

Trapianto di cellule staminali emopoietiche da donatore familiare HLA aploidentico incompatibile per tre loci.

M.F. Martelli, F. Aversa, A. Tabilio, A. Velardi

Un impiego piu' ampio del trapianto di cellule staminali emopoietiche allogeniche nel trattamento di pazienti con malattie ematologiche e' frenato dalla disponibilita' di donatori HLA compatibili nell'ambito dei consanguinei o del registro di volontari geneticamente non correlati (1, 2, 3).

D'altro canto, quasi tutti i pazienti che possono beneficiare di un trapianto, ma che non hanno un donatore compatibile, dispongono almeno di un potenziale donatore tra i familiari HLA aploidentici incompatibili per tre loci. Simili coppie donatori-riceventi sono usualmente incompatibili in ambedue le direzioni "host versus graft" e "graft versus host". Queste allorieazioni sono in gran parte mediate in vivo dai linfociti T, ma anche l'allorieattivit  delle cellule Natural Killer (NK) puo' avere un ruolo nell'esito clinico dei trapianti incompatibili per un intero aplotipo (4). In particolare, nel contesto di un trapianto incompatibile per tre loci, le cellule NK del donatore e/o del ricevente possono essere responsabili di tre situazioni :

1. un potenziale effetto "graft versus host" quando il ricevente non esprime gli alleli MHC riconoscibili dai recettori inibitori (KIR) delle cellule NK del donatore;
2. un potenziale effetto "host versus graft" mediato dalle cellule NK, quando il donatore non esprime gli alleli MHC riconoscibili dai KIR delle cellule NK del ricevente;
3. nessuna allorieattivit  NK quando gli alleli mismatched del donatore e del ricevente sono riconosciuti dai KIR sia del donatore che del ricevente.

Nel corso degli anni '80, tutti i tentativi clinici di effettuare trapianti da donatore incompatibile per tre loci dettero esito negativo a causa dell'elevatissima incidenza di GvHD severa nei trapianti non manipolati (T-repleti) (5,6) e, per converso, di rigetto dei trapianti il cui inoculo era stato sottoposto ex vivo ad intensa T deplezione (7,8).

Attorno alla fine degli anni '80, risultava evidente che, nei modelli sperimentali, il trapianto incompatibile T depleto poteva essere effettuato con successo, attraverso opportune modificazioni del regime di condizionamento e/o della composizione dell'inoculo.

Ad esempio, si dimostro' che la risposta del sistema immunologico residuo dell'ospite era superabile tramite l'impiego, accanto alla TBI, di agenti anti cellule T a bassa tossicit  extramidollare, quali l'ATG, gli anticorpi monoclonali anti-T (9) e la Fludarabina (10). L'attecchimento di un trapianto T depleto incompatibile poteva, poi, essere migliorato aggiungendo alla TBI farmaci mieloablativi come il Busulfano, il Dimetilmyleran (11) e il Tiotepa (12).

Per quanto riguarda la composizione dell'inoculo e' merito precipuo di Y. Reisner l'aver dimostrato nel modello sperimentale murino che l'impiego di megadosi di cellule staminali incompatibili T-depletate consentiva di ottenere l'attecchimento nella piu' parte dei riceventi anche in condizioni sperimentali particolarmente difficili, ad esempio in topi presensibilizzati con linfociti del donatore, o in animali il cui sistema immune era parzialmente ricostituito prima del trapianto tramite l'aggiunta di un certo numero di

timociti maturi dell'ospite (13) e infine in topi irradiati con dosi subletali (6.5 Gy) in cui un numero rilevante di T linfociti sopravviveva dopo l'irradiazione (14).

Nel 1993, il nostro gruppo, sulla base delle conoscenze derivanti dai modelli sperimentali, ha disegnato un regime di condizionamento in cui, successivamente all'irradiazione corporea totale (8 Gy in un'unica frazione ad alto dose rate), venivano impiegati Tiotepa (10 mg/Kg), Ciclofosfamide (60 mg/Kg/die per due giorni), ATG (5 mg/die per 5 giorni) con lo scopo di potenziare l'effetto mieloablativo e immunosoppressivo (15). Inoltre, poiché nei modelli sperimentali una dose elevata di cellule staminali si era rivelata come uno dei fattori più importanti nel promuovere l'attecchimento di un trapianto incompatibile T-depleto, venne impiegato un inoculo contenente un elevatissimo numero di cellule CD34+ (circa 10×10^6 /Kg). Per raggiungere questo livello, vennero impiegati, accanto al midollo osseo, progenitori ematici circolanti raccolti dal sangue periferico dopo stimolo con G-CSF. Sia il midollo osseo che le cellule mononucleate periferiche erano depletate dei T-linfociti con la metodica della E rosettazione e agglutinazione con la lectina soybean. L'inoculo conteneva in media un quantitativo di cellule CD3+ pari a 2×10^5 /Kg di ricevente.

Questo primo studio pilota, effettuato tra il 1993 e il 1995, comprendeva 36 pazienti affetti da Leucemia Acuta Mieloide (LAM) e Linfoide (LAL), con età mediana di 23 anni. La stragrande maggioranza dei casi era ad alto rischio vuoi per recidiva leucemica post-trapianto vuoi per mortalità trapianto-relata. L'80% dei pazienti raggiunse un attecchimento primario e stabile. Nonostante che non venisse impiegata alcuna terapia immunosoppressiva post trapianto, l'incidenza della GvHD (20%) era fortemente ridotta a confronto di un trapianto incompatibile non manipolato. Un importante punto da sottolineare è che in un precedente gruppo di pazienti sottoposti allo stesso regime di condizionamento, ma che erano stati infusi con una dose convenzionale di cellule staminali midollari incompatibili T-depletate, si verificò il rigetto in tutti i riceventi.

In sintesi, questo studio dimostra per la prima volta che nell'uomo - come nel topo - una megadose di inoculo rappresenta un fattore cruciale nel consentire il superamento della barriera di istocompatibilità.

Negli anni successivi, si è tentato di ridurre la tossicità extra ematologica del regime di condizionamento, sostituendo la Ciclofosfamide con la Fludarabina, nella dose di 40 mg/m²/die per 5 giorni. L'impiego della Fludarabina, da noi per la prima volta proposta nel trapianto di cellule staminali allogeniche, fa seguito a studi nel modello murino in cui si dimostra che Fludarabina + TBI determinava un'azione immunosoppressiva analoga a quella della Ciclofosfamide + TBI (10).

Allo scopo di eliminare completamente la GvHD, si decise di ridurre il numero dei T-linfociti nell'inoculo midollare a 3×10^4 /Kg, quantitativo inferiore di un log a quello utilizzato nello studio pilota precedente (2×10^5 /Kg). Per la T-deplezione ex vivo delle cellule mononucleate del sangue periferico venne impiegata la E-rosettazione seguita da immunoselezione delle cellule CD34+, con il sistema Ceprate.

Il secondo studio pilota, condotto tra il 1995 e il 1997, comprendeva 43 pazienti con età media di 22 anni, affetti da LAM e LAL, la più parte dei quali ad alto rischio per mortalità trapianto-relata e per recidiva leucemica. Otto dei 43 pazienti avevano recidivato dopo un trapianto autologo (16).

Per quanto concerne l'inoculo, in 28 pazienti vennero infusi sia il midollo osseo che i progenitori circolanti: l'inoculo finale conteneva una mediana di 10 milioni di cellule

CD34+ e di 3.5×10^4 cellule CD3+/Kg. Quindici pazienti ricevettero solo progenitori da sangue periferico con una composizione dell'inoculo affatto simile in termini di cellule CD34+ e CD3+.

La stragrande maggioranza (95%) dei pazienti raggiunse un attecchimento primario e stabile, con una ricostituzione emopoietica molto veloce sia in termini di granulociti neutrofili che di piastrine. Un'analisi in PCR del DNA polimorfismo evidenzio' un completo chimerismo del donatore nel sangue periferico e nel midollo osseo di tutti i pazienti. In due casi di rigetto un trattamento immunosoppressivo addizionale con Ciclofosfamide e ATG, seguito da un trapianto T-depleto da un differente membro della famiglia, consenti' di ottenere un attecchimento stabile.

Nessun caso di GvHD sia acuta che cronica complico' il decorso di questi trapianti da donatori incompatibili per tre loci, nonostante che non venisse praticata alcuna terapia immunosoppressiva post trapianto. Infine la tossicita' extraematologica del regime di condizionamento si rivelo' oltremodo modesta (nessun caso di VOD ; 5% di incidenza di mucosite severa e di distress respiratorio acuto), ove si consideri che la stragrande maggioranza dei pazienti era stata pesantemente pretrattata.

In sintesi questi risultati testimoniano del pieno raggiungimento di tutti gli obiettivi originari dello studio :

- a. alta incidenza di attecchimenti in pazienti trattati con un regime di condizionamento a bassa tossicita' extraematologica ;
- b. completa prevenzione della GvHD in pazienti che non erano stati sottoposti ad alcuna profilassi immunosoppressiva post trapianto.

Diciotto pazienti vennero trapiantati solo con cellule staminali da sangue periferico. A paragone dei soggetti che avevano ricevuto midollo osseo e cellule staminali periferiche, sia l'incidenza di attecchimento che la velocita' di ricostituzione emopoietica rimasero invariate, il che indica come l'aggiunta di midollo osseo alle cellule staminali periferiche non sia essenziale per l'attecchimento.

Un'altra riflessione emergente da questi dati e' che cellule staminali purificate, infuse in alto dosaggio, facilitano, di per se' stesse, l'attecchimento. Successivamente a questa ipotesi - e a riprova di questo concetto - Y. Reisner e coll. hanno dimostrato che cellule umane CD34+ - purificate con la stessa metodologia impiegata nel trapianto clinico - determinano in una cultura mista linfocitaria una riduzione specifica della frequenza di precursori citolitici diretti contro i loro antigeni di istocompatibilita', ma non contro cellule stimolatorie di una terza parte (17). In altri termini, le cellule CD34+ sono in grado di indurre una tolleranza specifica, come altre cellule veto o facilitanti. Una possibile spiegazione per questo effetto veto puo' essere costituita dal loro peculiare fenotipo che presenta antigeni MHC di classe I e II, in assenza delle molecole di costimolo B7, il che renderebbe le cellule T anergiche alle molecole MHC di classe I e II.

Un altro aspetto degno di menzione e' che i fattori che hanno condizionato l'alta percentuale di attecchimento , in assenza di GvHD, vale a dire il regime di condizionamento ed i numeri di cellule CD34+ e CD3+ nell'inoculo, sono tra loro strettamente legati, nel senso che variazioni nell'uno implicano di conseguenza anche variazioni negli altri. Un esempio puo' essere rappresentato dal recente studio clinico condotto da R. Handgretinger e coll. in Germania. In bambini affetti da Leucemia Acuta, trapiantati da donatori aploidentici, vennero riportati un'alta incidenza di attecchimenti e nessun caso di GvHD (18). Il regime di condizionamento, basato esclusivamente sulla chemioterapia (Tiotepa, Busulfano, Ciclofosfamide e ATG) e' sicuramente meno

immunosoppressivo di un condizionamento quale quello da noi utilizzato caratterizzato dalla presenza di TBI in unica frazione ad alto dose rate. D'altro canto, l'inoculo conteneva circa il doppio di cellule CD34+ (20 milioni/Kg contro 10 milioni/Kg) di quanto utilizzato nel nostro studio, poiché i pazienti della casistica tedesca, essendo bambini, avevano un basso peso corporeo.

Un altro esempio può essere costituito dal numero di T-linfociti nell'inoculo che rappresenta la dose soglia per la GvHD. Nella nostra esperienza l'impiego di un quantitativo di T-linfociti pari a 3×10^4 /Kg non è stato seguito da nessun caso di GvHD. Si deve però sottolineare la presenza dell'ATG nel regime di condizionamento. Dacché l'emivita plasmatica dell'ATG è di sei giorni, il farmaco può aver contribuito a ridurre l'incidenza della GvHD, esercitando un'azione di deplezione in vivo dei T-linfociti presenti nell'inoculo midollare.

È ampiamente noto come i problemi maggiori della T-deplezione siano rappresentati dall'aumentata incidenza di recidive leucemiche post-trapianto, (dovuta alla mancanza di un effetto GvL, GvHD-relato) e dal deficit immunologico post-trapianto con relativa aumentata incidenza di infezioni.

Nel nostro studio, la più parte delle recidive sono state osservate nei pazienti con LAL, particolarmente in quelli in recidiva, al momento del trapianto, fenomeno questo più che atteso in un simile gruppo di soggetti ad alto rischio. Per contro, nei 32 pazienti con LAM trapiantati nel corso del primo e del secondo studio, tra il 1993 e il 1997, la probabilità a sei anni di recidiva leucemica fu del 22%, un valore molto basso ove si consideri che circa la metà dei pazienti erano in recidiva al momento del trapianto, la più parte in recidiva chemioresistente.

Questi dati indicano un effetto GvL specifico nei riguardi della LAM. Recentemente, A. Velardi e coll. hanno suggerito che l'alloreattività NK possa avere un ruolo nell'azione GvL (4). Come già sottolineato, in molte coppie donatore-ricevente i recettori inibitori (KIR) per l'MHC delle cellule NK del donatore non riconoscono come self gli alleli di classe I del ricevente. Di conseguenza le cellule NK del donatore sono capaci di lisare le cellule linfemopoietiche del ricevente. In questi casi si è dimostrato che la ricostituzione del repertorio NK nel ricevente - per almeno 3-4 mesi dopo il trapianto - è caratterizzata dalla presenza di un quantitativo significativo di cloni NK alloreattivi nei riguardi del paziente. Questi cloni sono in grado di lisare in maniera molto efficace cellule di LAM e di LMC prelevate dai pazienti e criopreservate prima del trapianto. Per contro l'azione litica non si esplica nei riguardi delle cellule della più parte dei casi di LAL. I livelli di espressione di LFA-1 -una molecola di adesione essenziale per la formazione del coniugato cellula effettrice -cellula target e per l'attivazione delle cellule effettrici - sembrano indicare il grado di suscettibilità alla lisi NK (alta espressione nelle cellule sensibili della LAM e della LMC, bassa espressione nella più parte dei pazienti con LAL). A riprova di questa ipotesi, va sottolineato come sino al momento attuale non si sia osservata alcuna recidiva nei pazienti con LAM o con LMC trapiantati da donatori potenzialmente NK alloreattivi. I cloni alloreattivi NK lisano con la stessa efficienza anche le cellule linfemopoietiche normali (linfociti stimolati con PHA, linee linfoblastoidi B) del ricevente, criopreservate prima del trapianto, per cui è ipotizzabile che l'alloreattività NK abbia un ruolo anche nella prevenzione del rigetto, contribuendo ad eliminare il sistema immune residuo dopo il condizionamento.

Nessuno dei pazienti sviluppo' segni clinici di GvHD acuta o cronica, pur presentando in circolo un significativo numero di cellule NK alloreattive. Questa osservazione non deve destare sorpresa poiche' lo stesso fenomeno - seppur in senso opposto - e' stato descritto nel cosiddetto modello murino di resistenza ibrida, dove le cellule NK di un ricevente F1 sono in grado di rigettare il trapianto di midollo osseo dei genitori, ma non trapianti di cute o altri organi (19).

Il maggior problema clinico, nei pazienti adulti, ma non nei bambini, e' rappresentato dalla lentezza con cui avviene il ripristino di un'efficiente immunita' contro virus, batteri e funghi, dovuta ad un ritardo nella ricostituzione del sistema T-immune. Nonostante una profilassi antivirale e antifungina, il 71% delle morti non-leucemiche (quindi il 70% della mortalita' trapianto-relata che e' pari al 49%) e' dovuto ad infezioni batteriche e fungine. Questa incidenza di infezioni fatali puo' sembrare alta, ma e' necessario prendere in considerazione che la piu' parte dei pazienti del nostro studio aveva una lunga storia di malattia ed era stata pesantemente pre-trattata, con conseguente alta incidenza di colonizzazioni batteriche e fungine prima del trapianto. Ad esempio, vi e' una differenza notevole nell'incidenza di infezioni letali tra pazienti con pregresse storie di severe infezioni batteriche e/o fungine prima del trapianto e pazienti a minor rischio: nei pazienti non colonizzati la mortalita' dovuta ad infezioni era pari al 13%.

Inoltre va sottolineato come questa relativa immunoincompetenza non sia una caratteristica unica dei trapianti incompatibili per tre loci. Ad esempio simili condizioni di immunodeficienza e gli stessi tipi (e incidenza) di infezioni sono stati del tutto recentemente riportati in soggetti adulti che avevano ricevuto un trapianto di midollo osseo T-depleto da donatori HLA-compatibili non correlati geneticamente (20). E del resto analoghi problemi contraddistinguono il decorso di pazienti con GvHD sottoposti a trapianto convenzionale (T-repleto) da donatori non correlati.

E' ampiamente noto che, nei primi 6-8 mesi dopo il trapianto, la ripopolazione T linfoide di un paziente adulto e' essenzialmente sostenuta dall'espansione di T-linfociti maturi del donatore presenti nell'inoculo midollare. Anche nei trapianti convenzionali compatibili, il repertorio delle cellule T rimane piu' o meno severamente compromesso sino all'avvento di cellule CD4+, CD45RA+RO- che verosimilmente rappresentano il prodotto della maturazione intratimica. E' ovvio che nei trapianti intensamente T-depletati, come quelli che forzatamente devono essere effettuati nel caso di donatori incompatibili, il ritardo della ricostituzione dei livelli e delle funzioni dei linfociti T e' ancora piu' accentuato.

L'ostacolo potrebbe essere superato trasferendo, dopo il trapianto, cellule T mature del donatore, previa deplezione ex vivo delle cellule T alloreattive. Questi linfociti T non alloreattivi possono essere diretti (oppure no) contro specifiche sorgenti di infezione (ad esempio Candida, Aspergillo, Cytomegalovirus e Toxoplasma). Al momento attuale, il recupero delle funzioni immunitarie appare tuttavia piu' rapido di quanto da noi pubblicato nel 1998. Vari fattori potrebbero aver contribuito a tale fenomeno. In primo luogo, con il sistema Meltenyi e' possibile trapiantare un numero maggiore di cellule CD34+ (e, verosimilmente, anche piu' funzionali data la relativa rapidita' della procedura di purificazione). A questo riguardo, e' stato proposto come l'infusione di alti numeri di cellule CD34+ possa promuovere un piu' rapido recupero di cellule T (18). In secondo luogo, poiche' dati in vitro indicano che il gancyclovir potrebbe esercitare effetti immunosoppressivi, esso e' stato sostituito nella profilassi anti-CMV con il foscarnet. Dacche' e' stato dimostrato (Roncarolo MG et al, dati non pubblicati) che il G-CSF induce la produzione, da parte delle cellule presentanti l'antigene, della citochina

immunosoppressiva IL10 (che e' in grado a sua volta di impedire la presentazione antigenica e l'attivazione delle risposte immuni), il G-CSF non viene piu' somministrato ai pazienti dopo il trapianto, il che, del resto, non sembra aver prodotto conseguenze negative nell'attecchimento. Gli effetti immunoregolatori connessi a tale decisione terapeutica sono attualmente in fase di studio. Infine, mentre e' possibile che vari fattori ne siano responsabili, una chiara indicazione di un migliorato recupero delle funzioni immuni post-trapianto e' fornita anche dal fatto che le complicanze infettive appaiano al momento attuale in diminuzione.

Nonostante i problemi sovraesposti, nei 32 pazienti con LAM, trapiantati tra il 1993 e il 1997, nel corso del primo e secondo studi pilota, si e' osservata una probabilita' di sopravvivenza "event-free" a sei anni pari al 33%. Ove si consideri che 14 dei 32 soggetti erano in recidiva al momento del trapianto, e' evidente come simili risultati non potrebbero essere raggiunti da nessun'altra forma di trattamento disponibile al momento attuale. La probabilita' di sopravvivenza dei pazienti con LAL e' inferiore, essenzialmente per una piu' alta incidenza di recidiva, caratteristica di questi pazienti adulti ad altissimo rischio. In conclusione, i risultati in termini di mortalita' trapianto-relata e di sopravvivenza "event-free" non appaiono dissimili da quelli riportati in pazienti affetti da Leucosi Acuta, in analogo stato di malattia, sottoposti a trapianto convenzionale (o T-depletato) da donatori geneticamente non correlati. Pertanto il trapianto da donatore familiare aploidentico incompatibile per tre loci deve essere oramai considerato una realta' clinica, da impiegare nel trattamento dei pazienti con Leucosi ad alto rischio, che non dispongono di un donatore compatibile o che necessitano di un trapianto urgente. Per contro, questa strategia non puo' essere raccomandata nei pazienti con LAL chemioresistente o nei pazienti con una storia clinica recente di severe infezioni batteriche e/o fungine. Infine, la possibilita' di prevenire pressocche' totalmente due importanti complicanze quali la GvHD e il rigetto rappresenta un'importante tappa per future applicazioni del trapianto da familiare incompatibile in pazienti di eta' avanzata affetti da Leucosi Acute e nel trattamento di affezioni ematologiche non neoplastiche.

References.

1. Thomas ED, Marrow transplantation for malignant disease. *J Clin Incol* 1983; 1:517-31
2. Kernan NA, Bartsch G, Ash RC, et al. Retrospective analysis of 462 unrelated marrow transplants facilitated by the National Marrow Donor Program (NMDP) for treatment of acquired and congenital disorders of the lymphohematopoietic system and congenital metabolic disorders. *N Engl J Med* 1993; 328:593-602
3. Anasetti C, Etzioni R, Petersdorf EW, et al. Marrow transplantation from unrelated volunteer donors. *Ann Rev Med* 1995; 46:169-79
4. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 1999 ; 94(1):333-9
5. Anasetti C, Amos D, Beatty PG, et al. Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma. *N Engl J Med* 1989; 320:197-204
6. Beatty PG, Mori M, Milford E. Impact of racial genetic polymorphism on the probability of finding an HLA-matched donor. *Transplantation* 1995; 60:778-92
7. Kernan NA, Flomemberg N, Dupont B, O'Reilly RJ. Graft rejection in recipients of T

- cell depleted HLA-nonidentical marrow transplants for leukemia : identification of host derived anti-donor allocytotoxic T lymphocytes. *Transplantation* 1987; 43:842-7
8. Soiffer RJ, Mauch P, Tarbell NJ, et al. Total lymphoid irradiation to prevent graft rejection in recipients of HLA non-identical T cell-depleted allogeneic marrow. *Bone Marrow Transplant* 1991; 7:23-33
 9. Cobbold SP, Martin G, Quin S, Waldman H. Monoclonal antibodies to promote marrow engraftment and tissue graft tolerance. *Nature* 1986; 323:164-6
 10. Terenzi A, Aristei C, Chionne F, et al. Preliminary results in Fludarabin as an immunosuppressor in Bone Marrow transplantation conditioning. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: Suppl. 1:89. Abstract.
 11. Lapidot T, Lubin I, Terenzi A, et al. Enhancement of bone marrow allografts from nude mice into mismatched recipients by T cells void of graft-versus-host activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 97:4595-9
 12. Terenzi A, Lubin I, Lapidot T et al. Enhancement of T-cell depleted bone marrow allografts in mice thiotepa. *Transplantation* 1990; 50:517-9
 13. Lapidot T, Terenzi A, Singer TS, Reisner Y. Size of bone marrow inoculum versus number of donor-type cells used for presensitiation : a murine model for bone marrow allograft rejection in leukemia patients. *Blood* 1987 ; 70:309a.
 14. Bachar-Lusting E, Rachamim N, Li HW, et al.. Megadose of T cell-depleted bone marrow overcomes MHC barriers in sublethally irradiated mice. *Nature Medicine* 1995 ; 1:268-1273
 15. Aversa F, Tabilio A, Terenzi A, et al. Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical "three-loci" incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. *Blood* 1994; 84:3948-55.
 16. Aversa F, Tabilio A, Velardi A, et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cell from related with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med* 1998; 339:1186-1193
 17. Rachamim N, Gan J, Segall H, et al. Tolerance induction by "megadose" hematopoietic transplants : donor type human CD34 stem cells induce potent specific reduction of host anti-donor cytotoxic T lymphocyte precursors in mixed lymphocyte culture. *Transplantation* 1998 ; 65:1386-1393
 18. Eyrich M, Handgretinger R, Schumm M, et al. A prospective analysis of the pattern of immune reconstitution after haploidentical CD34+ peripheral stem cell transplantation in children, *Blood* 1998; 92:686a
 19. Bennett M. Biology and genetics of hybrid resistance. *Adv. Immunol.* 1987 ; 41:333-445.
 20. Small TN, Papadopoulos EB, Boulad F, et al. Comparison of immune reconstitution after unrelated and related T-cell-depleted bone marrow transplantation : effect of patient age and donor leukocyte infusions. *Blood* 1999 ; 93:467-80