

ОТ РЕДАКЦИИ



Дорогие друзья!

В этом номере рубрика «Оригинальные исследования/обзоры литературы» по предложению приглашенного главного редактора номера проф. Бориса Владимировича Афанасьева выглядит необычно – мы попросили представить лидеров направления свою точку зрения по актуальным вопросам трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Коллеги отстаивали свою точку зрения понравившимся им способом – это оригинальные статьи, либо материалы в формате «точка зрения».

В этом номере в формате "pro et contra" обсуждаются 2 вопроса. 1. Гаплоидентичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток – возможные подходы к улучшению результатов терапии. 2. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток пациентам с синдромом Гурлера – какой режим использовать? С полной или сниженной интенсивностью?

Надеемся, что представленный вариант закрепится в нашем журнале и будет и дальше широко использоваться. Читайте, обсуждайте, принимайте участие в дискуссии!

Деплеция альфа/бета-T-лимфоцитов – надежная платформа для развития трансплантации гемопоэтических стволовых клеток от гаплоидентичных доноров

М.А. Масчан

ФГБУ «ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117198, Москва, ул. Саморы Машела, 1

Контактные данные: Михаил Александрович Масчан mmaschan@yandex.ru

В материале представлено мнение об эффективности деплеции альфа/бета-T-лимфоцитов, как надежной платформе для развития трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) от гаплоидентичных доноров. Представлены исторические аспекты разработки и оптимизации метода, а также преимущества данного вида деплеции на современном этапе. Показана эффективность деплеции альфа/бета-T-лимфоцитов как способа значимой редукции опасности реакции «трансплантат против хозяина» и, следовательно, инфекционных осложнений. Материал представлен в формате «личное мнение» и отражает позицию руководителя отдела ТГСК ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.

Ключевые слова: дети, гаплоидентичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, дети, деплеция, реакция «трансплантат против хозяина», селекция, TCR альфа/бета лимфоциты

DOI: 10.17650/2311-1267-2015-2-3-34-38

Depletion of alpha/beta-T-cells is a robust platform for haploidentical hematopoietic stem cell transplantation results improvement

M.A. Maschan

Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitriy Rogachev, Ministry of Health of Russia; 1 Samory Mashela St., Moscow, 117198, Russia

An opinion on alpha/beta-T-cells depletion as effective platform for haploidentical hematopoietic stem cells transplantation (HSCT) is presented in this article. Historical aspects of the method development and improvement, advantages of this type of depletion in the modern era are presented. Effectiveness of alpha/beta-T-cell depletion for significant reduction of the risk of graft-versus-host disease and infection complications is showed. Article presented in the format of personal opinion of the head of department of the Dmitriy Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology.

Key words: haploidentical hematopoietic stem cell transplantation, children, depletion, reaction of graft-versus-host disease, selection, TCR alpha/beta lymphocytes

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), как медицинская технология, занимает особое место в терапевтическом арсенале детской гематологии/онкологии. С одной стороны, ТГСК является безальтернативным стандартом лечения ряда агрессивных гемобластозов, синдромов костномозговой недостаточности и врожденных иммунодефицитов, с другой стороны, ТГСК остается методом, ассоциированным с высоким риском развития тяжелых, подчас инвалидизирующих и смертельных осложнений. С точки зрения организации здравоохранения главной проблемой ТГСК как метода является ограниченная доступность, т. е. фактическая невозможность выполнения трансплантации всем нуждающимся в оптимальные сроки по отношению к ремиссии основного заболевания и соматическому статусу пациента. Оставляя за рамками обсуждения критическую ситуацию с количеством трансплантационных коек в Российской Федерации, отметим, что исторически ключевым фактором, определяющим доступность ТГСК, являлось наличие HLA-совместимых доноров, определяемое демографической ситуацией, наличием, размером и этногенетической структурой регистров неродственных доноров. Это ограничение связано с тем, что именно совместимость по антигенам главного комплекса гистосовместимости на ранних этапах развития ТГСК была признана необходимым условием для успеха трансплантации от аллогенных родственных, а затем и неродственных доноров. Парадигма HLA-совместимости легла в основу создания регистров неродственных доноров, суммарно объединяющих сегодня данные более чем 25 млн волонтеров из десятков стран. В странах с развитыми регистрами эффективность поиска неродственного донора достигает 85 %, а медиана длительности поиска — 45 дней. Эти данные заставляют думать, что создание качественных национальных регистров является ключом к обеспечению доступности трансплантации как метода, однако вместе с развитием регистров неродственных доноров пришло понимание, что этногенетический состав донорского пула не всегда точно отражает этническую структуру населения страны. Это существенно снижает шансы на идентификацию совместимого донора для этносов, ограничено представленных в регистрах в силу социокультурных причин. Кроме того, в реальности длительность трансграничного поиска донора составляет в среднем около 3 мес, что резко осложняет планирование трансплантаций и ведет к фактической селекции пациентов, т. е. отбору на трансплантацию от неродственного донора пациентов с более благоприятным течением основного заболевания и лучшим соматическим статусом. Создание национального регистра — дорогостоящий и долгий процесс, не решающий вопрос доступности трансплантации в перспективе нескольких лет. Развитие трансплантации пупо-

винной крови позволило в определенной степени отступить от жестких требований к HLA-совместимости трансплантата, однако естественное ограничение дозы клеток в образцах пуповинной крови делает этот метод относительно сложным в применении, особенно в популяции взрослых пациентов, так как успех трансплантации прямо коррелирует с дозой гемопоэтических предшественников в трансплантате. Необходимо отметить также, что ряд технических особенностей трансплантации пуповинной крови, в первую очередь — отсроченная миелореактивация, неблагоприятно сказывается на эффективности использования трансплантационных коек, неизбежно увеличивая средний койко-день и стоимость стационарного этапа ТГСК.

В значительной степени необходимость увеличить доступность трансплантации для всех нуждающихся пациентов явилась главным драйвером развития трансплантации от гаплоидентичных доноров.

История использования гаплоидентичных доноров насчитывает более трех десятилетий. Исторически гаплоидентичная трансплантация зарекомендовала себя как метод, сопряженный с наиболее тяжелыми осложнениями. При использовании стандартной фармакологической иммуносупрессивной терапии риск развития реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) III–IV степени составлял до 50 %, вероятность отторжения трансплантата — более 15 %, трансплантационная смертность — более 40 %. Фактически гаплоидентичные трансплантации в рамках стандартных протоколов профилактики РТПХ стали в определенной степени маргинальной технологией, терапией «последней надежды» с достаточно безнадежными результатами. Одновременно с первыми клиническими успехами аллогенной трансплантации костного мозга произошла расшифровка биологических механизмов аллореактивности и идентификация Т-лимфоцитов как главных эффекторов РТПХ. Очевидным следствием этих исследований стало развитие технологии деплеции Т-лимфоцитов как метода профилактики РТПХ. Идея Т-деплеции была предложена в середине 1980-х годов. Технически удаление Т-лимфоцитов из костного мозга осуществлялось с помощью фракционирования на основе физических характеристик. Эта методика позволяла добиться деплеции Т-лимфоцитов до 2 log. Основным результатом первых клинических исследований с использованием *ex vivo* Т-деплеции явилось принципиальное доказательство высокой эффективности метода в качестве профилактики РТПХ. Однако, помимо РТПХ, биологически Т-клеточная аллореактивность ассоциирована с рядом желательных эффектов трансплантации, таких как приживление (graft-facilitating activity) и реакция «трансплантат против лейкемии». Именно в связи с этим, несмотря на успех в профилактике РТПХ, общие результаты гапло-

идентичных трансплантаций на базе Т-деплеции оставались неблагоприятными. Главными причинами неудач являлись первичная недостаточность трансплантата, увеличение риска рецидива гемобластоза, особенно выраженное при хроническом миелолейкозе, и риска развития оппортунистических инфекций. Специфической проблемой Т-деплецированных трансплантаций стало развитие посттрансплантационной лимфопролиферации, ассоциированной с вирусом Эпштейн–Барра (ЭБВ-ПТЛЗ), так как селективное удаление Т-лимфоцитов из трансплантата вело к потере иммунологического надзора за пулом ЭБВ-инфицированных В-лимфоцитов, их неконтролируемой пролиферации и злокачественной трансформации.

Следующим этапом развития технологии *ex vivo* Т-деплеции стала позитивная селекция CD34-позитивной фракции. Данная технология развивалась в середине 1990-х годов в нескольких академических центрах Европы и США, наиболее интенсивно в университете Перуджи, университете Тюбингена и Мемориальном онкологическом центре «Слоан Кеттеринг» в Нью-Йорке. Метод основан на высокоэффективной позитивной иммуномагнитной селекции гемопоэтических стволовых клеток и ранних миелоидных предшественников. В результате процедуры глубина деплеции Т-лимфоцитов достигает $> 4,5 \log$, а доза Т-лимфоцитов в трансплантате составляет несколько тыс. клеток на кг массы тела. Глубокая Т-деплеция обеспечивает практически полный контроль РТПХ, а деплеция В-лимфоцитов – эффективную профилактику ЭБВ-ПТЛЗ. Одной из особенностей CD34-селекции является малая суммарная клеточность, и как следствие – риск первичной недостаточности трансплантата. Главным результатом серии исследований стала демонстрация принципиальной возможности полного контроля РТПХ при трансплантации от доноров, несовместимых по одному гаплотипу, что само по себе явилось огромным успехом. Среди важнейших находок этих клинических исследований – подтверждение постулированного в лабораторных экспериментах эффекта «мегадозы» стволовых клеток, т. е. необходимости использования высоких доз ($> 10 \times 10^6/\text{кг}$) для обеспечения приживления трансплантата. Второй центральной находкой стало доказательство влияния на исход трансплантации НК-аллореактивности. Так, согласно данным F. Aversa et al., способность НК-клеток донора эффективно атаковать клетки-мишени реципиента ассоциирована с существенным снижением риска рецидива при остром миелобластном лейкозе. Неразрешенной проблемой оставалась поздняя иммунореактивация, особенно в популяции взрослых пациентов с естественной инволюцией тимуса, а также необходимость использования интенсивного режима кондиционирования для обеспечения приживления малоклеточного трансплантата. Главной причиной неудач

трансплантации явились оппортунистические инфекции, а риск трансплантационной смертности составил до 40 %.

Логическим развитием этих работ стала предложенная R. Handgretinger технология CD3/CD19-деплеции. Центральной идеей технологии является сохранение в трансплантате НК-клеток и миелоидных предшественников и комбинация негативной деплеции Т- и В-лимфоцитов с целью профилактики РТПХ и ЭБВ-ПТЛЗ соответственно. Авторы методики полагали, что высокая клеточность трансплантата облегчит приживление, а высокая доза НК-клеток увеличит противолейкемическую активность. Сравнение данной технологии с CD34-селекцией показало, что эффективное приживление возможно при использовании относительно неинтенсивных режимов кондиционирования, основанных на комбинации тиофосамида и мелфалана, без использования тотального облучения тела. Одной из важных находок стало раннее восстановление гранулоцитарного и тромбоцитарного роста, связанное, вероятно, с высоким содержанием коммитированных предшественников в трансплантате. Вместе с тем качество профилактики РТПХ было снижено, что частично обусловлено менее эффективной, в сравнении с CD34-селекцией, деплецией Т-лимфоцитов.

Одновременно с клиническими исследованиями CD34-селекции и CD3/CD19-деплеции появились многочисленные исследования, указывающие на потенциальную роль популяции Т-лимфоцитов, несущих гамма/дельта Т-клеточный рецептор, в противоопухолевом иммунитете. Опираясь на эти данные и результаты клинического применения CD3/CD19-деплеции, R. Handgretinger et al. разработали новую методику обработки трансплантата – TCR альфа/бета и CD19-деплецию. В основе методики лежит моноклональное антитело, селективно связывающееся с константным участком альфа/бета Т-клеточного рецептора и оптимизированная система мечения, позволяющая увеличить нагрузку магнитных наночастиц на клетку. Оптимизация методики позволила увеличить эффективность деплеции до показателя $> 4,5 \log$, сопоставимого с аналогичным параметром CD34-селекции, в то время как показатель сохранности CD34 в трансплантате повысился до $> 90 \%$. В результате TCR альфа/бета и CD19-деплеции формируется трансплантат с высоким содержанием стволовых клеток, коммитированных миелоидных предшественников, НК-клеток и гамма/дельта Т-лимфоцитов.

Методика TCR альфа/бета и CD19-деплеции стала коммерчески доступна в 2011–2012 гг., и в этот период были инициированы первые клинические исследования у детей в университете Тюбингена, университете Рима и ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. В ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева в период 2012–2014 гг. было выполнено более 100 гаплотипичных транс-

плантаций с использованием нового метода процессинга трансплантата. Источником трансплантата во всех исследованиях являются стимулированные гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (Г-КСФ) стволовые клетки периферической крови, однако существуют определенные отличия в составе кондиционирования, в частности в использовании тотального облучения тела при острых лейкозах и в отношении вида, дозы и тайминга введения анти-тимоцитарного глобулина. Опубликованные ранние результаты и собственный опыт свидетельствуют о ряде существенных позитивных эффектов, ассоциированных с TCR альфа/бета и CD19-деплецией. К наиболее значимым следует отнести эффективность приживления трансплантата, контроль РТПХ и низкую трансплантационную смертность. Так, согласно данным ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, вероятность первичного приживления превышает 95 %. Средний срок восстановления гранулоцитарного и тромбоцитарного роста составляет 14 и 15 дней соответственно, а в сообщениях R. Handgretinger и F. Locatelli – около 10 дней, что обусловлено систематическим использованием Г-КСФ. Частота развития острой РТПХ II–IV степени варьирует от 0 до 35 %, а тяжелой РТПХ III степени не превышает 15 %. Вариации в частоте РТПХ обусловлены, вероятно, режимом использования анти-тимоцитарного глобулина, а также деталями кондиционирования, в частности – применением ритуксимаба в работах университета Рима. Во всех сообщениях показатель трансплантационной смертности не превышает 10 %, случаи ранней смерти исключительно редки, что может быть обусловлено как выбором режимов кондиционирования, так и вкладом аллореактивности в «классические» проявления острой токсичности трансплантации, такие как синдром обструкции синусоидов (веноокклюзионная болезнь), острое повреждение легких, синдром повышенной проницаемости капилляров и др. Одним из позитивных эффектов является относительно ранняя реконституция количественных показателей клеточного иммунитета, в частности – содержания NK-клеток и Т-лимфоцитов. Восстановление показателей Т-лимфоцитов обусловлено, в основном, экспансией гамма/дельта-Т-лимфоцитов и олигоклональной экспансией резидуальных альфа/бета-Т-лимфоцитов, сохранившихся в трансплантате. Вместе с тем, необходимо отметить, что регенерация широкого репертуара Т-лимфоцитов отсрочена до +150-го дня, когда по мере восстановления тимической функции происходит восстановление субпопуляций наивных Т-лимфоцитов. Таким образом, в первые месяцы после трансплантации сохраняется высокий риск развития тяжелых вирусных инфекций, в первую очередь – цитомегаловирусной и аденовирусной инфекции. В целом, трансплантационная смертность в значительной сте-

пени обусловлена именно этими патогенами, особенно аденовирусной инфекцией, фармакологический контроль которой крайне затруднен, а фульминантное течение ограничивает возможность упреждающей терапии, традиционной для цитомегаловирусной инфекции. Как и при всех технических вариантах аллогенной трансплантации в педиатрии, главной причиной неуспеха трансплантации при гемобластозах остаются рецидивы. В опыте ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева кумулятивный риск рецидивов варьирует от 20 % при остром миелобластном лейкозе до 40 % при остром лимфобластном лейкозе. Разброс в частоте рецидивов может быть обусловлен как биологической чувствительностью соответствующих форм острых лейкозов к NK-аллореактивности, так и составом кондиционирования, точнее недостаточной эффективностью химиотерапевтического кондиционирования при ОЛЛ в контексте трансплантации с «отключенной» Т-клеточной аллореактивностью.

Таким образом, дальнейшее совершенствование гаплоидентичной трансплантации на платформе TCR альфа/бета и CD19-деплеции должно включать обеспечение контроля вирусных инфекций до момента полноценной функциональной иммунореконституции и предотвращение рецидива при гемобластозах.

С точки зрения профилактики вирусных инфекций определенные надежды возлагаются на новые противовирусные препараты, в частности – brincyclovir, показавший высокую эффективность и незначительную токсичность при профилактическом применении после аллогенной трансплантации. Разрабатываются методы адоптивной клеточной терапии и профилактики вирусных инфекций на основе селекции и *ex vivo* экспансии вирус-специфичных донорских лимфоцитов, а также переноса широкого иммунологического репертуара, ассоциированного с Т-клетками памяти. Окончательное место конкурирующих технологий контроля вирусных инфекций будет определяться не только эффективностью, но и рыночными факторами.

В отношении контроля рецидивов наибольшие надежды связаны с внедрением таргетной терапии и нового поколения иммунотерапевтических подходов, наиболее важными из которых являются биспецифичные антитела, такие как блинатумомаб, и генетически модифицированные Т-лимфоциты (chimeric antigen receptor (CAR)). Центральным механизмом таргетной иммунотерапии является перенаправление цитотоксической активности Т-лимфоцитов с помощью антигенов, экспрессированных на опухолевых клетках и не экспрессированных на критических тканевых структурах. Первые результаты применения биспецифичных антител и CAR-Т-клеток при В-линейных лейкозах показали беспрецедентную эффективность этих методов. Вопросом ближайшего будущего является их практическая интеграция в систему терапии гемобластозов

высокого риска. Исходя из механизмов активности таргетной иммунотерапии, трансплантация с TCR альфа/бета и CD19-деплецией возможно является идеальной платформой для внедрения таких подходов, так как в раннем посттрансплантационном периоде создаются оптимальные условия для эрадикации злокачественного клона: минимальная масса опухоли и отсутствие посттрансплантационной иммуносупрессии.

Безусловно, помимо TCR альфа/бета и CD19-деплеции, предложено несколько технологических платформ, позволяющих успешно выполнять трансплантации от гаплоидентичных доноров. Наиболее известными являются: использование высокодозного циклофосфида в раннем посттрансплантационном периоде, усиленная фармакологическая иммуносуп-

прессия, CD34-селекция с инфузией регуляторных Т-лимфоцитов. Каждый из этих подходов обладает как безусловными достоинствами, так и очевидными недостатками. В настоящее время адекватное сравнение альтернативных методов выполнения гаплоидентичной трансплантации не выполнено. Вполне вероятно, что для разных возрастных групп и нозологий преимущества окажутся на стороне одного из указанных методов. При проведении анализа важно будет выполнить не только сравнение эффективности и безопасности конкурирующих методик, но и фармакоэкономический анализ, корректно оценивающий не прямые расходы, а также стоимость излечения одного пациента, а не абстрактную стоимость «одной трансплантации».

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ho V.T., Soiffer R.J. The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2001;98(12):3192–204.
2. Leung W., Campana D., Yang J. et al. High success rate of hematopoietic cell transplantation regardless of donor source in children with very high-risk leukemia. *Blood* 2011;118(2):223–30.
3. Booth C., Lawson S., Veys P. The current role of T cell depletion in paediatric stem cell transplantation. *Brit J Haematol* 2013;162(2):177–90.
4. Aversa F., Tabilio A., Velardi A. et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med* 1998;339(17):1186–93.
5. Schumm M., Lang P., Bethge W. et al. Depletion of T-cell receptor alpha/beta and CD19 positive cells from apheresis products with the CliniMACS device. *Cytotherapy* 2013;15(10):1253–8.
6. Chaleff S., Otto M., Barfield R.C. et al. A large-scale method for the selective depletion of alphabeta T lymphocytes from PBSC for allogeneic transplantation. *Cytotherapy* 2007;9(8):746–54.
7. Handgretinger R. New approaches to graft engineering for haploidentical bone marrow transplantation. *Semin Oncol* 2012;39(6):664–73.
8. Bertaina A., Merli P., Rutella S. et al. HLA-haploidentical stem cell transplantation after removal of $\alpha\beta^+$ T and B cells in children with nonmalignant disorders. *Blood* 2014;124(5):822–6.
9. Lang P., Feuchtinger T., Teltschik H.M. et al. Improved immune recovery after transplantation of TCRalpha/beta/CD19-depleted allografts from haploidentical donors in pediatric patients. *Bone Marrow Transplant* 2015;50 Suppl 2:S6–10.
10. Handgretinger R., Schumm M., Lang P. et al. Transplantation of megadoses of purified haploidentical stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 1999;872:351–61; discussion 361–2.
11. Eyrich M., Leiler C., Lang P. et al. A prospective comparison of immune reconstitution in pediatric recipients of positively selected CD34⁺ peripheral blood stem cells from unrelated donors vs recipients of unmanipulated bone marrow from related donors. *Bone Marrow Transplant* 2003;32(4):379–90.
12. Passweg J.R., Baldomero H., Bader P. et al. Hematopoietic SCT in Europe 2013: recent trends in the use of alternative donors showing more haploidentical donors but fewer cord blood transplants. *Bone Marrow Transplant* 2015;50(4):476–82.
13. Lankester A.C., Locatelli F., Bader P. et al. Will post-transplantation cell therapies for pediatric patients become standard of care? *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21(3):402–11.