПХ II–III стадии возникла *de-novo* после инфузии клеточного продукта. Таким образом, кумулятивная вероятность *de-novo* оРТПХ после ИДЛ составила 10% (95% ДИ: 4–22) (рисунки 2).

Среди 7 пациентов, развивших оРТПХ после ИДЛ, двое ответили на стандартную иммуносупрессивную терапию. Хроническая РТПХ развилась у 4 пациентов этой группы, все они живы на момент анализа; двое продолжают терапию РТПХ. У одного пациента развилась *de novo* хРТПХ с поражением кожи. Кумулятивная вероятность возникновения хРТПХ составила 10% (95% ДИ: 4–22) (рисунки 3). У одного пациента с активацией оРТПХ *de-novo* произошло отторжение трансплантата; он умер после повторной аллогенной ТГСК. Подробные характеристики всех случаев активации острой и хронической РТПХ после ИДЛ представлены в таблице 4.

**Вирусные инфекции.** У 21 пациента документирована ЦМВ-виремия, таким образом, кумулятивная вероятность активации ЦМВ в крови для всей группы больных составила 41% (95% ДИ: 31–59) (рисунки 4). У 16 (73%) пациентов ЦМВ-виремия была зарегистрирована до или в течение 1 недели после первой ИДЛ; медиана срока реактивации – 11 (от 1 до 43) дней до 1-й инфузии. У 6 (12%) пациентов ЦМВ-реактивация произошла после начала профилактических ИДЛ. Все пациенты с обнаруженным ЦМВ в крови ( $n = 22$ ) получили упреждающую фармакологическую противовирусную терапию (ганцикловир или фоскарнет). Медиана продолжительности ЦМВ-позитивности составила 4 (1–12) недели; медиана количества реактиваций – 1 (1–2) неделю; медиана длительности лекарственной противовирусной терапии – 6 (2–15) недель. ЦМВ-болезнь развилась у 6 пациентов (28% общего числа пациентов с ЦМВ-виремией и 12% всех пациентов) с присоединением ЦМВ-хориоретинита ( $n = 4$ ), ЦМВ-пневмонии ( $n = 2$ ). Медиана

манифестации ЦМВ-болезни – 5-я неделя (0–14-я неделя) от первого обнаружения ЦМВ в крови. Пациентам с ЦМВ-хориоретинитом еженедельно проводили интравитреальные инъекции противовирусных препаратов с детекцией ДНК ЦМВ в глазной жидкости (ПЦР). У одного пациента, перенесшего ЦМВ-хориоретинит, впоследствии диагностировали отслойку сетчатки обоих глаз. Одна пациентка умерла от резистентной ЦМВ-пневмонии. Подробные характеристики пациентов с течением ЦМВ-инфекции – в таблице 5. ЭБВ-инфекция, требовавшая лекарственной коррекции, не была зарегистрирована ни у одного пациента на этапе посттрансплантационного периода. У 4 пациентов выявили аденовирусную инфекцию; у 3 – в крови и кале, в связи с чем им была проведена терапия сидофовиром – с эффектом. У одного пациента, продолжительно получавшего иммуносупрессивную терапию по поводу аутоиммунного гемолиза, отмечено резистентное течение ЦМВ и АДВ-болезни с поражением легких и кишечника, что послужило непосредственной причиной его смерти.

**Мониторинг противовирусного иммунного ответа.** У 9 пациентов ЦМВ-реактивные Т-клетки были обнаружены до ИДЛ № 1; 9 пациентов не имеют достоверных результатов анализа ELISPOT во всех необходимых временных периодах, поэтому только 33 пациента могут быть оценены на предмет влияния инфузий Т-клеток памяти как фактора, потенциально способствующего восстановлению ЦМВ-специфического иммунного ответа. У 10 из 33 пациентов из группы ЦМВ-негативных на момент  $t_0$  (непосредственно перед ИДЛ № 1) были обнаружены ЦМВ-реактивные клетки в момент  $t_1$  (непосредственно перед ИДЛ № 2). Еще у 5 пациентов ЦМВ-реактивные Т-клетки были выявлены в момент времени  $t_2$  (перед ИДЛ № 3) и у одного пациента – в момент  $t_3$  (через 30 дней после ИДЛ № 3) (рисунки 5). В целом восстановление ЦМВ-специфического иммунитета после ИДЛ зарегистрировано у 16 (48%) пациентов. Среди этих случаев медиана максимального количества ЦМВ-реактивных Т-лимфоцитов между  $t_0$  и  $t_{\max 1-3}$  составила 652 (от 5 до 1340) клеток на 300 тыс. МНС крови (рисунки 6).

Анализ показал, что у 12 (81%) из 16 пациентов с детектируемым иммунным ответом к ЦМВ была ЦМВ-виремия, в то время как среди пациентов без ЦМВ-реактивности – у 3 (18%). Таким образом, обнаружение ДНК ЦМВ в крови достоверно связано с восстановлением ЦМВ-специфического иммунитета (критерий Фишера,  $p < 0,0001$ ). Значимой корреляции между количеством ЦМВ-специфических лимфоцитов в ИДЛ и ЦМВ-Т-реактивностью у исследуемой группы больных получено не было: у пациентов с ЦМВ-Т-реактивностью медиана дозы

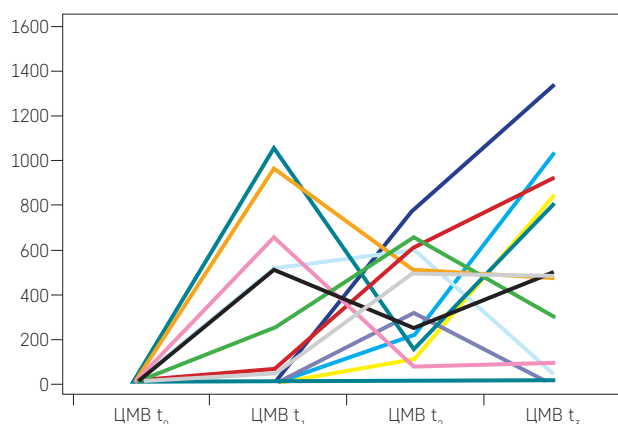
Таблица 5

## Характеристика пациентов с ЦМВ-инфекцией (n = 21)

МИС ID	Диагноз	Тип ТГСК	Любая ОРТПХ	ИСТ после ИДЛ	Актив. ЦМВ до ИДЛ	Кол-во реакт. ЦМВ	Длит-ть ЦМВ, нед.	Период лекарст. терапии ЦМВ	ЦМВ-болезнь	Орган поражения ЦМВ	ЦМВ до ТГСК	Исход ЦМВ-инфекции на момент написания работы
42365	ПАА	Неродств.	Да	1	Да	2	6	10	Да	Ретинит	Нет	Реконвалесцент
29102	ТКИН	Гапло	Да	1	Да	1	1	2	Нет		Нет	Отторжение трансплантата, смерть после повторной ТГСК
17942	ПИД	Неродств.	Нет	1	Нет	1	6	10	Нет		Виремия	Реконвалесцент
19724	ПАА	Неродств.	Нет	1	Да	1	5	7	Нет		Нет	Реконвалесцент
29000	ПИД	Гапло	Нет	1	Нет	1	7	7	Да	Ретинит	Виремия, пневмония	Отторжение трансплантата
16755	ПАА	Неродств.	Нет	0	Да	1	5	4	Да	БАЛ	Нет	Смерть от инфекции
21436	ПАА	Неродств.	Да	1	Нет	1	2	4	Нет		Нет	Реконвалесцент
9346	ПАА	Гапло	Да	1	Нет	1	1	3	Нет		Нет	Реконвалесцент
576	ПИД	Неродств.	Нет	1	Нет	2	4	6	Нет		Нет	Реконвалесцент
25597	ПИД	Неродств.	Нет	0	Нет	1	6	8	Нет		Нет	Реконвалесцент
11971	ВАА	Неродств.	Нет	1	Нет	2	11	12	Нет		Виремия	Реконвалесцент
15918	ПИД	Неродств.	Нет	1	Да	1	3	4	Нет		Нет	Реконвалесцент
43763	ПИД	Гапло	Нет	0	Да	1	12	15	Да	Ретинит	Виремия	Реконвалесцент
25082	ПИД	Неродств.	Нет	0	Нет	1	1	2	Нет		Нет	Отторжение трансплантата
11108	ПИД	Гапло	Нет	0	Нет	1	2	3	Нет		Нет	Реконвалесцент
23729	ПАА	Неродств.	Нет	1	Нет	1	2	4	Нет		Нет	Реконвалесцент
38192	ПИД	Гапло	Да	1	Нет	2	12	14	Да	Ретинит	Нет	Реконвалесцент
24975	ПИД	Гапло	Нет	0	Нет	2	5	7	Нет		Виремия	Реконвалесцент
1340	ПАА	Неродств.	Нет	1	Нет	1	4	6	Нет		Нет	Отторжение трансплантата, смерть после повторной ТГСК
29321	ПИД	Неродств.	Нет	0	Нет	1	8	8	Да	БАЛ, моча	Нет	Смерть от инфекции
29048	ПИД	Неродств.	Нет	1	Да	1	2	4	Нет		Нет	Реконвалесцент

Рисунок 5

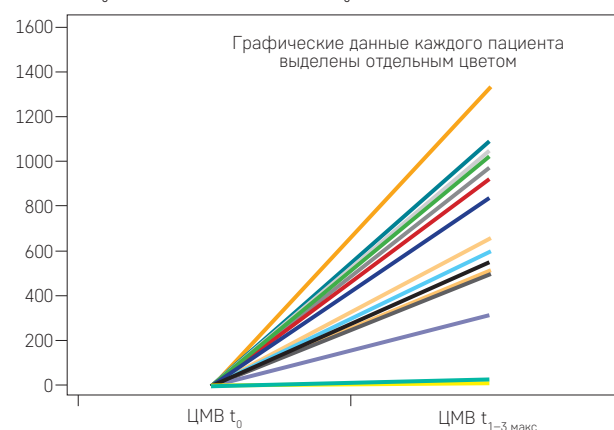
Динамика экспансии ЦМВ-реактивных Т-лимфоцитов после инфузии CD45RA-деплементированных донорских лимфоцитов у пациентов, не имевших ЦМВ-специфичных клеток до 1-й инфузии



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.

Рисунок 6

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)

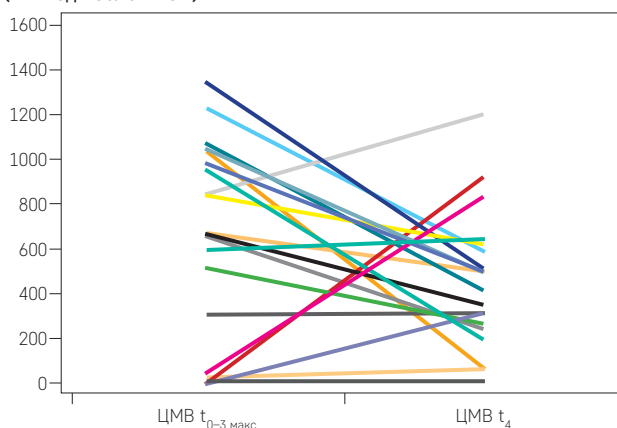


Графические данные каждого пациента выделены отдельным цветом



**Рисунок 7**

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 (клеток/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)

Таблица 6

**Факторы, способные оказать влияние на появление ЦМВ-специфических Т-клеток к точке  $t_2$  или  $t_3$ , у пациентов, не имевших ЦМВ-реактивности в точке  $t_0$  (n = 34)**

Показатель	Пациенты с ЦМВ-реактивностью n = 16	Пациенты без ЦМВ-реактивности n = 17	p Критерий Манна-Уитни
	медиана (диапазон)	медиана (диапазон)	
Доза ЦМВ-Т в ИДЛ, кл/кг	30 (0–346)	7 (0–1279)	0,35
Доза $\alpha\beta$ -Т в трансплантате $\times 10^5$ /кг	22 (3–155)	35 (1–461)	0,66
$\gamma\delta$ CD3, количество перед ИДЛ № 1, кл/мкл	29 (0–97)	19(0–560)	0,76
$\gamma\delta$ CD3, количество перед ИДЛ № 2, кл /мкл	28(3–470)	8 (0–271)	0,21
Возраст донора, лет	34 (25–48)	28 (19–51)	0,165
Возраст пациента, лет	6 (1–22)	3 (1–18)	0,154
CD19+ в трансплантате	69 (2–1486)	215 (32–2330)	0,036
			p Тест Фишера
ЦМВ-виремия, n (%)	12 (16)	3 (17)	0,006
Тип донора (гапло:совместимые)	5:11	4:13	0,7
Пол донора, м:ж	8:8	10:7	0,73
Иммуносупрессия после DLI, да:нет	10:6	12:5	1,0
Химеризм по CD3+ в $t_0$ (< 0% собственных; >10% собственных)	12:4	11:6	0,75
Химеризм общий в $t_0$ (< 10%собственных; > 10% собственных)	14:3	14:2	1
Химеризм по CD3+ в $t_1$ (< 10% собственных; > 10% собственных)	11:5	9:8	0,35
Химеризм общий в $t_1$ (< 10% собственных; > 10% собственных)	12:4	16:1	0,3

**Рисунок 8**

Становление патоген-специфического иммунного ответа на примере пациента, у которого был отмечен позитивный титр ЦМВ-специфических лимфоцитов с  $t_1$  (после ИДЛ № 1) и в дальнейших контрольных точках вплоть до +1 года после ТГСК

Пациент 24975	$t_0$ 03.10.2016	$t_1$ 31.10.2016	$t_2$ 28.11.2016	$t_3$ 16.01.2017	$t_4$ 13.09.2017
ЦМВ					
Положительный контроль					
Отрицательный контроль					

ЦМВ-специфических Т-лимфоцитов в ИДЛ составляла 30 клеток/кг (от 0 до 346 клеток) против 7 клеток/кг (от 0 до 1279 клеток) у пациентов, в крови которых ЦМВ-специфические лимфоциты не обнаружены (тест Манна-Уитни,  $p = 0,35$ ).

Исследуемые факторы, способные оказать влияние на появление ЦМВ-специфических Т-клеток, представлены в таблице 6. На момент  $t_4$  (через 1 год после трансплантации) наблюдались 28 (85%) пациентов; 18 (64%) из них имели ЦМВ-реактивность (рисунок 7). Общие данные мониторинга патоген-специфической реактивности у всех пациентов исследуемой группы суммированы в таблице 7.

Становление ЦМВ-специфического клеточного иммунного ответа (на примере одного из пациентов исследуемой группы) отражено на рисунке 8. По данным ELISPOT-исследования крови пациента в контрольных точках, привлекает внимание появляющаяся со 2-й контрольной точки постоянная ЦМВ-Т-реактивность.

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

**Клинические исходы.** Два пациента умерли вследствие течения тяжелых вирусных инфекций через 78 и 96 дней после ТГСК (9 и 13 дней после ИДЛ № 3 соответственно). Кумулятивная вероятность трансплантационной смертности составила 4% (95% ДИ: 1–15) (рисунок 9). В обоих случаях непосредственной причиной смерти стала прогрессирующая неконтролируемая вирусная болезнь (ЦМВ, ЦМВ + АДВ). У обоих пациентов вирус-специфические лимфоциты не были

Таблица 7

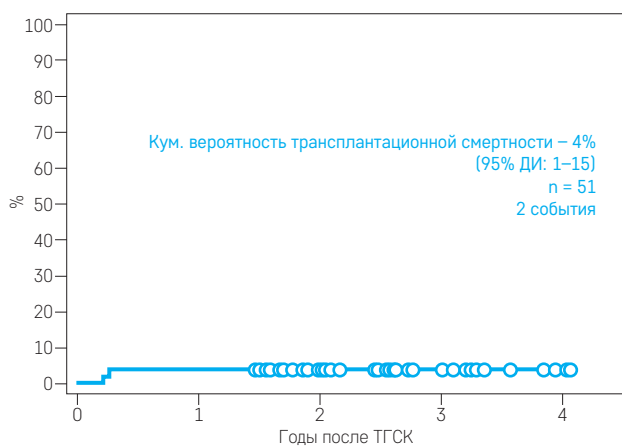
**Общие данные мониторинга патоген-специфической реактивности в динамике (вся группа, n = 51)**

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 (17–91)	+61 (48–133)	+96 (73–153)	+150 (86–204)	+370 (333–502)
Элиспот к ЦМВ, n	49	47	41	39	28
‡ЦМВ-Т пол., n (%)	9 (18)	17 (36)	19 (46)	19 (49)	18 (64)
§ЦМВ-Т отр., n (%)	40 (82)	30 (64)	22 (54)	20 (51)	10 (36)
ЦМВ-Т кл/3* × 10 <sup>5</sup> МНС, медиана	0 (0–829)	0 (0–1096)	3 (0–1226)	29 (0–1340)	242 (0–1200)
γδ Т лф. кл/мкл, медиана	37 (0–560)	22 (0–916)	50 (3–1258)	430(2–750)	1039 (44–4287)
**Наивные Т-клетки, кл/мкл	–	1 (0–6)	4(0–17)	24 (0–146)	360 (2–2397)
Элиспот к АДВ, n	49	47	40	34	25
АДВ-Т пол., n (%)	2 (4)	8 (17)	9 (23)	10 (29)	9 (36)
АДВ-Т кл/3 × 10 <sup>5</sup> МНС, медиана	0 (0–588)	0 (0–145)	0 (0–446)	1 (0–398)	0 (0–68)
Элиспот к ЭБВ, n	49	47	40	34	25
ЭБВ-Т пол., n (%)	1 (2)	7 (15)	3 (8)	6 (18)	8 (32)
ЭБВ-Т кл/3 × 10 <sup>5</sup> МНС, медиана	0 (0–8)	0 (0–220)	0 (0–1265)	0 (0–1444)	0 (0–529)

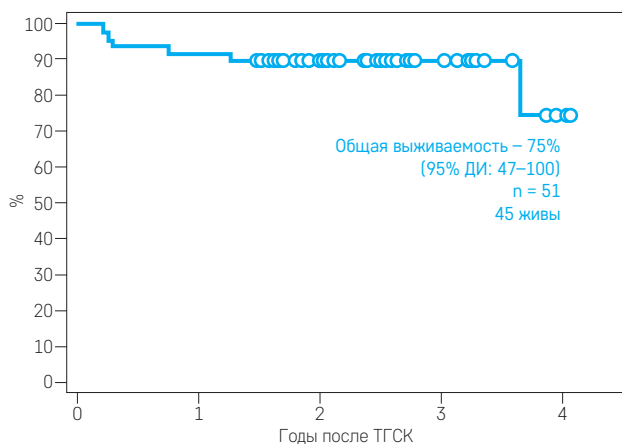
\* Точки: t<sub>0</sub> – перед ИДЛ № 1; t<sub>1</sub> – перед ИДЛ № 2; t<sub>2</sub> – перед ИДЛ № 3; t<sub>3</sub> – 30 дней после ИДЛ № 3; t<sub>4</sub> – +1 год после ТГСК; ‡ ЦМВ (АДВ, ЭБВ)-Т пол. – уровень > 5 спотов/300 000 МНС, по данным ELISPOT; § ЦМВ(АДВ, ЭБВ)-Т отр. – уровень 0–5 спотов /300 000 МНС, по данным ELISPOT; \*\* наивные Т-лф – CD3+CD45RA+CD197+; МНС – мононуклеарные клетки крови.

**Рисунок 9**

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

**Рисунок 10**

Общая выживаемость у всей группы пациентов

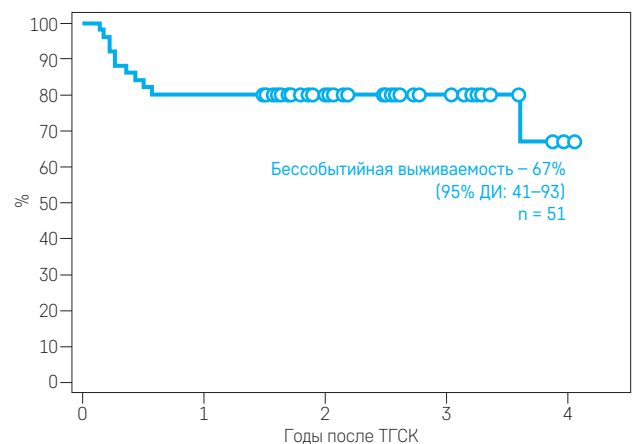


обнаружены ни в одной контрольной точке. Ретроспективный анализ аликвот пациентов на предмет ЦМВ- и АДВ-специфичных лимфоцитов также показал отрицательный результат. Одна пациентка с врожденным дискератозом умерла через 3,5 года после ТГСК вследствие прогрессии сердечно-легочной недостаточности в рамках гепатопульмонального синдрома. Трое пациентов умерли после повторной ТГСК, проводимой по поводу отторжения трансплантата.

Общая выживаемость на сроке 2 года от ТГСК для всей группы составила 90% (95% ДИ: 82–98) (рисунок 10). Бесобытийная выживаемость на сроке 2 года от ТГСК составила 80% (95% ДИ: 69–91) (рисунок 11).

**Рисунок 11**

Бесобытийная выживаемость у всей группы пациентов (событие – рецидив основного заболевания и смерть от любой причины)



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью настоящего исследования была оценка безопасности и потенциальной эффективности введения низких доз донорских Т-лимфоцитов, очищенных от наивных (CD45RA+) клеток. Несмотря на то что потенциал аллореактивности фракции Т-клеток памяти значительно снижен, по данным нескольких исследований [19, 21], перекрестная реактивность репертуара Т-клеток памяти в отношении аллогенных антигенов системы HLA – известный феномен [25–29]. В клинической практике потенциал Т-клеток памяти в плане индукции РТПХ остается неизученным. Опубликованный клинический опыт свидетельствует о том, что удаление пула наивных Т-клеток не отменяет полностью риск РТПХ [17, 18, 30, 31], хотя и снижает риск развития тяжелых ее форм. По нашим данным, дополнительные инфузии Т-клеток памяти в дозах до  $100 \times 10^3/\text{кг}$  для реципиентов гаплоидентичных ТГСК и до  $300 \times 10^3/\text{кг}$  в случае трансплантаций от неродственных совместимых доноров связаны с низким риском возникновения РТПХ *de novo*.

Мониторинг ЦМВ-реактивных Т-клеток указывает на то, что при стимуляции антигеном содержание соответствующих реактивных Т-клеток интенсивно нарастает. Источником восстановления ЦМВ-специфичных клонов могут быть: 1) остаточные ЦМВ-специфичные клетки памяти в первичном трансплантате; 2) ЦМВ-специфичные Т-лимфоциты памяти в ИДЛ; 3) наивные донорские Т-клетки, продуцированные *de novo* и 4) 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. Следует отметить, что о клинически значимой генерации противовирусного иммунного ответа можно судить при наличии не менее чем 10 патоген-реактивных клеток на 300 тыс. мононуклеаров крови. У одной пациентки, у которой произошла 2-я реактивация ЦМВ до 2 тыс. коп./мл на +80-е сутки после ТГСК, имевшей удовлетворительную ЦМВ-реактивность по данным ELISPOT (100 ЦМВ-специфичных лимфоцитов), ЦМВ-виремия была купирована в течение 2 недель без применения лекарственной

противовирусной терапии. Несмотря на отсутствие достоверной корреляции между количеством трансфузируемых вирус-специфических лимфоцитов и вирус-специфической реактивностью, на основании результатов настоящего анализа можно предположить, что низкое содержание вирус-специфических клеток в ИДЛ служит негативным прогностическим фактором в случае присоединения резистентной вирусной инфекции. В целом наши данные свидетельствуют о том, что введение донорских лимфоцитов памяти после приживления трансплантата 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 как у когорты больных, трансплантированных по поводу злокачественного поражения гемопоэтической ткани [24], так и у группы пациентов в нашем исследовании. Оценивая сроки активации ЦМВ-инфекции (до 1-го введения клеток памяти она произошла у 73% пациентов), для эффективного использования в качестве профилактической меры представляется необходимым, чтобы инфузии Т-лимфоцитов памяти проводились рано, предпочтительно как часть первичного трансплантата. Однако иммуносупрессивная профилактика, традиционно проводимая до +60-го дня, может снижать эффективность ИДЛ у таких больных. Для подтверждения эффективности данной технологии как терапевтической либо профилактической опции необходимо проведение рандомизированного проспективного исследования.

### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы выражают благодарность компании «Амджен» и благотворительному фонду «Подари жизнь».

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

### ORCID

**Blagov S.L.** ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8754-1376>  
**Shelikhova L.N.** ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0520-5630>  
**Balashov D.N.** ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2689-0569>  
**Osipova E.Yu.** ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1873-3486>  
**Efimenko M.V.** ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3001-4820>  
**Khripkova N.A.** ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3001-4820>  
**Muzalevskiy J.O.** ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3513-8299>  
**Dunaikina M.A.** ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1384-1752>  
**Pershin B.S.** ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6481-8608>  
**Maschan A.A.** ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0016-6698>  
**Maschan M.A.** ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1735-0093>

## Литература

1. Румянцев А.Г., Масчан А.А. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей. – М.: МИА, 2003, 912 с.
2. 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. Doi: 10.1080/14653240701644000
3. Handgretinger R. Negative depletion of CD3(+) and TcRalphabeta(+) T-cells. *Curr Opin Hematol* 2012; 19 (6): 434–9. Doi: 10.1097/MOH.0b013e3283582340
4. 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. Doi: 10.1016/j.jcyt.2013.05.014
5. 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. Doi: 10.1182/blood-2014-03-563817
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. Doi: 10.1016/j.bbmt.2015.07.008
7. 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. Doi: 10.1038/bmt.2015.343
8. Zvyagin I.V., Mamedov I.Z., Tatari-nova 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. Doi: 10.1038/leu.2016.321
9. Airoidi I., Bertaina A., Prigione I., Zorzoli A., Pagliara D., Cocco C., et al. gam-madelta T-cell reconstitution after HLA-haploidentical hematopoietic transplantation depleted of TCR-alphabeta+/CD19+ lymphocytes. *Blood* 2015; 125: 2349–58.
10. Богдавленская 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.
11. Elfeky R., Shah R.M., Unni M.N.M., Ottaviano G., Rao K., Chiesa R., et al. New graft manipulation strategies improve the outcome of mismatched stem cell transplantation in children with primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2019 Feb 4. pii: S0091-6749(19)30187–3. Doi: 10.1016/j.jaci.2019.01.030
12. Laberko A., Bogoyavlenskaya A., Shelikhova 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. Doi: 10.1016/j.bbmt.2016.12.635
13. 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.
14. Papadopoulou A., Gerdemann U., Kataris 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. Doi: 10.1126/scitranslmed.3008825
15. Peggs K.S., Verfuert 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. Doi: 10.1016/S0140-6736(03)14634-X
16. 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. Doi: 10.1111/j.1537-2995.2010.02940.x
17. 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. Doi: 10.1172/JCI81229
18. 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. Doi: 10.1002/pbc.25352
19. Teschner D., Distler E., Wehler D., Frey M., Marandiu D., Langeveld K., et al. Depletion of naive T-cells using clinical grade magnetic CD45RA beads: anewapproachforGVHDprophylaxis. *Bone Marrow Transplant* 2014; 49 (1): 138–44. Doi: 10.1038/bmt.2013.114
20. 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): 1303–9 e1301–3. Doi: 10.1016/j.jaci.2014.08.019
21. 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. Doi: 10.1016/j.bbmt.2014.01.032
22. Brodzki N., Turkiewicz D., Toporski J., Truedsson L., Dykes J. Novel treatment of severe combined immu-

- nodeficiency utilizing ex-vivo T-cell depleted haploidentical hematopoietic stem cell transplantation and CD45RA+ depleted donor lymphocyte infusions. *Orphanet J Rare Dis* 2016; 11: 5. Doi: 10.1186/s13023-016-0385-3
23. Maschan M., Blagov S., Shelikhova L., Shekhovtsova Z., Balashov D., Starichkova J., et al. Low-dose donor memory T-cell infusion after TCR alpha/beta depleted unrelated and haploidentical transplantation: results of a pilot trial. *Bone Marrow Transplant* 2018 Mar; 53 (3): 264–73. Doi: 10.1038/s41409-017-0035-y
24. Благов С.Л., Шелихова Л.Н., Осипова Е.Ю., Киселева В.В., Казаченок А.С., Шеховцова Ж.Б. 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. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2018, 17 (2): 9–20.
25. 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.
26. 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. Doi: 10.1182/blood-2010-06-289991
27. 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. Doi: 10.1016/j.bbmt.2010.12.711
28. 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. Doi: 10.1016/j.trim.2010.06.008
29. 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. Doi: 10.1007/978-1-61779-842-9\_19.
30. 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. Doi: 10.1038/bmt.2014.324
31. 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. Doi: 10.1016/j.jcyt.2014.02.010