



## Тезисы докладов IV Ежегодного Международного симпозиума «Актуальные вопросы клеточных технологий: Практика трансплантаций стволовых клеток пуповинной крови»

Москва, 15 апреля 2011 г.

Б.В. Афанасьев

### Результаты различных видов аллогенных трансплантаций гемопоэтических клеток у детей и взрослых

*Институт детской гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Санкт-Петербург*

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является эффективным методом лечения гематологических, онкологических и наследственных заболеваний у детей, подростков и взрослых. Ежегодно в мире проводится около 15 000 аллогенных ТГСК от совместимого родственного, неродственного, гаплоидентичного донора или из образцов пуповинной крови. Для пациентов, у которых отсутствует совместимый родственный донор, существует три альтернативных источника аллогенных гемопоэтических стволовых клеток: совместимый неродственный донор, ГСК из образца пуповинной крови или гаплоидентичный донор. Гаплоидентичная трансплантация стволовых гемопоэтических клеток (Гапло-ТГСК) — метод лечения для 70–90% больных, не имеющих совместимого родственного, неродственного донора и образцов пуповинной крови с достаточной клеточностью.

**Цель:** оценить эффективность применения различных видов аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК): родственной, неродственной и гаплоидентичной у детей, подростков и взрослых с онкологическими, гематологическими и наследственными заболеваниями.

**Материал и методы.** В исследование включено 532 больных, получивших алло-ТГСК, из них 275 пациентов получили аллогенную неродственную ТГСК, 191 — аллогенную родственную и 66 — Гапло-ТГСК. В 70% случаев алло-ТГСК получили больные с острым лейкозом, 30% пациенты со злокачественными лимфомами, ХМЛ, апластической анемией, солидными опухолями. У 58% больных использовался миелоаблативный режим кондиционирования, режим кондиционирования со сниженной интенсивностью получили 42%. Базисная профилактика оРТПХ проводилась Циклоспорин + Метотрексат или Такролимусом + Селлсепт. Лечение РТПХ — глюкокортикоиды, экстракорпоральный фотоферез и

моноклональные антитела. Источники трансплантата: костный мозг использовался для 41% больных, 59% получили периферические ГСК. При Гапло-ТГСК источник трансплантата: стимулированный неманипулированный костный мозг получили 36% больных, комбинация стимулированного костного мозга и стволовых гемопоэтических клеток костного мозга с использованием позитивной селекции CD34+ при помощи аппарата CliniMACS (Miltenyi Biotec) — 64% пациентов.

**Результаты.** 10-летняя общая выживаемость (ОВ) больных, получивших аллогенную родственную и неродственную ТГСК, при ОЛЛ в I–II ремиссию у детей составила 53%, подростков — 40%, у взрослых — 35%. 10-летняя ОВ больных, получивших аллогенную родственную и неродственную ТГСК, при ОМЛ в I–II ремиссию у детей достигает 65%, подростков — 45%, у взрослых — 42%. Годовая ОВ для пациентов, получивших Гапло-ТГСК во II и более ремиссии при ОЛЛ составила 42,9%, при ОМЛ — 80%.

Практически всем пациентам, нуждающимся в алло-ТГСК, возможно найти донора. При отсутствии совместимого родственного или неродственного донора, возможно использовать ГСК из альтернативных источников (гаплоидентичный донор). Немиелоаблативные режимы кондиционирования могут быть использованы у подавляющего большинства больных (тяжело предлеченные пациенты, больные старше 50 лет). Алло-ТГСК эффективный метод лечения врожденных и приобретенных синдромов костномозговой недостаточности (анемия Фанкони, анемия Блэкфана-Даймонда, синдром Швахмана-Даймонда, синдром Костмана), первичных иммунодефицитов (синдром Вискотт-Олдрича), болезней накопления (синдром Гурлера, болезнь Крабе, X-сцепленная адренолейкодистрофия, метахроматическая лейкодистрофия, остеопетроз). Основная причина смерти после алло-ТГСК — рецидивы заболевания и смертность, связанная с процедурой трансплантации (РТПХ и инфекционные осложнения). Экстракорпоральный фотоферез является эффективным методом лечения РТПХ. Длительное поддержание ремиссии заболевания требует посттрансплантационной терапии в зависимости от диагноза (введение донорских лимфоцитов, использование гиперметилирующих препаратов, поддерживающая химиотерапия).

В клиниках ТКМ РФ необходимо развивать все виды алло-ТГСК — родственную, неродственную и гаплоидентичную, используя в качестве источника ГСК костный мозг, периферическую кровь или пуповинную кровь.

B.V. Afanasyev

### **Results of different types of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children and adults**

*R.M. Gorbacheva Memorial Institute of Children Hematology and Transplantation, St. Petersburg Pavlov State Medical University St. Petersburg, Russia*

#### **Introduction**

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is an effective treatment of hematological, oncology and hereditary diseases in children, adolescents and adults. Annually in the world it is nearby about 15 000 allogeneic HSCT from a compatible sibling, unrelated, or haploidentical donors or cord blood transplantation are carried out. For patients who lack HLA-matched siblings, there are three alternative sources of stem cells for allo-SCT: (1) volunteer unrelated donors; (2) umbilical cord blood and (3) partially HLA-mismatched, or HLA-haploidentical, related donors. Haploidentical SCT (Haplo-SCT) is treatment option for 70–90% patients (pts) who don't have an HLA-identical sibling donor, HLA-matched unrelated donor or insufficient amount of cord blood cells.

#### **Aim**

Evaluate the effectiveness of different types of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT): related, unrelated and haploidentical in children, adolescents and adults with cancer, hematological and hereditary diseases.

#### **Design and Methods**

A total of 532 pts who received HSCTs from unrelated (275 pts), sibling (191 pts) or haploidentical (66 pts) donors were included in this analysis. In 70% of allo-HSCT were patients with acute leukemia, 30% of patients with malignant lymphoma, CML, aplastic anemia, solid tumors. In 58% of patients received myeloablative conditioning regimen (MAC), 42% of patients were conditioned with reduced intensity (RIC). All transplant recipients received prophylaxis of acute Graft vs Host Disease (aGvHD): CsA+MTX or Tacro+MMF. For the treatment of GvHD were used glucocorticoids, extracorporeal photopheresis (ECP) and monoclonal antibodies. Transplant sources: bone marrow (BM) was used for 41 % of patients, 59% have received peripheral HSC. Unmanipulated BM+PBSC were used for 36% pts and 64% recipients received partial manipulated graft (selection of CD34<sup>+</sup> cells combined with unmanipulated BM).

#### **Results**

10-years overall survival (OS) in pts after allogeneic related and unrelated HSCT, with ALL CR 1–2 in children was 53%, adolescents 40% and adults 35%. 10-years OS in pts after allogeneic related and unrelated HSCT, with AML CR 1–2 in children was 65%, adolescents 45% and adults 42%. 1-year OS after Haplo-HSCT in pts with ALL CR 2 and more was 42,9%, 1-year OS in pts with AML CR 2–80%.

#### **Conclusion**

Virtually all patients in need of allo-HSCT may find a donor. In the absence of a compatible sibling or unrelated donor may use alternative sources of HSCs (haploidentical donor). RIC regimens can be used in majority of patients (heavily pretreated patients, patients older than 50 years). Allo-HSCT effective method of treatment of congenital and acquired BM failure syndromes (Fanconi anemia, Bleckfan-Diamond anemia, Shwachman-Diamond syndrome, Kostman's syndrome), primary immunodeficiencies (Wiskott-Aldrich syndrome), storage diseases (Hurler syndrome, Krabbe disease, X-Linked adrenoleucodystrophy, metachromatic leucodystrophy, marble bones). Main causes of death after allo-HSCT are relapse and transplant related mortality (GvHD and infections complications). ECP is an effective treatment of GvHD. Long-term maintenance of remission of the disease requires a post-transplant therapy, depending on the diagnosis (DLI, the use of hypermethylation drugs, supporting chemotherapy). It is necessary to develop all kind of allo-HSCT — related, unrelated and haploidentical, using as a source of HSC BM, peripheral blood or umbilical cord blood in Russian Federation.

Э. Глюкман

### **Пуповинная кровь как альтернативный источник гемопоэтических стволовых клеток для трансплантации**

*Eurocord, госпиталь Saint Louis Парижский университет, Франция*

Пуповинная кровь (ПК) является важным источником трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток для взрослых и детей, страдающих онкологическими и неонкологическими заболеваниями. В реестре Еврокорда (Eurocord) собраны и проанализированы данные по исходу лечения более 7000 пациентов из стран Европы и др. Детям трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток проводили по следующим показаниям: острый лейкоз (23%), миелодиспластический синдром (15%), синдром недостаточности костного мозга (BMFS) (17%), гемоглобинопатии (9%), тяжёлый комбинированный иммунодефицит (14%) и расстройства метаболизма (13%). У взрослых наиболее частыми показаниями были острый лейкоз (58%), миелодиспластический синдром/хронический миелолейкоз/ хронический лимфолейкоз (23%) и синдром недостаточности костного мозга (5%). За последние годы число трансплантаций пуповинной крови взрослым возросло благодаря использованию двойной трансплантации пуповинной крови и режиму кондиционирования со сниженной интенсивностью. Оба метода увеличили выживаемость и доступность трансплантата для пожилых и тяжело больных взрослых, которым невозможно найти образец пуповинной крови с достаточным количеством клеток, а также сократили частоту ранних осложнений путем снижения токсичности, связанной с режимом введения.

Впервые преимущества трансплантатов пуповинной крови были показаны у образцов от доноров-родственников. Кроме того, банки пуповинной крови ввели критерии стандартизации получения, банкирования, обработки и криоконсервирования пуповинной крови для трансплантатов, полученных от

неродственных доноров, предназначенных для пациентов с различными онкогематологическими и неонкологическими заболеваниями. В настоящее время пуповинная кровь стала одним из наиболее распространенных источников гемопоэтических стволовых клеток для аллогенных трансплантаций. Сегодня существует глобальная сеть банков пуповинной крови и центров трансплантации для публичного пользования. На хранении в них находятся около 600 тыс. образцов ПК, при этом более 20 тыс. образцов уже использованы во всем мире для лечения взрослых и детей, страдающих тяжелыми гематологическими заболеваниями. Различные исследования показали, что число клеток является самым важным фактором для приживления трансплантата, при этом допустима некоторая несовместимость по HLA-антигенам.

Важными преимуществами ПК являются неограниченные ресурсы по ее заготовке, возможность подбора редких HLA-гаплотипов при заборе крови среди этнических меньшинств, отсутствие риска для донора и матери. Существенным является то, что перед криоконсервированием в обязательном порядке выполняется HLA-типирование и контроль инфекционной безопасности; она сохраняется в жидком азоте более 20 лет. Для пациента в этом случае нет времени ожидания, т. к. образец пуповинной крови может быть быстро предоставлен через международную сеть банков. После трансплантации клеток из этого источника отмечается замедленное приживление клеток, но при этом констатируется меньшая частота реакции «трансплантат против хозяина» и наблюдается эффект «трансплантат против лейкоза» при сниженном риске рецидива онкологического заболевания.

Следует учесть недостатки использования клеток из данного источника. Так, для успешного приживления трансплантата необходимо вводить реципиенту не менее  $3 \times 10^7$  ядродержащих клеток или  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup> клеток. Данный ограничивающий фактор может быть преодолен с помощью использования двух образцов пуповинной крови. В настоящее время исследуются другие способы, в том числе выращивание гемопоэтических клеток *ex vivo*, внутрикостное введение, совместное введение с мезенхимальными стромальными клетками.

До сих пор окончательно не выяснена роль HLA-несовместимости. Нам известно, что большинство трансплантатов отбирались по типированию антигенов I класса HLA и по типированию аллелей для II класса. При злокачественных заболеваниях HLA-несовместимость частично преодолевается путем увеличения количества клеток, возрастает возможность развития реакции «трансплантат против хозяина», однако снижается риск рецидива лейкоза, следовательно, на выживаемость без рецидива не влияет степень HLA-несовместимости. При доброкачественных заболеваниях представляет проблему приживление трансплантата, следовательно, важно выбрать образец пуповинной крови с большим количеством клеток и как можно более совместимый по HLA антигенам.

После трансплантации у реципиента отмечается замедленное восстановление иммунитета, что очевидно связано с незрелостью иммунной системы новорожденного, а следовательно и клеток ПК.

В двух исследованиях сравнивали результаты трансплантации клеток пуповинной крови и костно-

го мозга, полученных от неродственников, детям, страдающим злокачественными заболеваниями. Eurocord опубликовал данные исследования, в котором сравнивались результаты лечения с использованием совместимых неродственных клеток либо не подвергнутого воздействию, либо без T-клеточного костного мозга (HLA 6 из 6) с результатами трансплантации несовместимых клеток пуповинной крови. Результаты показали, что после трансплантации клеток ПК приживление было отсрочено, реакция «трансплантат против хозяина» уменьшалась подобно таковой при трансплантации костного мозга без T-клеток; уровень рецидивов, а также выживаемость без лейкоза были таким же.

Eapen M. и соавт. для Центра международных исследований трансплантации крови и костного мозга (Center for International Blood & Marrow Transplant Research (CIBMTR) и NYCBB сравнили результаты лечения 503 детей с острым лейкозом с помощью пересадки несовместимых клеток пуповинной крови от неродственных доноров с результатами, полученными у 282 реципиентов клеток костного мозга, полученных от неродственных доноров (116 с совместимыми по HLA аллелям 8 из 8). У реципиентов несовместимого по HLA аллелям костного мозга наблюдалась более острая и продолжительная реакция «трансплантат против хозяина» без уменьшения выживаемости без лейкоза. Важно то, что исследователи обнаружили, что даже при использовании материала от донора костного мозга, совместимого по всем аллелям, выживаемость без лейкоза статистически не отличалась от результатов использования трансплантата клеток пуповинной крови, отличных по 1 или 2 HLA-антигенам, и что у реципиентов HLA-совместимых клеток ПК исход лечения был лучше по сравнению с реципиентами костного мозга, совместимого по HLA аллелям. Однако, повышенная смертность, связанная с трансплантацией, наблюдалась среди детей, получивших низкую дозу клеток ПК ( $< 3 \times 10^7$ /кг) и образец ПК, отличный по 1 HLA антигену, а также у детей, получивших образец неродственной ПК, отличный по 2 HLA антигенам независимо от введенной клеточной дозы. Интересно, что введение неродственной ПК, несовместимой по 2 HLA антигенам, было связано с более низкой частотой рецидива.

Аналогичные исследования были проведены у взрослых с онкологическими заболеваниями. В исследовании, проведенном Eurocord, сравнивали данные лечения взрослых с острым лейкозом, получивших совместимые неродственные клетки костного мозга (HLA 6 из 6), либо клетки несовместимой пуповинной крови. Полученные результаты показали, что, несмотря на задержку приживления, трансплантация клеток пуповинной крови приводила к сходной выживаемости без лейкоза по сравнению с пересадкой костного мозга. CIBMTR и NYCBB показали, что у взрослых онкологических больных введение клеток пуповинной крови дает такую же выживаемость без лейкоза, что и пересадка неродственного костного мозга, несовместимого по 1 антигену. В то же время, исследование, проведенное в Японии, показало, что введение клеток пуповинной крови дает лучшие результаты, чем пересадка совместимого неродственного костного мозга. Был проведен мета-анализ данных, полученных в опубликованных исследованиях, по 161 ребенку и 316 взрослым,

перенесшим трансплантацию клеток неродственной пуповинной крови (в большинстве случаев несовместимых по 1 или 2 антигенам) и по 316 детям и 996 взрослым после пересадки неродственного костного мозга (почти полностью совместимого с реципиентом). Данные по пересадке костного мозга без Т-клеток в исследование не включались, анализировались данные только по пересадке полностью совместимого костного мозга. Объединенные сравнения исследований пересадки клеток неродственной пуповинной крови и неродственного костного мозга у детей выявили, что частота хронической реакции «трансплантат против хозяина» была ниже при пересадке клеток неродственной ПК, но частота острой реакции «трансплантат против хозяина» III–IV степени не отличалась. Не наблюдалось различий в 2-годичной выживаемости среди детей, когда данные исследований объединялись. У взрослых смертность, связанная с трансплантацией и выживаемость без лейкоза статистически не различались.

Эти работы явились значимым признаком развития трансплантации клеток пуповинной крови в мировом масштабе, так как они ясно продемонстрировали, что трансплантацию клеток ПК можно применять у взрослых так же, как и у детей; показано, что трансплантация несовместимых клеток неродственной пуповинной крови дает такие же результаты, как и пересадка HLA совместимого неродственного костного мозга взрослых.

Недавно Eurocord и CIBMTR провели исследование по сравнению результатов применения неродственного костного мозга, совместимого по HLA, или несовместимого по 1–2 антигенам ( $n=364$ ) или G-CSF мобилизованных клеток периферической крови ( $n=728$ ) с результатами трансплантации несовместимых клеток пуповинной крови ( $n=148$ ) взрослым пациентам с острым лейкозом. По результатам многофакторного анализа при трансплантации неродственной пуповинной крови смертность, связанная с трансплантацией, была выше, но уровень рецидивов и реакции «трансплантат против хозяина» был ниже, приводя к одинаковой выживаемости без лейкоза, по сравнению с другими источниками стволовых клеток. Совместные результаты данных сравнительных исследований и мета-анализ показали, что: 1) трансплантация клеток неродственной пуповинной крови возможна у взрослых, когда образец пуповинной крови содержит более высокое количество клеток, и должна рассматриваться как альтернатива в качестве источника аллогенных стволовых клеток для пациентов, не имеющих HLA совместимого донора костного мозга; 2) несмотря на несовместимость по HLA антигенам, пуповинная кровь от неродственных доноров обеспечивает достаточно обнадеживающие результаты трансплантации совместимого неродственного костного мозга у взрослых с онкогематологическими заболеваниями, приводя к заключению, что как и у детей, процесс поиска донора костного мозга и пуповинной крови от неродственных доноров следует начинать одновременно, особенно для пациентов с острым лейкозом, когда фактор времени является решающим.

В заключение необходимо указать, что в относительно короткое время многое стало известно о свойствах гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови и их клиническом применении. Трансплантация клеток пуповинной крови должна решить несколько новых задач.

E. Gluckman

### **Cord blood: an Alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation**

*Eurocord, Hospital Saint Louis (APHP)  
University Paris VII (IUH), Paris, France*

#### **Introduction**

Cord blood has emerged as an important source of hematopoietic stem cell transplants for adults and children with malignant and non malignant diseases. Eurocord registry has collected and analyzed outcomes data from more than 7.000 patients from European and non European centers. In children, the most frequent indications were Acute leukemia (23%), Myelodysplastic syndrome (MDS)(15%), Bone marrow failure syndrome (BMFS)(17%), Hemoglobinopathies (9%), Severe combined immunodeficiency (14%) and Metabolic diseases (13%). In adults, it was acute leukemia (58%), MDS/CML/CLL (23%) and BMFS (5%). The number of adults cord blood transplant has been increasing in recent years because of the use of double cord blood transplant and reduced intensity conditioning. Both methods increased survival and transplant accessibility to elderly or severely disabled patients in adults who could not find a cord blood unit with enough cells number and diminishing early complications by reduction of regimen related toxicity.

#### **Advantages**

These advantages were first recognized in CBT using related donors; secondarily, cord blood banks (CBB) established criteria for standardization of cord blood collection, banking, processing, and cryopreservation for unrelated donor transplants in patients with various hematological malignant and non malignant diseases. Umbilical cord blood (UCB) has now become one of the most commonly used source of hematopoietic stem cells for allogeneic transplantation. To-day a global network of cord blood banks (CBB) and transplant centers has been established for a common inventory, an estimated 600.000 UCB have been banked and more than 20.000 UCB units distributed worldwide for adults and children with severe hematological diseases. Several studies have shown that the number of cells is the most important factor for engraftment while some degree of HLA mismatches is acceptable.

The advantages are the unlimited supply of cord blood, the selection of rare HLA haplotypes by collecting cord blood in ethnic minorities, the absence of risk for the donor and the mother, HLA typing and infectious disease tests are performed at collection, cord blood can be kept in liquid nitrogen for more than 20 years, there is no waiting time the cord blood unit is readily available through the international network of cord blood banks. Engraftment is delayed but graft versus host disease is reduced and graft versus leukemia is observed with a diminished risk of relapse in malignant diseases.

#### **Disadvantages**

Cell number is an important factor. A minimum number of  $3 \times 10^7$  nucleated cells or  $1 \times 10^5$  CD34+ cells are necessary for engraftment. This limiting factor has been overcome by the use of 2 cord blood units. Other methods are under investigation including ex vivo expansion, intrabone infusion, co infusion of mesenchymal stromal cells.

The role of HLA mismatches is still unclear, we know that most transplants have been selected on antigen typing for HLA class I and allelic typing for class II. In malignant diseases HLA mismatches is partially overcome by increasing the cell number, GVH increases with more mismatches but leukemic relapse decreases in consequence leukemia free survival is not influenced by the number of HLA mismatches. In non malignant diseases, the problem is engraftment, therefore it is important to select a cord blood unit with a high number of cells and as closely HLA matched as possible.

Immune reconstitution is delayed because of the immaturity of the new-born immune system, in addition donor lymphocyte infusion cannot be used in case of leukemic relapse except when the donor is an HLA identical sibling.

Comparison of cord blood with other sources of stem cells.

In children, with malignant diseases, two studies compared the outcome of unrelated UCBT and BMT. Eurocord published a study comparing the outcome of matched unrelated BMT (HLA 6 out of 6) either unmanipulated or T-depleted to mismatched UCBT. Results showed that after UCBT, engraftment was delayed, GVHD was reduced similarly to T-cell depleted BMT; relapse was the same as well as leukemia free survival. Eapen M. et al. for the CIBMTR and the NYCBB compared outcomes of 503 children with acute leukemia given an unrelated mismatched UCBT with 282 unrelated BM transplant recipients (116 HLA allele matched 8 out of 8). HLA allele mismatched BM recipients had more acute and chronic GVHD without decreasing leukemia free survival (LFS). Importantly, they found that even using an allele matched BM donor, LFS was not statistically different from one or 2 HLA disparate UCBT and that an HLA matched UCBT recipient had better outcomes compared to HLA allele matched BM recipients. However, an increased transplant related mortality was observed in children transplanted with a low CB cell dose ( $< 3 \times 10^7/\text{kg}$ ) and 1 HLA disparate CB graft or in children given a 2 HLA disparate UCBT independently of the cell dose infused. Interestingly, use of 2 HLA mismatched UCBT was associated with lower incidence of relapse.

The same studies were performed in adults with malignancies. Eurocord study compared adults with acute leukemia receiving either a matched unrelated bone marrow transplant (HLA 6 out of 6) or a mismatched cord blood transplant. Results showed that, despite a delay of engraftment, UCBT gave similar leukemia survival compared to BMT. In the same issue of the journal, CIBMTR and NYCBB showed that, in adults with malignancies, UCBT gave the same LFS survival than 1 antigen mismatched unrelated bone marrow transplant (UBMT). At the same time, a Japanese study showed that CBT gave better results than matched unrelated bone marrow transplants. In a meta analysis, combining the published studies, 161 children and 316 adults undergoing UCBT (mostly 1 or 2 antigen-mismatched), along with 316 children and 996 adults undergoing UBMT (almost entirely fully matched with the recipient), were analyzed. T-cell-depleted UBMT was excluded where data were available, only fully matched UBMT was used in the analysis. Pooled comparisons of studies of UCBT and UBMT in children found that the incidence of chronic GVHD was lower with UCBT, but the incidence of grade III–IV acute GVHD did not differ. There was no difference

in 2-year overall survival in children when studies were pooled. For adults, transplantation-related mortality (TRM) and LFS were not statistically different.

These papers were the hallmark of the worldwide development of cord blood transplant as they clearly demonstrated that cord blood transplant could be used in adults as well as in children further, it showed that unrelated mismatched cord blood transplant gave the same results as a HLA matched unrelated adult bone marrow transplant.

Recently, Eurocord and CIBMTR performed a study comparing the outcome of unrelated HLA matched or 1-2 antigens mismatched bone marrow ( $n=364$ ) or G-CSF mobilized peripheral blood ( $n=728$ ) to mismatched cord blood transplant ( $n=148$ ) in adults with acute leukemia. In multivariate analysis, in UCBT, TRM was higher but relapse rate and GVHD were lower resulting in the same LFS compared to the other sources of stem cells. The results of these comparative studies and the meta-analysis, gathered together showed that 1) UCBT is feasible in adults when a cord blood unit contains a higher number of cells and should be considered an option as an allogeneic stem cell source for patients lacking a HLA matched bone marrow donor; 2) Despite increased HLA disparity, UCB from unrelated donors offers sufficiently promising results to matched UBMT in adults with hematological malignancies leading to the conclusion, as in children, that the donor search process for BM and UCB from unrelated donors should be started simultaneously, especially in patients with acute leukemia, where the time factor is crucial.

In conclusion, much has been learned in a relatively short time on the properties of cord blood hematopoietic progenitors and their clinical application. Cord blood transplant needs to meet several new challenges. First, several methods of improvement of the speed of engraftment and decreasing transplant related mortality are investigated such as, the increase of donor pool to decrease the number of HLA mismatches or the use of double cord blood transplants. Other methods are currently investigated such as cord blood intra-bone infusion, ex-vivo expansion with cytokine cocktails or homing factors or addition of mesenchymal stem cells.

Gluckman E., Broxmeyer H.E., Auerbach A.D. et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. *New Engl. J. Med.* 1989; 321: 1174–78.

Rubinstein P., Rosenfield R.D., Adamson J.W., Stevens C.E. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood* 1993; 81: 1679–90.

Broxmeyer H.E., Gordon G.W., Hangoc G. et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *PNAS USA* 1989; 86: 3828–32.

Broxmeyer H.E., Hangoc G., Cooper S. et al. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *PNAS USA* 1992; 89: 4109–13

Rubinstein P., Dobrila L., Rosenfield R.E. et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *PNAS USA* 1995; 92: 10119–22.

Gluckman E., Rocha V., Boyer Chamard A. et al. Outcome of cord blood transplantation from related and unrelated donors. *New Engl. J. Med.* 1997; 337: 373–81.

Wagner J.E., Barker J.N., DeFor T.E. et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and non malignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* 2002; 100: 1611–8.

Gluckman E., Rocha V., Arcese W. et al. On behalf of Eurocord group. Factors Associated with Outcome of Unrelated Cord Blood Transplant: Guidelines for Donor Choice. *Experimental Hematol.* 2004; 32: 397–407.

Rocha V., Wagner J.E., Sobocinski K. et al. Comparison of graft-versus-host disease in children transplanted with HLA identical sibling umbilical cord blood versus HLA identical sibling bone marrow transplant. *New Engl. J. Med.* 2000; 342: 1846–54.

Wagner J.E., Rosenthal J., Sweetman R. et al. Successful transplantation of HLA Matched and HLA mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft versus host disease. *Blood* 1996; 88: 795–802.

Locatelli F., Rocha V., Chastang C. et al. Factors associated with outcome after cord blood transplantation in children with acute leukemia. *Blood* 1999; 93: 3662–7.

Rubinstein P., Carrier C., Scaradavou A. et al. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *New Engl. J. Med.* 1998; 339: 1565–77.

Laughlin M.J., Barker J., Bambach B. et al. Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344: 1815–22.

Rocha V., Cornish J., Sievers E. et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* 2001; 97: 2962–71.

Eapen M., Rubinstein P., Zhang M.J. et al. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukemia: a comparison study. *Lancet* 2007; 369: 1947–54.

Rocha V., Labopin M., Sanz G. et al. for the Acute Leukemia Working Party of European Blood and Marrow Transplant group and Eurocord-Netcord registry. Comparison of outcomes after unrelated umbilical cord versus unrelated bone marrow transplants in adults with acute leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2004; 351: 2276–85.

Laughlin M.J., Eapen M., Rubinstein P. et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2004; 351: 2265–75.

Hwang W.Y., Samuel M., Tan D. et al. A Meta-Analysis of Unrelated Donor Umbilical Cord Blood Transplantation versus Unrelated Donor Bone Marrow Transplantation in Adult and Pediatric Patients. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2007; 13: 444–53.

Eapen M., Rocha V., Sanz G. et al. Effect of graft source on unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation in adults with acute leukaemia: a retrospective analysis. *The Lancet Oncol.* e-pub June 16, 2010.

Ballen K.K., Spitzer T.R., Yeap B.Y. et al. Double unrelated reduced-intensity umbilical cord blood transplantation in adults. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2007; 13: 82–9.

Barker J.N., Weisdorf D.J., DeFor T.E. et al. Rapid and complete donor chimerism in adult recipients of unrelated donor umbilical cord blood transplantation after reduced-intensity conditioning. *Blood* 2003; 102: 1915–9.

С.Л. Киселев

**Плюрипотентные клетки человека как источник биотехнологического производства компонентов крови**

*Институт стволовых клеток человека, Российский научный центр «Курчатовский институт», Москва*

Для переливания крови необходимо соблюдение условий совместимости группы крови. В настоящее время в трансфузиологии используется донорская кровь. Однако, даже в развитых странах потребность превышает запасы крови для переливания, а хранение и сбор донорской крови требуют существенных затрат. Также существует опасность заражения донорской крови такими инфекционными агентами как вирусы иммунодефицита или гепатита. Нулевой резус-фактор негативный тип крови может быть безопасно перелит каждому, однако таких доноров немного, всего 7% от популяции. Таким образом запасы универсальной группы крови ограничены. Плюрипотентные клетки естественным образом приспособлены дифференцироваться в любой тип клеток включая клетки крови, при этом имея возможность неограниченно долго поддерживаться в культуре. Сегодня существуют два типа плюрипотентных клеток человека возможности которых активно изучаются: эмбриональные стволовые и индуцированные. В своих предыдущих работах из плюрипотентных клеток

нами были успешно получены клетки гемангиобласта и эндотелия. Задачей настоящего исследования является разработка технологии дифференцировки плюрипотентных клеток человека в клетки крови.

S.L. Kiselev

**Pluripotent stem cells as an unlimited source of blood for transfusions**

*Human stem cells Institute, Russian Scientific Center «Kurchatov Institute», Moscow*

People require blood transfusions that match their own blood type. At present time donors blood is used for transfusions. Apart of expenses to collect and store blood cells from donors demand often exceeds supply. There is also a chance the blood could be contaminated with diseases such as AIDS or Hepatitis C. Type O-negative can be safely transferred into anyone, but is only possessed by about 7 percent of the population, leaving supplies perpetually short. Pluripotent stem cells are naturally capable of becoming any type of tissue in the body including blood and in the same time they have an ability to multiply indefinitely in the laboratory. There are two types of human pluripotent stem cells: embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells, both of which are currently under study. Previously we have successfully generated hemangioblast and endothelial cells from both types of human pluripotent stem cells. The aim of the present work is to develop the technique how to differentiate pluripotent stem cells to blood.

А. Кулиев, Е. Померанцева, Т. Паскальчук, Д. Полинг, О. Верлинский, С. Речитская

**Предимплантационная диагностика – создание инструмента для эффективной HLA-совместимой трансплантации**

*Институт Репродуктивной генетики Чикаго, США*

Предимплантационная генетическая диагностика (ПГД) появилась как возможность рождения здоровых детей для пар, находящихся в группе риска по наследственным заболеваниям. Данную диагностику предлагали пройти парам, имевшим ребенка с патологией, чтобы получить возможность рождения здорового ребенка, который также может быть полностью HLA-совместимым для больного сиблинга, что гарантирует успешную трансплантацию донорских тканей при необходимости. Первоначально мы применили данный подход в 1996 г. для лечения ребенка больного анемией Фанкони с помощью введения стволовых клеток пуповинной крови. Сейчас, однако, данный метод применяется для растущего числа врожденных и приобретенных нарушений.

Предимплантационное HLA-типирование выполняется с применением стандартного ЭКО-протокола в сочетании с незначительным воздействием на образцы ооцитов и бластомер, подробно описанные в других источниках (Verlinsky and Kuliev, 2005). Получаемый при биопсии материал подвергают многократному анализу ПЦР, а также мутационному тестированию, одновременно с использованием сцепленных маркеров на HLA-типирование, предназначенное для выявления эмбрионов, содержащих

материнские и отцовские хромосомы, идентичные для больного сиблинга (Verlinsky and Kuliev, 2006). Вероятность выявления непораженного эмбриона, полностью совместимого с пораженными сиблингами, составляет 18,75%, основанная на 25% вероятности HLA-типирования и 75% вероятности наличия непораженного эмбриона, если анализ проводится совместно с ПЦР на наличие генетических нарушений.

На данный момент мы провели приблизительно 300 циклов ПГД на HLA-типирование, что привело к рождению 50 здоровых, HLA-совместимых детей, чья пуповинная кровь и (или) костный мозг могут быть использованы для пересадки больным сиблингам в терапевтических целях. В 192 из этих случаев в сочетании с ПГД было выполнено тестирование на различные генетические нарушения (талассемия, серповидно-клеточная анемия, анемия Фанкони, синдром Вискотта-Олдрича, X-сцепленная аденолейкодистрофия, сцепленный с X-хромосомой иммунодефицит с гиперпродукцией IgM, X-сцепленная гипогидротическая эктодермальная дисплазия с иммунодефицитом, болезнь Краббе, наследственная форма синдрома Даймонда-Блэкфана, X-сцепленная форма хронического гранулематоза), проводя предварительный отбор здоровых детей, которые были также HLA идентичны пораженным сиблингам. Это составляет значительную часть из проведенных нами процедур предимплантационной генетической диагностики для более чем 220 различных генетических состояний в 2028 случаях, что привело к рождению приблизительно 700 здоровых детей. В настоящее время в мире проведена успешная реконституция гемопоэтических клеток пуповинной крови или пересадка костного мозга со стволовыми клетками, полученными приблизительно от 50 HLA-совместимых сиблингов, рожденных после проведения ПГД. Это наглядно показывает, что проведение ПГД для HLA-типирования является эффективным методом для улучшения пересадки костного мозга при лечении врожденных и приобретенных заболеваний, который будет способствовать улучшению доступа к HLA-совместимой пересадке костного мозга.

A. Kuliev, E. Pomerantseva, T. Packalchuk,  
D. Poling, O. Verlinsky, S. Rechitsky

#### **Preimplantation Diagnosis – Established Tool for HLA Matched Stem Cell Transplantation**

*Reproductive Genetics Institute, 2825 North Halsted Street, Chicago IL, 60657*

*Tel: 773 472-4900; Fax: 773 871-5221*

*e-mail: anverkuliev@hotmail.com*

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) was introduced as an option for at risk couples to reproduce without fear of having an affected child. It was then offered also to those already having affected children, to produce an unaffected offspring that may be also a complete HLA match to affected siblings to ensure successful bone marrow transplantation. Originally, we introduced this approach in 1999 for cord blood stem cells transplantation treatment of child with Fanconi anemia, but it is now being applied for increasing number of congenital and acquired disorders.

Preimplantation HLA typing is performed using a standard IVF protocol coupled with micromanipulation procedures for oocyte or blastomere sampling, described in detail elsewhere (Verlinsky and Kuliev, 2005). The

biopsied material is tested by the multiplex nested PCR analysis, involving the mutation testing, simultaneously with linked markers for HLA typing, designed to identify the embryos containing the maternal and paternal chromosomes 6 identical to the affected siblings (Verlinsky and Kuliev, 2006). The chance to identify unaffected embryos fully matched to affected siblings is 18,75%, based on 25% chance of HLA match and 75% chance of having unaffected embryo, if tested together with PGD for genetic disorder.

Our current experience includes approximately 300 PGD cycles for HLA typing, resulting in birth of over 50 unaffected HLA matched children, providing their cord blood and/or bone marrow for transplantation treatment of the affected siblings. 192 of these cases were performed in combination with PGD for different genetic disorders (thalassemia, sickle cell disease, Fanconi anemia, Wiscott-Aldrich syndrome, X-linked adrenoleukodystrophy, X-linked Hyper-IgM Immunodeficiency, X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia with immune deficiency, Krabbe disease, inherited form of Diamond-Blackfan anemia and X-Linked Chronic Granulomatous Disease, involving the pre-selection of unaffected children who were also HLA identical to the affected siblings. This is significant proportion of our overall PGD experience performed for more than 220 different genetic conditions in 2028 cases, yielding the birth of approximately 700 unaffected children. The present world's overall experience includes successful hematopoietic reconstitution of cord blood or bone marrow transplantation with stem cells obtained from approximately fifty HLA matched siblings born after PGD. This demonstrates that PGD for HLA matching is an efficient approach for improving success of bone marrow transplantation treatment for congenital and acquired disorders, which will have an increasing impact on improving access to HLA matched bone marrow transplantation.

A. Мадригал

#### **Иммунологические свойства пуповинной крови**

*Институт Энтони Нолана  
Лондон, Великобритания*

Стволовые клетки определяют по их функциональным свойствам, таким как способность к самообновлению и дифференцировке в различные клеточные линии. Эти клетки являются источниками тканей посредством скоординированного и программируемого деления, они также участвуют в поддержании этой ткани в течение ее жизни. Первоначально, стволовые клетки обеспечивали развитие из оплодотворенного овоцита всех тканей и органов с точной локализацией, структурой и специфическими функциями. Затем, как только ткани оказывались сформированы, поддержание их постоянства зависит от существования тканеспецифических стволовых клеток, которые производят новые функциональные клетки в нормальных условиях, а также после специфического стресса по мере возрастающих потребностей активности или повреждения (физиологическая и репаративная регенерация). Считают, что эти клетки находятся в соответствующих органах, где они строго контролируются специфическим микроокружением; после поступления соответствующего сигнала эти клетки мобилизуются и привлекаются к участкам, в которых требуется клеточная регенерация.

Впервые стволовые клетки были продемонстрированы на модели трансплантации костного мозга. Таким образом, многие годы гемопоэтические стволовые клетки в общем смысле идентифицировались как стволовые. У взрослых добровольцев, родственных доноров и неродственных доноров стволовые клетки получают при заборе костного мозга или из периферической крови при использовании гранулоцитарного колониестимулирующего фактора G-CSF. Недавно другим важным источником стволовых клеток стала пуповинная кровь (ПК). Есть вероятность, что существуют некоторые едва уловимые различия между этими клетками по их потенциалу к дифференциации и приживлению.

Введение клеток, полученных из костного мозга, миелоаблативному пациенту позволяет создать долгосрочные лимфо-гемопоэтические химеры, которые поддерживают выработку всех гемопоэтических линий в течение жизни. Используя ДНК маркеры, можно показать, что такая репопуляция происходит от очень ограниченной группы клеток. Например, отбор по CD34 или CD133 наглядно показал способность человека к репопуляции клеток костного мозга как за короткий период времени, так и долгосрочно. Более того, на моделях животных некоторые группы исследователей продемонстрировали, что одиночная клетка способна регенерировать многочисленные ткани у одного определенного индивидуума, таким образом, она используется как суррогатная в присутствии стловых клеток. Не так давно почти во всех типах тканей были выявлены другие типы стловых клеток. В научном мире имеют место прения по определению и классификации стловых клеток в соответствии с их потенциалами к воспроизводству дериватов тех или иных эмбриональных листков. Тем не менее, используя либо стловые клетки, либо клетка-предшественники, некоторые исследователи показали их возможную терапевтическую пользу как у животных, так и у человека.

Однако, стловые клетки, предназначенные для лечения, требуют особого анализа. Стволовые клетки не оцениваются по их качествам как собственно стловые, скорее по тому, как они способствуют обратимости дегенеративных процессов или даже, способности запускать регенеративные процессы при повреждении. Следовательно, они заключают в себе две различных способности. Во-первых, они могут дифференцироваться в конкретные зрелые клеточные типы. Вследствие этого, эти клетки можно использовать для восстановления соответствующих тканей, используя закономерности и опыт тканевой инженерии. Во-вторых, стловые клетки сами вырабатывают широкий спектр биоактивных макромолекул, которые являются иммунорегуляторами, а также служат для формирования регенеративного микроокружения в области повреждения ткани.

Терапевтическое воздействие на иммунную систему может преодолеть заболеваемость и смертность, вызванные недостаточной способностью адаптивного иммунитета и злокачественными новообразованиями, которые не поддаются лечению с помощью других терапевтических мероприятий, хирургического лечения, лучевой терапии или химиотерапии. Мероприятия, которые изменяют иммунную реактивность, могут быть полезны для лечения аутоиммунных и воспалительных хронических заболеваний, и приемы, которые обеспечат адаптивный иммунитет,

активный или адаптивный, являются крайне важными для уменьшения заболеваемости и смертности пациентов и реципиентов. Различные методы пересадки органов, тканей и клеток и эффективность трансплантации гемопоэтических стловых клеток (ТГСК) для лечения онкогематологических заболеваний можно улучшить с помощью мероприятий, направленных на обеспечение адаптивной или выработки эндогенной противоопухолевой иммунной реактивности.

Таким образом, если рассматривать клеточную терапию как использование клеток в качестве терапевтических агентов, можно выделить две большие области, одна из них включает регенерацию, замену или замещение функциональных клеток (терапия стловыми клетками) и другая, связанная с использованием иммуноцитов, в которой будут эксплуатироваться их специфические типы ответов в области эффекторов и супрессоров (клеточная иммунотерапия). В контексте аллогенной ТГСК, это может привести к реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ), реакции «трансплантат против лейкоза» (реакции ТПЛ) и реакции «трансплантат против инфекции» (реакции ТПИ). Другой потенциальной сферой применения помимо указанных областей, является регенеративная медицина дегенеративных заболеваний и (или) аутоиммунных заболеваний.

В Соединенном Королевстве ежегодно проводится поиск доноров-добровольцев для около 1400 пациентов, для которых нет тканесовместимых сиблингов, однако осуществляется только около 500 трансплантаций; для 60% из них подбираются доноры из Соединенного Королевства (на настоящее время в стране насчитывается около 750 000 зарегистрированных доноров, 7% от общемирового количества). Для того, чтобы обеспечить эффективное лечение, необходимо рассмотреть и решить два важных вопроса: как сделать доступной трансплантацию для 20% пациентов оставшихся без доноров (главным образом происходящие не из северо-западной Европы) и своевременно обеспечить стловыми клетками 30% пациентов, которым необходима срочная трансплантация. По нашим оценкам 1 из 4 пациентов, подавших заявку на аллогенный неродственный трансплантат для лечения таких состояний, воспользуется помощью национального проекта банков пуповинной крови (около 200–300 пациентов в год только в Соединенном Королевстве). Эти показатели соответствуют текущим данным по трансплантациям ПК, проводимым в странах таких, как США, Франция, Испания и Австралия, где количество трансплантаций ПК составляет 3–5 в год на миллион населения.

Пуповинная кровь обладает существенными логистическими и клиническими преимуществами над другими источниками стловых клеток, такими как а) доступность для лечения со значительной быстротой применения; б) большая частота менее репрезентативных генотипов, по сравнению с реестрами костного мозга, что позволяет выполнять трансплантации этническим меньшинствам; в) меньший риск передачи латентных вирусов или индуцирования злокачественных новообразований; г) отсутствие истощения донора; д) отсутствие риска для донора и, наконец, е) неограниченный источник материала для исследования стловых клеток.

Проекты крупных банков ПК предлагают уникальную возможность сделать доступными для исследований

большое количество собранных с соблюдением соответствующих процедур, клинически оцененных образцов пуповинной крови, которые не подходят для клинического применения. Действительно, частота применения ПК возрастает в геометрической прогрессии, рядом исследователей продемонстрировано широкое разнообразие применения этих клеток в терапевтических целях. Сейчас существует реальная возможность использовать стволовые клетки для негемопоетических трансплантаций, т.к. из ПК и плаценты были также выделены негемопоетические стволовые клетки. Эти клетки могут быть выращены и дифференцированы в различные ткани, в том числе в мезенхимальные стволовые клетки, костную, хрящевую ткань и другие линии. Они обладают преимуществом перед другими источниками стволовых клеток, эмбриональными стволовыми клетками и индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками, т.к. их количество не ограничено, их можно использовать для аутогенных и аллогенных трансплантаций, они не нуждаются в интенсивной обработке, а также они не вызывают этических проблем. В ближайшем будущем дальнейшие исследования определяют потенциал клеток пуповинной крови для лечения некоторых заболеваний, в том числе, помимо других возможностей, диабет, артрит, неврологические заболевания и инфаркт миокарда.

В исследовательском институте имени Антони Нолана разрабатываются новые возможности оптимизации использования аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, основанные на прогнозировании и модуляции иммунного ответа для того, чтобы снизить риск РТПХ, выработать противоопухолевый иммунный ответ и обеспечить защитный иммунитет против оппортунистических инфекций.

Не так давно внимание нашей группы было сосредоточено на пуповинной крови, в попытке определить клеточную субпопуляцию, которую можно будет применять для лечения как хорошо определенный продукт, но при этом с минимальным набором процессинговых процедур. Это может дать возможность создать готовый к использованию продукт, который будет апробирован в клинических условиях для применения в регенеративной медицине (используя например, естественные необученные Т-супрессоры после отбора CD25<sup>+</sup>). Очевидно, что этот подход потребует понимания и контроля возможных иммунных реакций, вызванных введением аллогенных клеток, полученных от одного или нескольких доноров, определенному пациенту. В совокупности, знания, полученные при проведении фундаментальных исследований стволовых клеток и иммуномодулирующих клеток, содержащихся в ПК, помогут решению задач по применению клеток ПК в клеточной терапии.

Одной из наиболее сложных задач в клиническом масштабе является переход от лабораторного и опытного к промышленному производству нужного клеточного продукта — это определение гомогенной популяции, способной к предсказуемому *in vivo* ответу. Наконец, важно учитывать, что в трансплантате стволовых клеток, который используется для лечения пациентов после химиотерапии или лучевой терапии, есть другие «посторонние» клетки, которые играют важную роль в исходе клеточной трансплантации. Эти клетки, главным образом Т-клетки памяти, могут индуцировать РТПХ, РТПЛ или РТПИ.

В последние годы мы заняты характеристикой свойств каждого из этих типов клеток и, в дополнение, мы используем «обученные» Т-клетки вызывать реакции либо РТПЛ, либо РТПИ, либо модулировать реакцию РТПХ и переносимость.

A. Madrigal

#### **Immunological Properties of Cord Blood**

*The Anthony Nolan Research Institute, Royal Free Hospital; Department of Haematology, Royal Free and University College School of Medicine, London, UK*

*The Anthony Nolan Research Institute, Royal Free Hospital, Pond Street, Hampstead, London, NW3 2QG.*

*Tel: 00-44-20-7284-8315*

*Fax: 00-44-20-7284-8331*

*Email: a.madrigal@medsch.ucl.ac.uk*

Stem cells are defined biologically by their functional properties; such as self-renewal capacity and multilineage differentiation. These cells are tissue generators through coordinated and programmed divisions, but are also implicated in the maintenance of this tissue during life. Originally, stem cells contributed to create tissues and organs with precise locations, morphologies and integrated functions, from a fertilised ovocyte. Then, once formed, tissue maintenance depends on the existence of tissue-specific stem cells that generate new functional cells in normal conditions (replacement), but also after specific stress as increasing activity requirements or injuries (rebuilding). These cells are thought to reside in these organs where they are tightly controlled within specific niches, after appropriate signals that cells are mobilised and attracted to places where cell regeneration is required.

Stem cells were first demonstrated in the model of bone marrow transplantation. So, haematopoietic stem cells were generically identified as stem cells for years. In adult voluntary related or unrelated donors, stem cells are obtained from harvesting bone marrow or by the use of G-CSF to mobilise them by PBMSC. Recently, another important source of stem cells are those obtained from cord blood (CB). There is the possibility that there are some subtle differences between these stem cells in terms of its potential for differentiation and engraftment.

Transplantation of cellular concentrates from bone marrow to a myelobladed individual, allows the generation of a long-term lympho-haematopoietic chimera that maintains production of all haematopoietic lineages throughout life. Using DNA markers, it is possible to demonstrate that this repopulation comes from a very narrow group of cells. For instance, CD34 or CD133 selection has demonstrated in humans an ability to repopulate the bone marrow, both in a short and long-term period. Moreover, in animal models, some groups have demonstrated that a single cell is able to regenerate multiple tissues in one particular individual, so this is used as a surrogate in the presence of stem cells. Recently, other types of stem cells have been recognised in nearly all tissues. In the community, there is a scientific debate on stem cell definition and classification, according to their plasticity across embryonic layer boundaries. Nevertheless, several authors using either stem cells or progenitor cells have shown potential therapeutic benefits both in animals and humans.

However, stem cells for therapy require a different analysis. Stem cells are not judged by their «stem-

cellness», rather than by how they can contribute to reverting degenerative processes or, even, trigger regenerative responses in the context of injuries. Therefore, they have been implicated in two different capacities. First, they can differentiate into distinctive end-stage cell types. Hence, these cells can be used for reforming these tissues through the principles and practices of tissue engineering. Second, stem cells themselves secrete a broad spectrum of bioactive macromolecules that are both immunoregulatory and serve to structure regenerative microenvironments in fields of tissue injury.

Therapeutic manipulation of the immune system may overcome morbidity and mortality caused by a deficient capacity for adaptive immunity and by malignancies not eradicable by other therapeutic interventions, surgery radiotherapy or chemotherapy. Interventions to modulate immune reactivity may be valuable for treatment of autoimmune and inflammatory chronic disease and manoeuvres to provide adaptive immunity, active or adoptive are of utmost importance to reduce the heavy burden of morbidity and mortality of patients and recipients. Different modalities of organs, tissues and cell transplants, and the efficiency of haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) to treat haematological malignancies may be enhanced by interventions directed to provide adoptive or to generate endogenous anti-tumour immune reactivity.

Thus, if cell therapy is considered as a use of cells as therapeutic agents, two large areas can be differentiated, one involving regeneration, substitution or replacement of functional cells (stem cell therapy) and the other, related to the use of immune cells to exploit their specific types of responses in the effector and suppressor directions (cellular immunotherapy). In the context of allogeneic HSCT this could lead to graft versus host disease (GvHD), graft versus leukaemia (GvL) and graft versus infection. Another potential application outside these areas is regenerative medicine in the context of degenerative diseases and/or autoimmunity.

In the UK, volunteer donors are sought for about 1,400 patients per annum who lack a tissue compatible sibling, but only about 500 are actually transplanted; 60% of them using UK donors (there are currently around 750,000 registered donors in the UK, 7% of the worldwide inventory). Two main issues need to be addressed in order to offer a more equitable therapy: access for the 20% of patients without a donor (mainly patients of non-North Western European descent), and the timely provision of stem cells for 30% of patients requiring urgent transplants. We estimate that 1 out of 4 patients requesting an unrelated allogeneic transplant to treat these conditions will benefit from a national cord blood bank initiative (around 200–300 patients per year in the UK alone). These estimates accord with the current numbers of CB transplants performed in countries such as USA, France, Spain and Australia where the number of cord blood transplant ranges from 3–5 per million inhabitants per year.

Cord blood offers substantial logistical and clinical advantages over other sources of stem cells such as (a) off-the-shelf access to the therapy with significantly faster availability; (b) higher frequency of less representative tissue types compared to bone marrow registries, since it is easier to target ethnic minorities; (c) lower risk of transmitting infections

by latent viruses or inducing malignancies; (d) lack of donor attrition; (e) lack of risk to the donor; and finally, (f) an unlimited source of material for stem cell research.

Large CB bank initiatives offer a unique opportunity to make available for research a high number of ethically collected, clinical grade CB units that are not suitable for clinical use when evaluated at the processing centre. Indeed, CB usage is increasing exponentially and a number of researchers have shown a wide range of therapeutic applications for these cells. There is now a real opportunity to use CB for non-haematopoietic transplants as well since non-haematopoietic stem cells have been isolated from CB and placenta. These cells can be grown and differentiated in various tissues including mesenchymal stem cells, bone, cartilage and other lineages. They have an advantage over other sources of stem cells, embryonic stem cells or induced pluripotent stem cells because the supply is unlimited, they can be used in autologous or allogeneic situations, they need minimal manipulation, and they raise no ethical concerns. Future studies will in the near future test the potential of CB cells for the treatment of several diseases including, among other possibilities, diabetes, arthritis, burns, neurological disorders and myocardial infarction.

At the Anthony Nolan Research Institute, new strategies are being developed for optimising the use of allogeneic HSCT, based on the prediction and modulation of the immune response in order to reduce the risk of GvHD, generate selective anti-tumour immune responses and to provide protective immunity against opportunistic infections.

Recently, our group has focussed its attention on CB, trying to define cell subpopulations useful for therapy in the context of a well-defined product, but also with minimally manipulated procedures. This could make possible the generation of «off-the-shelf» products to be tested clinically for application in regenerative medicine (using CBSC after CD133<sup>+</sup> selection) and tolerance (using natural native T regulatory cells after CD25<sup>+</sup> selection). Obviously, this approach will require understanding and control of the potential immunoreactions produced by infusing allogeneic cells from one or multiple donors to a particular patient. Altogether, knowledge acquired by basic research studies on stem cells and immunomodulatory cells contained in CB, would help with the translational challenges before application of CB cells in adoptive cell therapy.

One of the most difficult steps in clinical 'scaling-up', is the definition of a homogeneous population capable of producing predictable in-vivo responses. This results in a particular need in many applications to produce cells after a very comprehensive ex-vivo manipulation, or the use of heterogeneous sources of cells which makes a product containing different proportions of targeted cells them or even having different functional stages.

Finally, it is important to consider that in the stem cell graft that is used to rescue patients after chemotherapy or radiotherapy, there are other «contaminant cells» that play important roles in the outcome of stem cell transplantation. These cells, mainly memory T cells, can be responsible for mediating GvHD, GvI or GvL. We have been working during the last years to characterise the properties of each one

of these cells and, in addition, through international collaborative projects such as AlloStem (AlloStem.org), we are using «educated» T-cells to mediate either GvL and GvI, or to modulate GvHD and tolerance.

Data will be presented on the identification and isolation CB stem cells, regulatory T cells (Tregs) and NK cells with the objectives of targeting GvL, GvI, and immunomodulation in HSCT.

А. Мадригал

**Подбор неродственных доноров костного мозга.**

**Опыт, полученный**

**в научно-исследовательском институте**

**Антони Нолана**

*Институт Энтони Нолана*

*Лондон, Великобритания*

Научно-исследовательский институт им. Антони Нолана был основан с целью спасения жизни людей. С начала работы в 1974 г. свыше 8000 людей получили шанс жизни. В прошлом, наиболее успешном для нас году, нам удалось подобрать совместимых доноров для почти 1000 пациентов, но все еще мы можем помочь только 50% пациентов в Соединенном Королевстве, нуждающихся в пересадке стволовых клеток

История института им. Антони Нолана началась с помощи людям, страдающим лейкозом и подобными состояниями, используя пересадку взрослого костного мозга. В 2008 г. мы открыли Центр клеточной терапии им. А. Нолана с целью обеспечения хранения и обработки образцов пуповинной крови, что позволит нам улучшить помощь больным лейкозом.

Подбор добровольных неродственных доноров для обеспечения трансплантации гемопоэтических стволовых клеток исторически был основан на подборе пар донор-реципиент, совместимых на HLA-A, B и DRB1 локусов. Не так давно мы начали применять методики гистотипирования с высоким разрешением для выявления ранее «скрытой» несовместимости на пять классических HLA локусов, HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1. Ретроспективный анализ показывает улучшение выживаемости и снижение частоты развития реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) среди пациентов, совместимых на 10 из 10 аллелей пяти HLA локусов по сравнению с пациентами, у которых имела место некоторая гистонесовместимость. Остается нерешенным вопрос об относительной важности гистонесовместимости для определенных локусов и важности совместимости для шестого полиморфного HLA локуса, DPB1.

Нами проведена корреляция клинического исхода с уровнем совместимости по HLA антигенам у 423 пациентов, которым был пересажен материал, полученный от добровольных неродственных доноров в Соединенном Королевстве. HLA-совместимость определялась на уровне аллелей (т.е. высокого разрешения) с применением конформационного анализа на HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 и -DPB1 локусах.

Из 423 пар донор-реципиент 282 (67%) были совместимы по пяти классическим HLA-локусам (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1; т.е. 10 из 10 совместимых аллелей), а 141 пар были несовместимы: 103 — по одному аллелю, и 38 — на несколько аллелей.

Вероятность 3-годовой общей выживаемости (ОВ) составила 45% (средний показатель выживаемости — 593 дней; вероятность шестилетней ОВ составил 40%). Средний период наблюдения — 1013 дней (89–2697 дней). У реципиентов с совместимыми HLA локусами наблюдалась значительно лучшая ОВ по сравнению с несовместимыми парами донор-реципиент (47% против 40%,  $p = 0,040$ ). Этот результат мог быть улучшен на основе числа аллелей, которые были несовместимы. У пациентов с одной HLA-несовместимостью ОВ составила 43%, по сравнению с 30% среди реципиентов с несовместимостью по нескольким показателям; однако, не было статистически значимых различий среди полностью совместимых пар и пар с одной несовместимостью.

Совместимость по локусам класса-I предопределяла значительно лучшую ОВ. При дальнейшем распределении пациентов по числу несоответствий, ОВ составила 47% для совместимых с донором пациентов, 44% — для тех, у которых был донор с одним несоответствием и 26% — для доноров с двумя несоответствиями ( $p = 0,036$ ). Совместимость по классу II не была связана со значительными различиями по ОВ, хотя число несоответствий было очень небольшим. Однако при несовместимости по антигенам класса II демонстрировалась такая же общая выживаемость, что и при несовместимости по антигенам класса I (40%), которая была в некоторой степени лучше, чем для пар, несовместимых по антигенам как класса I, так и класса II (36%).

Анализируя влияние совместимости для индивидуальных несоответствий по HLA на исход трансплантации, мы предположили, что важно рассматривать влияние индивидуального локуса на полностью HLA-совместимый материал по другим показателям для того, чтобы исключить смешиваемые эффекты. Мы обнаружили, что несовместимость по HLA-A не оказывала отрицательного воздействия во всех проанализированных случаях трансплантации. HLA-B несовместимость довольно отрицательно сказывалась на выживаемости (логарифмический ранг  $p = 0,0005$ ). HLA-C несовместимость не была значима для ОВ, однако, она была связана со значительным повышением длительной реакции ТПХ ( $p = 0,002$ ). Для статистически значимого анализа число несоответствий в данном исследовании по HLA-DRB1 и -DQB1 было недостаточным.

Нами было проанализировано воздействие, которое оказывало состояние совместимости по DPB1 на исход лечения в той же группе пациентов. Среди 282 HLA-совместимых пар, 29% были совместимы по DPB1, и 28% были совместимы по DPB1 среди 141 HLA-несовместимых пар. Сначала мы проанализировали влияние совместимости по DPB1 только у пар, где имела место совместимость по пяти HLA локусам ( $N = 282$ ). 3-годовая вероятность рецидива составила 61% (средняя выживаемость — 461 дней). Имело место довольно значительное повышение частоты рецидивов заболевания среди DPB1-совместимых пар (74%) по сравнению с парами с одним или двумя DPB1 несоответствиями (56%) (логарифмический ранг  $p = 0,001$ ). Этот эффект не отличался по мере увеличения числа DPB1 несоответствий (т.е. одно или два несоответствия оказывали равно защитное воздействие, 56% против 55% соответственно, логарифмический ранг  $p = 0,959$ ). Эта находка сохранялась и в многофакторном

анализе, включая факторы, которые, как известно, связаны с рецидивом заболевания. Далее мы проанализировали эффект DPB1 совместимости, который она оказывает на рецидив заболевания в группе, включавшей всех пациентов ( $N = 423$ ). В этой группе имел место значительный возрастающий риск рецидива при DPB1 совместимости (логарифмический ранг  $p = 0,0001$ ). Хотя не было значительных различий по общей выживаемости в зависимости от DPB1 совместимости во всей группе, при остром лимфолейкозе среди пар, совместимых по DPB1, наблюдалась значительно более низкая общая выживаемость (логарифмический ранг  $p = 0,025$ ). Таким образом, совместимость по DPB1 связана со значительно возрастающим риском рецидива заболевания, независимо от статуса совместимости по другим HLA молекулам.

T-супрессоры (Treg) представляют собой естественную регуляторную популяцию  $CD4^+CD25^{hi}$  T-клеток, которые экспрессируют транскрипционный ген-репрессор FoxP3 и вырабатывают противовоспалительные цитокины, такие как трансформирующий фактор роста (TGF $\beta$ ), в ответ на активацию и являются обязательными для поддержания толерантности. Tregs играют некоторую роль в регуляции практически всех иммунных ответов. Начальные наблюдения предполагали, что наличие  $CD4^+CD25^{hi}$  T-клеток может уменьшить противоопухолевые реакции. Однако их потенциальная роль в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток остается противоречивой.

Мы подсчитали число  $CD4^+CD25^{hi}$  клеток и уровень экспрессии FoxP3 и TGF $\beta$  мРНК в образцах, не подвергнутых кондиционированию, полученных от пациентов, которым проводится трансплантация HLA-идентичных (10 из 10 соответствий по аллелям) гемопоэтических стволовых клеток, полученных от неродственного донора. T-клетки удалялись из аллогraftа с помощью алектузумаба (*alemtuzumab*), который, как считают, сохраняет Tregs. Экспрессия  $CD4^+CD25^{hi}$  коррелировала как с уровнем FoxP3 в мРНК ( $r = 0,484$ ;  $p = 0,0001$ ), так и выработкой TGF $\beta$  ( $r = 0,911$ ;  $p < 0,0001$ ), как ранее было описано для Tregs. Затем мы проанализировали влияние уровней Tregs на исход лечения 89 взрослых пациентов. Мы обнаружили, что высокое процентное содержание Tregs до трансплантации оказывает благоприятное воздействие на активацию приживления ( $p = 0,027$ ), как ранее сообщалось для высоких уровней содержания Treg у донора. Нами также было обнаружено, что большее содержание  $CD4^+CD25^{hi}$  в T-клетках находится в корреляционной связи с более низкой выживаемостью ( $p = 0,002$ ). Такое высокое содержание также было связано с более высокой частотой рецидива ( $p = 0,001$ ) и со снижением выживаемости без признаков заболевания ( $p = 0,010$ ). По частоте острой или продолжительной РТПХ эффекта не наблюдалось.

По данным многофакторного анализа высокое содержание Tregs до трансплантации приводило к плохим результатам ОВ (относительный риск (ОР), 2,74;  $p = 0,01$ ), тенденции к снижению выживаемости без признаков заболевания (ОР, 2,05;  $p = 0,060$ ), и к возрастанию рецидивов (ОР, 3,36;  $p = 0,006$ ). Это наводит на мысль о том, что  $CD4^+CD25^{hi}$  резидуальные T-супрессоры пациента могут подавлять реакции «трансплантат против опухоли», сокращая

общую выживаемость путем уменьшения уровней рецидива.

NOD2/CARD15 ген кодирует белок NOD2, который вовлечен в реализацию механизмов естественного иммунитета. По результатам некоторых исследований однонуклеотидный полиморфизм NOD2/CARD15 гена связан с воспалительными заболеваниями, такими как болезнь Крона, синдром Блау и злокачественными новообразованиями. В частности, однонуклеотидный полиморфизм NOD2/CARD15 ассоциирован с увеличением смертности и острой РТПХ.

Было выполнено генотипирование на NOD2/CARD15 196 пациентов с диагнозом острый лейкоз и их добровольных неродственных доноров. Трансплантации выполняли в период с 1996 по 2003 год в 25 центрах Соединенного Королевства. Были диагностированы острый лимфобластный лейкоз (50%) и острый миелолейкоз (50%). 64% пар были HLA-совместимы на 10 из 10 аллелей (HLA-A, -B, -C, -DRB1, и -DQB1), 10% — HLA-совместимы на 12 из 12 аллелей (включая HLA-DPB1). В 78% трансплантаций был применен режим миелоаблативного кондиционирования. Элиминацию T-клеток включили в 83% протоколов кондиционирования, чаще всего для этого использовали алектузумаб (*alemtuzumab*). В 81% случаев пересаживали костный мозг, в 19% трансплантаций вводили стволовые клетки крови. Главным образом использовали два вида посттрансплантационной иммуносупрессии — циклоспорин А и метотрексат (*methotrexate*) (47%) или только циклоспорин А (31%).

Однонуклеотидный полиморфизм гена NOD2/CARD15 в паре реципиент гемопоэтических стволовых клеток и добровольный неродственный донор привел к значительному увеличению частоты рецидива заболевания. Предположительная 2-годичная частота рецидива заболевания составила 54% среди пар с однонуклеотидным полиморфизмом гена NOD2/CARD15 по сравнению с 32% среди пар с диким типом ( $P = 0,001$ ). Это привело к значительному повышению смертности. 3-годичная общая выживаемость в этой группе составила 22% и 44% для пар с и без однонуклеотидного полиморфизма гена NOD2/CARD15 соответственно ( $P = 0,0087$ ). Такие же данные были получены при многофакторном анализе. Обнаружено, что генотип NOD2/CARD15 является наиболее значительным фактором для неблагоприятного исхода кроме случаев трансплантации во время рецидива заболевания.

Мы пришли к заключению, что при остром лейкозе наличие однонуклеотидного полиморфизма гена NOD2/CARD15 в генотипе пар реципиент ГСК и неродственный донор приводит к значительному увеличению частоты рецидива заболевания и, следовательно, к смерти. Эти данные показывают важную роль генотипирования на NOD2/CARD15 в трансплантации и предполагает возможный эффект белка NOD2 для аллореактивности и контроля за новообразованиями. Генотипирование донора и реципиента до проведения трансплантации может предоставить ценную информацию для планирования и проведения режимов пред-трансплантационного кондиционирования, для прогнозирования исхода лечения.

В конечном итоге алгоритм подбора лучшего донора должен включать всю доступную генетическую

информацию, а также учет специфических характеристик донора. Кроме того, подбор донора может отличаться в зависимости от заболевания индивидуального пациента, его стадии и протокола трансплантации. Число трансплантаций, необходимых для анализа, чтобы получить информацию по всем этим вопросам, огромно, при этом нельзя недооценивать важность международного сотрудничества и совместного использования данных.

**Краткое изложение стратегии, применяемой для подбора доноров**

1. Данные, полученные в ходе новых крупных исследований подтверждают, что лучшим выбором является донор совместимый по 8 из 8 аллелей. По результатам большинства исследований показано, что показатель HLA-DQB1 не нужно принимать во внимание при наличии удачно подобранного донора, однако есть данные, что при DQB1 несовместимости могут иметь место аддитивные эффекты, если имеется несовместимость по другому локусу.

2. В некоторых исследованиях использование 7/8 (9/10) совместимых доноров ассоциируют с исходом лечения, сходным с таковым, когда донор совместим на 8/8 (10/10). Клинические ситуации, когда несовместимость по одному показателю может быть допустима, включают элиминацию Т-клеток, наличие NMA/RIC или поздняя стадия заболевания.

3. В определенных обстоятельствах (и особенно, если используется материал более чем от одного донора) должно быть выполнено типирование на HLA-DPB1 локусу.

4. Вопрос о том, как проводить отбор среди HLA-несовместимых доноров (т.е. какие из несовместимых локусов предпочтительно выбирать) остается открытым. Разные исследования сообщают о большей значимости несовместимости по разным локусам. Одним объяснением может быть различное число несовместимостей на индивидуальный локус в разных исследованиях. Другим может быть то, что определенные несовместимости допустимы (и что они больше преобладают в определенных группах). Выбор между HLA-A, -B, -C или DRB1 несовместимым донором должен основываться на местных исследованиях и опыте.

5. Несовместимость по двум и более HLA-A, -B, -C, -DRB1 аллелям обычно связана с худшей выживаемостью (хотя может быть допустима при запущенном заболевании).

6. Убедительных доказательств того, что следует предпочитать несовместимость по аллелям по отношению к антигенной несовместимости при отборе донора не существует (за исключением, возможно, для HLA-C).

A. Madrigal

**An unrelated bone marrow donor panel – the Anthony Nolan Experience**

*The Anthony Nolan Research Institute, Royal Free Hospital; Department of Haematology, Royal Free and University College School of Medicine London, UK*

*The Anthony Nolan Research Institute, Royal Free Hospital, Pond Street, Hampstead, London, NW3 2QG.  
Tel: 00-44-20-7284-8315, Fax: 00-44-20-7284-8331  
Email: a.madrigal@medsch.ucl.ac.uk*

Anthony Nolan was set up on a simple and powerful premise, *to save lives*. This work has continued since 1974 with over 8000 people being given the chance of life. Last year, our most successful ever, we were able to find matching donors to provide the chance of life for nearly 1000 people, but still our work only helps 50% of the people in need of a stem cell transplant in the UK.

Anthony Nolan's history has been built on helping patients suffering from leukaemia and similar conditions, through adult bone marrow transplants. In 2008 we were able to realise our goal of improving the lives of leukaemia sufferers by opening the Anthony Nolan Cell Therapy Centre for the storage and processing of cord blood units.

Selection of volunteer unrelated donors (VUD) for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) historically was based on matching donor-recipient pairs at HLA-A, B and DRB1 loci. More recently, the application of high resolution tissue typing techniques, to uncover previously 'hidden' mismatches, for the five Classical HLA loci, HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 has been introduced.<sup>1</sup> Retrospective analyses show an improvement in survival and reduction in graft versus host disease (GvHD) in patients matched for 10 of 10 alleles at 5 HLA loci compared to those patients with mismatches.<sup>2-5</sup> The relative importance of mismatching for particular loci and the significance of matching for the sixth polymorphic HLA locus, DPB1, remain unresolved.

We have correlated the clinical outcome with the level of HLA matching in 423 patients who received a transplant from a VUD in the United Kingdom (Table 1). HLA matching was performed at the allelic level (i.e., high-resolution) using reference strand mediated conformation analysis (RSCA) at HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 and -DPB1.

Of the 423 donor-recipient pairs, 282 (67%) were matched for the five «classic» HLA loci (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1; i.e., 10 of 10 alleles matched) and 141 were mismatched; 103 at a single allele and 38 at multiple alleles.

The 3-year probability of overall survival (OS) was 45% (median survival of 593 days; six year OS probability was 40%). The mean follow-up was 1013 days (range 89-2697). Those matched for their HLA loci had a significantly better OS than the mismatched pairs (47% versus 40%,  $p = 0,040$ ). This result could be refined based on the number of alleles that were mismatched. In patients with a single HLA mismatch, the OS was 43%, compared to 30% in those with multiple mismatches; however, there was no statistically significant difference between matched pairs or those with one mismatch.

A match at Class I loci predicted for significantly better OS. When patients were further stratified

for the number of mismatches, the OS was 47% for matched donors, 44% for donors with one mismatch and 26% for donors with two mismatches ( $p = 0,036$ ). Class II matching was not associated with a significant difference in OS, though the number of mismatches was very small. However, Class II mismatched pairs had the same OS as Class I mismatched pairs (40%), which was somewhat better than pairs mismatched for both Class I and Class II (36%).

When analysing the effects of matching for individual HLA mismatches on transplant outcome, we felt that it was important to consider the effect of an individual locus on an otherwise completely HLA matched background in order to remove confounding effects. We found HLA-A mismatches to be tolerated with regards to all transplant outcomes analysed. HLA-B mismatches were associated with a highly significant survival disadvantage (log rank,  $p = 0,0005$ ). HLA-C mismatches were tolerated with regards to OS, however they were associated with a significant increase in chronic GvHD ( $p = 0,002$ ). The number of mismatches in this study for HLA-DRB1 and -DQB1 was too small to allow statistical analysis.

We analysed the impact of DPB1 matching status on outcome in the same cohort of patients. In the 282 HLA matched pairs, 29% were DPB1 matched, and in the 141 HLA mismatched pairs, 28% were matched for DPB1. We first analysed the impact of DPB1 matching in only those pairs who were matched for five HLA loci ( $N = 282$ ). The 3-year probability of relapse was 61% (median survival was 461 days). There was a highly significantly increase in disease relapse in DPB1 matched pairs (74%) as compared to those pairs with either one or two DPB1 mismatches (56%) (log rank,  $p = 0,001$ ). There was no difference in this effect as the number of DPB1 incompatibilities increased (i.e., one or two incompatibilities were equally protective, 56% versus 55% respectively, log rank  $p = 0,959$ ). This finding persisted in a multivariate analysis including factors known to be associated with disease relapse. We next analysed the impact of DPB1 matching on disease relapse in the group overall ( $N = 423$ ). There was a significantly increased risk of relapse in this cohort if DPB1 was matched (log rank;  $p = 0,0001$ ). Although there was no significant difference in the overall survival dependant on DPB1 matching in the group overall, in acute lymphocytic leukaemia DPB1 matched pairs had a significantly worse overall survival (log rank;  $p = 0,025$ ). Thus, a match for DPB1 is associated with a significantly increased risk of disease relapse, irrespective of the matching status for the other HLA molecules.

Regulatory T cells (Treg) are a naturally occurring regulatory population of  $CD4^+CD25^{hi}$  T-cells, which express the transcription repressor FoxP3 and produce anti-inflammatory cytokines such as transforming growth factor (TGF)  $\beta$  on activation and are essential to maintain tolerance. Tregs play a role in the regulation of virtually all immune responses. Initial observations suggested that the presence of  $CD4^+CD25^{hi}$  T cells could diminish anti-tumour responses. However, their potential role in HSCT remains controversial.

We measured  $CD4^+CD25^{hi}$  levels and expression of mRNA FoxP3 and TGF $\beta$  in pre-conditioning samples from patients undergoing HLA-identical (10 of 10 allelic match) unrelated donor (UD)-HSCT. The allografts were T-cell depleted with alemtuzumab, which has

been described to spare Tregs.  $CD4^+CD25^{hi}$ -expression correlated with both FoxP3 mRNA-levels ( $r = 0,484$ ;  $p = 0,0001$ ) and TGF $\beta$  production ( $r = 0,911$ ;  $p < 0,0001$ ), as previously described for Tregs. We then analysed the effect of levels of Tregs on the outcome of 89 adult patients. We found that high percentage of pre-transplant Tregs have a beneficial effect promoting engraftment ( $p = 0,027$ ), as previously reported for high levels of donor Treg. We also found that higher proportion of  $CD4^+CD25^{hi}$  T-cells correlated with worse survival ( $p = 0,002$ ). This higher proportion also correlated with higher incidence of relapse ( $p = 0,001$ ) and with decrease in disease free survival ( $p = 0,010$ ). No effect was seen in the incidence of acute or chronic GvHD.

In a multivariate analysis, a high pre-transplant levels of Tregs resulted in worse OS (Relative Risk (RR), 2,74;  $p = 0,01$ ), a trend in reduced DFS (RR, 2,05;  $p = 0,060$ ), and an increase in disease relapse (RR, 3,36;  $p = 0,006$ ). This suggests that residual patient  $CD4^+CD25^{hi}$  regulatory T cells may have an impact suppressing graft-versus-tumour responses, decreasing the overall survival by increasing the rates of relapse.

The nucleotide-binding oligomerisation domain 2/ caspase recruitment domain 15 (NOD2/CARD15) gene encodes the NOD2 protein, which is critically involved in innate immunity. Several studies have associated single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the NOD2/CARD15 gene with inflammatory disorders such as Crohn's Disease, Blau Syndrome and malignant diseases. In particular, NOD2/CARD15 SNPs have been associated with increases in transplant related mortality and acute graft versus host disease.

NOD2/CARD15 genotyping was performed on 196 patients diagnosed with acute leukaemia (AL) and their VUD. Transplants occurred between 1996 and 2003 at 25 UK centres. Diagnoses were acute lymphoblastic leukaemia (50%) and acute myeloid leukaemia (50%). Sixty-four percent of pairs were a 10 of 10, HLA allele match (HLA-A, -B, -C, -DRB1, and -DQB1), while 10% were a 12 of 12, HLA match (including HLA-DPB1). Myeloablative conditioning regimens were used in 78% of transplants. T-cell depletion was included in 83% of conditioning protocols, with *in vivo* alemtuzumab being the preferred method. Marrow was used as a graft in 81% of transplants, the remaining 19% used blood stem cells. Two forms of post-transplant immunosuppression predominated, cyclosporine A and methotrexate (47%) and Cyclosporine A alone (31%).

NOD2/CARD15 SNPs within an VUD-HSCT pair resulted in a significant increase in disease relapse. The estimated two-year incidence of disease relapse was 54% in pairs with NOD2/CARD15 SNPs as compared to 32% in wild-type pairs ( $P = 0,001$ ). This resulted in a significant increase in mortality. The estimated 3-year overall survival for the cohort was 22% and 44% for pairs with and without NOD2/CARD15 SNPs respectively ( $P = 0,0087$ ). These findings persisted in multivariate analysis. NOD2/CARD15 genotype was found to be the most significant factor for an adverse outcome other than being transplanted in disease relapse.

We conclude that in acute leukaemia the presence of NOD2/CARD15 SNPs in the genotype of VUD-HSCT pairs results in significant increases in disease

relapse and consequently in death. These data show an important role for NOD2/CARD15 genotyping in transplantation and suggest a possible effect of the NOD2 protein in alloreactivity and tumour surveillance. Genotyping recipients and donors prior to transplant may present valuable information for planning and management of pre-transplant conditioning regimens, and for prognosis of the outcome.

Ultimately an algorithm for selecting the best donor should include all available genetic information, as well as taking into account specific donor characteristics. In addition, the selection may differ depending on the individual patient's disease, stage and transplant protocol. It is unlikely that the 'best' donor will be the same for all patients. The number of transplants required for analysis in order to obtain evidence for all of these questions is enormous and the importance of international collaborations and data-sharing cannot be overstated.

### **Summary of donor selection strategy (HLA matching)**

Recent available data from large studies suggest that an 8/8 matched donor is the best choice. Most studies now agree that HLA-DQB1 does not need to be considered in a well-matched donor, but there is evidence that there may be additive effects of a DQB1 mismatch, if a mismatch at another locus is present.

In some studies the use of a 7/8 (9/10) matched donor has been associated with an outcome equally as good as an 8/8 (10/10) matched donor. The clinical situations where a single mismatch may be tolerated include: in the T-cell depleted setting, using NMA/RIC or in advanced stage disease.

In certain circumstances (and particularly if more than one donor is available) typing for the HLA-DPB1 locus should be done, and the degree and type of matching considered in donor selection.

How to select between HLA mismatched donors (i.e., which mismatched locus should be chosen in preference) remains incompletely answered. Different studies report greater significance related to different locus mismatches. One explanation may be differing numbers of mismatches at an individual locus in different studies. Another may be that certain mismatches are permissive (and that these are more prevalent in particular populations). Advice in choosing between an HLA-A, -B, -C or DRB1 mismatched donor should be based on local studies and experience.

Two or more mismatches for HLA-A, -B, -C, -DRB1 alleles are usually associated with a worse survival (although may be tolerated in advanced disease).

There is no strong evidence that an allelic mismatch should be selected in preference to an antigenic mismatch (except, possibly, for HLA-C).

В.Н. Смирнов<sup>1</sup>, Ю.А. Романов<sup>1</sup>, М.А. Пальцев<sup>2</sup>, Ю.И. Поляков<sup>3</sup>, С.В. Медведев<sup>3</sup>, В.А. Хачатрян<sup>4</sup>, К.Э. Лебедев<sup>4</sup>, А.Б. Смулевич<sup>5</sup>, Я.В. Морозова<sup>5</sup>, Ж.Б. Семенова<sup>6</sup>, Л.М. Рошаль<sup>6</sup>, С.Д. Прошкин<sup>1</sup>, С.М. Радаев<sup>1</sup>, Т.Н. Дугина<sup>1</sup>, С.С. Ряскина<sup>1</sup>, А.Н. Даревская<sup>1</sup>

### **Терапевтический потенциал клеток пуповинной крови при неврологических и психических заболеваниях**

<sup>1</sup> Банк стволовых клеток «КриоЦентр», Москва

<sup>2</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский Институт», Москва

<sup>3</sup> Институт мозга человека РАН, Санкт-Петербург

<sup>3</sup> Российский нейрохирургический институт им. А.Л. Поленова, Санкт-Петербург

<sup>4</sup> Научный центр психического здоровья РАМН, Москва

<sup>5</sup> Главный военный клинический госпиталь им. Н.Н. Бурденко, Москва

<sup>6</sup> НИИ неотложной детской хирургии и травматологии, Москва

В настоящее время не существует специфической терапии, способствующей восстановлению поврежденных тканей головного мозга или улучшению функционирования при прогрессировании нейродегенерации. Использование клеточных технологий открывает новые перспективы в регенерации нервной ткани. Способность клеток пуповинной крови снижать неврологический дефицит была подтверждена в целом ряде экспериментальных исследований, что позволяет предположить эффективность этого подхода и в клинических условиях.

Основной целью ограниченных клинических исследований, организованных Банком стволовых клеток «КриоЦентр» и выполненных на базе ведущих специализированных клиник Москвы и Санкт-Петербурга, была оценка безопасности и эффективности внутривенной инфузии ядросодержащих клеток пуповинной крови у пациентов с психоневрологическим дефицитом, возникшим в результате травм головного мозга, болезни Паркинсона, детского церебрального паралича или эндогенного процесса (шизофрении в стадии ремиссии).

Исследования были одобрены локальными этическими комитетами, межвузовским комитетом по этике, экспертным советом по новым технологиям МЗ РФ. После информированного согласия пациентам было проведено 1–4 трансфузии отмытых от криопротектора аллогенных ABO/Rh-идентичных клеток пуповинной крови в дозе около 250 млн жизнеспособных клеток на введение (повторные введения проводились с интервалом в 2 нед.).

Дальнейшее наблюдение за пациентами на протяжении 1–3–6–12 мес. показало, что введение клеток пуповинной крови хорошо переносится и не вызывает острых или отдаленных нежелательных реакций. Напротив, у большинства пациентов, как взрослого, так и детского возраста наблюдалось значительное снижение психоневрологического дефицита и улучшение когнитивных функций. Так, у пациентов с травматическими поражениями головного мозга (посттравматической энцефалопатией) отмечалась стойкая тенденция к снижению проявлений астенического синдрома; существенно повышался уровень инициативы и психической активности. У пациентов с парезами выявлено значительное

улучшение показателей физической активности. У пациентов с афазией отмечено восстановление речи. Позитивная динамика выявлена примерно у половины пациентов детского возраста со спастическими формами гидроцефалии и детского церебрального паралича. У пациентов с болезнью Паркинсона статистически значимое улучшение было отмечено по многим показателям: ригидности, брадикинезии и функциональным возможностям. Стойкое улучшение показателей психической активности (объема повседневной активности, памяти, обучаемости, способности к концентрации внимания и т.д.), вплоть до достижения возрастной нормы, отмечено у больных шизофренией.

Таким образом, использование внутривенной трансфузии аллогенных ABO/Rh-идентичных клеток пуповинной крови можно считать безопасной и эффективной процедурой при перечисленных психоневрологических состояниях. Эффекты клеток пуповинной крови могут быть связаны с нейропротекторным воздействием и трофической поддержкой тканей головного мозга, определяющими выявленный стойкий положительный клинический эффект. Дальнейшие исследования могут быть направлены на уточнение дозировок и кратности введения клеток пуповинной крови при этих и других заболеваниях и патологических состояниях.

V.N. Smirnov<sup>1</sup>, Yu.A. Romanov<sup>1</sup>, M.A. Paltsev<sup>2</sup>, Yu.I. Polyakov<sup>3</sup>, S.V. Medvedev<sup>3</sup>, V.A. Khachatryan<sup>4</sup>, K.E. Lebedev<sup>4</sup>, A.B. Smulevich<sup>5</sup>, Ya.V. Morozova<sup>5</sup>, J.B. Semenova<sup>6</sup>, L.M. Roshal<sup>6</sup>, S.D. Proshkin<sup>1</sup>, S.M. Radaev<sup>1</sup>, T.N. Dugina<sup>1</sup>, S.S. Ryaskina<sup>1</sup>, A.N. Darevskaya<sup>1</sup>

#### **Therapeutic potential of cord blood cells in patients with neurological and mental disorders**

<sup>1</sup> Stem Cell Bank «CryoCenter, Ltd.», Moscow

<sup>2</sup> National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow

<sup>3</sup> Institute of the Human Brain, Russian Academy of Sciences, St.-Petersburg

<sup>4</sup> Polenov Institute of Neurosurgery, St.-Petersburg

<sup>5</sup> Mental Health Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

<sup>6</sup> Burdenko Main Military Clinical Hospital, Moscow

<sup>6</sup> Clinical and Research Institute of Emergency Children's Surgery and Trauma, Moscow

Most of therapies for neurological disorders are palliative rather than restorative, greatly impacting the quality of life for affected individuals, as well as the medical burden of society. The use of stem cells holds the promise of regenerating affected neurological tissues. Cord blood cells are amenable to neurological applications as evidenced by in vitro studies and pre-clinical animal models of diseases.

The aim of clinical trials (phase I-IIa) organized and sponsored by Stem Cell Bank «CryoCenter, Ltd.» and carried out in a number of clinical centers of Moscow and St.-Petersburg was the investigation of safety and efficacy of intravenous infusion of human cord blood cells (CBC) in patients with neurological and mental disorders including posttraumatic encephalopathy, Parkinson's disease, cerebral palsy, and schizophrenia in remission (5–15 patients in each trial).

All clinical protocols were approved by Institutional Review Boards, Local and Independent Ethics Committees. After informed consents (in case of under age patients consent was given by parents), patients received 1–4 intravenous infusions of allogenic, ABO/Rh-identical, RBC-depleted CBC at the average dose of  $250 \times 10^6$  cells per infusion with 2 weeks intervals (in case of multiple infusions). Standard therapies were preserved in all patients.

Patient's follow-up for 3–6 and 12 months demonstrated that intravenous injections of allogenic, ABO/Rh-identical CBC did not cause any adverse effects in adult as well as in juvenile patients. On the contrary, significant improvement of neurological status and/or cognitive functions was observed. In patients with posttraumatic encephalopathy we registered clear tendency for quick reduction of all asthenic syndrome components. The level of initiative and mental activity considerably elevated. Some patients having paresis showed almost complete disappearance of symptoms. A considerable function restoration was registered in patients having aphasic disorders. Positive dynamics was registered in a half of all junior patients with spastic form of cerebral palsy and congenital hydrocephalus. In patients with Parkinson's disease statistically significant differences were revealed in several symptoms: rigidity, bradykinesia and functional ability. A considerable improvement of several indexes was registered in patients with schizophrenia. Elevation of mental activity, improvement of attention/vigilance (volume, concentration, switching, distribution) and memory (verbal, nonverbal), restoration of learning ability, intensification of executive functions (planning, modeling and mental activity control optimization) were registered.

The results obtained suggest that intravenous infusion of allogenic ABO/Rh-identical RBC-depleted cord blood cells to patients with above-mentioned neurological and mental diseases is safe. In several group of patients a considerable cognitive improvement was registered including restoration of lost brain programs. Observed effects of CBC infusions may be explained by neuroprotective effect and trophic support on brain tissues resulting in positive clinical dynamics. Further studies are needed to precisely define the regimen of infusions and cell dosages.

М. Фернандез

#### **Использование аллогенного материала от взрослого донора для улучшения результатов трансплантации клеток пуповинной крови**

Госпиталь Universitario Puerta de Hierro Мадридский университет, Испания

Основными препятствиями к более широкому использованию клеток пуповинной крови (ПК) в трансплантологии у взрослых пациентов являются позднее и замедленное приживление трансплантата и позднее восстановление Т-зависимого адаптивного иммунитета. Методы, используемые для увеличения скорости и уровня миелоидной реконституции и, таким образом, снижения риска ранней смертности, связанной с длительной посттрансплантационной нейтропенией, включают выращивание клеток ПК ex vivo, двойную трансплантацию ПК, субмиелоаблативный режим кондиционирования, внутрикостное

введение и совместное введение мобилизованных гемопоэтических стволовых клеток, полученных от взрослого донора («двойная трансплантация клеток ПК и мобилизованных гемопоэтических клеток»), стратегия, использованная впервые в нашем центре, значительно менее дорогостоящая и экономически более эффективная, чем стратегии на основе выращивания трансплантатов ПК, содержащих два образца крови *ex vivo* в соответствии с GMP стандартами производства.

Используя модель ксеногенной трансплантации клеток человека SCID/NOD мышам, мы показали, что кроветворные стволовые клетки пуповинной крови обладают конкурентными преимуществами по сравнению с приживлением мобилизованных гемопоэтических стволовых клеток. На основе этого мы провели клиническую оценку стратегии двойной трансплантации, проведенной 55 неотобраным взрослым кандидатам на трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток из-за высокого риска онкогематологических заболеваний, для которых не было HLA-совместимых доноров. В исследовании принимали участие 34 мужчины и 21 женщина, средний возраст составил 34 года (16–60 лет), средний вес – 69 кг (43–95 кг). После проведения режима миелоаблативного кондиционирования им ввели один образец ПК, несовместимый на 0–3 (в среднем 2) HLA-антигена, обеспечивая  $2,3 \times 10^7/\text{кг}$  (1,14–4,30) TNC (thymic nurse cells) клеток и  $0,1 \times 10^6/\text{кг}$  (0,04–2,86) CD34<sup>+</sup> клеток. Затем сразу же было введено  $2,3 \times 10^6/\text{кг}$  (1,05–2,84) мобилизованных гемопоэтических стволовых клеток, полученных от взрослого донора (98% чистота), содержащих  $3,1 \times 10^3/\text{кг}$  (0,5–15,6) CD3<sup>+</sup> клеток. Для 39 пациентов взрослыми донорами были гаплотидентичные родственники, в 16 случаях взрослый донор и реципиент имели разный гаплотип.

Восстановление ANC (Absolute Neutrophil Count – абсолютное число нейтрофилов) до  $>500/\text{uL}$  произошло в течение 9–36 дней (P50 и P75 соответственно, 11 и 14 дни; CMI (maximum cumulative incidence – максимальная кумулятивная частота возникновения) составила 0,96, 95% CI (cumulative incidence – кумулятивная частота возникновения): 0,91–1). Восстановление полученных из ПК ANC до  $>500/\text{uL}$  произошло в течение 13–57 дней (P50 и P95 соответственно, 21 и 57 дни; MCI = 0,94, 95% CI: 0,89–1,00). Полное замещение клетками пуповинной крови произошло в течение 11–186 дней (P50 и P90 соответственно, 37 и 96 дни; MCI = 0,91, 95% CI: 0,84–0,99), после временных периодов замещения клетками двух образцов пуповинной крови и взрослого донора. Восстановление тромбоцитов до  $>20,000/\text{uL}$  и до  $>50,000/\text{uL}$  произошло после в среднем 32 и 46 дней (MCI = 0,8 и 0,71, 95% CI: 0,68–0,90 и 0,58–0,82). Два пациента получили образцы ПК, которые, как оказалось, не содержали после размораживания жизнеспособных клеток-предшественников, еще у одного пациента произошло раннее отторжение пересаженных образцов ПК. У всех трех было раннее приживление мобилизованных гемопоэтических стволовых клеток, полученных от взрослого донора, которое поддерживало нормальный уровень ANC до приживления второго образца ПК с интервалом в 32–63 дней, далее последовало уничтожение клеток взрослого донора.

График выживаемости, полученный по методу Каплана-Мейера, показывает 17% стабильное значение через 15 мес., а кривые выживаемости без признаков заболевания по методу Каплана-Мейера показывают 54% стабильное значение для всех пациентов через один год, 61% и 39% соответственно для пациентов моложе и старше 40 лет. Основными причинами заболеваний и смертности после приживления трансплантата явились оппортунистические инфекции, по-видимому, связанные с поздним восстановлением Т-клеток. У большинства пациентов количество Т-клеток оставалось очень низким более 6 мес., в то время как NK- и В-клетки восстанавливались намного раньше (к 3-му и 6-му мес., соответственно). Циркулирующие ЦМВ-специфические Т-клетки всякий раз наблюдались у пациентов, у которых имела место реактивация ЦМВ. sjTRECS анализы показали, что через 6 мес. после трансплантации у пациентов имелось большое число тимических, недавно переселившихся клеток, сопоставимое с количеством клеток у группы контроля. Выживаемость без признаков заболевания среди пациентов, получавших двойную трансплантацию клеток ПК и мобилизованных гемопоэтических стволовых клеток взрослого донора для лечения острого лейкоза, была сопоставима с таковой в группе реципиентов мобилизованных гемопоэтических стволовых клеток от HLA идентичных сиблингов (52% против 42% через 5 лет).

Наши результаты однозначно показывают, что, создав ранний мост к трансплантату (bridge graft) мобилизованных гемопоэтических стволовых клеток взрослого донора, стратегия «двойного трансплантата» обеспечивает защиту против бактериальных и грибковых инфекций и способность перенести лечение ганцикловиром и другими противомикробными препаратами, обладающими миелосупрессивными побочными эффектами, таким образом, обеспечивая поддержку до более позднего приживления трансплантатов ПК. Данные отчетливо показывают, что эта стратегия делает достижение приживления и полного замещения пуповинными клетками практически возможным у любого пациента при введении образцов с несовместимостью на 0–3 HLA антигена и содержанием клеток значительно ниже пороговых  $2,5 \times 10^7/\text{кг}$  TNC и  $0,17 \times 10^6/\text{кг}$  CD34<sup>+</sup> клеток, которые обычно приводятся как необходимые для приживления высокой степени. Образцы с такими характеристиками не подходят для пациентов с большим весом. Более того, данная стратегия позволяет определить HLA-совместимость по содержанию клеток при отборе пуповинной крови. Она позволяет провести отбор взрослых доноров, KIR-совместимых с образцом ПК, и несовместимых с реципиентом (что может оказаться полезным для предотвращения реакций «трансплантат против хозяина» и «трансплантат против опухоли»), а также использование взрослых доноров в качестве источника других клеточных типов (таких как мезенхимальные стволовые клетки или патоген-специфические цитолитические Т-лимфоциты) для проведения других клеточных иммуно-терапевтических мероприятий. Предварительные данные, полученные нашей группой, кажутся перспективными в этом отношении.

M. N. Fernandez

**Use of adult third party donor cells to improve outcome of single unit cord blood transplants**

*Hospital Universitario Puerta de Hierro  
Universidad Autónoma de Madrid, Spain*

Main roadblocks to wider use of cord blood transplants (CBT) in adults have been late and low rate engraftments and late recovery of T cell dependant adaptive immunity. Approaches used to increase speed and rate of myeloid reconstitution and thus to reduce risks of early mortality related to lasting post-transplant neutropenia include use of ex-vivo expanded CB cells, double CBT, submyeloablative conditioning, intra-bone infusion and co-infusion of mobilized haematopoietic stem cells from a third party donor (TPD-MHSC) («dual CB/MHSC transplants»), a strategy pioneered by us and that is considerably less expensive and more cost/effective than those based on ex-vivo GMP expansion of double CB transplants.

Using a model of xenogenic transplantation of human cells to SCID/NOD mice we showed the CB-HSC have competitive advantage for engraftment on MHSC. Based on this, we clinically evaluated the dual transplant strategy in 55 consecutive adult candidates to HSCT because of high risk haematological malignancies who had not a HLA compatible donor. Patients were M/F 34/21, median age and weight 34 years and 69 Kg, ranges 16–60 and 43–95). After myeloablative conditioning they received a single 0–3 (median 2) HLA mm CB unit providing  $2,30 \times 10^7$ /Kg (1,14–4,30) TNC and  $0,10 \times 10^6$ /Kg (0,04–2,86) CD34<sup>+</sup> cells, immediately followed by the infusion of  $2,3 \times 10^6$ /Kg (1,05–2,84) TPD-MHSC (98% purity), carrying  $3,1 \times 10^3$ /Kg (0,5–15,6) CD3<sup>+</sup> cells. For 39, the TPD was a haplo-identical relative and for 16 the TPD shared no haplotype. ANC recovery to  $>500$ /uL occurred within a range of 9–36 days (P50 and P75 respectively 11 and 14 days; maximum cumulative incidence (CMI) 0,96, 95%CI 0,91–1). Recovery of CB derived ANC  $>500$ /uL occurred within 13–57 days (P50 and P95 respectively 21 and 57 days; MCI 0,94, 95%CI: 0,89–1.00). Full CB chimerism was achieved within 11–186 days (P50 and P90 respectively 37 and 96 days; MCI 0,91, 95%CI: 0,84–0,99), after transient periods of double UCB and TPD chimerism. Platelet recovery to  $>20,000$ /uL and to  $>50,000$ /uL occurred after median times of 32 and 46 days (MCI 0,8 and 0,71, 95% CI: 0,68–0,90 and 0,58–0,82).

Two patients received CB units that proved to have no viable progenitor cells after thawing and one patient had early rejection of the transplanted CB unit. All three had early engraftment of the TPD-MHSC that maintained normal ANC until engraftment of a second CBU transplanted after intervals of 32–63 days, what was followed by effacement of the TPD cells.

K-M relapse curve shows a 17% plateau after 15 months and the K-M DFS curves show a 54% plateau for all patients after one year, 61% and 39% respectively for patients younger and older than 40 years. Main cause of post-engraftment morbidity and mortality were opportunistic infections seemingly related to the late recovery of T cells. In most patients these remained very low longer than 6 months, meanwhile NK and B cells recovered much earlier (respectively by months 3rd and 6th). Circulating CMV specific T cells were consistently demonstrable in patients who had CMV reactivations. Analyses of sjTRECS showed that after post-transplant month 6th patients had numbers of thymic recent emigrant cells comparable to those shown by normal controls. DFS of patients receiving dual CB/TPD-MHSC transplants to treat acute leukaemia compared favourably to a comparable group of recipients of MHSC transplants from HLA identical siblings (52% vs 42% after 5 years).

Our results clearly show that, by producing an early bridge graft of the TPD-MHSC, the «dual transplant» strategy provides protection against bacterial and fungal infections and capacity to withstand treatments with gancyclovir and other antimicrobials with myelo-suppressive side effects, thus providing support until the later engraftment of the CBT. Data clearly show that the strategy makes achievement of engraftment and full CB chimerism feasible in almost any patient with units of 0–3 HLA mm and cell content significantly lower than the thresholds of  $2,5 \times 10^7$ /kg TNC and  $0,17 \times 10^6$ /kg CD34<sup>+</sup> cells usually quoted as required for a high probability of engraftment. Units of such size are rarely available for high weight patients. Moreover, the strategy makes it feasible to prioritize HLA match on cell content in the selection of the UCB. It also offers the possibility of selecting TPD KIR compatible with the CBT and incompatible with the recipient (what may prove beneficial regarding prevention of GVHD and GVT effect) as well as using the TPD as a source of other cell types (such as MSC or pathogen specific CTLs) for other cell-based immunotherapeutic interventions. Preliminary data of our group look promising in these regards.