



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

**Progenitors hematopoètics de sang perifèrica:
característiques del producte que impacten en el
receptor i en els controls de qualitat del processament**

Jesús Fernández Sojo



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



BANC DE SANG
I TEIXITS

Progenitors hematopoètics de sang perifèrica: característiques del producte que impacten en el receptor i en els controls de qualitat del processament

Memòria de tesi doctoral presentada per Jesús Fernández Sojo per optar al grau
de doctor per la Universitat de Barcelona



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



BANC DE SANG
I TEIXITS

Progenitors hematopoètics de sang perifèrica: característiques del producte que impacten en el receptor i en els controls de qualitat del processament

Memòria de tesi doctoral presentada per Jesús Fernández Sojo per optar al grau
de doctor per la Universitat de Barcelona

Dirigida pel **Dr. Joan Cid Vidal**, investigador de la línia d'Oncologia i Hematologia del
Programa de Doctorat de Medicina i Recerca Translacional de la Universitat de
Barcelona i facultatiu de la Unitat d' Afèresi i Teràpia Cel·lular del Banc de
Progenitors Hematopoètics del Servei d'Hemoteràpia i Hemostàsia de l'Institut
Clínic de Malalties Hematològiques i Oncològiques (ICMHO) de l'Hospital Clínic de
Barcelona, i pel **Dr. Sergi Querol Giner**, director del Servei de Teràpia Cel·lular i
Avançada del Banc de Sang i Teixits de Barcelona.

Tutoritzada pel **Dr. Miquel Lozano Molero**, investigador de la línia d'Oncologia i
Hematologia del Programa de Doctorat de Medicina i Recerca Translacional de la
Universitat de Barcelona i director de la Unitat d' Afèresi i Teràpia Cel·lular del Banc
de Progenitors Hematopoètics del Servei d'Hemoteràpia i Hemostàsia de l'ICMHO
de l'Hospital Clínic de Barcelona.

**Programa de Doctorat de Medicina i Recerca Translacional Facultat de Medicina
i Ciències de la Salut, Universitat de Barcelona**

Maig de 2023

AUTORITZACIÓ DE LA PRESENTACIÓ DE LA TESI

El **Dr. Joan Cid Vidal**, investigador de la línia d'Oncologia i Hematologia del Programa de Doctorat de Medicina i Recerca Translacional de la Universitat de Barcelona i facultatiu de la Unitat d' Afèresi i Teràpia Cel·lular del Banc de Progenitors Hematopoètics del Servei d'Hemoteràpia i Hemostàsia de l'ICMHO de l'Hospital Clínic de Barcelona, amb DNI 40932650X, i el **Dr. Sergi Querol Giner**, director del Servei de Teràpia Cel·lular i Avançada del Banc de Sang i Teixits de Barcelona, amb DNI 18950578G,

DECLAREN:

Que la memòria de tesi presentada pel **Sr. Jesús Fernández Sojo** amb títol «**Progenitors hematopoètics de sang perifèrica: característiques del producte d'afèresi que impacten en el receptor i en els controls de qualitat del processament**» ha estat redactada sota la nostra direcció i que n'autoritzem el dipòsit per ser defensada i jutjada per un tribunal.

Signat el dia *16 de maig de 2023*

Director

Juan Cid Vidal



Director

Sergi Querol

DECLARACIÓ DE LA PERSONA DOCTORAND I LES PERSONES QUE DIRIGEIXEN DE L'ORIGINALITAT I LES BONES PRÀCTIQUES DE LA TESI

El **Dr. Joan Cid Vidal**, investigador de la línia d'Oncologia i Hematologia del Programa de Doctorat de Medicina i Recerca Translacional de la Universitat de Barcelona i facultatiu de la Unitat d' Afèresi i Teràpia Cel·lular del Banc de Progenitors Hematopoètics del Servei d'Hemoteràpia i Hemostàsia de l'ICMHO de l'Hospital Clínic de Barcelona, amb DNI 40932650X, i el **Dr. Sergi Querol Giner**, director del Servei de Teràpia Cel·lular i Avançada del Banc de Sang i Teixits de Barcelona, amb DNI 18950578G,

DECLAREN:

Que la tesi doctoral, amb títol «**Progenitors hematopoètics de sang perifèrica: característiques del producte d'afèresi que impacten en el receptor i en els controls de qualitat del processament**» és original i conté resultats i informació fruit de la recerca pròpia i que no s'han plagiat continguts d'altres tesis o publicacions o recerques d'altres autors. Així mateix, confirmen que s'han seguit els codis ètics i de bones pràctiques per elaborar la tesi.

Manifesten que donen el consentiment perquè la memòria de tesi pugui ser sotmesa a procediments per comprovar-ne l'originalitat.

Perquè consti, signen el dia *16 de maig de 2023*



Director

Juan Cid Vidal



Director

SERGI QUEROL



Doctorand

JENS FERNANDEZ 5070

DECLARACIÓ D'AUTORIA DE LA TESI

El doctorand Sr. **Jesús Fernández Sojo**, amb DNI 52162505T,

DECLARA:

Que és l'autor de la tesi doctoral titulada «**Progenitors hematopoètics de sang perifèrica: característiques del producte d'afèresi que impacten en el receptor i en els controls de qualitat del processament**».

19 de Maig 2023

Signat el dia



El doctorand

Jesús Fernández Sojo

AGRAÏMENTS

En primer lugar, querría agradecer a mis padres, hermano y familia el soporte y el apoyo que me han dado, sin el cual no podría estar aquí, y el hecho de haberme permitido estudiar la carrera de Medicina. També a totes aquelles persones que em van animar a aconseguir els meus objectius professionals com són Montserrat Mata durant el batxillerat; Maribel, que vaig conèixer durant les pràctiques de dissecció de la Facultat de Medicina; Montse Batlle per convèncer-me de triar la família de Can Ruti per fer l'especialitat d'Hematologia, i els companys i amics de la universitat, amb qui tantes hores hem passat junts al campus de Bellvitge.

A Carlos y David, amigos de la infancia con los que, a pesar de que no nos vemos tan a menudo como nos gustaría, seguimos manteniendo ese vínculo creado después de tantos buenos momentos que hemos pasado juntos.

Voldria mencionar els companys i amics de feina del Servei de Teràpia Cel·lular i Avançada, pel seu compromís professional i pels bons moments que passem a la feina, i el Banc de Sang i Teixits, per donar-me l'oportunitat de desenvolupar la meva carrera professional al costat de grans professionals i persones. També voldria recordar les persones que vaig conèixer en la meva primera etapa en el Banc de Sang de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron i que em van introduir en el món de l'hemoteràpia.

Voldria mostrar el meu agraïment a Joan Cid per l'oportunitat que em va oferir de ser el meu director de tesi doctoral quan ens vam conèixer en el viatge a Chicago en el congrés anual de l'American Society for Apheresis (ASFA), per transmetre'm els seus coneixements i per donar-me claredat en els moments més complicats durant aquests anys. També a Miquel Lozano pel rigor científic i per oferir-se a tutoritzar la meva tesi.

També voldria mostrar el meu agraïment al meu company de feina Sergi Querol per donar-me l'oportunitat de treballar al seu costat en el Servei de Teràpia Cel·lular i Avançada quan estava en el Banc de Sang de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, per

tots els teus consells i per transmetre'm la teva passió científica. Al començament eres el meu referent, i durant aquest temps t'has convertit també en un amic.

Quero agradecerlle a Luis e a miña sogra Kika o seu amor e hospitalidade e os bos momentos que pasamos en Louro, Galicia, lugar que me deu tanta inspiración para escribir os artigos que compoñen esta tese.

Finalmente, quero mostrar o meu agradecemento a Alba Leis por estar todos os días ao meu lado, confiar en min e facer da vida un agasallo, pola túa forma de ver a vida, esa espontaneidade e emoción tan necesarias que te fan única. Y ¿cómo dejarme a lago, mi hijo?, por enseñarme que lo más bonito de la vida está en los pequeños detalles y en el tiempo compartido juntos. Os quiero con locura.

ÍNDEX

1	ABREVIATURES I ACRÒNIMS	16
2	ENUMERACIÓ DELS ARTICLES DE LA TESI	20
3	INTRODUCCIÓ	24
3.1	TRASPLANTAMENT DE PROGENITORS HEMATOPOÈTICS: UNA VISIÓ GENERAL	26
3.1.1	Breu història del trasplantament de progenitors hematopoètics.....	26
3.1.1.1	<i>Trasplantament al·logènic.....</i>	<i>26</i>
3.1.1.2	<i>Trasplantament autòleg.....</i>	<i>28</i>
3.1.2	Generalitats del trasplantament de progenitors hematopoètics.....	29
3.1.2.1	<i>Objectius.....</i>	<i>29</i>
3.1.2.2	<i>Tipus.....</i>	<i>30</i>
3.1.2.3	<i>Règim de condicionament.....</i>	<i>32</i>
3.1.2.4	<i>Immunosupressió.....</i>	<i>33</i>
3.1.2.5	<i>Indicació del trasplantament de progenitors hematopoètics</i>	<i>33</i>
3.1.2.6	<i>Malaltia de l'empelt contra l'hoste</i>	<i>34</i>
3.2	CÈL·LULES PROGENITORES HEMATOPOÈTIQUES DE SANG PERIFÈRICA	35
3.2.1	Mobilització	36
3.2.2	Objectiu cel·lular a recollir	38
3.2.3	Leucafèresi	40
3.3	PROCESSAMENT CEL·LULAR	43
3.3.1	Manipulacions mínimes.....	45
3.3.2	Criopreservació.....	47
3.4	CONTROL DE QUALITAT	51
3.4.1	Tests de seguretat	52
3.4.2	Tests d'identitat.....	53
3.4.3	Tests de viabilitat.....	55
3.4.4	Tests de potència.....	55
3.4.5	Avaluació <i>in vivo</i>	57

3.5	FACTORS BIOLÒGICS DELS PRODUCTES QUE IMPACTEN EN ELS RESULTATS DEL TRASPLANTAMENT I EN EL CONTROL DE QUALITAT	57
3.5.1	Impacte clínic de la viabilitat i la potència en el TPH autòleg	59
3.5.2	Impacte clínic de la criopreservació en el TPH al·logènic de sang perifèrica	61
3.5.3	Impacte de les característiques dels productes col·lectats en els controls de qualitat després de la criopreservació de les donacions de CPH al·logèniques de sang perifèrica	65
4	HIPÒTESIS	70
5	OBJECTIUS	74
6	MATERIALS, MÈTODES I RESULTATS	78
7	DISCUSSIÓ.....	106
8	CONCLUSIONS.....	120
9	BIBLIOGRAFIA	126

ÍNDEX IMATGES

Figura 1. Trasplantament de progenitors hematopoètics a Espanya entre els anys 2013 i 2021 en funció del tipus de donant.....	30
Figura 2. Trasplantaments de progenitors hematopoètics familiars a Espanya des de l'any 2003 fins a l'any 2021 segons la font de cèl·lules progenitores	31
Figura 3. Trasplantaments de progenitors hematopoètics no emparentats a Espanya des de l'any 2003 fins a l'any 2021 segons la font de cèl·lules progenitores	32
Figura 4. Un model de la mobilització amb G-CSF	38
Figura 5. Mobilització de CPH amb plerixafor	40
Figura 6. Gravetat específica de les cèl·lules sanguínies. Font: Moog R [46]......	41
Figura 7. Relació entre el comptatge de cèl·lules CD34+ previ a la leucafèresi i la quantitat de cèl·lules CD34+ recollides.....	43
Figura 8. Flux general de la donació de CPH fins a l'administració al pacient passant per totes les etapes intermèdies	45
Figura 9. Tecnologies emprades per al processament cel·lular de productes	47
Figura 10. Corba de congelació amb el CRC CM2010	49
Figura 11. Enumeració de cèl·lules CD34+ en una mostra de leucafèresi mobilitzada utilitzant un protocol basat en la ISHAGE fet mitjançant l'aparell Navios EX pel laboratori cel·lular del BST	54
Figura 12. Lectura de les UFC en una mostra d'una leucafèresi mobilitzada.	56

ÍNDEX TAULES

Taula 1. Enquesta d'activitat del European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) del 2020	36
---	----

1 ABREVIATURES I ACRÒNIMS

Progenitors hematopoètics de sang perifèrica: característiques del producte que impacten en el receptor i en els controls de qualitat del processament

7-AAD	7-aminoactinomicina D
ACDA-A	solució anticoagulant de citrat i dextrosa fórmula A
ADN	adenosina desoxiribonucleic
ATP	adenosinatrifosfat
BST	Banc de Sang i Teixits
CC	centre de col·lecta
CIBMTR	Center for International Blood and Marrow Transplant Research
CMN	cèl·lules mononucleades
CNT	cèl·lules nucleades totals
CPH	cèl·lules progenitores hematopoètiques
CRC	congeladors de ràtio controlada
CT	centre de trasplantament
CXCR4	receptor 4 de citocines
DKMS	German Bone Marrow Donor Center
DMSO	dimetilsulfòxid
DNE	donant no emparentat
EBMT	European Group for Blood and Marrow Transplantation
FACT	Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy
G-CSF	factor estimulator de colònies granulocítiques
HEM	hidroxietil midó
HLA	sistema del human leukocyte antigen
HR	hazard ratio (quocient de riscos)
IC	interval de confiança
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's medium (mitjà Dulbecco modificat d'Iscove)
ISCT	International Society for Cellular Therapy
ISHAGE	International Society for Hematotherapy and Graft Engineering
LH	limfoma de Hodgkin
LNH	limfoma no hodgkinià
LTC	laboratori de teràpia cel·lular
MECH	malaltia de l'empelt contra l'hoste
MM	mieloma múltiple

MNR	mortalitat no relacionada amb recaiguda
MO	medul·la òssia
mTOR	mammalian target of rapamycin (diana de la rapamicina en mamífers)
NK	natural killer [cell] (cèl·la citocida natural)
ONT	Organización Nacional de Trasplante
SCU	sang de cordó umbilical
SDF-1	stromal cell-derived factor 1 (factor 1 derivat de cèl·lules estromals)
SG	supervivència global
SLM	supervivència lliure de malaltia
SP	sang perifèrica
TPH	trasplantament de progenitors hematopoètics
UFC-GM	unitats formadores de colònies granulomacròfages

2 ENUMERACIÓ DELS ARTICLES DE LA TESI

La tesi s'estructura, seguint la normativa del Programa de Doctorat de Medicina de la Universitat de Barcelona, en format de compendi de publicacions.

La tesi consta de tres articles, que són els següents:

1. **Fernandez-Sojo J**, Cid J, Azqueta C, Valdivia E, Martorell L, Codinach M, Marsal J, Mussetti A, Esquirol A, Trabazo M, Benitez MI, Ferra C, Fox ML, Linares M, Alonso E, García-Rey E, García-Muñoz N, Medina L, Castillo-Flores N, Vall-Llovera F, Garcia A, Pinacho A, Talarn C, Arroba JG, Coll R, Santos M, Valero O, Carreras E, Lozano M, Querol S. **Post thawing viable CD34+ cells dose is a better predictor of clinical outcome in lymphoma patients undergoing autologous stem cell transplantation.** Bone Marrow Transplant. 2022; 57 (8): 1341-3. Journal Citation Report (JCR): factor d'impacte, 5.176. Quartil 2. Àrea de coneixement: hematologia.
2. **Fernandez-Sojo J**, Azqueta C, Valdivia E, Martorell L, Medina-Boronat L, Martínez-Llonch N, Torrents S, Codinach M, Canals C, Elorza I, Parody R, Martino R, Trabazo M, Díaz de Heredia C, Ferra C, Valcárcel D, Linares M, Ancochea Á, García-Rey E, García-Muñoz N, Medina L, Castillo N, Carreras E, Villa J, Querol S. **Cryopreservation of unrelated donor hematopoietic stem cells: the right answer for transplantations during the COVID-19 pandemic?** Bone Marrow Transplant. 2021; 56 (10): 2489-96. Journal Citation Report (JCR): factor d'impacte, 5.176. Quartil 2. Àrea de coneixement: hematologia.
3. **Fernandez-Sojo J**, Horton R, Cid J, Azqueta C, Garcia-Buendia A, Valdivia E, Martorell L, Rubio-Lopez N, Codinach M, Aran G, Marsal J, Mussetti A, Martino R, Diaz-de-Heredia C, Ferra C, Valcarcel D, Linares M, Ancochea A, García-Rey E, García-Muñoz N, Medina L, Carreras E, Villa J, Lozano M, Gibson D, Querol S. **Leukocytapheresis variables and transit time for allogeneic cryopreserved hpc: better safe than sorry.** Bone Marrow Transplant. 2022; 57 (10): 1531-8. Journal Citation Report (JCR): factor d'impacte, 5.176. Quartil 2. Àrea de coneixement: hematologia.

3 INTRODUCCIÓ

3.1 TRASPLANTAMENT DE PROGENITORS HEMATOPOÈTICS: UNA VISIÓ GENERAL

3.1.1 Breu història del trasplantament de progenitors hematopoètics

3.1.1.1 Trasplantament al·logènic

Els primers intents per tractar pacients amb irradiació corporal total i quimioteràpia seguidament d'un trasplantament de progenitors hematopoètics (TPH) van ser reportats pel grup de Thomas l'any 1957 [1]. Dos anys més tard, el mateix grup va descriure la seva experiència amb dos pacients amb diagnòstic de leucèmia, que van rebre un TPH de medul·la òssia (MO) del seu bessó [2]. Els dos pacients van evidenciar una ràpida recuperació hematològica, però van morir mesos després per recaiguda de la malaltia. Els anys següents, malgrat l'augment de TPH fets, cap dels receptors no va sobreviure a llarg termini i el TPH va esdevenir una teràpia desoladora. Les causes d'aquests pobres resultats van ser que no es va poder determinar el millor donant, així com problemes en la teràpia de suport, la transfusió i la disponibilitat d'antibiòtics, a més del fenomen de la malaltia de l'empelt contra l'hoste (MECH).

No va ser fins a finals dels anys seixanta que es va esdevenir l'era moderna del TPH, amb l'èxit dels resultats de tres nens amb diagnòstic d'immunodeficiència que van rebre un TPH d'MO i sang perifèrica (SP) dels seus germans *human leukocyte antigenic* (HLA) idèntics. Tots tres van mostrar empelt hematològic i curació de la seva malaltia, i van sobreviure fins a l'edat adulta [3-5]. Aquests resultats esperançadors es van consolidar en els anys següents, tal com va demostrar l'equip de trasplantament de Seattle amb els primers 100 pacients (73 amb leucèmia avançada i 37 amb anèmia aplàstica) amb unes supervivències mai vistes anteriorment [6]. De manera addicional, es van produir millores en el tractament de suport del TPH com ara la reducció del risc de sagnat per trombopènia amb la transfusió de plaquetes, l'aparició d'antibiòtics efectius i millores en les estratègies del seu ús per prevenir el risc d'infeccions en la fase d'aplàsia.

Considerant que la recaiguda era la principal causa de fallida del TPH, va ser lògic considerar aquesta teràpia en pacients amb malalties malignes en primera remissió completa, quan la càrrega de la malaltia és relativament baixa i els clons patològics encara no són resistents a altes dosis de radioquimioteràpia. Aquesta observació va millorar enormement els resultats en comparació amb els pacients que rebien un TPH en malalties malignes avançades [7]. Durant aquest temps, van aparèixer nous abordatges per a la prevenció del rebuig de l'empelt i de l'MECH, i el tractament estàndard va ser la combinació de ciclosporina i metotrexat [8, 9].

Un altre esdeveniment crític en la història del trasplantament va ser la fundació del registre Anthony Nolan el 1974, que es va convertir en el primer registre de donants voluntaris i que va fer possible el primer TPH de donant no familiar el 1979 amb diagnòstic de leucèmia aguda, que es va empeltar i va romandre sense malaltia durant dos anys i sense MECH [10]. Aquest fet va donar pas a la creació d'altres registres arreu del món, principalment a finals dels anys vuitanta i principis dels noranta, i des d'aleshores el transport de cèl·lules entre centres de col·lecta (CC) i centres de trasplantament (CT) mitjançant transportistes especialitzats es va convertir en una pràctica diària. Aquesta col·laboració internacional durant les quatre últimes dècades ha resultat en la possibilitat de disposar de més de 32 milions de donants no familiars potencialment disponibles per fer una donació de CPH per TPH. Cal remarcar que aquest augment de donants voluntaris també va ser gràcies a les millores en les tècniques de tipificació de l'HLA, que han anat reemplaçant les tècniques convencionals serològiques.

En la dècada dels noranta, es van descobrir noves fonts de cèl·lules progenitores hematopoètiques (CPH) per al TPH al·logènic. El coneixement que les CPH es troben circulant en la sang, l'arribada dels factors de creixement com els factors estimulants de colònies granulocítiques (G-CSF) i la disponibilitat de tècniques d'afèresi van permetre l'aplicació d'SP per al TPH al·logènic [11-13]. L'altra font important introduïda per Gluckman i col·laboradors va ser l'SCU [14]. La creació posterior dels

bancs de cordó ha permès l'ús ampli d'aquesta font per a pacients, especialment pediàtrics.

En els últims vint anys, els règims d'intensitat reduïda han aconseguit l'ús del TPH al·logènic en pacients d'edat avançada o amb comorbiditats, situacions que prèviament haurien fet descartar la possibilitat d'aquesta teràpia en aquest grup de malalts [15]. A més, l'eliminació de cèl·lules T al·loreactives *in vitro* o *in vivo* amb ciclofosfamida post TPH ha permès controlar l'MECH i emprar donants alternatius com els haploidèntics [16, 17].

3.1.1.2 *Trasplantament autòleg*

El concepte de reemplaçar les CPH dels pacients receptors d'altas dosis de radioteràpia i quimioteràpia mitjançant infusions autòlogues subsegüents es va desenvolupar a mitjans del segle xx. A mesura que els condicionaments esdevenien més complexos i requerien més temps per administrar-los, la congelació de les CPH d'MO va ser la pràctica habitual. Inicialment, es va emprar glicerol per protegir les CPH dels efectes de la congelació i la descongelació, que va ser substituït amb èxit pel dimetilsulfòxid (DMSO) encara utilitzat avui dia. Els primers malalts sotmesos a TPH autòleg d'MO es van reportar entre els anys 1959 i 1962, aconseguint la restauració de l'hematopoesi i obtenint respostes tumorals de manera transitòria majoritàriament en malalts amb limfoma de Hodgkin (LH) i limfoma no hodgkinià (LNH) [18-21].

Igual que amb el TPH al·logènic, a la dècada dels noranta l'ús de procediments d'afèresi va permetre l'èxit del TPH autòleg d'SP, inicialment aprofitant el repunt de CPH a la circulació després de l'administració de quimioteràpia en els pacients [22, 23]. No obstant això, el progrés més important es va esdevenir amb l'arribada del G-CSF [24-26], que es va convertir en la pràctica actual. Dos assajos clínics que van comparar la font d'MO respecte de l'SP en el TPH autòleg per a malalts amb limfoma van demostrar la superioritat de l'SP en menys morbimortalitat per la ràpida recuperació hemoperifèrica [27, 28].

Els anys següents, l'ús del TPH autòleg en el càncer de mama va representar el 40 % del total de processos. No obstant això, la revelació de frau científic en les publicacions d'assajos clínics que reportaven benefici va provocar la dramàtica reducció d'aquesta teràpia en el càncer de mama [29, 30]. Finalment, els principals avenços produïts en els últims vint anys han estat millors en els règims de condicionament, així com en els esforços post TPH autòleg per consolidar les respostes.

3.1.2 Generalitats del trasplantament de progenitors hematopoètics

No és l'objectiu d'aquesta tesi doctoral aprofundir en el coneixement biològic o clínic dels aspectes del TPH. No obstant això, és imprescindible aportar una visió global i detallar alguns aspectes concrets del procediment del TPH per a una correcta comprensió del present treball d'investigació.

3.1.2.1 Objectius

Tot TPH persegueix un dels objectius següents:

1. Permetre l'administració de quimioteràpia a dosis elevades per eliminar la malaltia, per evitar una mielosupressió perllongada o irreversible mitjançant l'administració de CPH del pacient (TPH autòleg). En molts casos, aquest rescat hematopoètic té una finalitat curativa com en els limfomes, però en altres malalties com el mieloma múltiple (MM) s'aplica per millorar i allargar la resposta a tractaments previs.
2. Substituir una determinada població cel·lular derivada de la cèl·lula mare de l'hematopoesi, perquè és totalment o parcialment defectuosa, insuficient o bé neoplàsica, per una de normal procedent d'un donant sa (TPH al·logènic). Aquesta modalitat de TPH es beneficia de l'activitat de l'empelt contra el tumor [31].

Avui en dia el TPH autòleg s'està emprant també amb altres dues finalitats:

Progenitors hematopoètics de sang perifèrica: característiques del producte que impacten en el receptor i en els controls de qualitat del processament

1. Induir una immunosupressió més profunda i duradora que permeti eliminar les cèl·lules que identifiquen tant cèl·lules pròpies com estranyes (malaltia autoimmunitària).

2. Frenar el dipòsit i afavorir l'eliminació d'immunoglobulines i altres substàncies responsables de manifestacions clíniques de diverses discràsies de cèl·lules plasmàtiques (amiloïdosi, síndrome POEMS, entre d'altres).

3.1.2.2 Tipus

Des d'un punt de vista immunològic, hi ha tres tipus de TPH: (1) al·logènic, en el qual es fa servir una persona diferent del pacient com a donant (familiar o no emparentat); (2) singènic, com un cas especial en el qual el pacient i el donant són idèntics, i (3) autòleg, en el qual el mateix pacient rep un producte col·lectat prèviament.

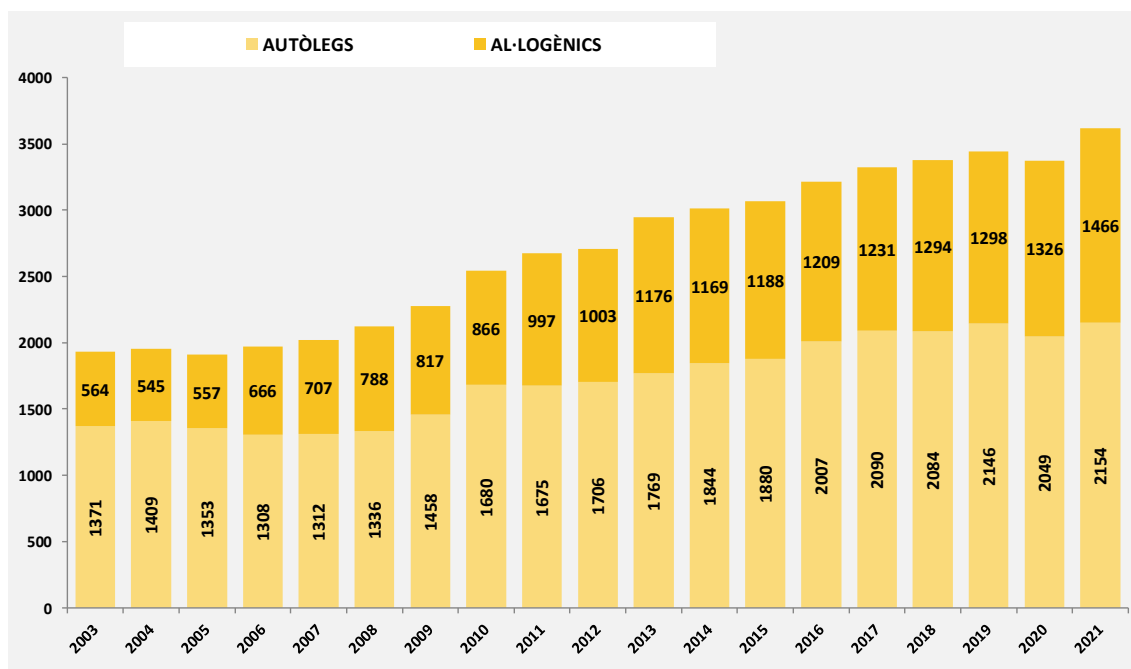


Figura 1. Trasplantament de progenitors hematopoètics a Espanya entre els anys 2013 i 2021 en funció del tipus de donant. Font: memòries anuals de l'Organización Nacional de Trasplantes (ONT), per cortesia de Dolores Hernández.

En funció de la font de les CPH, podem diferenciar:

— MO: en el passat, va ser la font més utilitzada. Conté un nombre mixt de cèl·lules hematopoètiques madures i immadures (incloent-hi les progenitores). L'MO es col·lecta a través de múltiples punxions a la cresta ilíaca per extreure entre 10 i 20 ml/kg de pes per aconseguir un objectiu de $2-5 \times 10^8$ CN/kg de pes del receptor. Els seus principals avantatges són els següents: (1) és una font rica de CPH i (2) té menys limfòcits que l'SP i, per tant, menys risc d'MECH crònica.

— SP: en les últimes tres dècades ha estat la font que gradualment ha anat substituint l'MO. La mobilització de les CPH al corrent sanguini després de la quimioteràpia o a través dels G-CSF ha estat la causa de l'augment del seu ús. Els seus avantatges són els següents: (1) té un nombre elevat de CPH i (2) i té un nombre elevat de cèl·lules limfoides i, per tant, més efecte de l'empelt contra la leucèmia.

— SCU: s'obté de les gestants en el moment del part. Els seus avantatges són els següents: (1) se'n pot fer un ús immediat donat que està criopreservada i (2) els limfòcits tenen més tolerància immunològica.

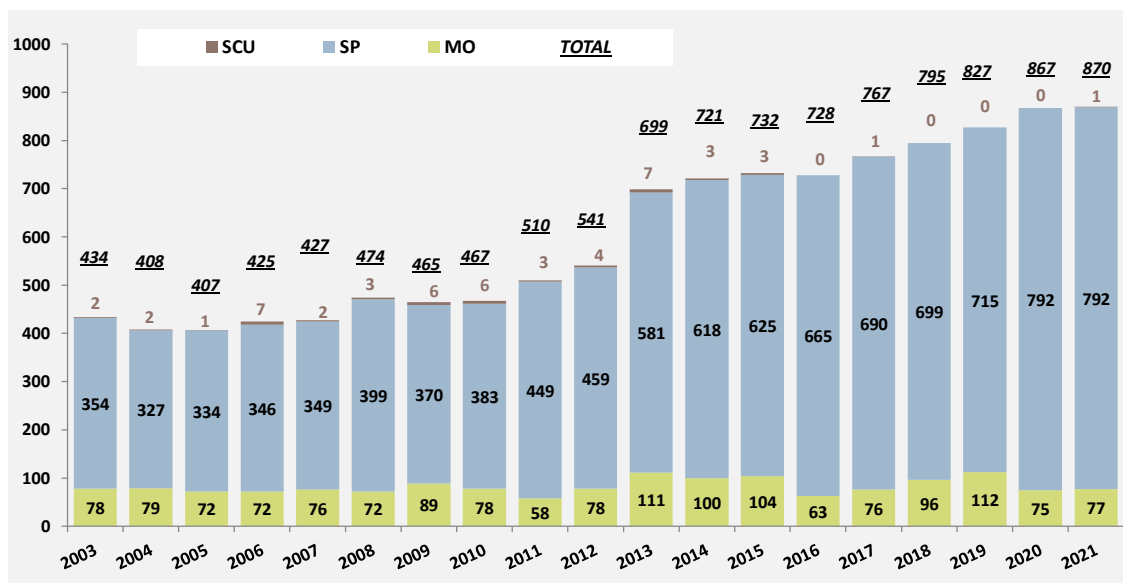


Figura 2. Trasplantaments de progenitors hematopoètics familiars a Espanya des de l'any 2003 fins a l'any 2021 segons la font de cèl·lules progenitores. Font: memòries anuals de l'ONT, per cortesia de Dolores Hernández.

Progenitors hematopoètics de sang perifèrica: característiques del producte que impacten en el receptor i en els controls de qualitat del processament

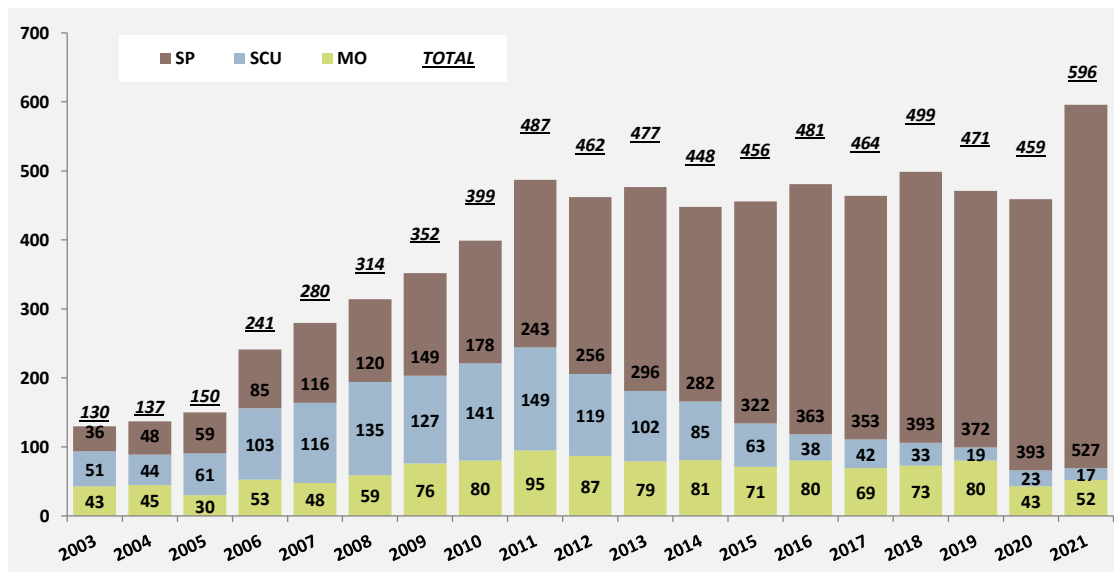


Figura 3. Trasplantaments de progenitors hematopoètics no emparentats a Espanya des de l'any 2003 fins a l'any 2021 segons la font de cèl·lules progenitores. Font: memòries anuals de l'ONT, per cortesia de Dolores Hernández.

3.1.2.3 Règim de condicionament

L'objectiu del condicionament, en funció del tipus de TPH, és el següent:

- Antineoplàstic: eliminar la totalitat o la màxima quantitat possible de malaltia residual. És l'únic objectiu en el TPH autòleg.
- Immunosupressor: suprimir la immunitat del receptor per evitar el rebuig de les cèl·lules administrades. S'aplica en el TPH al·logènic.

El règim de condicionament consisteix en agents selectius (fàrmacs i/o radioteràpia) pel fet de ser actius contra la malaltia a tractar. Aquests agents han anat evolucionant al llarg dels anys per disminuir toxicitats com la malaltia venooclusiva hepàtica, la pneumonitis intersticial, la mucositis i la cistitis hemorràgica. En el cas del condicionament per al TPH al·logènic, pocs agents tenen la capacitat d'immunosuprimir i actuar contra el tumor, per això la ciclofosfamida i la irradiació corporal total són els més utilitzats històricament. Posteriorment, l'aparició de fàrmacs amb una gran activitat immunosupressora, però menys tòxics, com són els anàlegs de les purines i els anticossos antilimfòcits T com la timoglobulina, ha fet

augmentar els agents efectius per al condicionament. Addicionalment, els esforços en règims de condicionament d'intensitat reduïda, que emfatitzen l'efecte antitumoral de les cèl·lules del donant, han donat pas a noves estratègies de condicionament.

La selecció del tipus de condicionament ve donada per diferents factors: (1) tipus de malaltia, (2) estat de la malaltia, (3) estat general del pacient, (4) tractament previs, (5) risc de fallida d'empelt, (6) experiència del centre, (8) inclusió de radioteràpia o només quimioteràpia i (9) tipus d'intensitat.

3.1.2.4 *Immunosupressió*

El tractament d'immunosupressió en el TPH al·logènic té dos objectius:

1. Afavorir l'empelt de les cèl·lules.
2. Evitar l'MECH, principal responsable de la morbidimortalitat del TPH al·logènic i de comprometre la qualitat de vida dels pacients.

El fonament de la immunosupressió és disminuir l'alloreactivitat a diferents nivells de la resposta limfocitària, des de la presentació antigènica fins a l'activació limfocitària i la proliferació cel·lular. Els fàrmacs emprats són els corticoides, els inhibidors de la calcineurina, els inhibidors de la diana de la rapamicina en mamífers (mTOR), els fàrmacs antiproliferatius, la ciclofosfamida post TPH i els anticossos anticèl·lules T. En general, la immunosupressió es va retirant de manera gradual, amb l'objectiu de discontinuar-la al cap de sis mesos, tret que aparegui l'MECH i sigui necessària la seva continuació. En els últims anys, la millora dels fàrmacs immunosupressors han contribuït a les millores en els resultats del TPH.

3.1.2.5 *Indicació del trasplantament de progenitors hematopoètics*

El TPH al·logènic és una opció terapèutica principalment per a pacients amb diagnòstic de leucèmia, síndrome mielodisplàstica o aplàsia medul·lar. En malalts

amb leucèmia aguda mieloblàstica o limfoblàstica, el TPH al·logènic es considera quan la leucèmia no ha respost a la quimioteràpia d'inducció o ha recaigut després del primer tractament. No obstant això, en algunes situacions de mal pronòstic es pot fer el TPH en primera remissió completa. En el cas de la síndrome mielodisplàstica, es considera el TPH al·logènic quan hi ha un excés de blasts, anomalies citogenètiques de mal pronòstic o citopènies multilínia. Els pacients amb aplàsia medul·lar amb un donant d'HLA idèntic familiar es consideren tributaris d'un TPH al·logènic. Altres malalties mieloproliferatives, l'anèmia de cèl·lules falciformes, talassèmies i altres malalties hematològiques greus poden ser considerades candidates a trasplantament al·logènic [32].

El TPH autòleg és una opció terapèutica per a pacients amb diagnòstic d'MM i limfoma. En malalts amb MM s'ha demostrat que el TPH confereix una millora de la supervivència i redueix la càrrega de la malaltia després d'un cicle inicial de quimioteràpia. En pacients amb diagnòstic de limfoma agressiu, el TPH autòleg es considera davant de la recaiguda, tot i que en alguns casos molt agressius es pot considerar en primera remissió completa. Altres malalties com el neuroblastoma, l'LH recurrent o refractari, l'LNH de baix grau recurrent i altres tumors sòlids són considerades també tributàries d'un TPH autòleg. En malalties com l'LH, el trasplantament pot ser fins i tot curatiu. Finalment, la indicació de TPH en malalties autoimmunitàries com l'esclerosi múltiple, entre d'altres, està en augment en les últimes dues dècades [32].

3.1.2.6 Malaltia de l'empelt contra l'hoste

L'MECH és la principal complicació del TPH al·logènic. La seva base està en les cèl·lules immunocompetents del producte infós que no són rebutjades pel receptor i que reconeixen antígens no presents en el donant. Per al seu desenvolupament s'han de complir les condicions següents:

1. El producte ha de contenir cèl·lules immunocompetents.

2. El receptor ha de tenir al·loantígens que siguin diferents dels del donant.
3. El receptor ha de ser incapaç de produir una resposta immunitària contra l'empelt.

Malgrat la millora dels fàrmacs immunosupressors, aquesta complicació continua apareixent en un 30-50 % dels pacients, en funció del tipus de donant i la disparitat d'HLA. La seva presentació clínica és variable i pot afectar múltiples òrgans i teixits, com ara els ulls, la mucosa oral i genital, la pell, el pulmó o el fetge. Els pacients amb MECH se subclassifiquen en funció del moment de presentació i de les característiques:

— MECH aguda clàssica: signes i/o símptomes característics de l'MECH aguda que apareixen en els cent primers dies posteriors al TPH en absència de característiques d'MECH crònica.

— MECH aguda persistent, recurrent i d'inici tardà: MECH aguda d'aparició posterior als 100 dies en absència de característiques de l'MECH crònica.

— MECH crònica clàssica: les característiques de l'MECH crònica són presents independentment del temps d'aparició després del TPH.

— Síndrome de superposició: coexisteixen característiques de les MECH aguda i crònica.

3.2 CÈL·LULES PROGENITORES HEMATOPOÈTIQUES DE SANG PERIFÈRICA

Les CPH es donen a totes les cèl·lules hematopoètiques (leucòcits, hematies i plaquetes) i de la línia limfoide. Aquestes cèl·lules multipotents poden migrar, autoregenerar-se, proliferar i diferenciar-se en un ampli espectre de llinatges fenotípics. L'antigen CD34 és una glicoproteïna present en la superfície de les CPH i és molt útil per identificar, quantificar i purificar aquesta població progenitora.

La presència de CPH a l'SP va ser reportada inicialment el 1909 per Alexander Maximov [33]. No obstant això, no va ser fins al descobriment del G-CSF i d'altres citocines que es va aconseguir un increment substancial de cèl·lules CD34+ en el corrent sanguini [24, 25], inicialment en donants autòlegs i, cinc o sis anys més tard, en donants al·logènics. En l'actualitat, més d'un 80 % dels TPH al·logènics a Europa són fets amb CPH d'SP en comptes d'MO, així com pràcticament el 100 % dels trasplantaments autòlegs [34].



EBMT Activity Survey in 2020:

Donor type and stem cell source: all transplants

Donor Type	BM	PBSC	Cord	Total
HLA -is sibling	1,169	4,070	36	5,275
Haplo-identical	667	3,123	n.a.	3,790
Other family	87	195	11	293
Syngeneic	n.a.	n.a.	n.a.	24
Unrelated	888	8,228	298	9,414
Allogeneic	2,811	15,616	345	18,796
Autologous	57	26,510	1	26,568

Taula 1. Enquesta d'activitat del European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) del 2020. Tipus de donant i font de les cèl·lules progenitores hematopoètiques (CPH): tots els trasplantaments de progenitors hematopoètics (TPH). Font: EBMT [34].

3.2.1 Mobilització

El microambient hematopoètic té un paper important en el manteniment i la proliferació de les CPH. Les CPH expressen molècules d'adhesió, incloent-hi receptors com el CXCR4 i el CXCR2. Per altra banda, les cèl·lules estromals de l'MO presenten lligands d'aquestes molècules d'adhesió de les CPH, garantint d'aquesta manera el manteniment de les CPH en l'estroma medul·lar (figura 5). Addicionalment, altres molècules com la VLA-4 preserven les CPH de l'apoptosi, les manté en quiescència i les preserva en un estat indiferenciat.

Hi ha principalment dues estratègies per a la mobilització de CPH de l'MO al corrent sanguini per a la seva recol·lecció. Aquestes es basen en l'ús o no de quimioteràpia:

— Mobilització sense quimioteràpia: l'única citocina recomanada per a la mobilització de CPH és el G-CSF. Aquest produeix una hiperplàsia medul·lar i l'alliberament de cèl·lules CD34+ al corrent sanguini a través de l'escissió proteolítica de molècules d'adhesió [35] (figura 2). La dosi recomanada de G-CSF és de 10 µg/kg/dia, subcutània, durant 5-7 dies consecutius, fent la leucafèresi habitualment el dia +5 quan hi ha > 8-10 CD34/µl en l'SP. Aquest tipus de mobilització té una relativa baixa toxicitat, una bona predicció del dia de la leucafèresi i una administració del G-CSF domiciliària. Per contra, hi ha una variabilitat en el fracàs de mobilització i menys rendiment de cèl·lules CD34+ en comparació a l'abordatge amb quimioteràpia.

— Mobilització amb quimioteràpia: l'ús de fàrmacs citotòxics en combinació amb G-CSF és l'estratègia preferida en els pacients que requereixen un descens de la càrrega de la malaltia i la necessitat d'aconseguir una gran quantitat de CPH. L'elecció del tipus de quimioteràpia depèn de les característiques de la malaltia del pacient i dels protocols locals de cada centre. Alguns exemples són la ciclofosfamida 2-4/m², l'R-DHAP o l'R-ICE. Habitualment, l'inici del G-CSF és entre el primer i el cinquè dia després de finalitzar la quimioteràpia. El principal avantatge en comparació a la mobilització sense quimioteràpia, a part de la disminució de la càrrega de la malaltia, és el rendiment més important de cèl·lules CD34+ col·lectades [36]. Per contra, pot haver-hi toxicitat relacionada amb la quimioteràpia i requereix habitualment hospitalització, per tant, un cost més elevat. A més, a vegades és difícil predir el pic de cèl·lules CD34+, per això es requereixen controls diaris per determinar el dia de la leucafèresi.

Progenitors hematopoètics de sang perifèrica: característiques del producte que impacten en el receptor i en els controls de qualitat del processament

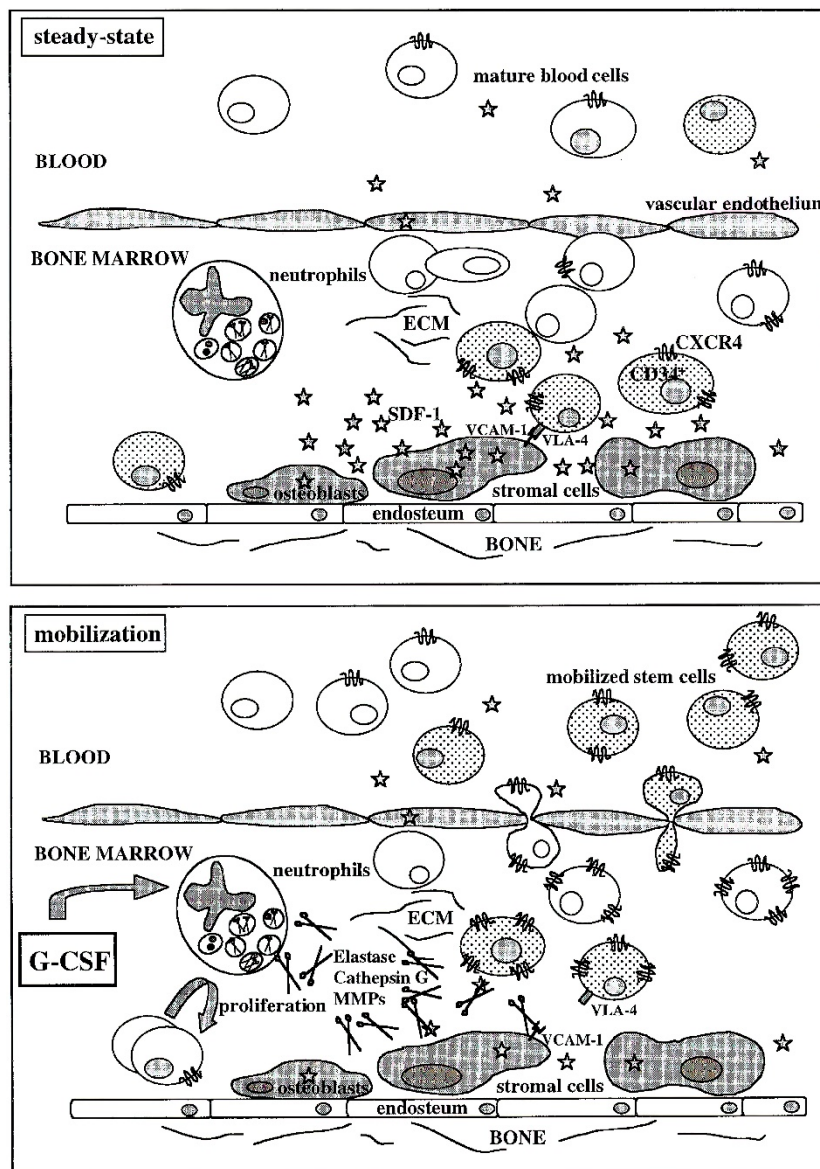


Figura 4. Un model de la mobilització amb G-CSF. En un estat estable (imatge superior), les CPH es localitzen prop de les cèl·lules estromals. Aquestes són retingudes mitjançant molècules d'adhesió com la VCAM-1/VLA-4 i a través de la interacció d'SDF-1 i CXCR4. Durant la mobilització (imatge inferior), el G-CSF induïx la proliferació cel·lular i l'alliberament de proteases de neutròfils (elastasa, catepsina G i metal·loproteases de matriu), les quals participen en la sortida cel·lular mitjançant la degradació dels senyals de retenció (VCAM-1 i SDF-1) i la remodelació de la matriu extracel·lular. La regulació del CXCR4 en les cèl·lules de l'MO durant la mobilització amb el G-CSF suggereix una participació activa de la interacció d'SDF-1 i CXCR4 en la migració de les cèl·lules cap al corrent sanguini. Font: Lapidot T i Petit I [35].

3.2.2 Objectiu cel·lular a recollir

Fins avui, la determinació de les cèl·lules CD34+ en el producte mobilitzat és el paràmetre de qualitat més important i l'únic predictor d'èxit en el TPH autòleg

[37]. La quantitat mínima acceptada de cèl·lules CD34+ per quilogram per procedir a un TPH autòleg és de 2×10^6 CD34+/kg [36]. No obstant això, dosis més altes de $4-5 \times 10^6$ CD34+/kg s'associen a una recuperació hemoperifèrica més alta i menys temps d'hospitalització [39, 40]. En el TPH al·logènic, la quantitat mínima a col·lectar més acceptada és de $4-5 \times 10^6$ CD34+/kg del receptor, tot i que dosis inferiors també han demostrat empelt [41].

En un 15% dels pacients que es mobilitzen per a un TPH autòleg, aquests no aconsegueixen arribar als 2×10^6 CD34+/kg col·lectats o no arriben a tenir 10-20 CD34+/ μ l a l'SP, cosa que es considera una fallida de mobilització [42]. En aquests casos, s'hauria de valorar l'ús de plerixafor en dosis de 0,24 mg/kg subcutanis. Aquest fàrmac actua com a inhibidor reversible del receptor de citocines de la cèl·lula CD34+, el receptor 4 de citocines (CXCR4), que condueix a una mobilització ràpida de les CPH al corrent sanguini [43, 44] (figura 3). Aquest fàrmac no només augmenta el nombre de cèl·lules CD34+ positives, sinó també altres poblacions cel·lulars com el CD19+ i limfòcits T i NK [45], tot i que això no sembla que tingui una traducció clínica en relació amb la recuperació hemoperifèrica.

Progenitors hematopoètics de sang perifèrica: característiques del producte que impacten en el receptor i en els controls de qualitat del processament

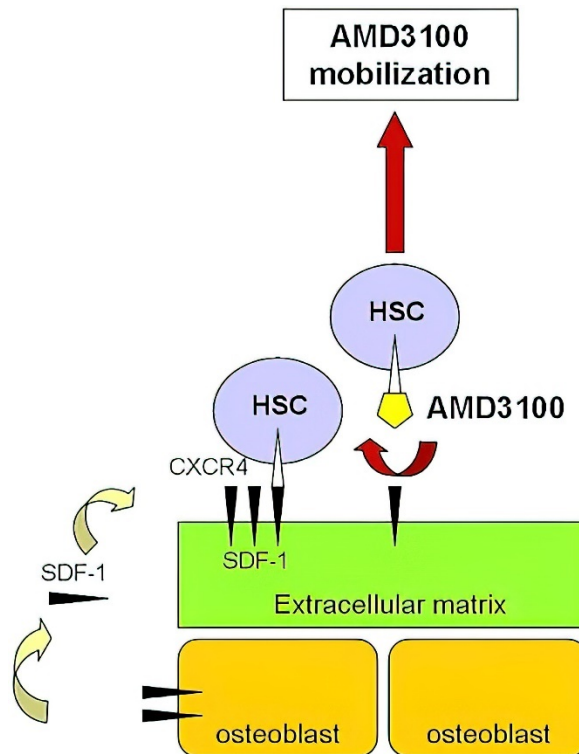


Figura 5. Mobilització de CPH amb plerixafor. Factor 1 derivat de les cèl·lules estromals (SDF-1) secretat per les cèl·lules estromals, que retenen les CPH via SDF-1/CXCR4 interaccionant amb l'estroma medul·lar. El plerixafor (AMD3100, actualment Mozobil) interfereix en aquesta interacció unint-se directament amb el CXCR4 i, a conseqüència d'això, allibera CPH al corrent sanguini. Font: Nervi B et al. [44].

3.2.3 Leucafèresi

La leucafèresi (recollida de leucòcits) es fa mitjançant centrifugació, que per gravetat específica separa els components cel·lulars. En aplicar la força centrífuga, les hematies (component cel·lular més dens) se situen a la part més externa del bol o canal, i el plasma (component amb menys densitat) se situa a la part més interna. Entremig, en ordre de més a menys densitat, se situen els granulòcits, les cèl·lules mononucleades (CMN) i les plaquetes. En la fracció de CMN es troben els limfòcits, els monòcits i les CPH (figura 7).

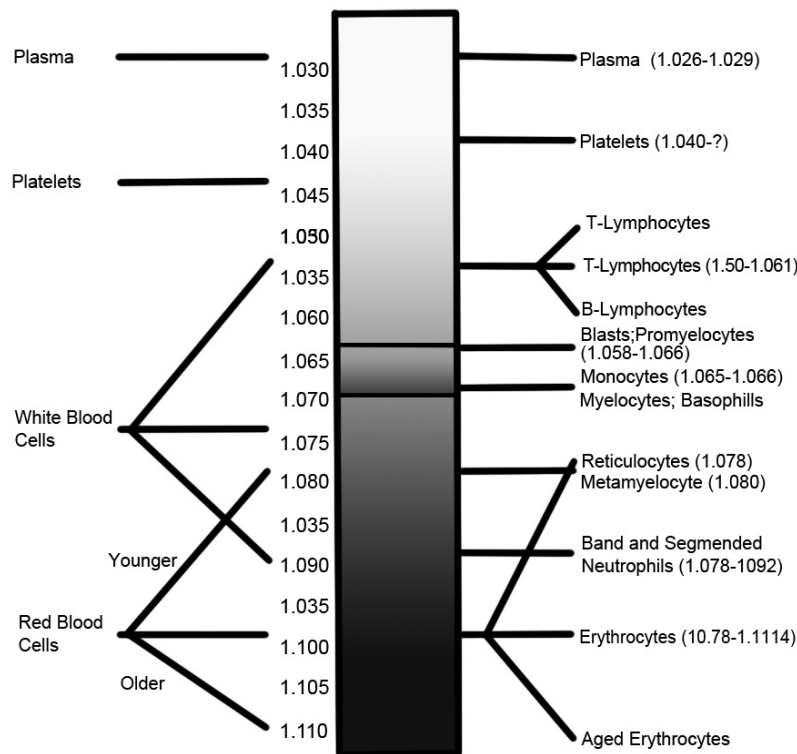


Figura 6. Gravetat específica de les cèl·lules sanguínies. Font: Moog R [46].

Hi ha diferents instruments de leucafèresi en el mercat emprats per a la recollida de CPH en SP. Aquests difereixen en les especificacions del maquinari, les tecnologies de separació, els kits, els requisits de volum extracorpori i els nivells d'automatització [46]. En el camp de l'afèresi, els separadors cel·lulars es classifiquen en funció de si funcionen amb un flux intermitent o continu. Els aparells amb flux discontinu disposen d'una cambra que fins que no s'omple de sang del donant no fa la separació dels components cel·lulars. En canvi, en els dispositius amb flux continu la separació es duu a terme de manera continuada. La primera recollida en SP va ser feta amb el separador cel·lular Baxter CS 3000 (Baxter, Deerfield, Illinois, EUA), de flux continu, i l'Haemonetics M30 o V50 (Haemonetics, Braintree, Massachusetts, EUA), de flux discontinu. Els aparells de flux discontinu permeten la unipunció, són aparells més petits i portàtils, i la separació es fa en un bol de Latham (125 ml). La seva limitació és que es pot processar una quantitat de sang petita i, per tant, el rendiment de recollida de cèl·lules CD34+ és baix [46]. Posteriorment, van aparèixer dispositius totalment computats de flux continu com el CS 3000 Plus (Baxter, Deerfield, Illinois, EUA) i semiautomatitzats de flux continu que funcionen amb fases cíclics de

separació amb una cambra com Amicus i COM.TEC (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Alemanya). El nou model de la COBE Spectra, Spectra Optia (CaridianBCT, Lakewood, Colorado, EUA), és un altre aparell de flux continu que adapta la centrifugació automàticament a la velocitat d'entrada de la sang i de l'hematòcrit, permet altes velocitats d'entrada i aconseguir processar grans volums de sang amb un producte final del 2-4 %. L'eficiència en la col·lecta de CD34+ és similar entre els aparells Amicus i Spectra Optia, els models més emprats actualment, però aquesta última col·lecta més plaquetes en el producte, cosa que produeix un descens superior de la xifra de plaquetes en el comptatge després del procés [46].

El comptatge de cèl·lules CD34+ previ a la leucafèresi és el millor predictor de rendiment de CPH recol·lectades, particularment quan el valor és superior a 10-20 cèl·lules CD34+/ μ l (figura 8). La durada del procés de recol·lecció no sol excedir les 5-7 hores i és més efectiva en processar grans volums (4-5 vegades el volum total del donant) [47]. No obstant això, aquest procés de leucafèresi requereix anticoagular la sang que entra en el dispositiu, ja sigui amb solució anticoagulant de citrat i dextrosa amb fórmula A (ACD-A) com a solució única o en combinació amb heparina en funció de la política de cada centre. L'avantatge de la combinació d'ACD-A i heparina és la minimització d'efectes adversos per hipocalcèmia en leucafèresis de grans volums.

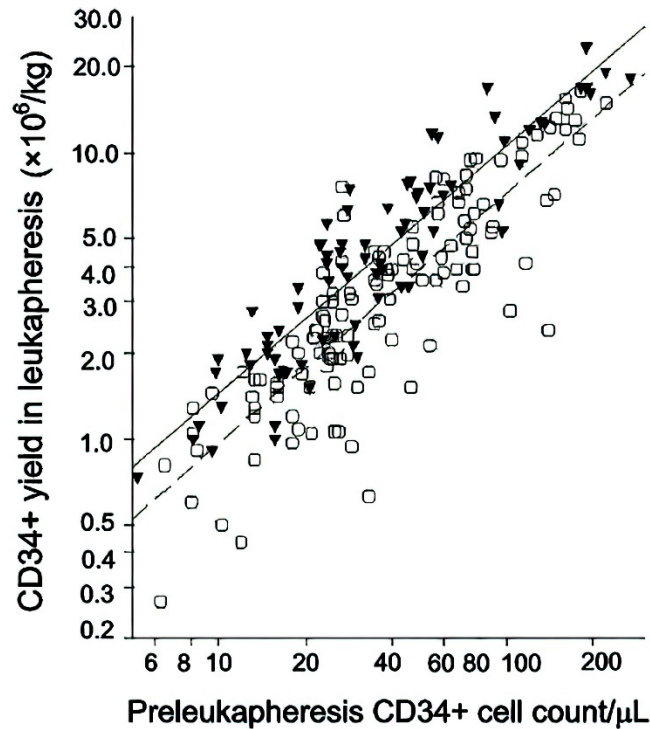


Figura 7. Relació entre el comptatge de cèl·lules CD34+ previ a la leucafèresi i la quantitat de cèl·lules CD34+ recollides. □: 125 col·leccions de no gran volum processat. ▼: 82 col·leccions de gran volum processat. Relació significativa per anàlisi de regressió lineal per a tots dos grups ($r^2 = 0,75$, $P < 0,001$; $r^2 = 0,84$, $P < 0,001$). Font: Abrahamsen JF *et al.* [47].

3.3 PROCESSAMENT CEL·LULAR

El progrés d'un producte de teràpia cel·lular des del donant, a través del laboratori, fins al pacient és representat en la figura 9. Inicialment, hi ha una avaluació de la idoneïtat i l'elegibilitat del donant per procedir a la leucafèresi. Un cop feta la recollida de les CPH en les instal·lacions de la unitat de col·lecta, aquestes han de ser transportades en estat líquid al laboratori de processament sota condicions controlades. El nivell de control i els requisits del transport depenen de la distància, les condicions externes i el temps. Els productes han d'arribar a la seva destinació etiquetats correctament i acompanyats de la informació requerida (com a mínim, serologies i la declaració d'elegibilitat, en cas de TPH al·logènica). El sistema ISBT 128 per a l'etiquetatge de productes de teràpia cel·lular és el sistema més acceptat internacionalment. La informació mínima que ha de constar és la identificació del donant, el pacient, la instal·lació que ha fet la col·lecta, el tipus de producte, la data i l'hora de la col·lecta i la caducitat, així com un número únic de donació per traçar el

producte des de la col·lecta fins a la seva disposició final. Un cop es rep el producte en el laboratori, s'avalua la qualitat inicial del producte (contingut cel·lular, viabilitat, funcionalitat i esterilitat). Seguidament, es procedeix a la manipulació del producte. Aquestes manipulacions poden ser simples o complexes. Les manipulacions simples separen diferents tipus cel·lulars i els seus components a través de les seves propietats físiques, com ara la mida i la densitat, però retenint la funcionalitat natural de les cèl·lules. Els processaments simples inclouen la criopreservació (procediment més emprat), la selecció cel·lular i la reducció de plasma, entre d'altres, que es descriuen més endavant en aquest capítol. Els processaments complexos són una manipulació més que mínima. Aquestes manipulacions separen els tipus cel·lulars pels seus marcadors de superfícies únics i característiques biològiques. Aquestes inclouen l'expansió *ex vivo*, la generació de cèl·lules dendrítiques i la teràpia cel·lular adoptiva amb limfòcits T específics, entre d'altres, i converteix el producte de teràpia cel·lular en un medicament des del punt de vista regulatori. Un cop s'ha manipulat el producte, aquest pot quedar emmagatzemat durant anys a temperatures criogèniques si ha estat criopreservat, o de manera temporal (com a màxim tres dies fins a la seva administració) en un estat líquid a temperatura refrigerada. Abans de fer la distribució del producte per infondre'l al pacient, cal avaluar la qualitat del producte i garantir el compliment dels criteris d'alliberament o acceptació. Els laboratoris de processament han millorat aquests controls de qualitat, que garanteixen el compliment dels estàndards i les regulacions. Aquests estan destinats a documentar-ne la seguretat, la potència i l'eficàcia. Finalment, els productes de teràpia cel·lular són distribuïts per administrar-los al pacient, ja sigui descongelant el producte o administrant-lo en fresc directament.

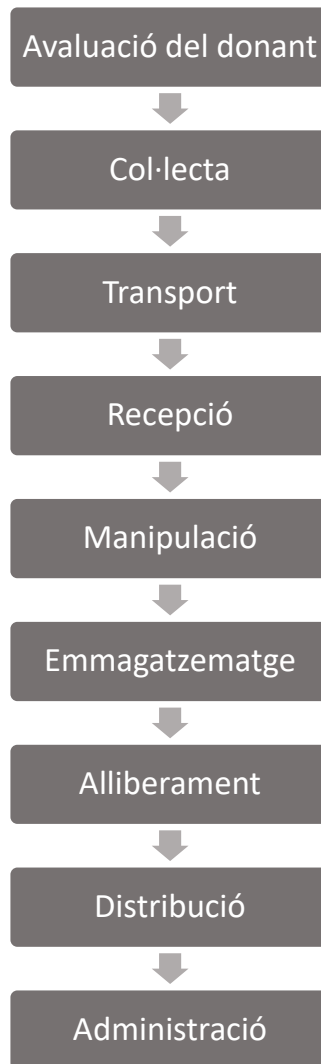


Figura 8. Flux general de la donació de CPH fins a l'administració al pacient passant per totes les etapes intermèdies. Tot aquest flux general és supervisat per organismes acreditadors com la Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy (FACT), la International Society for Cellular Therapy (ISCT), la European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) i el Joint Accreditation Committee ISCT-Europe & EBMT (JACIE), i és regulat per les legislacions i les autoritats competents corresponents.

3.3.1 Manipulacions mínimes

La manipulació de les CPH està destinada a facilitar les condicions apropiades per a l'administració al pacient. Aquests processaments cel·lulars no han d'afectar les propietats biològiques de les CPH obtingudes, les quals han de repoblar el teixit hematopoètic i establir un quimerisme en els receptors d'un TPH al·logènic. Les principals manipulacions fetes per al TPH són:

— Reducció de volum: com a preparació prèvia a la congelació per reduir el volum dels productes i, per tant, el volum de solució de criopreservació, per evitar efectes adversos per sobrecàrrega de volum (< 20 ml/kg del pacient) o per minimitzar l'hemòlisi per incompatibilitat ABO menor (anticossos anti-ABO del donant enfront del receptor). La recuperació de cèl·lules nucleades és alta, pràcticament del 100 % [48].

— Depleció d'hematies: per evitar reaccions adverses a la infusió per a l'hemòlisi davant d'incompatibilitat ABO major (anticossos del receptor anti-ABO enfront del donant). Aquesta manipulació es fa principalment en la font d'MO mitjançant l'obtenció de la capa leucoplaquetària o *buffy coat* per centrifugació (manual o automatitzada). L'aïllament de CMN també es pot fer amb l'addició de Ficoll, que permet més purificació de CPH; per contra, presenta menys recuperació. L'objectiu final d'aquest procés és un contingut inferior de 20-25 ml d'hematies ABO incompatibles. Habitualment se sol retenir el 80-90 % de les cèl·lules nucleades del producte inicial amb els separadors cel·lulars actuals [48].

— Criopreservació: és la manipulació més emprada en un laboratori de processament cel·lular. Permet emprar un producte de teràpia cel·lular durant mesos, i fins i tot anys, després de la seva obtenció garantint la cel·lularitat i la funcionalitat de les CPH. La viabilitat esperada després de la descongelació sol ser superior al 70 %, amb un requisit mínim del 50 % per poder fer l'alliberament del producte [48].

— Rentat: per evitar efectes adversos a la infusió davant de productes descongelats per la presència de detritus cel·lulars en el plasma per excés de cèl·lules nucleades o per excés de dimetilsulfòxid (DMSO). També es duu a terme aquest procés en situacions de reaccions al·lèrgiques greus. La recuperació esperada de cèl·lules nucleades, igual que en la depleció d'hematies, sol ser superior al 80 % [48].

Aquests tipus de processaments cel·lulars s'han de dur a terme en instal·lacions adequades amb controls microbiològics i ambientals (temperatura, ventilació, filtració) i amb una neteja i una desinfecció validades. Donat que la manipulació

comporta en certs passos l'exposició ambiental, aquesta s'ha de fer en cabines biològiques de flux laminar de grau A en un entorn ambiental almenys equivalent al grau D [49] d'acord amb les normes de bona pràctica de fabricació. L'equipament necessari per al processament cel·lular poden ser des de centrífugues fins a processadors cel·lulars automatitzats basats en centrifugació, elutriació, membrana o acústica [50] (figura 10). La selecció del dispositiu adequat s'ha de basar en els requisits del procés de manipulació i en els avantatges i els desavantatges de cada tecnologia.

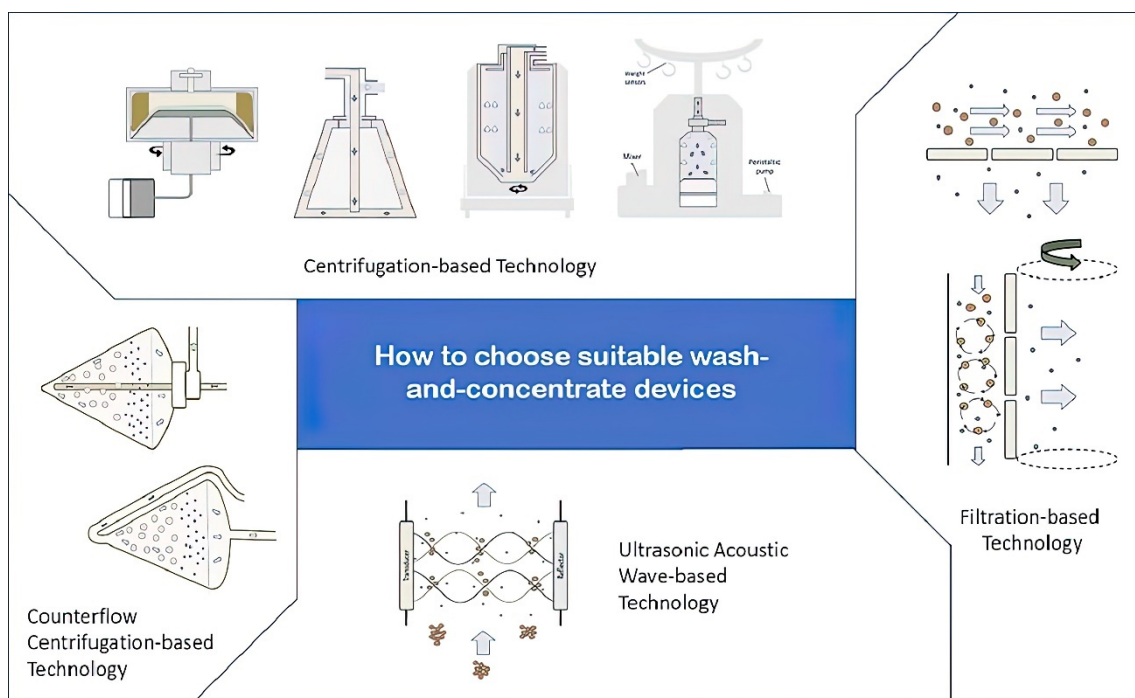


Figura 9. Tecnologies emprades per al processament cel·lular de productes. Font: Li A *et al.* [50].

3.3.2 Criopreservació

La preservació de les CPH inclou tècniques com la refrigeració, que permet l'emmagatzematge a curt termini de les cèl·lules, i la criopreservació, que permet fer-les servir més enllà de les 72 hores i fins i tot anys més tard. La congelació se sol fer idealment dintre de les primeres 24 hores des de la col·lecta. Aquest procés garanteix el manteniment de la qualitat, la potència i l'eficàcia de les cèl·lules a llarg termini. La criopreservació és necessària en el TPH autòleg i pot ser emprada en el TPH al·logènic. Els seus principals avantatges són els següents: (1) permet assegurar una cel·lularitat suficient abans de programar el condicionament del pacient i (2) facilita la logística

del TPH al·logènic, tant per al receptor com per al donant. La congelació també comporta certs riscos, com ara la reducció de la viabilitat i la cel·lularitat dels productes administrats en relació amb els productes en fresc. No obstant això, les cèl·lules CD34+ semblen més resistents als efectes de la criopreservació en comparació a altres cèl·lules nucleades i, per tant, la seva viabilitat és superior a la resta de poblacions cel·lulars [51].

Els dos elements del protocol de la criopreservació són:

1. Introducció de la solució: la solució de criopreservació està composta per tres tipus de components:

(1) Medi isotònic: aquest pot ser plasma autòleg o al·logènic, sèrum salí o solucions electrolítiques comercials com Normosol-R, Ringer lactat o Plasma-Lyte A.

(2) Proteïnes: ajuden a estabilitzar la membrana cel·lular després de la descongelació. La font de proteïnes pot provenir del plasma autòleg o al·logènic o bé de l'albumina al 5 %.

(3) Agents crioprotectors: actuen mitjançant mecanismes. (1) L'addició de molècules orgàniques redueix la concentració de sal a temperatures per sota dels 0 °C, (2) influeixen en el creixement i l'estructura de la formació de gel i (3) poden estabilitzar la membrana. Els crioprotectors es poden classificar com a intracel·lulars (per exemple, glicerol o DMSO) o extracel·lulars (hidroxietil midó o dextran). El més emprat universalment és l'agent crioprotector DMSO. El DMSO al 10 % té una osmolaritat aproximadament de l'1,4 (en comparació a la concentració osmòtica d'una solució isotònica, que en té de 270-300). Això provoca una ràpida sortida d'aigua de les cèl·lules cap a la solució de criopreservació, i aquesta deshidratació és una situació de menys risc de lisi cel·lular en comparació a la rehidratació. Altres agents crioprotectors emprats, en aquests casos extracel·lulars, són l'hidroxietil midó i el dextran. Aquestes macromolècules poden ser emprades de manera combinada amb el DMSO disminuint la quantitat d'aquest últim crioprotector. Aquests polímers

formen una solució viscosa extracel·lular que ajuda a mantenir la viabilitat cel·lular mitjançant la prevenció de la deshidratació cel·lular [52, 53].

2. Ràtio de congelació: la velocitat de congelació influeix de manera significativa en la supervivència postdescongelació de diferents tipus cel·lulars [53]. Aquesta velocitat s'aconsegueix mitjançant congeladors de ràtio controlada (CRC), que majoritàriament funcionen amb nitrogen en fase gasosa que s'allibera en una cambra. La temperatura de la cambra disminueix en el temps segons el protocol programat. La congelació no pot ser massa ràpida, per evitar la formació de cristalls intracel·lulars que trenquin la membrana cel·lular, ni massa lenta, perquè formaria cristalls extracel·lulars i consegüentment s'absorbiria aigua extracel·lular lliure, cosa que causaria una concentració de sals, hiperosmolaritat i una deshidratació cel·lular greu [52]. A continuació, es mostra un exemple de la corba de congelació per al CRC CM2010 disponible al laboratori de teràpia cel·lular (LTC) del Banc de Sang i Teixits (BST) de Barcelona (figura 8).

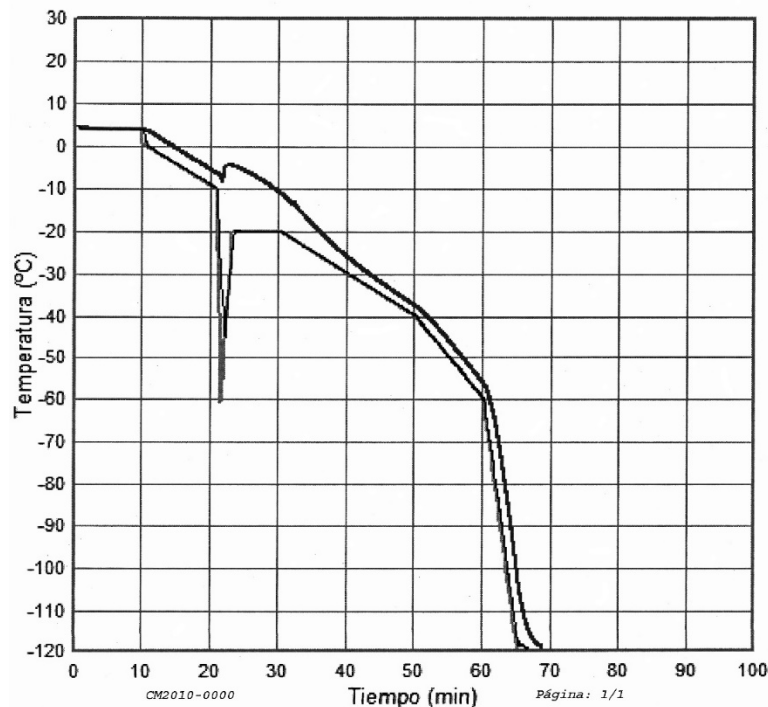


Figura 10. Corba de congelació amb el CRC CM2010. Aquest aparell disposa de dos sensors de temperatura, un situat dintre de la cambra del congelador i l'altre col·locat en una mostra amb solució de criopreservació, simulant d'aquesta manera la temperatura del producte. Font: obtinguda per cortesia del BST de Barcelona.

Aquesta corba de congelació està composta per un primer segment, que és la fase d'equilibri (prerrefredament), que permet a la cambra del CRC equilibrar el producte que s'ha de congelar abans d'iniciar el protocol de congelació. El segon segment, típicament, consisteix en un descens constant de la temperatura ($1^{\circ}\text{C}/\text{min}$). En un punt d'aquest segon segment es forma gel a la solució extracel·lular i s'incrementa la temperatura degut a l'alliberament de calor pel punt de fusió (fase de nucleació). Aquest augment de temperatura és compensat automàticament per un descens ràpid de la temperatura seguit d'un ascens ràpid. El tercer i últim segment consisteix en un refredament més ràpid fins a aconseguir la temperatura final $< -150^{\circ}\text{C}$, temperatura que permet una llarga estabilitat cel·lular.

Per dur a terme el control de qualitat dels productes criopreservats, de manera paral·lela al procés de congelació de les CPH, es criopreserven tubs sentinella o criovials, que es descongelen per a la seva anàlisi i que permeten garantir la seguretat del producte i el seu alliberament. Més endavant es descriuen els controls de qualitat duts a terme en aquestes mostres.

Posteriorment, les CPH criopreservades són descongelades ràpidament a 37°C en 10-15 minuts per minimitzar l'expansió dels cristalls de gel i diluir l'increment de concentració de la solució cel·lular, que poden conduir a la lesió cel·lular. Per aquests motius, els protocols de descongelació ($> 80^{\circ}\text{C}/\text{min}$) són tan crítics com els de congelació. Finalment, un cop descongelat el producte, es procedeix a administrar-lo al pacient en un temps inferior a 30-60 minuts.

S'han descrit reaccions adverses a la infusió relacionades amb el DMSO, habitualment lleus, que inclouen les nàusees i les tremolors, que poden ser controlades amb medicació profilàctica o amb la disminució de la velocitat d'administració [54]. En alguns casos, s'han reportat reaccions greus relacionades amb el DMSO, amb esdeveniments cardiovasculars, neurològics i pulmonars [55-58]. La dosi exacta de toxicitat per DMSO en humans es desconeix, tot i que es recomana que pacients adults i pediàtrics rebin $< 1\text{ g}/\text{kg}$ en un període de 24 hores [59]. Cal destacar que altes dosis de DMSO s'han administrat en contextos fora del trasplantament sense que

se'n detectin efectes adversos. Per tant, tot i que sembla que el DMSO pot associar-se a reaccions adverses, aquestes solen ser lleus i ben tolerades amb el maneig actual. Tot i així, alguns laboratoris de processament cel·lular renten els productes criopreservats abans de la seva administració, no només en situacions especials (> 1 g/kg/dia de DMSO, pacients pediàtrics), sinó de manera rutinària per prevenir el risc de l'administració del DMSO [54]. Hi ha diferents mètodes de rentat, però generalment aquest processament consisteix en l'addició de líquid estèril com ara sèrum salí, albúmina o dextran en el producte, llavors se centrifuga i es retira el sobrenedant. El rentat pot conduir a una certa pèrdua de cel·lularitat, del 10-30 %, a més del consum de temps per al laboratori i el cost i el risc d'oportunitats de contaminació [60, 61]. D'acord amb la literatura disponible, les CPH congelades majoritàriament no requereixen cap rentat si no se supera el límit d'1 g/kg/dia de DMSO.

3.4 CONTROL DE QUALITAT

El control de qualitat permet mesurar, testar i monitorar cadascun dels passos del flux de la donació de CPH fins a l'alliberament per a l'administració en el pacient (figura 6). Els objectius del control de qualitat són els següents:

- Garantir la seguretat de les CPH minimitzant el risc de transmissió de malalties infeccioses.
- Garantir l'eficàcia del producte assegurant un nombre adequat de cèl·lules funcionals per establir l'empelt en el pacient.

Hi ha proves de competència requerides pels laboratoris que determinen els controls de qualitat. Aquestes proves inclouen els comptatges cel·lulars, la viabilitat, els tests d'esterilitat i els tests d'avaluació d'unitats formadores de colònies (UFC).

3.4.1 Tests de seguretat

El primer pas per minimitzar el risc de contaminació microbiològica de les CPH es fa mitjançant l'avaluació de l'elegibilitat del donant. Aquesta consisteix en una entrevista mèdica i una exploració física per descartar malalties infeccioses transmissibles, així com la determinació en SP de marcadors infecciosos [62]. Un cop es fa la col·lecta de les CPH, i després del seu processament cel·lular, cal obtenir mostres del producte per fer tests microbiològics. Si alguna de les dues mostres és positiva, es podrà determinar en quin moment ha ocorregut la contaminació. Aquests tests han de detectar bacteris aeròbics, bacteris anaeròbics i fongs que puguin ser presents en el producte, mitjançant tècniques d'incubació durant un període validat, com a mínim de set dies. Aquests mètodes automatitzats incorporen un sistema d'incubació-detecció computada amb una gran varietat de medis, molts dels quals contenen una substància per inhibir els antibiòtics, que permeten la detecció de creixement microbiològic automàtic. Molts laboratoris de processament fan servir el sistema BACT/ALERT. Aquest mètode no invasiu consisteix en un sensor de detecció del creixement microbiològic a través de la producció de CO₂. Els microorganismes que hi ha en el medi i que alliberen CO₂ alteren el color del recipient i, per tant, és detectat pel sensor. En cas de creixement, es procedeix a la identificació del microorganisme i l'antibiograma.

La limitació d'aquests tests d'incubació és que, en casos de productes en fresc, la detecció de contaminació microbiològica es pot evidenciar després de l'administració del producte, fet que es pot prevenir si un producte es criopreserva. No obstant això, a diferència d'altres substàncies d'origen humà, la contaminació microbiològica de les CPH no sempre comporta el seu rebuig, donat que són productes dirigits i irremplaçables per a un pacient i, per tant, cal avaluar el risc-benefici del seu ús. Aquesta decisió depèn de la susceptibilitat per antibiograma, el tipus de microorganisme, la quantitat de producte disponible i l'estat del pacient, entre altres factors. En els casos en què s'han administrat productes contaminats, no s'han descrit reaccions adverses greus [63].

En el cas de les CPH d'SP, aquestes tenen un risc de contaminació molt baix atès que l'obtenció de les cèl·lules es fa amb equips d'un sol ús amb circuit tancat, a diferència d'altres fonts com l'MO o l'SCU, que poden ser contaminades per microorganismes de la flora cutània com els *Staphylococcus coagulansnegativus* o els *Cutibacterium acnes* [63].

3.4.2 Tests d'identitat

Molts laboratoris de processament cel·lulars fan servir analitzadors hematològics per determinar la concentració cel·lular dels productes, les subpoblacions de la sèrie blanca i el nombre de plaquetes i d'hematies. El nombre cèl·lules nucleades totals (CNT) en combinació amb el nombre de cèl·lules CD34+ és la mesura més estesa per avaluar la qualitat d'un producte col·lectat. Addicionalment, productes amb un percentatge superior de CMN correlacionen amb millors viabilitats després de la descongelació i menys reaccions adverses a la infusió [64]. En relació amb la manipulació de productes, la recuperació de CNT i de CD34+ és imprescindible per avaluar que el procés s'ha dut a terme de manera adequada amb unes recuperacions cel·lulars conformes. En manipulacions com la reducció d'hematies, cal considerar la recuperació de CMN i la reducció d'hematies com a criteris de conformitat donat que formen part de l'objectiu del procés.

El comptatge de cèl·lules CD34+ es determina com a marcador de CPH, ja sigui en SP en individus sotmesos a mobilització com en el producte per garantir una quantitat mínima. La seva determinació, com s'ha comentat anteriorment, és el predictor més reproducible de velocitat d'empelt. La seva determinació es mesura mitjançant citometria de flux, fent servir anticossos monoclonals que reconeixen un epítop o diversos de l'antigen CD34 de la membrana. La International Society for Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) facilita un algorisme robust i reproducible per mesurar les cèl·lules CD34+ d'SP i dels productes d'afèresi a partir dels paràmetres *forward scatter* i *side scatter*, i la intensitat de tinció de les poblacions de CD45+ i CD34+ [65] (figura 9). Actualment, es recomana emprar la plataforma simple per a la determinació de les cèl·lules CD34+.

Progenitors hematopoètics de sang perifèrica: característiques del producte que impacten en el receptor i en els controls de qualitat del processament

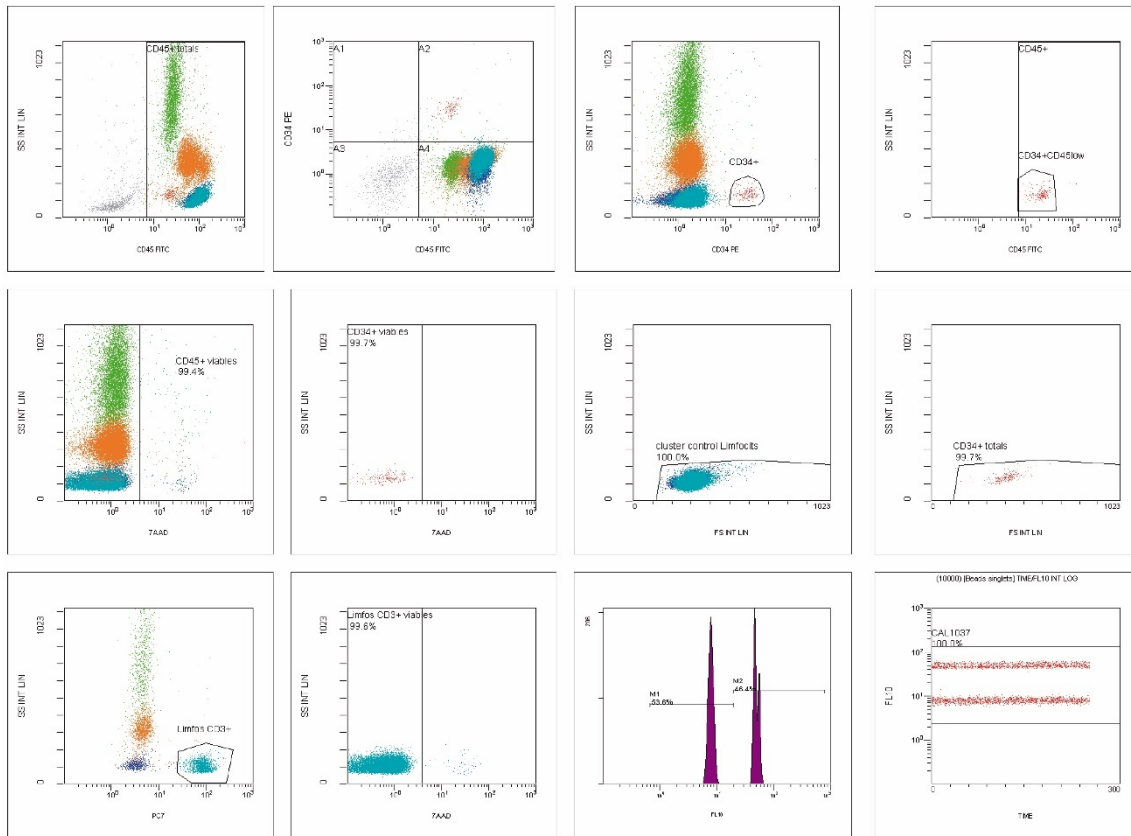


Figura 11. Enumeració de cèl·lules CD34+ en una mostra de leucafèresi mobilitzada utilitzant un protocol basat en la ISHAGE fet mitjançant l'aparell Navios EX pel laboratori cel·lular del BST. La descripció dels diagrames es fa d'esquerra a dreta i de dalt a baix. Diagrama 1: es defineix la regió «CD45+ totals», que determina les cèl·lules CD45+. Diagrama 2: és un diagrama de referència (informatiu), on es defineix el llindar de positivitat per a CD34 i CD45. Diagrama 3: es defineix la regió «CD34+», que determina les cèl·lules CD34+ que tenen una complexitat limfoide. Diagrama 4: es defineix la regió «CD34+CD45^{low}», que determina les cèl·lules CD34+ i que, a més, mostra una baixa expressió per al CD45 (CD45^{low}). Diagrama 5: a partir de les cèl·lules CD45+ totals seleccionades al diagrama 1, es defineix la regió «CD45 viables», que determina les cèl·lules CD45+ que són 7-AAD negatives. Diagrama 6: a partir de les cèl·lules CD34+ totals seleccionades al diagrama 8, es determina la regió «CD34+ viables» (7-AAD negatives). Diagrama 7: defineix la regió «clúster control limfòcits», que determina els paràmetres FS i SS de la població limfoide. Diagrama 8: determinem les cèl·lules CD34+ que tenen una expressió CD45^{low} i que tenen una mida o complexitat limfoide. Diagrama 9: a partir de les cèl·lules CD45+ totals, i seleccionant la població limfoide per a FSC/SSC, es defineix la regió «Limfòcits CD3+». Diagrama 10: a partir de les cèl·lules CD3+, es defineix la regió «Limfòcits CD3 viables», que determina les cèl·lules CD3+ que són 7-AAD negatives. Diagrama 11: es defineixen les dues poblacions (M1 i M2) de les microesferes de recompte, i es verifica que la relació entre les dues poblacions compleix l'especificat en cada lot, que ha de ser aproximadament un 50 % de cadascuna. Diagrama 12: es visualitza l'adquisició de les microesferes de recompte al llarg del temps per confirmar que l'adquisició ha estat estable. Es defineix la regió «CAL», que inclou els singlets de les beads (s'exclouen doblats i detritus) i el seu valor s'utilitza per fer els càlculs de concentració cel·lular. Font: LTC del BST per cortesia de Margarita Codinach.

3.4.3 Tests de viabilitat

Per garantir que les CPH són funcionals i que, per tant, mantenen la seva capacitat de repoblar l'hematopoesi del pacient, cal determinar la viabilitat de les cèl·lules. Aquesta mesura es fa mitjançant la determinació de la integritat física de la membrana cel·lular. En aquest sentit, les cèl·lules necròtiques presenten porus en la membrana que la fan permeable. Hi ha mètodes antics per tinció impermeable, principalment amb blau tripan, que marquen les cèl·lules blanques necròtiques. Mètodes més actuals com la citometria de flux amb 7-aminoactinomicina D (7-AAD), marcador que s'uneix a l'ADN, permeten avaluar la viabilitat en diferents subpoblacions cel·lulars (CD45, CD34, CD3, etc.). La limitació d'aquests tests d'avaluació d'integritat de la membrana és que en els productes cel·lulars és habitual la presència de necrosis, però també d'apoptosi. Aquesta última situació manté la integritat de la membrana i, per tant, requereix altres anàlisis per a la seva determinació.

Aquests mètodes d'avaluació de la viabilitat representen un repte quan s'analitza una mostra descongelada en comparació a una mostra en fresc, donat que poden haver-hi situacions que alteren els seus resultats. Primer de tot, les cèl·lules en descongelar-se es rehidraten i poden, transitòriament, presentar porus a la membrana [66]. De manera semblant, les cèl·lules descongelades experimenten una supressió metabòlica de la seva activitat i se'n demora la recuperació [67]. Finalment, l'estrès de la congelació-descongelació de les CPH s'ha demostrat que pot donar com a resultat una apoptosi cel·lular, en la qual es manté la integritat de la membrana cel·lular [68]. Per tant, en funció del temps després de la descongelació en què es determina la viabilitat, aquesta pot variar.

3.4.4 Tests de potència

Una altra manera d'avaluar la funcionalitat de les CPH és a través de la mesura de les UFC en un medi de metilcel·lulosa suplementat amb factors de creixements específics. Aquest test *ex vivo* permet determinar el nombre i el tipus (vermelles o

blanques) de CPH que són capaces de proliferar i formar colònies *in vitro*. Mesuren el nivell d'activitat biològica o funcional de les CPH i són emprats com a subrogant de l'efecte *in vivo* de les cèl·lules. El resultat de les UFC-granulomacròfagues (GM) pot ser un predictor d'empelt [69]. Aquest test funcional és emprat habitualment en productes per a investigació, en avaluació de programes d'estabilitat, així com per avaluar l'impacte de desviacions o davant de resultats pobres de viabilitats. Tot i que la lectura d'UFC-GM permet disposar d'un valor quantitatiu, la interpretació dels resultats és més aviat qualitativa (creixement, no creixement) com a criteri d'alliberament.

Algunes limitacions d'aquest assaig són les següents: (1) el cost del material, (2) el temps necessari per implementar la tècnica, (3) la dificultat de la interpretació, (4) la necessitat d'entrenament especialitzat, (5) el temps de cultiu (aproximadament 10-14 dies) abans de fer la lectura dels resultats i (6) la variabilitat de resultat entre laboratoris. Per a aquesta última limitació, STEMCELL Technologies ofereix un programa de competència específic per a la determinació d'UFC: altres alternatives a la lectura d'UFC són els mètodes semiautomàtics com el test de potència HALO, que avaluen l'activitat proliferativa a partir de la generació d'adenosinatrifosfat (ATP) [70].

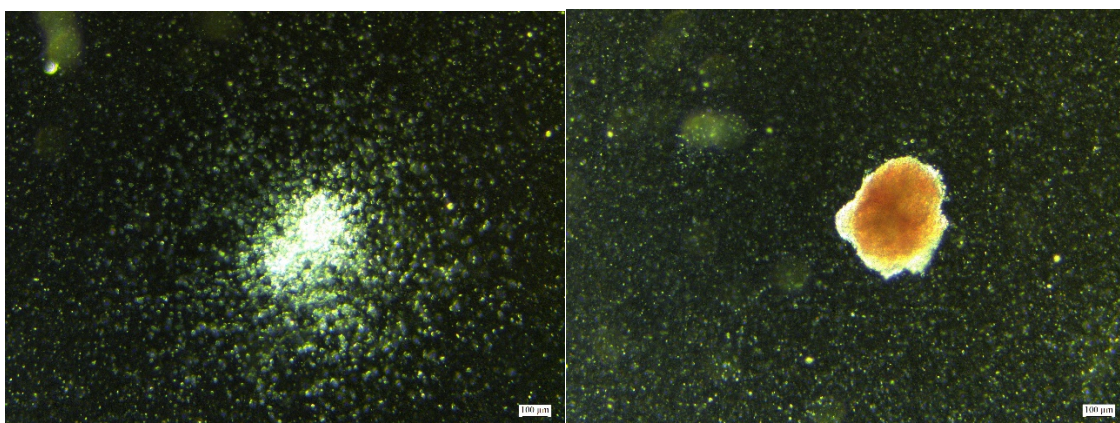


Figura 12. Lectura de les UFC en una mostra d'una leucafèresi mobilitzada. Les cèl·lules se sembren en 1 ml de metilcel·lulosa (STEMCELL Technologies) suplementat amb 100 µl d'IMDM (*Iscove's modified Dulbecco's medium*), s'homogeneïtza amb vòrtex, es deixa reposar uns minuts i amb una xeringa s'aspira tot el volum i se sembra per duplicat en una placa de Petri de 33 mm de diàmetre. Les plaques s'incuben juntament amb una plaqueta amb aigua durant 10-14 dies amb un 5,5 % de

diòxid de carboni, a 37 °C i a una humitat superior al 90 %; finalment, se'n fa la lectura. A la imatge de l'esquerra, s'observa una colònia blanca (GM) amb un augment $\times 4$. A la imatge de la dreta, es veu una colònia vermella (eritroide) amb un augment $\times 4$. Totes dues fotografies en fons negre. Font: LTC del BST per cortesia de Margarita Codinach.

3.4.5 Avaluació *in vivo*

La mesura dels temps per a la recuperació de neutròfils i plaquetes en el receptor d'un TPH proporciona una informació essencial sobre la qualitat de les CPH. El temps esperat d'empelt de neutròfils ($> 500/\mu\text{l}$ en tres determinacions consecutives) i de plaquetes ($> 20.000/\mu\text{l}$ en tres determinacions consecutives sense suport transfusional en els set últims dies) està entre els 10 i els 14 dies en el trasplantament autòleg. En el cas del TPH al·logènic d'SP i d'MO de donant familiar amb HLA idèntic, un estudi de l'EBMT va demostrar un temps de recuperació de neutròfils de 12 i 14 dies, respectivament, i un temps de recuperació de plaquetes de 15 i 20 dies, respectivament [71]. No obstant això, aquesta mesura de presa es pot veure influenciada per altres factors com el condicionament emprat, la compatibilitat d'HLA de donant-receptor, la profilaxi de l'MECH i les complicacions després del TPH.

Altres determinacions de l'eficàcia *in vivo* de les CPH administrades en els pacients és l'avaluació de la recuperació immunitària a través de cèl·lules B i T, i tècniques de quimerisme que es basen en les diferències de marcadors genètics polimòrfics entre el donant i el receptor del TPH.

3.5 FACTORS BIOLÒGICS DELS PRODUCTES QUE IMPACTEN EN ELS RESULTATS DEL TRASPLANTAMENT I EN EL CONTROL DE QUALITAT

Des dels seus inicis fins a l'actualitat, la indicació del TPH es basa en una avaluació dels riscos i els beneficis del procediment en un pacient. Els beneficis venen donats per l'eliminació de les cèl·lules tumorals, en el cas del TPH autòleg, i per l'esmentat efecte de l'empelt contra el tumor, en el cas del TPH al·logènic. Històricament, els factors clínics que s'associen a millors resultats del TPH són l'edat, el tipus de malaltia, l'estat de la malaltia, l'estat general del pacient, el tipus de donant i la disparitat d'HLA, la

font de progenitors, la compatibilitat de CMV de receptor-donant, les característiques del donant (edat, sexe) i les comorbiditats del pacient. No obstant això, no hi ha tanta literatura en relació amb la manera com influeixen en els resultats del TPH les característiques dels productes infosos i com es pot mantenir la qualitat dels productes. Aquest últim aspecte serà la base central de la present tesi doctoral.

Com s'ha descrit anteriorment, per aconseguir l'èxit del TPH és molt important assegurar que les CPH tinguin un nombre i una qualitat adequats per a cada tipus de TPH, ja sigui autòleg o al·logènic, o de diferent font, com ara SP, MO o SCU. Anomenem *factors biològics del producte* les característiques cel·lulars tant quantitatives, entenent la dosi, com qualitatives, quant a la funcionalitat. Les característiques cel·lulars (dosis de CN, cèl·lules CD34+, CD3+, entre d'altres) tenen un paper a l'hora de facilitar l'empelt en els pacients, així com en la resposta a la malaltia i en la supervivència global (SG). Per contra, la cel·lularitat pot ser un condicionant de risc per complicacions post TPH com l'MECH. Les característiques qualitatives o funcionals, tradicionalment, han tingut un paper com a control de qualitat *ex vivo* i es correlacionen amb la capacitat proliferativa de les CPH *in vivo*. Aquests factors biològics cel·lulars són considerats de gran importància en l'actualitat per avaluar els resultats del TPH. Aquests factors són el nucli essencial d'aquesta tesi doctoral.

El TPH autòleg és un procés que pràcticament sempre es fa criopreservat, la intensitat de condicionament és homogènia i no hi ha l'efecte d'incompatibilitat d'HLA. Per tant, en aquesta modalitat de TPH, hi ha menys factors de confusió a l'hora d'analitzar l'impacte de les característiques dels productes en els resultats clínics del TPH. El TPH autòleg serà el seleccionat pel primer treball que forma part d'aquesta tesi doctoral, per investigar l'efecte de les característiques biològiques dels productes destinats a TPH en els resultats clínics d'SG i supervivència lliure de malaltia (SLM).

Com s'ha descrit anteriorment, la criopreservació és la manipulació més àmpliament emprada en un laboratori de processament cel·lular. Aquest procés pot afectar en la quantitat i la funcionalitat dels productes de teràpia cel·lular. L'única modalitat de

TPH en la qual es fa l'administració dels productes en fresc o descongelats és en el TPH al·logènic, ja sigui de font d'SP o d'MO, tot i que en els donants no emparentats és excepcional l'ús de productes congelats. Per aquest motiu, el segon treball inclòs en aquesta tesi doctoral avalua l'impacte clínic de la criopreservació en la modalitat de TPH al·logènic d'SP de donant no familiar comparant-lo amb l'administració en fresc.

Finalment, el fet de garantir un bon control de qualitat de la criopreservació no només depèn del procés mateix de congelació, sinó també de les característiques del producte recol·lectat i del temps fins al seu processament. Per tant, el tercer treball d'aquesta tesi doctoral investiga els factors que impacten en els controls de qualitat després de la descongelació dels productes cel·lulars. Per dur a terme aquest últim treball, s'han seleccionat les donacions de CPH d'SP al·logèniques familiars i de donant no emparentat (DNE) criopreservades.

3.5.1 Impacte clínic de la viabilitat i la potència en el TPH autòleg

Tal com s'ha descrit anteriorment, la dosi de cèl·lules CD34+/kg administrada en el pacient receptor d'un TPH autòleg prediu la velocitat d'empelt, fet ja suggerit històricament per l'autor Siena i altres autors posteriorment [72-74]. En relació amb l'impacte clínic de la dosi de CD34/kg en els resultats del TPH autòleg, els resultats són controvertits. Alguns autors com Gordan i col·laboradors han demostrat en 90 malalts amb diagnòstic d'LNH i LH una millor SLM i SG en el grup que va rebre una dosi superior de 2×10^6 CD34/kg en comparació al grup que no va arribar a aquesta dosi [74]. El grup liderat per Bolwell i col·laboradors va fer un estudi amb 693 pacients amb diagnòstic d'LNH i LH sotmesos a TPH autòleg, i es va evidenciar una millor SG en els pacients supermobilitzadors que van rebre més de 8×10^6 de cèl·lules CD34+/kg, tot i que aquest grup de malalts supermobilitzadors presentaven altres factors favorables relacionats amb la malaltia que podrien explicar en part aquests resultats de supervivència. En el seu treball, la dosi de cèl·lules CD34+/kg infosa no va tenir cap impacte en la recaiguda de la malaltia [65]. L'estudi que ha avaluat la influència de la dosi de CD34/kg infosa en 158 pacients amb diagnòstic d'MM no ha

objectivat diferències significatives en relació amb l'SG [77]. No obstant això, sí que van demostrar que la concentració alta de cèl·lules CD34+ en SP el dia de la col·lecta (supermobilitzadors) sí que impactava de manera significativa en la supervivència d'aquests malalts. La hipòtesi que expliquen aquests autors és que tenir una concentració alta de cèl·lules CD34+ a SP podria ser un subrogant de nínxol medullar intacte amb conservació de la capacitat regenerativa. Un altre estudi que va analitzar 390 malalts amb diagnòstic d'MM i sotmesos a TPH autòleg va confirmar que una dosi per sobre de $6,55 \times 10^6$ de cèl·lules CD34+/kg tenia un impacte en la velocitat d'empelt, però no en l'SG ni en la mortalitat relacionada amb el trasplantament [78].

Els estudis descrits anteriorment confirmen majoritàriament uns millors resultats d'SG i SLM en malalts amb diagnòstic d'LNH i LH quan reben dosis de cèl·lules CD34+/kg més altes, tot i que hi ha disparitat en el llindar d'aquesta correlació. Aquests treballs també suggereixen una manca de correlació de supervivència en malalts amb diagnòstic d'MM sotmesos a TPH autòleg amb dosi de cèl·lules CD34+/kg alta. Una similitud, i una limitació, que tenen aquests estudis és que tenen en compte la dosi de cèl·lules CD34+/kg abans de la congelació en comptes de després de la descongelació, que és la que realment reben els pacients. Pocs estudis han analitzat l'impacte del producte després de la descongelació. L'autor Bai i col·laboradors van demostrar en 446 pacients amb diagnòstic de limfoma i MM sotmesos a TPH autòleg una correlació estreta entre la dosi de cèl·lules CD34+/kg en fresc i la postdescongelada ($r^2 = 0,8448$) [79]. No obstant això, tot i aquesta correlació, cal tenir present la variabilitat de pèrdua de cèl·lules CD34+ viables després de la criopreservació, que pot arribar a ser del 0-83% [80]. Turunen i col·laboradors van analitzar 129 pacients amb diagnòstic d'LNH sotmesos a TPH autòleg i van evidenciar que una dosi de cèl·lules CD34+/kg vives després de la descongelació de $> 2,5 \times 10^6$ s'associava a una millor SG i SLM en l'anàlisi multivariant.

Probablement, hi ha altres causes relacionades amb la malaltia que afecten l'evolució clínica post TPH, així com factors relacionats amb altres subpoblacions cel·lulars presents en el producte que també puguin influir. En aquest sentit, hi ha estudis que

han demostrat una millor SG i SLM en malalts sotmesos a TPH autòleg els productes del qual contenen una quantitat de limfòcits, cèl·lules CD3+/CD4+ i *natural killer* (NK) més alta [80, 81].

En relació amb l'avaluació de la potència dels productes descongelats (UFC-GM) i el seu impacte clínic, Yang i col·laboradors van analitzar en 78 donacions autòlogues de CPH d'SP criopreservades les cèl·lules CD34+/kg vives infoses i les UFC dels productes descongelats. Van evidenciar una correlació d'aquestes dues variables en la velocitat d'empelt dels pacients. En el cas de les UFC-GM es va correlacionar amb l'empelt de neutròfils, però no de plaquetes. Cal remarcar que tots els productes analitzats van tenir uns valors de cèl·lules CD34+/kg i UFC-GM per sobre del mínim estipulat de $2 \times 10^6/\text{kg}$ i $1 \times 10^5/\text{kg}$, respectivament [82].

Diferents autors han demostrat una correlació entre les UFC-GM després de la congelació i una velocitat d'empelt no només en el TPH autòleg, sinó també en altres fonts com l'SCU [83]. Addicionalment, aquests tests de potència poden tenir un impacte en els resultats clínics del TPH d'SCU, com ha demostrat Nerea i col·laboradors, que va evidenciar en 110 pacients una correlació entre eficiència clonogènica (clon) i SG. [84]. La mesura del clon té en compte la quantitat de cèl·lules CD34+ abans de la congelació respecte de les UFC totals, que representa un marcador més dinàmic de creixement *in vitro*. Fins avui, no hi ha cap estudi que hagi avaluat la correlació entre tests de potència (UFC-GM) i resultats clínics com ara SG i/o SLM en el TPH autòleg.

El fet d'analitzar l'impacte dels controls de qualitat després de la descongelació en els resultats clínics del TPH autòleg va motivar el primer treball d'aquesta tesi doctoral.

3.5.2 Impacte clínic de la criopreservació en el TPH al·logènic de sang perifèrica

La congelació va permetre el desenvolupament dels bancs d'SCU, que és també la manipulació més emprada en el TPH autòleg. El principal avantatge de la congelació

és la manca de pèrdua progressiva de CPH al llarg del temps. A finals del segle xx hi havia una preocupació per la possibilitat que la congelació tingués un efecte perjudicial en els resultats del TPH al·logènic, principalment pel fet de lesionar les cèl·lules T i altres CMN, per això majoritàriament es feien en fresc. Altres preocupacions eren la possibilitat d'efectes adversos relacionats amb el DMSO i el risc de no fer servir les donacions congelades. Per aquest motiu, inicialment, només es feia la criopreservació de CPH d'MO i d'SP en situacions excepcionals relacionades amb l'estat del donant i/o del pacient. Shinkoda i col·laboradors van descriure el cas de dos bessons a qui es va diagnosticar una leucèmia aguda mieloblàstica en un mes, que van rebre un TPH al·logènic d'MO del seu germà amb HLA idèntic d'una única col·lecta. Un dels bessons va rebre la meitat de la donació en fresc i l'altre bessó, un mes més tard, va rebre l'altra meitat del producte congelat. Ambdós pacients van presentar un temps de recuperació mieloide i d'MECH similar, i es va aconseguir la remissió de la malaltia al cap de quatre anys [85]. Els primers estudis fets de congelació de CPH al·logèniques fora de l'SCU, inicialment, van ser amb la font d'MO, amb un nombre de casos limitats [86, 87] i majoritàriament amb donants familiars. Els resultats van evidenciar majoritàriament que la criopreservació no era inferior quant als resultats al TPH (empelt, MECH aguda i supervivència al cap de 100 dies) en comparació als productes en fresc. L'autor Eckardt i col·laboradors van objectivar fins i tot una incidència més baixa d'MECH aguda en el grup criopreservat d'MO (20 %) en comparació al 57,5 % trobat en el grup en fresc (estadísticament significatiu), i va plantejar una hipòtesi que la població de cèl·lules T és més sensible a la congelació-descongelació [88]. En conclusió, no hi havia prou literatura per recomanar l'administració d'MO en fresc per sobre de la congelada. Addicionalment, la congelació representava un avantatge logístic, perquè permet la flexibilitat del TPH, i de seguretat, perquè garanteix la disponibilitat d'un bon producte abans de començar el condicionament del malalt. No obstant això, també es van descriure alguns inconvenients potencials de la congelació, com ara l'augment de reaccions adverses no greus per la presència de DMSO i la no utilització de productes, posant els donants en un risc innecessari [89].

Els resultats encoratjadors de la criopreservació de CPH d'MO va donar pas a l'augment de congelacions de productes d'SP. Ja era coneguda la quantitat més gran de limfòcits T en aquesta font i el risc més alt d'MECH crònica en comparació a l'MO. Per tant, tornant a la hipòtesi plantejada per Eckardt de l'impacte de la congelació-descongelació de cèl·lules T, la criopreservació podria tenir un efecte diferent en la font d'SP. Ràpidament se'n van publicar els primers estudis. Kim i col·laboradors van analitzar 105 TPH al·logènics d'SP de donant familiar criopreservats entre el 2003 i el 2005 i els van comparar amb una cohort històrica de 106 malalts que van rebre el producte en fresc. Els diagnòstics dels pacients van ser hemopaties malignes. No van trobar diferències significatives entre el grup de criopreservats i en fresc en relació amb l'empelt de neutròfils (17 i 18 dies, $P = 0,178$, respectivament) ni de plaquetes (13 dies, $P = 0,785$). Tampoc no hi va haver diferències entre el grup de pacients que va rebre el TPH d'SP familiar criopreservat en comparació al grup en fresc quant a la recuperació limfoide (22 dies, $P = 0,923$), els resultats clínics com MECH aguda II-IV (78,2 % i 81,2 %, $P = 0,113$), MECH crònica al cap de l'any (83,8 % i 90,6 %; $P = 0,675$), recaiguda al cap de dos anys (26,6 % i 19,4 %, $P = 0,295$), mortalitat no relacionada amb recaiguda (MNR) al cap de l'any (24,6 % i 20,4 %, $P = 0,340$) ni amb SG al cap de dos anys (52,7 % i 59,4 %, $P = 0,668$), respectivament. La dosi rebuda de cèl·lules CD34+/kg va ser similar en els dos grups [90]. Altres autors com Parody i col·laboradors van confirmar els resultats ja objectivats pel grup de Kim en comparar 224 TPH al·logènics d'SP de donant familiar respecte de 107 TPH en fresc [91]. Aquests resultats van consolidar la política d'alguns centres de TPH de congelar les CPH d'SP de donants familiars, cosa que facilita la logística del trasplantament.

A principis de l'any 2020, arran de l'aparició de la pandèmia de COVID-19, les autoritats competents i les organitzacions internacionals van recomanar la congelació de les CPH de donants no familiars. Aquesta decisió va ser presa pels riscos següents en els donants i en els receptors: (1) la infecció per COVID-19 en el donant, tot i que no hi ha estudis que n'hagin demostrat la transmissió a través del TPH, posava en risc la col·lecta de les CPH; (2) l'estat d'emergència declarat en molts països limitava el transport aeri, mitjà de transport imprescindible per a les donacions localitzades a

llarga distància, i allargava el temps fins a l'arribada del producte al CT, i (3) la infecció per COVID-19 en un receptor que ha de començar el condicionament per al TPH podia representar complicacions greus. Fins ara, excepte en situacions excepcionals relacionades amb l'estat del pacient, l'administració de les CPH al·logèniques de DNE tradicionalment es feia en fresc. Per tant, els estudis disponibles sobre l'impacte de la criopreservació en el TPH al·logènic d'SP de DNE eren limitats. L'autor Medd i col·laboradors van incloure en la seva anàlisi de 76 pacients sotmesos a TPH d'SP criopreservat un subgrup de 19 pacients no emparentats i els va comparar amb 126 TPH en fresc, amb un subgrup de 60 pacients no emparentats. No hi va haver diferències significatives en l'empelt ni en altres resultats clínics, però no es van subanalitzar per separat els pacients no emparentats. Addicionalment, en aquest treball es descriu el motiu de la congelació dels productes dels donants familiars (donant de > 60 anys, diferència de pes superior al 40 % i comorbiditat del donant), però dels productes dels donants no emparentats no s'especifica i simplement s'indica que va ser per motius logístics [92]. Un article publicat per Lioznov va posar en alerta la criopreservació de CPH d'SP de DNE per reportar que 9 de 33 pacients (27 %) van presentar una fallida d'empelt. Novament, conclouen que aquests resultats tan diferents respecte de la seva cohort històrica podien ser deguts en part al biaix de preselecció dels pacients que van rebre els productes no emparentats, ja que 8 dels 9 pacients amb fallida d'empelt van rebre un condicionament d'intensitat reduïda, règim que pot ser emprat en malalts amb comorbiditats. Addicionalment, la dosi de cèl·lules CD34+/kg que van rebre alguns malalts va ser inferior a 2×10^6 . Per tant, el possible efecte deleteri de la congelació podria ser més intens en aquest grup de malalts amb comorbiditats (susceptibles a complicacions posttrasplantament) i en malalts que reben una dosi de CD34/kg baixa [93]. Finalment, el grup liderat per Hamadani i col·laboradors va publicar a l'inici de la pandèmia de COVID-19 un treball en què va analitzar l'impacte de la criopreservació en pacients sotmesos a TPH al·logènic amb profilaxi de l'MECH amb ciclofosfamida post TPH. En aquest treball es van comparar 274 pacients en el grup amb producte criopreservat en comparació a 1.080 en el grup amb producte en fresc. No obstant això, únicament es van incloure 66 pacients que van rebre el producte congelat de DNE i, de nou, no es disposava del

motiu de la congelació d'aquests productes. Els autors van concloure que no hi va haver diferències significatives en l'empelt, l'MECH, la recaiguda i l'SG entre els dos grups sense subanalitzar els donants no familiars [94].

De manera resumida, els estudis descrits anteriorment en relació amb la criopreservació de CPH d'SP de DNE presentaven les limitacions següents: (1) el nombre de pacients inclosos era relativament baix, (2) hi ha un biaix de selecció dels pacients pel desconeixement del motiu de la criopreservació o per l'estat del malalt i (3) no es va fer cap subanàlisi dels pacients que van rebre els productes de donants no familiars. Per aquests motius, confirmar que la congelació de CPH d'SP de DNE no tenia cap efecte deleteri en el pacient va esdevenir de gran importància per provar que aquest canvi de política arran de la pandèmia de COVID-19 de criopreservar tots els productes era segur per als pacients. Això va conduir el nostre grup a elaborar el segon treball d'aquesta tesi doctoral.

3.5.3 Impacte de les característiques dels productes col·lectats en els controls de qualitat després de la criopreservació de les donacions de CPH al·logèniques de sang perifèrica

És conegut que el que passa des del moment de l'obtenció de les cèl·lules fins a la seva criopreservació pot influir en la resposta de les CPH a l'estrès de la congelació. Per exemple, Hubel i coautors van demostrar que les condicions d'emmagatzematge i transport de les cèl·lules en suspensió líquida (temps, temperatura, concentració cel·lular i solució d'emmagatzematge) poden influir en l'habilitat de les CPH d'SCU per sobreviure a la criopreservació [95]. Per exemple, la temperatura de transport de les cèl·lules abans del processament (ambient versus 2-8 °C) s'ha demostrat que té un impacte en l'aïllament tant de les CPH d'SP com d'MO [96]. En relació amb les CPH d'SP, diferents estudis han demostrat que la viabilitat i les UFC-GM del producte es mantenen estables durant les primeres 72-96 hores si aquestes es conserven a 4 °C [97,98]. L'autora Antonenas i col·laboradors van extreure mostres de 34 donacions de CPH d'SP i les van mantenir refrigerades, a temperatura ambient i a 37 °C. Van objectivar que la pèrdua de cèl·lules CD34+ vives a les 24, les 48 i les 72 hores, quan es van mantenir en fred, va ser del 9,4 %, el 19,4 % i el 28 %, respectivament. Per contra,

en mantenir-les a temperatura ambient, la pèrdua va ser del 21,9 %, el 30,7 % i el 43,3 %, respectivament. Finalment, en conservar-les a 37 °C, cap cèl·lula CD34+ va romandre viva al cap de 24 hores [99]. Addicionalment, Jansen i col·laboradors van analitzar, en 12 donacions de CPH d'SP de donants sans, l'efecte no només de la temperatura, sinó també de la concentració de CN. El seu estudi va objectivar que a temperatura ambient les cèl·lules CD34+ viables disminuïen al 81 % amb una concentració inicial de 25×10^6 CN/ml, mentre que, quan la concentració arribava a 200×10^6 CN/ml, el descens de CD34+ viues era fins al 19 %. Quan les mostres es mantenien refrigerades, l'efecte de la concentració de CN/ml en la quantitat de cèl·lules CD34+ viues fins a les 48 hores va ser pràcticament inexistent, però no així en la supervivència d'UFC-GM, que amb una concentració de 25×10^6 CN/ml va ser del 91,1 % en contrast amb el 85,8 % amb una concentració de 200×10^6 CN/ml, cosa que suggereix que l'impacte d'una alta concentració de CN és deleteri per a la supervivència de les UFC-GM [100].

Els estudis anteriors van analitzar l'efecte de les característiques dels productes de CPH d'SP que s'administraven en fresc. Com s'ha descrit anteriorment, la criopreservació representa un estrès per a les cèl·lules. La demora entre la col·lecta i la criopreservació és una situació cada cop més usual per la distància entre els CC i els laboratoris de processament; la mediana de temps és de 37 hores (rang de 19-50 h) en productes obtinguts a Europa destinats als Estats Units [100]. L'autora Fray i col·laboradors van analitzar l'impacte de la temperatura (2-8 °C, temperatura ambient) i el temps (24, 48 i 72 hores) fins a la congelació de CPH d'SCU (N = 10), SP (N = 11) i MO (N = 10) [101]. Centrant-se en l'SP, es va objectivar una pèrdua significativa del 32,66 % de les UFC al cap de 48 hores entre la col·lecta i la congelació ($P = 0,006$), pèrdua que es va prolongar fins a un 39,46 % al cap de 72 hores. Els autors van concloure que l'efecte de la demora de la criopreservació de CPH d'SP va tenir un impacte en la recuperació de cèl·lules CD34+ viues després de la descongelació a partir de les 48 hores ($P = 0,005$). També van observar que la temperatura d'emmagatzematge òptima per mantenir la viabilitat de les CPH d'SP era de 2-8 °C, tal com han descrit anteriors autors [97, 98]. La limitació principal d'aquest estudi va ser que el protocol de criopreservació emprat no va ser igual que el que es fa servir per a

la criopreservació assistencial, en què els volums dels productes són més alts i la criopreservació es fa en CRC. No obstant això, en comparar aquests dos mètodes de congelació diferents en mostres d'SCU, la recuperació d'UFC va ser únicament un 7,2 % més baixa en congelar baixos volums; per tant, aquests resultats suggerien que eren reproduïbles en l'àmbit assistencial.

Arran de la pandèmia de COVID-19, es va recomanar la congelació de totes les donacions de CPH, incloent-hi les donacions de DNE. Com s'ha descrit anteriorment, aquest tipus de donacions representa una demora entre el temps de col·lecta i el temps de criopreservació. Aquesta nova situació va conduir que diferents grups analitzessin l'impacte en situacions reals dels factors precongelaació. L'autor Purtill i col·laboradors van analitzar 288 donacions al·logèniques de CPH d'SP criopreservades entre el 2015 i el 2019 en nou laboratoris de processament d'Austràlia [102]. Aquest treball va incloure tant donants familiars com donants voluntaris. Aquest grup va evidenciar que la congelació més enllà de 36 hores tenia una recuperació més baixa de cèl·lules CD34+ vives després de la descongelació (un 72 % respecte d'un 77 %, $P = 0,061$) i més probabilitat d'una recuperació pobra després de la descongelació (< 50 % de cèl·lules CD34+ vives). De manera addicional, també va analitzar l'efecte de la concentració de CN en la recuperació de cèl·lules CD34+ vives després de la descongelació, establint un llindar de 300×10^6 CN/ml, el qual va impactar de manera significativa en una recuperació pobra de cèl·lules CD34+ després de la descongelació (un 25 % respecte d'un 13 %, $P = 0,021$). Cal destacar que els cinc pacients que van rebre productes que van tenir una recuperació de cèl·lules CD34+ vives després de la descongelació de menys del 50 % van empeltar neutròfils amb una mediana de temps de 16 dies (12-33 dies). En aquest treball no es descriu la quantitat de CD34/kg que van rebre aquests malalts ni la funcionalitat dels controls de qualitat després de la descongelació (UFC-GM) [102]. Posteriorment, aquest mateix grup va analitzar 148 pacients que van rebre un TPH al·logènic de DNE d'SP criopreservat. Aquest treball sí que va analitzar la dosi de cèl·lules CD34+/kg vives administrades al pacient. No va objectivar cap correlació entre la dosi de cèl·lules CD34+/kg vives després de la descongelació amb el temps dels neutròfils, però sí amb l'empelt de

plaquetes (*hazard ratio* d'1,12 per 1×10^6 de cèl·lules CD34+/kg de dosi, interval de confiança del 95 % 1,01-1,22, $P = 0,26$). La mediana de cèl·lules CD34+/kg vives que van rebre els pacients va ser de $5,04 \times 10^6$ /kg, però amb un rang inferior d' $1,6 \times 10^6$ /kg. Únicament sis malalts van presentar una fallida d'empelt, i la dosi de CD34/kg vives després de la descongelació va ser superior a 4×10^6 de cèl·lules CD34+/kg en tots els casos excepte en dos malalts, que va ser de 2,8 i $3,2 \times 10^6$. Aquestes dosis en altres pacients no van conduir a fallida d'empelt; per tant, fa pensar que fins i tot dosis baixes de cèl·lules CD34+/kg vives presenten capacitat clonogènica i, per tant, d'empelt [103]. Altres autors com Kim i col·laboradors ja han demostrat una moderada correlació entre CD34/kg vives administrades i UFC-GM ($r = 0,666$, $P < 0,001$). En aquest treball que es van incloure 105 pacients receptors d'un TPH al·logènic d'SP, tots els productes van presentar un creixement *in vitro* (UFC-GM), cosa que demostra, per tant, la gran funcionalitat de les CPH malgrat que la dosi de cèl·lules CD34+/kg sigui baixa [90]. El nostre laboratori fa aquest test de funcionalitat des de fa més de vint anys, per la qual cosa disposa d'una gran capacitat del personal que fa aquest test i, per tant, d'experiència assistencial sobre els factors que poden conduir a la baixa recuperació d'UFC-GM després de la criopreservació.

Tal com s'ha descrit anteriorment, la sensibilitat d'altres subtipus cel·lulars com la població de CD3+ és més alta a la criopreservació. Aquesta observació ha estat evidenciada per autors i el rang de recuperació de cèl·lules CD3+ vives després de la descongelació és del 67-91 % [102]. Una pèrdua significativa de cèl·lules CD3+ podria interferir clínicament en l'efecte de l'empelt contra la leucèmia del TPH o amb l'ús d'infusions de limfòcits de donant. L'autor Berens i col·laboradors van analitzar en 95 donacions de CPH d'SP l'impacte de la criopreservació en diferents subpoblacions cel·lulars i van evidenciar una recuperació de cèl·lules CD34+ vives del 93 % ($\pm 30,7$ %) en comparació a la recuperació de cèl·lules CD3+ del 83,1 % ($\pm 15,4$ %). Una conclusió important va ser que no hi va haver diferències estadísticament significatives de pèrdua de cèl·lules CD3+ després de la descongelació en comparar els productes de donants mobilitzats amb G-CSF ($N = 65$) ni en funció de si els donants van ser familiars o voluntaris. No obstant això, en aquest treball, 20 dels 34 productes no emparentats

provenien de CC del mateix país i, per tant, el temps fins a la congelació no va diferir entre les donacions familiars i no emparentades [104]. Per contra, l'autor Fisher i col·laboradors, que també van comparar la recuperació de cèl·lules CD34+ i CD3+ després de la descongelació en 48 donacions de CPH d'SP relacionades i en 14 donacions voluntàries, sí que van objectivar diferències significatives entre els dos grups. En el grup de donacions familiars, la recuperació de cèl·lules CD3+ va ser del 90,7 % en comparació al 66,6 % del grup no familiar ($P = 0,002$) [104]. La limitació dels estudis descrits anteriorment va ser que no van analitzar les possibles causes d'aquesta recuperació més baixa de cèl·lules CD3+ després de la descongelació en els productes dels DNE. En el nostre tercer i últim treball s'investiguen les causes de la recuperació més baixa de cèl·lules CD34+, CD3+ i UFC-GM després de la descongelació de donacions de CPH d'SP relacionades i voluntàries.

Com a sumari, i tal com s'ha descrit anteriorment, l'èxit del TPH comença amb la infusió d'un producte cel·lular que tingui unes característiques biològiques òptimes. Aquestes característiques són principalment la dosi cel·lular i la funcionalitat de les CPH (viabilitat i potència). Aquests factors biològics dels productes de teràpia cel·lular es poden veure compromesos per la manipulació més emprada en els laboratoris de processament, que és la criopreservació. Finalment, controlar les variables que poden afectar els controls de qualitat dels productes criopreservats esdevé de gran importància per minimitzar l'impacte biològic de la criopreservació. Aquesta tesi s'ha centrat a estudiar els factors biològics limitants dels productes per assegurar un trasplantament òptim.

4 HIPÒTESIS

De manera transversal, aquesta tesi doctoral pretén analitzar l'impacte de les característiques biològiques d'una afèresi d'SP en els resultats del TPH i dels controls de qualitat després de la congelació. Per aconseguir-ho, es formulen tres hipòtesis:

Hipòtesi 1

El control de qualitat després de la descongelació, tal com s'ha descrit anteriorment, pot ser complex i amb resultats variables entre laboratoris. No obstant això, és de gran importància donat que representa la dosi i la funcionalitat final del producte que s'administra al pacient. La gran majoria d'estudis que analitzen l'impacte de la dosi i la viabilitat del producte en els resultats del TPH autòleg ho fan amb els resultats precongelació en comptes dels de postdescongelació, que hipotèticament s'espera que la correlació sigui superior. A més, la funcionalitat de les CPH mitjançant un test de potència podria tenir un impacte no només en els resultats d'empelt, sinó també en els resultats clínics, com s'ha demostrat en altres fonts com l'SCU.

Per aquests motius, la primera hipòtesi del primer treball publicat d'aquesta tesi doctoral és confirmar si en el TPH autòleg la dosi i la funcionalitat (viabilitat i UFC-GM) del producte postdescongelació correlacionen millor en els resultats clínics (SG i SLM).

Hipòtesi 2

A diferència del TPH autòleg, el TPH al·logènic emparentat, habitualment, s'administra en fresc, amb un màxim de temps des de l'obtenció fins a l'administració de 48-72 hores. Els estudis que han analitzat l'impacte de la criopreservació en el TPH d'SP de donant familiar no han evidenciat diferències significatives en relació amb l'empelt, l'MECH aguda i crònica, la recaiguda i l'SG en comparar-ho amb productes administrats en fresc. No obstant això, la criopreservació en el TPH al·logènic de donant emparentat és més controlada logísticament i temporalment en comparació a donacions no emparentades, que en alguns casos poden ser transoceàniques. L'aparició de la COVID-19 va obligar a congelar totes les donacions de CPH, incloent-

hi les no emparentades. No obstant això, tradicionalment, els registres de donants voluntaris no han permès la criopreservació dels productes o el motiu de la criopreservació ha estat per l'estat del pacient. Per tant, hi ha escassa evidència de l'impacte de la congelació en aquesta modalitat de TPH.

Per aquests motius, la segona hipòtesi d'aquesta tesi doctoral és confirmar que no hi ha diferències en els resultats clínics del TPH al·logènic d'SP de donant no relacionat quan s'utilitzen productes criopreservats en comparació a productes en fresc.

Hipòtesi 3

Tot i que els estudis recents que s'han fet durant la pandèmia de COVID-19 han mostrat que la congelació de les CPH d'SP de DNE és segura per al receptor d'un TPH al·logènic, s'han posat de manifest alguns productes amb una baixa qualitat després de la criopreservació, en concret recuperacions pobres de cèl·lules CD34+ i CD3+ després de la descongelació. Aquesta troballa pot posar en risc l'ús de les cèl·lules i, per tant, el trasplantament. Així doncs, el tercer treball d'aquesta tesi planteja la hipòtesi que la composició cel·lular i les condicions d'emmagatzematge abans de la criopreservació de les CPH d'SP al·logèniques afecten els controls de qualitat després de la descongelació (dosis i funcionalitat).

5 OBJECTIUS

Progenitors hematopoètics de sang perifèrica: característiques del producte que impacten en el receptor i en els controls de qualitat del processament

1. Analitzar l'impacte dels valors del control de qualitat abans i després de la descongelació (dosis i funcionalitat) en els resultats d'SG i SLM dels pacients sotmesos a un TPH autòleg amb diagnòstic d'LNH i MM.
2. Analitzar l'efecte de la criopreservació en els resultats clínics del TPH al·logènic d'SP de DNE, així com en l'aparició d'efectes adversos i complicacions logístiques.
3. Investigar els factors de la col·lecta i el transport que poden influir en els controls de qualitat després de la criopreservació de les CPH d'SP al·logèniques per a TPH.

6 MATERIALS, MÈTODES I RESULTATS

Objectiu 1. Analitzar l'impacte dels valors del control de qualitat abans i després de la descongelació (dosis i funcionalitat) en els resultats d'SG i SLM dels pacients sotmesos a un TPH autòleg amb diagnòstic d'LNH i MM.

Títol: Post thawing viable CD34+ cells dose is a better predictor of clinical outcome in lymphoma patients undergoing autologous stem cell transplantation.

Resum:

Introducció: el TPH autòleg està àmpliament indicat en malalties hematològiques, així com en tumors sòlids i malalties autoimmunitàries. No obstant això, malgrat el seu ús, encara no és un tractament curatiu per a nombrosos pacients amb malalties malignes i el risc de recaiguda post TPH és possible. L'objectiu de l'estudi va ser analitzar retrospectivament l'efecte de les característiques demogràfiques, del TPH, de la col·lecta i del control de qualitat (cel·lularitat, viabilitat i UFC-GM) sobre l'SG i l'SLM en malalts amb diagnòstic d'LNH i MM sotmesos a TPH autòleg.

Material i mètodes: l'estudi es va fer en col·laboració amb 11 unitats de TPH de Catalunya, Espanya, i l'LTC del BST de Barcelona. Els criteris de selecció dels pacients van ser: primer TPH autòleg en pacients amb diagnòstic d'LNH i MM, productes no manipulats després de la descongelació i pacients adults. Tots els pacients que van complir els criteris anteriors entre el març del 2014 i el desembre del 2016 van ser inclosos en l'estudi.

Resultats: un total de 329 pacients es va incloure en l'anàlisi. 178 pacients (58 %) amb diagnòstic d'LNH i 151 (46 %) amb diagnòstic d'MM. En el grup d'LNH, l'estat de la malaltia en el moment del TPH i una quantitat superior a 2×10^6 CD34 vives després de la descongelació es van correlacionar amb una millor SG [hazard ratio (HR) = 1.991; interval de confiança (IC) del 95 % 1,001-3,964; $P = 0,0398$]. L'edat en el TPH i una quantitat superior a $2,3 \times 10^6$ CD34 vives després de la descongelació es van correlacionar amb una millor SLM [HR = 1.670; IC del 95 % 0,994-2,807; $P = 0,0048$]. En

el grup d'MM, només les línies rebudes abans del TPH es van correlacionar amb una millor SG i cap variable no va impactar en l'SLM en l'anàlisi multivariant.

Discussió: el control de qualitat després de la criopreservació, concretament una quantitat superior a 2×10^6 CD34/kg vives, es correlaciona amb una millor SG i SLM en pacients amb diagnòstic d'LNH sotmesos a TPH autòleg. En el cas de malalts amb diagnòstic d'MM, probablement la teràpia post TPH i l'evolució pròpia de la malaltia no han permès establir cap benefici clínic de la qualitat del producte. Per tant, la pèrdua de CD34/kg després de la descongelació ha de tenir-se en compte abans de programar un TPH, principalment en malalts amb diagnòstic d'LNH.



CORRESPONDENCE



Post thawing viable CD34⁺ Cells dose is a better predictor of clinical outcome in lymphoma patients undergoing autologous stem cell transplantation

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2022

Bone Marrow Transplantation; <https://doi.org/10.1038/s41409-022-01722-6>

TO THE EDITOR:

Autologous stem cell transplantation (ASCT) is widely indicated for hematological diseases, solid tumors and immune disorders [1]. However, despite its use, ASCT is still not curative for a number of patients with malignant disease, and the risk of early relapse is not negligible. CD34⁺ cells dose infused in ASCT has been associated with faster myeloid recovery [2–4], and high amount collected has been correlated with better overall survival (OS) and progression-relapse free survival (PFS) in non-Hodgkin lymphoma (NHL) patients after ASCT [5, 6]. In addition, higher lymphocyte content has been also linked with improved outcome in NHL patients [7].

The vast majority of ASCT procedures require a cryopreservation step, and therefore the quality of collection, cell processing, cryopreservation and storage can affect graft function after thawing. To assess quality, reference samples are used to evaluate surrogate purity and potency markers in the transplant cryobags [8]. Complete blood counts (CBC) and the number of CD34⁺ cells are commonly used to assess graft purity, while viable CD34⁺ cell recovery and their colony-forming ability (e.g., in a colony-forming assay) are used to assess graft potency. The CD34⁺ cell dose per kg and post-thaw granulocyte-macrophage colony-forming unit (GM-CFU) growth usually determine neutrophil and platelet engraftment kinetics after ASCT [2, 9]. However, limited data are available regarding quality control after thawing and clinical outcomes (OS, PFS) after ASCT.

The aim of the present study was to retrospectively analyze the effect of demographic and transplant characteristics, and collection and quality control parameters (purity, viability and potency tests), on OS and PFS after ASCT in lymphoma and myeloma multiple (MM) patients.

This study was carried out within the Catalan Stem Cell Therapy Alliance, which is a collaborative group composed of 11 clinical units in nine hospitals in Catalonia, Spain. Eligibility criteria for patients were: (i) first ASCT in lymphoma and MM patients, (ii) unmanipulated grafts after thawing, and (iii) adult patients. All consecutive patients meeting these criteria who underwent transplantation from March 2014 to December 2016 with grafts provided by the Banc de Sang i Teixits (Blood and Tissue Bank, BST) Cell Therapy Service were retrospectively included in the study. All recipients provided written informed consent prior to collection and transplantation. The Hospital Clínic de Barcelona

ethics committee reviewed and approved the study (CEIC [CREC] code HCB/2019/0325).

Demographic characteristics, chemotherapy treatment lines prior to ASCT, conditioning regimens and status at transplantation (CR, complete remission; PR, partial remission, PROG, progression) were analyzed. Leukocytapheresis was characterized with automated CBC, total white blood cell count/kg, mononuclear cells (MNC)/kg, neutrophils/kg, lymphocytes/kg, lymphocyte-to-monocyte ratio, red blood cells (RBC)/mL and platelets/mL. Flow cytometry was performed to assess CD45 and CD34 expression according to the single-platform International Society for Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) protocol, while cell viability was assessed using 7-aminoactinomycin D (7-AAD) staining. Cryopreservation was carried out within 24 h after collection. Prior to cryopreservation, leukocytapheresis material was concentrated. The cryopreservation solution was added volume: volume over 10 min, at increasing speed, to a final concentration of 10% dimethyl sulfoxide, 4% human serum albumin and 5% ACD-A in Plasma-Lyte. A programmable controlled-rate freezer was used at a decreasing rate of 1 °C/minute until –40 °C, then continuing with a decreasing rate of 5 °C/min. Three 0.5 mL aliquots of the cell preparation were frozen together with the bag and were used to perform: CBC; assessment of CD45 and CD34 expression by flow cytometry according to the ISHAGE protocol single-platform multigating strategy, adjusting for forward and straight side scatter [10]; and assessment of viability using 7-AAD staining. Potency was evaluated with granulocyte-macrophage (GM) and total CFU assays using Methocult 4434 supplemented with IMDM.

OS and PFS were analyzed using the log-rank test. Normality assumptions were checked with the Shapiro–Wilk normality test. The hazard ratio (HR) with 95% confidence interval (CI) was obtained. A multivariate model was added, considering as explanatory variables all those with a *p* value < 0.1 in the bivariate analysis, and excluding those that presented collinearity problems. The final model was obtained using the backward variable selection method.

A total of 329 patients were included in the analysis. One hundred and seventy-eight patients (54%) were NHL patients and 151 (46%) MM patients. The median time of follow-up in NHL and MM groups were 48 and 52 months, respectively. In NHL group, in univariate analysis, only conditioning regimens, status at ASCT, RBC/mL, post thawing CD45⁺ cells/μL and viable post thawing CD34⁺ cells were statistical significance with OS. In multivariate analysis, status at ASCT, age and post thawing viable CD34⁺ cells/kg remained statistical significance. More than 2 × 10⁶ post thawing viable CD34⁺ cells/kg correlated with better OS [HR = 1.991; CI 95% 1.001–3.964; *P* = 0.0398] (Fig. 1a). Regarding PFS, in univariate analysis, prior lines and status at ASCT, age, pre-freezing CD34⁺

Received: 12 December 2021 Revised: 13 May 2022 Accepted: 17 May 2022
Published online: 25 May 2022

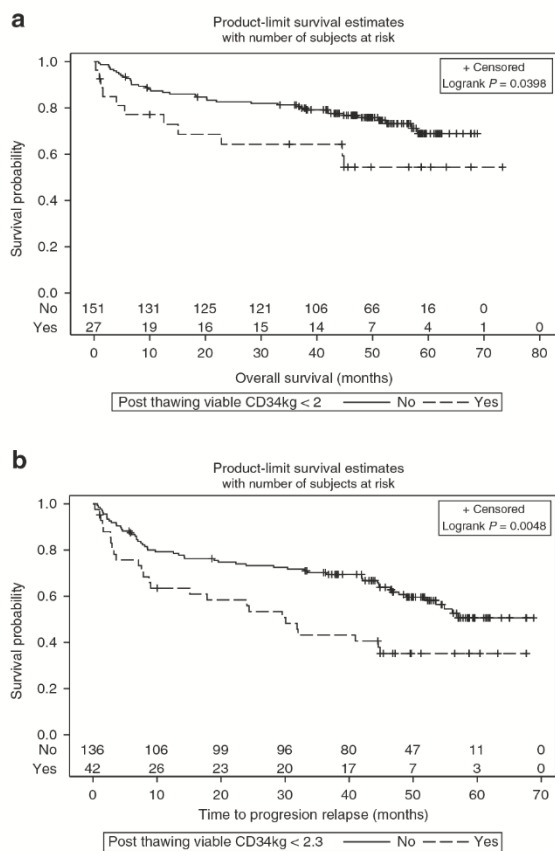


Fig. 1 OS and PFS in NHL patients regarding post thawing viable CD34⁺ cells/kg. **a** More than 2×10^6 post thawing viable CD34⁺ cells/kg (solid line) correlated with better OS [HR = 1.991; CI 95% 1.001–3.964; $P = 0.0398$]. **b** More than 2.3×10^6 post thawing viable CD34⁺ cells/kg (solid line) correlated with better PFS [HR = 1.670; CI 95% 0.994–2.807; $P = 0.0048$].

cells/kg, post thawing viable CD34⁺ cells/kg and ratio lymphocyte were statistical significance. In multivariate analysis, age and more than 2.3×10^6 post thawing viable CD34⁺ cells/kg correlated with better PFS [HR = 1.670; CI 95% 0.994–2.807; $P = 0.0048$] (Fig. 1b).

In MM group, prior lines to ASCT, RBC/mL, prefreezing CD34⁺ cells/kg, NC/kg, PMN/kg and lymphocyte/kg correlated with OS in univariate analysis. However, only prior lines to ASCT remained statistical significance in multivariate analysis. Regarding PFS, conditioning regimen, prior lines to ASCT, prefreezing CD34⁺ cells/kg and NC/kg correlated with PFS, but no one remained statistical significance in multivariate analysis.

We studied the impact of demographic, pre-ASCT characteristics, leukocytapheresis and post thawing quality control on OS and PFS in 178 and 151 NHL and MM patients, respectively, after ASCT. The variables status at transplantation, age and post thawing viable 2×10^6 CD34⁺ cells/kg correlated with OS, and age and post thawing 2.3×10^6 CD34⁺ cells/kg associated with PFS in NHL patients in multivariate analysis. In MM, only prior lines to ASCT correlated with OS in multivariate analysis.

Several findings in our study are worth mentioning. First, our data are consistent with scientific literature, as the Turunen et al. colleagues showed that $>$ post thawing viable 2.5×10^6 CD34⁺ cells/kg improved OS and PFS in NHL patients after ASCT [6]. Second, in our series, no impact of lymphocyte content and

GM-CFU was found on OS and PFS. Third, our results highlighted the importance of quality control after cryopreserved product as were associated with better outcomes in NHL patients in contrast to prefreezing CD34⁺ cells/kg.

To our knowledge, this is the first study to assess the influence of quality control after thawing cryopreserved ASCT on clinical outcomes in NHL and MM patients, not only in viable CD34⁺ cells/kg but also potency test as GM-CFU. Nevertheless, our study has some limitations, primarily its retrospective design. Second, we did not analyze cell subpopulations, such as NK⁺, CD8⁺, CD4⁺ or CD3⁺ cells, which have been shown to be an independent factor of better OS and PFS [6]. A final consideration is that CFU assays require training time to become proficient at recognizing and counting the colonies, interlaboratory variation exists and grafts may be used before its results.

In conclusion, quality control after thawing not only guarantee myeloid engraftment but also minimum viable 2×10^6 CD34⁺ cells/kg may predicts better OS and PFS in NHL patients. Therefore, CD34⁺ cells lose because of cryopreservation should be considered before scheduling ASCT.

Jesus Fernandez-Sojo^{1,2,✉}, Joan Cid³, Carmen Azqueta^{1,2}, Elena Valdivia^{1,2}, Lluís Martorell^{1,2}, Margarita Codinach⁴, Julia Marsal⁵, Alberto Mussetti⁶, Albert Esquirol⁷, Maria Trabazo⁸, Maria Isabel Benitez⁹, Christelle Ferra¹⁰, Maria Laura Fox¹¹, Mónica Linares^{2,12}, Eva Alonso¹³, Enric García-Rey¹⁴, Nadia García-Muñoz¹⁵, Laura Medina¹⁶, Nerea Castillo-Flores¹⁷, Ferran Vall-Llovera¹⁸, Antoni Garcia¹⁹, Asuncion Pinacho²⁰, Carme Talarn²¹, Jose Garcia Arroba²², Rosa Coll²³, Mireia Santos²⁴, Oliver Valero²⁵, Enric Carreras²⁶, Miquel Lozano³ and Sergio Querol^{1,2}

¹Advanced & Cell Therapy Services, Banc de Sang i Teixits, Barcelona, Spain. ²Transfusion Medicine Group, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Vall d'Hebron Hospital Universitari, Barcelona, Spain.

³Apheresis & Cellular Therapy Unit, Department of Hemotherapy and Hemostasis ICMHO, Hospital Clinic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain. ⁴Cell Laboratory, Banc de Sang i Teixits, Barcelona, Spain. ⁵Pediatric Hematology Department, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain. ⁶Adult Hematology Department, Institut Català d'Oncologia-Hospitalet, Barcelona, Spain.

⁷Adult Hematology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, IIB-Sant Pau and Jose Carreras Leukemia Research Institute, Universitat Autònoma of Barcelona, Barcelona, Spain. ⁸Pediatric Hematology Department, Hospital Universitari de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain.

⁹Pediatric Hematology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain. ¹⁰Adult Hematology Department, Institut Català d'Oncologia-Badalona, Barcelona, Spain. ¹¹Adult Hematology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

¹²Banc de Sang i Teixits, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain. ¹³Banc de Sang i Teixits, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain. ¹⁴Banc de Sang i Teixits, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain. ¹⁵Banc de Sang i Teixits, Hospital Universitari de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

¹⁶Banc de Sang i Teixits, Hospital Universitari de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain. ¹⁷Banc de Sang i Teixits, Hospital Mutua de Terrassa, Terrassa, Barcelona, Spain. ¹⁸Adult Hematology Department, Hospital Mutua de Terrassa, Terrassa, Barcelona, Spain. ¹⁹Adult Hematology Department, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, Spain. ²⁰Banc de Sang i Teixits, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, Spain.

²¹Adult Hematology Department, Institut Català d'Oncologia-Tarragona, Tarragona, Spain. ²²Banc de Sang i Teixits, Hospital Universitari Joan XXIII, Tarragona, Spain. ²³Adult Hematology Department, Institut Català d'Oncologia-Girona, Girona, Spain. ²⁴Banc de Sang i Teixits, Hospital Universitari Josep Trueta, Girona, Spain. ²⁵Servei d'Estadística Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. ²⁶Spanish Bone Marrow Donor Registry, Josep Carreras Foundation and

Leukemia Research Institute, Barcelona, Catalonia, Spain.
✉email: jefernandez@bst.cat

DATA AVAILABILITY

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

REFERENCES

1. Duarte RF, Labopin M, Bader P, Basak GW, Bonini C, Chabannon C, et al. Indications for alloand auto-SCT for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2019. *Bone Marrow Transpl.* 2019;54:1525–52.
2. Allan DS, Keeney M, Howson-Jan K, Popma J, Weir K, Bathia M, et al. Number of viable CD34(p) cells reinfused predicts engraftment in autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transpl.* 2002;29:967–72.
3. Stiff PJ, Micallef I, Nademanee AP, Stadtmauer EA, Maziarz RT, Bolwell BJ, et al. Transplanted CD34(p) cell dose is associated with long-term platelet count recovery following autologous peripheral blood stem cell transplant in patients with non-Hodgkin lymphoma or multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transpl.* 2011;17:1146–53.
4. Ungerstedt JS, Watz E, Uttervall K, Johansson BM, Wahlin BE, Näsman P, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma and lymphoma: an analysis of factors influencing stem cell collection and hematological recovery. *Med Oncol.* 2012;29:2191–9.
5. Carlsten M, Jädersten M, Hellström A, Littmann K, Melén CM, Junlén HR, et al. The Karolinska experience of autologous stem-cell transplantation for lymphoma: a population-based study of all 433 patients 1994–2016. *Exp Hematol Oncol.* 2019;8:7.
6. Turunen A, Valtola J, Partanen A, Ropponen A, Kuitinen O, Kuitunen H, et al. Autograft cellular composition and outcome in NHL patients: results of the prospective multicenter GOA study. *Leuk Lymphoma.* 2020;61:2082–92.
7. Porrata LF, Litzow MR, Inwards DJ, Gastineau DA, Moore SB, Pineda AA, et al. Infused peripheral blood autograft absolute lymphocyte count correlates with day 15 absolute lymphocyte count and clinical outcome after autologous peripheral hematopoietic stem cell transplantation in non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transpl.* 2004;33:291–8.
8. Giral S, Costa L, Schriber J, Dispersion J, Maziarz R, McCarty J, et al. Optimizing autologous stem cell mobilization strategies to improve patient outcomes: consensus guidelines and recommendations. *Biol Blood Marrow Transpl.* 2014;20:295–308.

Correspondence

3

9. Yang H, Acker JP, Cabuhat M, Letcher B, Larrat L, McGann LE. Association of post-thaw viable CD34 p cells and CFU-GM with time to hematopoietic engraftment. *Bone Marrow Transpl.* 2005;35:881–7.
10. Lanza F, Saccardi R, Seghatchian J. New horizons on stem cell cryopreservation through the artificial eyes of CD34 using modern flow cytometry tools. *Transfus Apher Sci.* 2020;59:102785.

ACKNOWLEDGEMENTS

Statistical analysis was carried out at the statistics department of the Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). The authors would like to thank Jesus Maroto, Silvia Tuset, and Mar Sanchez for their administrative support. We would also like to acknowledge the BST Cell Therapy Service technical team (Sonia Maroto, Maria Ruz, Yolanda Chacon, Sergio Arteaga, Marina Hortola and Camila Cardona) and the Cell Laboratory team (Javier Algar, Begoña Amill, Margarita Blanco, Ruth Forner, Daniel Navarro, Aroa Perez and Isabel Tarrago) for their work. Finally, we would like to thank all the physicians, nurses, and auxiliaries in the hematopoietic stem cell transplantation unit for their valuable contributions.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JFS, JC, and SQ were responsible for the study design. JFS, JM, AE, MIB, ML, NGM, FVL, AG, CT, MS were involved in data collection. OV was involved in statistical analysis. JFS, JC, and SQ wrote the paper and all authors contributed to the revision of the paper.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

ADDITIONAL INFORMATION

Correspondence and requests for materials should be addressed to Jesus Fernandez-Sojo.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Objectiu 2. Analitzar l'efecte de la criopreservació en els resultats clínics del TPH al·logènic d'SP de DNE, així com en l'aparició d'efectes adversos i complicacions logístiques.

Títol: Cryopreservation of unrelated donor hematopoietic stem cells: the right answer for transplantations during the COVID-19 pandemic?

Resum:

Introducció: les CPH de donants al·logènics no emparentats, habitualment, es transporten en fresc des del CC fins al CT mitjançant transportistes especialitzats. No obstant això, arran de la pandèmia de COVID-19 es va recomanar la criopreservació dels productes per assegurar el producte abans d'iniciar el condicionament degut a les restriccions de transport i la possible infecció per SARS-CoV-2 del donant i del receptor. L'impacte clínic en els resultats del TPH de la decisió de congelar aquests productes no ha estat avaluada anteriorment.

Material i mètodes: es va fer un estudi retrospectiu comparatiu entre dues cohorts, pacients que van rebre un TPH d'SP de DNE criopreservat durant la pandèmia de COVID-19 i un grup de control de pacients que van rebre un TPH d'SP de DNE en fresc. Es van comparar la velocitat d'empelt de neutròfils i plaquetes, el temps fins al quimerisme complet, l'aparició d'MECH aguda, la teràpia preventiva contra la infecció per CMV, l'SLM i l'SG. També es van analitzar aquells productes criopreservats que no es van fer servir, així com els problemes derivats de la congelació dels productes.

Resultats: es van incloure un total de 32 pacients a cada grup. La mediana de dies d'empelt de neutròfils va ser, en el grup criopreservat i en fresc, de 17,5 i 17 dies, respectivament. No es va objectivar cap demora significativa en l'empelt de plaquetes en ambdós grups (25,5 respecte de 19 dies; $P = 0,192$) ni en el temps de quimerisme complet (35 respecte de 31,5 dies; $P = 0,875$). La ràtio d'MECH al cap de 100 dies després del TPH va ser del 41 % (un 95 % d'IC [21-55 %]) en el grup criopreservat respecte del 31 % (un 95 % d'IC [13-46 %]) en el grup en fresc ($P = 0,380$). L'SLM al cap

de 100 dies i l'SG no van mostrar diferències estadísticament significatives. No obstant això, durant la pandèmia de COVID-19, sis donacions criopreservades no es van fer servir i es van detectar incidències relacionades amb el procés de congelació, empaquetament i transport.

Discussió: en conclusió, la criopreservació de CPH d'SP de DNE va ser segura per als malalts durant la pandèmia de COVID-19. No obstant això, es requereixen més esforços per assegurar que tots els productes congelats es facin servir, així com guies internacionals per harmonitzar la criopreservació i el seu transport.



Cryopreservation of unrelated donor hematopoietic stem cells: the right answer for transplantations during the COVID-19 pandemic?

Jesus Fernandez-Sojo¹ · Carmen Azqueta¹ · Elena Valdivia¹ · Lluís Martorell¹ · Laura Medina-Boronat¹ · Nuria Martínez-Llonch¹ · Silvia Torrents¹ · Margarita Codinach¹ · Carme Canals¹ · Izaskun Elorza² · Rocio Parody³ · Rodrigo Martino⁴ · Maria Trabazo⁵ · Cristina Díaz de Heredia⁶ · Christelle Ferra⁷ · David Valcárcel⁸ · Mónica Linares⁹ · Águeda Ancochea¹⁰ · Enric García-Rey¹¹ · Nadia García-Muñoz¹² · Laura Medina¹³ · Nerea Castillo¹⁴ · Enric Carreras¹⁵ · Juliana Villa¹⁵ · Sergio Querol¹

Received: 27 November 2020 / Revised: 16 May 2021 / Accepted: 26 May 2021 / Published online: 14 June 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2021

Abstract

Cryopreservation was recommended to ensure continuity of unrelated donor (UD) hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) during COVID-19 pandemic. However, its impact on clinical outcomes and feasibility was not well known. We compared 32 patients who underwent UD HSCT using cryopreserved peripheral blood stem cells (PBSC) during the COVID-19 pandemic with 32 patients who underwent UD HSCT using fresh PBSC in the previous period. Median neutrophil engraftment was 17.5 and 17.0 days with cryopreserved and fresh grafts, respectively. Non-significant delays were found in platelet recovery days (25.5 versus 19.0; $P = 0.192$) and full donor chimerism days (35.0 and 31.5; $P = 0.872$) using cryopreserved PBSC. The rate of acute graft-versus-host disease at 100 days was 41% (95% CI [21–55%]) in cryopreserved group versus 31% (95% CI [13–46%]) in fresh group ($P = 0.380$). One-hundred days progression-relapse free survival and overall survival did not differ significantly. During COVID-19 pandemic, six frozen UD donations were not transfused and logistical and clinical issues regarding cryopreservation procedure, packaging, and transporting appeared. In summary, UD HSCT with cryopreserved PBSC was safe during this challenging time. More efforts are needed to ensure that all frozen grafts are transplanted and cryopreservation requirements are harmonized.

✉ Jesus Fernandez-Sojo
jefernandez@bst.cat

¹ Banc de Sang i Teixits, Barcelona, Spain

² Pediatric Hematology Department, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

³ Adult Hematology Department, Institut Català d'Oncologia-Hospitalet, Barcelona, Spain

⁴ Adult Hematology Department, Hospital Universitari de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

⁵ Pediatric Hematology Department, Hospital Universitari de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

⁶ Pediatric Hematology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

⁷ Adult Hematology Department, Institut Català d'Oncologia-Badalona, Barcelona, Spain

⁸ Adult Hematology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

⁹ Banc de Sang i Teixits, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

¹⁰ Banc de Sang i Teixits, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

¹¹ Banc de Sang i Teixits, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

¹² Banc de Sang i Teixits, Hospital Universitari de Bellvitge, H. Llobregat, Barcelona, Spain

¹³ Banc de Sang i Teixits, Hospital Universitari de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

¹⁴ Banc de Sang i Teixits, Hospital Mutua de Terrassa, Terrassa, Barcelona, Spain

¹⁵ Spanish Bone Marrow Donor Registry, Josep Carreras Foundation and Leukemia Research Institute, Barcelona, Catalunya, Spain

Introduction

Unrelated donor (UD) hematopoietic stem cells (HSC) are usually freshly transported away from transplant centers (TCs) by door-to-door courier services shortly after collection. This practice usually allows grafts to be transfused without the need for a cryopreservation step [1], and is enabled by the adequate provision of donor products through the national registries, under the support of the World Marrow Donor Association.

The emergence of COVID-19 caused by SARS-CoV-2 and the subsequent evolution to a global pandemic significantly disrupted graft transportation within and between countries. Suddenly, transit restrictions for people and goods made it difficult to guarantee the timely delivery of fresh UD HSC, which is a requirement for successful transplantation [1]. Moreover, the concern that the donor could be at risk of community-acquired infection once the patients had started the conditioning procedure led professional societies to recommend immediately the cryopreservation of grafts [2–4]. However, evidence about the feasibility of cryopreservation prior to UD HSC was scarce, since most of the literature has approached this topic within the context of match-related donors (MRD) [5–9], where logistics and time from collection to cryopreservation are perfectly controlled, and the few studies available have yielded controversial results [5, 10, 11].

The aim of the present study was to retrospectively investigate the clinical outcomes, namely myeloid engraftment, full donor chimerism, acute graft-versus-host disease (GVHD), preemptive therapy on cytomegalovirus (CMV) disease, progression-relapse-free survival (PFS), and overall survival (OS), of patients who underwent UD hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) with cryopreserved peripheral blood stem cells (PBSC) during COVID-19 pandemic, and compare them with those of patients who had undergone UD HSCT with fresh PBSC in the immediately previous period, as well as to identify frozen grafts not used, and logistical and clinical issues related to the cryopreservation of UD HSC during the COVID-19 pandemic.

Materials and methods

Donors and patients

All donors and recipients provided written informed consent prior to collection and transplantation. The Vall d'Hebron University Hospital's Ethics Committee reviewed and approved the study [CEIC code PR(AG)355/2020]. Eligibility criteria for patients were: (i) first allo-HSCT, (ii) non-manipulated UD PBSC as graft source, (iii) no presence of donor-specific anti-human leukocyte antigen (HLA)

antibodies (DSA), and (iv) partial or complete disease remission status at the time of the transplantation procedure. All consecutive patients meeting these criteria who underwent transplantation from June 2019 to October 2020 with grafts provided by Banc de Sang i Teixits' (BST) Cell Therapy Service were retrospectively included in the study and stratified in two groups regarding the use of cryopreserved grafts during the COVID-19 pandemic or fresh grafts in the previous time. Recipients were longitudinally followed until death or by day +100 after HSCT, whatever occurred first.

All patients were tested for SARS-CoV-2 by PCR before starting the conditioning procedure regardless of whether or not they presented with any symptoms. Donors were tested for SARS-CoV-2 prior to collection. Regarding UD HSC from countries where COVID-19 screening was not mandatory, a cryoquarantine of 14 days was required for these products by the Spanish Health Authority [12].

Cryopreservation procedure

For cryopreservation, leukapheresis material was concentrated prior to cryoprotection at $<300 \times 10^6$ TNC/mL. The cryopreservation solution consisted of 10% dimethyl sulfoxide (DMSO), 4% human serum albumin, and 5% citrate dextrose solution A in Plasma-Lyte. A controlled-rate/programmable freezer CM2010 (Carubros Medica, Barcelona, Spain) was used at <-5 °C/min, and storage was performed at <-150 °C in vapor phase of liquid nitrogen. Three 0.5 mL aliquots of the cell preparation were frozen together with the bag and were used to perform the appropriate quality controls: blood cell count; flow cytometry assessment of CD45, CD34, and CD3 expression according to the ISHAGE protocol single-platform multi-gating strategy adjusting for forward side scatter, straight side scatter, CD45 and CD34 [13], and of viability using 7-aminoactinomycin D (7-AAD); colony-forming unit (CFU) assay using Methocult 4434 from Stem Cell Technologies (Vancouver, Canada) supplemented with Iscove's Modified Dulbecco's Medium from BLOWEST (Nuailié, France).

Definitions

Neutrophil recovery was considered to occur on the first of 3 consecutive days with an absolute neutrophil count $>500/\mu\text{L}$ after the post-transplantation nadir. Platelet recovery date was the first of 3 consecutive days with a platelet count $>20,000/\mu\text{L}$, in the absence of platelet transfusion for 7 consecutive days. Full donor chimerism date was defined as the first day with complete donor chimerism (100% donor) in total cells and/or peripheral cell subpopulations (CD15 and CD3), and was analyzed with a panel of 12 polymorphic short tandem repeat markers using the Mentype™

kit from Biotype (Dresden, Germany). Graft failure (GF) was defined as having never achieved absolute neutrophil count $>500/\mu\text{L}$, autologous recovery, or loss of donor engraftment. Acute GVHD was defined and graded according to standard criteria [14, 15]. Preemptive therapy on CMV disease was considered when initiation of antiviral therapy for early asymptomatic CMV viremia detected by surveillance testing was started. PFS was defined as survival without progression or relapse of primary disease.

Available information about the reasons why some cryopreserved grafts were not finally used during the COVID-19 pandemic and until February 1, 2021 was registered, and serious adverse reactions (SAR) or events occurring in patients or in the procurement, respectively, were also recorded [16]. Regarding logistical issues any incident that happened throughout the process (cryopreservation, packaging, and transportation) was documented.

Study endpoints

The primary study endpoint was to compare hematological recovery (neutrophil and platelet engraftment) and full donor chimerism between patients who underwent UD HSCT with cryopreserved, non-manipulated PBSC during COVID-19 pandemic in Spain (March 13 to November 1, 2020) and those who had undergone the procedure with fresh non-manipulated PBSC in the immediately previous period (June 1, 2019 to March 12, 2020). Secondary endpoints included comparisons of acute GVHD, preemptive therapy on CMV disease, PFS, and OS between both cohorts. Finally, frozen grafts not transfused and logistical and clinical issues arising with cryopreserved UD HSC in the context of the pandemic were also assessed.

Statistical analysis

Two cohorts of UD HSCT were analyzed according to the use of fresh or cryopreserved products. Patient-, disease-, transplantation, and graft-related factors were compared between both groups using a comparison test (Mann–Whitney U test for quantitative variables and χ^2 or Fisher test for the categorical ones). Median and interquartile range (IQR) or frequency and percentage were used for quantitative and qualitative variables, respectively. Time to primary outcomes (neutrophil/platelet engraftment and 100% donor chimerism) and secondary outcomes (acute GVHD, preemptive therapy on CMV infection, PFS, and OS) were calculated using survival analyses. Kaplan–Meier curves and log-rank tests were used to compare both groups. A cause-specific analysis was performed for each individual outcome. Deaths without the event were treated as not-recoverable events. A type-I error of 5% was considered.

Results

Baseline characteristics of patients and grafts

A total of 47 UD HSC were cryopreserved during the COVID-19 pandemic. Forty-one patients underwent UD HSCT. Five and one patients were transplanted with grafts subjected to major ($\text{CD}34^+$ selection) and minor (washing or red cell depletion) manipulation, respectively, and bone marrow was used in three patients. All these nine patients were excluded from the clinical outcomes analysis. Therefore, 32 patients underwent UD HSCT with cryopreserved non-manipulated PBSC during COVID-19 pandemic and were compared with 32 patients who had undergone UD HSCT with fresh non-manipulated PBSC in the immediately previous period. Results are summarized in Table 1. There were no statistically significant differences between cohorts in terms of age, gender, hematologic malignancy, donor/recipient ABO, sex, HLA, or CMV serostatus compatibility. Conditioning, GVHD prophylaxis and prognosis index were comparable between two cohorts. Regarding graft characteristics (Table 1), no differences were observed between both groups except in the median number of $\text{CD}34^+$ cells/kg ($\times 10^6$) prior to freezing or transfused in fresh, which was higher in those patients transplanted with cryopreserved grafts (6.0 versus 5.2; $P = 0.016$). The quality control in the post-thawing reference samples of cryopreserved products is shown in Table 2. After cryopreservation, the median loss of viable $\text{CD}34^+$ cells was 24.2%. The median (IQR) of $\text{CD}45^{+}/7\text{-AAD}$ negative cells and $\text{CD}3^{+}/7\text{-AAD}$ negative cells were 66.8% (52.8–74.6) and 48.4% (33.7–64.8), respectively.

Clinical outcomes

Table 3 shows the univariate analysis of neutrophil/platelet engraftment, full donor chimerism, acute GVHD, preemptive therapy on CMV disease, PFS, and OS according to UD HSC. No statistical differences were found in the median days, the rate of recovery at day +21 and the cumulative incidence of neutrophil engraftment (Fig. 1A) between both groups. All patients transplanted with fresh grafts achieved neutrophil recovery within a median of 17.0 days versus 17.5 days in those transplanted with cryopreserved PBSC. In the group of patients transplanted with cryopreserved grafts, one of them reached neutrophil engraftment by day +33 and a herpes simplex virus 6 infection was detected. Another patient had GF in spite of an optimal cell dose, viability, and CFU growth. The median time to platelet recovery was 19.0 days with fresh grafts and 25.5 days with cryopreserved grafts ($P = 0.192$). No statistical differences were observed in the rate of platelet recovery at days +30 and +100 (Table 2), and cumulative incidence of platelet engraftment (Fig. 1B). All

Table 1 Baseline characteristics of patients according to UD HSC.

Characteristic	Cells		P value
	Fresh (n = 32)	Cryopreserved (n = 32)	
Age at transplantation (years), median (IQR)	50.5 (32.2–61.2)	52 (38–66)	0.333
Sex (female), n (%)	11 (34.4)	(28.1)	0.787
Disease, n (%)			0.921
Acute leukemia ^a	17 (53.1)	16 (50)	
MDS/MPN	6 (18.8)	7 (21.9)	
Lymphoma	5 (15.6)	6 (18.8)	
Myeloma multiple	4 (12.5)	2 (6.2)	
Chronic leukemia	0 (0)	1 (3.1)	
ABO D/R incompatibility, n (%)	12 (37.5)	13 (37.5)	1.000
Sex D/R incompatibility, n (%)	12 (37.5)	12 (37.5)	1.000
HLA compatibility, n (%)			0.197
9/10	15 (46.9)	9 (28.1)	
10/10	17 (53.1)	23 (71.9)	
CMV D/R status, n (%)			0.067
Pos/Pos	20 (62.5)	10 (31.2)	
Neg/Pos	8(25)	12 (37.5)	
Neg/Neg	2 (6.2)	7 (21.9)	
Pos/Neg	2 (6.2)	3 (9.4)	
Myeloablative conditioning, n (%)	14 (43.8)	14 (43.8)	1.000
GVHD prophylaxis, n (%)			0.577
PTCy	13 (40.6)	17 (53.1)	
Cyclosporine	13 (40.6)	11 (34.4)	
Tacrolimus	6 (18.8)	4 (12.5)	
<90% Karnofsky Index, n (%)	6 (18.8)	4 (12.5)	0.731
Disease Risk Index, n (%)			0.308
Low	4 (12.5)	3 (9.4)	
Intermediate	15 (46.9)	21 (65.6)	
High	8 (25)	7 (21.9)	
Very high	5 (15.6)	1 (3.1)	
HCT-CI, n (%)			0.125
0	8 (25)	10 (31.2)	
1–2	11 (34.4)	15 (46.9)	
>2	13 (40.6)	7 (21.8)	
EBMT score, n (%)			0.605
0–2	6 (18.8)	5 (15.6)	
3–5	22 (68.8)	20 (62.5)	
>5	4 (12.5)	7 (21.9)	
Graft characteristics			
Number of days of collections, n (%)			1
One	29 (90.6)	30 (93.8)	
More than one	3 (9.4)	2 (6.2)	
Hours from collection, median (IQR) ^b	36.2 (29.4–48)	41.9 (29.7–59.4)	0.327
Cellularity, median (IQR) ^c			
TNC × 10 ⁸ /kg	6.4 (5.1–8.7)	6.3 (5.1–7.5)	0.682
Neutrophil × 10 ⁸ /kg	1.1 (0.6–2.4)	1.9 (1.4–2.5)	0.878
CD34 ⁺ × 10 ⁶ /kg	5.1 (5–6)	6 (5.6–6)	0.016
CD3 ⁺ × 10 ⁸ /kg	1.8 (1.4–2.9)	1.9 (1.4–2.5)	0.878
TNC/mL × 10 ⁶ , median (IQR)	199.5 (173.6–253.6)	210.9 (184.1–273.1)	0.626
% mononuclear cells, median (IQR)	80.6 (73.9–85.3)	83.7 (78.4–90.3)	0.155
Viability, median (IQR)			
CD45 ⁺ 7-AAD negative (%)	98.7 (97.8–99.1)	99 (98.2–99.2)	0.205
CD34 ⁺ 7-AAD negative (%)	99.2 (99–99.5)	99.3 (99–99.7)	0.538
CD3 ⁺ 7-AAD negative (%)	98.6 (96.9–99.2)	99 (97.7–99)	0.876

UD HSC unrelated donor hematopoietic stem cell, IQR interquartile range, MDS/MPN myelodysplastic syndrome/myeloproliferative neoplasm, D/R donor/recipient, HLA human leukocyte antigen, GVHD graft-versus-host disease, PTCy post-transplantation cyclophosphamide, HCT-CI hematopoietic cell transplantation-specific comorbidity index, EBMT European Bone Marrow Transplantation, TNC total nucleated cell, 7-AAD 7-aminoactinomicine D.

^aFour and eight patients with acute lymphoblastic leukemia in fresh group and cryopreserved group, respectively. Thirteen and eight

patients with acute myeloblastic leukemia in fresh group and cryopreserved group, respectively.

^bTo transfusion (fresh cells) or prior cryopreservation (cryopreserved cells).

^cIn cells to be transfused to fresh group patients (“Fresh” column), or, prior to cryopreservation, in cells to be transfused to cryopreserved group patients (“Cryopreserved” column).

survivors achieved platelet engraftment by 100 days after the procedure. Regarding full donor chimerism, no statistical differences were found in the median days, the rate of achievement at day +30 and +100, and the cumulative incidence between both cohorts (Table 2 and Fig. 1C). One and two patients in each group who received fresh and cryopreserved grafts, respectively, achieved mixed chimerism by 100 days after transplantation. All three patients had received RIC conditioning.

The cumulative incidence of acute GVHD (Table 2 and Fig. 2A) observed at day +100 in patients transplanted with fresh cells was 31% versus 41% in those transplanted with cryopreserved cells ($P = 0.380$). No statistical differences were observed in incidence of preemptive therapy on CMV between both groups (Table 2 and Fig. 2B).

The rates of PFS at day +100 were 81% (95% confidence interval [CI] [69–96]) and 88% (95% CI [77–100]) in fresh and cryopreserved grafts, respectively ($P = 0.500$) (Table 2 and Fig. 2C). The corresponding rates of OS at day +100 were 81% (95% CI [69–96]) and 90% (95% CI [90–100]) ($P = 0.300$) (Table 2 and Fig. 2D).

Clinical and logistical issues in cryopreserved grafts

Six of 47 (13%) donated and cryopreserved UD HSC had not yet been transplanted at February 1, 2021. The main cause was relapse/progression of underlying disease (three cases). The others cases corresponded to a patient’s HLA-typing error that was detected after collection, a patient who presented with DSA refractory to desensitization treatment and finally, and one patient who refused HSCT days after graft cryopreservation. The median (IQR) number of days that elapsed from collection to transplantation was 21 (21–49). In one case, cryopreserved cells were transfused 175 days after collection.

Only one SAR was documented at transfusion of HPC. That patient had tachycardia and generalized cutaneous rash, because of the incompatibility between the external cryopreserved donor bag and the transfusion set, which forced healthcare staff to transfuse urgently the cells manually, which precluded an appropriate transfusion speed control. An allergic reaction to DMSO was suspected, which was completely resolved after antihistamine treatment and decreasing transfusion rate.

Neither patients nor donors had a SARS-CoV-2 positive test.

The median hours from collection to transfusion or cryopreservation was 36.2 with fresh PBSC and 41.9 with frozen PBSC, respectively ($P = 0.327$) (Table 1). Such delay was due to the policy of TC to perform in-house cryopreservation. Nevertheless, seven UD HSC were cryopreserved at collection centers because of the unavailability of in-fresh transportation. In one case, this onsite cryopreservation was unintended and led to a deviation of procedures that complicated and delayed quality release of the product for transplantation albeit with no impact on clinical outcomes. In another case, rapid instructions to package the cryopreserved product had to be issued to an external facility and, in a third case, a problem caused by the incompatibility size between BST's cell processing laboratory cassettes and the rack provided by the sender within the dry shipper had to be overcome.

Table 2 Quality parameters of cryopreserved cells.

Quality test	Median (IQR)
CD45 ⁺ /7-AAD (%)	66.8 (52.8–74.6)
CD34 ⁺ /7-AAD (%)	81.8 (66.0–94.35)
CD3 ⁺ /7-AAD (%)	48.4 (33.7–64.8)
CFU-GM/kg $\times 10^5$	9.0 (5.8–13.8)
Total CD34 ⁺ recovery (%)	96.2 (80.8–100)
Viable CD34 ⁺ recovery (%)	75.8 (60.5–88.4)
TNC recovery (%)	100 (99.2–100)

7-AAD 7-aminoactinomycin D, CFU-GM granulocyte/macrophage colony-forming units, TNC, total nucleated cell.

Table 3 Univariate analysis of neutrophil/platelet engraftment, full donor chimerism, acute GVHD, preemptive therapy on cytomegalovirus disease, PFS, and OS according to UD HSC.

Variable	Cells		P value
	Fresh (N = 32)	Cryopreserved (N = 32)	
<i>Neutrophils</i>			
Days to recovery, median (95% CI)	17 (14–24)	17.5 (16–21)	0.767
Rate of recovery at 21 days (95% CI)	72 (51–84)	75 (54–86)	0.850
<i>Platelets</i>			
Days to recovery, median (95% CI)	19 (17–35.5)	25.5 (19–31)	0.192
Rate of recovery at 30 days (95% CI)	69 (48–81)	69 (47–81)	0.620
Rate of recovery at 100 days (95% CI)	94 (76–98)	97 (76–96)	0.620
<i>Full donor chimerism</i>			
Days to achievement, median (95% CI)	31.5 (27–56.5)	35 (26–48.2)	0.872
Rate of achievement at 30 days (95% CI)	44 (24–59)	25 (8–39)	0.990
Rate of achievement at 100 days (95% CI)	75 (54–86)	84 (65–93)	0.990
Rate of acute GVHD at 100 days (95% CI)	31 (13–46)	41 (21–55)	0.380
Rate of preemptive CMV at 100 days (95% CI)	38 (18–52)	38 (18–52)	1.000
Rate of PFS at 100 days (95% CI)	81 (69–96)	88 (77–100)	0.500
OS at 100 days (95% CI)	81 (69–96)	90 (85–100)	0.300

CI confidence interval, GVHD graft-versus-host disease, CMV cytomegalovirus, PFS progression-relapse-free survival, OS overall survival.

Discussion

In spite of the fact that reliable randomized, controlled studies regarding graft cryopreservation impact on clinical outcomes of patients undergoing UD HSCT were not available when the COVID-19 pandemic broke out, cryopreservation was recommended as a general rule. The aim of our study was to assess the impact of this recommendation comparing engraftment and clinical outcomes of patients who underwent UD HSCT with cryopreserved non-manipulated PBSC during COVID-19 pandemic with those who had undergone this procedure with fresh non-manipulated PBSC in the previous period. Also, we reviewed the unused frozen grafts, and clinical and logistical issues regarding cryopreservation. Our results suggest that cryopreservation during the COVID-19 pandemic did not negatively affect neutrophil/platelet engraftment and full donor chimerism. In order to prevent engraftment delays or failures, a negative impact of insufficient CD34⁺ cell dose on survival outcomes, and cell losses or low viability due to cryopreservation, the amount of frozen CD34⁺ cells was intentionally higher than that transfused in fresh grafts [17, 18]. Regarding quality control of cryopreserved grafts, all the UD HSC were fully compliant according to cell counts, viability and CFUs. CD45⁺/7-AAD and CD3⁺/7-AAD negative cells were lower than 70% due to the impact of cryopreservation, but this did not influence potency assays. One GF occurred in the cohort transplanted with cryopreserved PBSC. However, the quality control showed that cell dose, purity, and potency were optimal. Time from collection to cryopreservation was 4 h and the patient

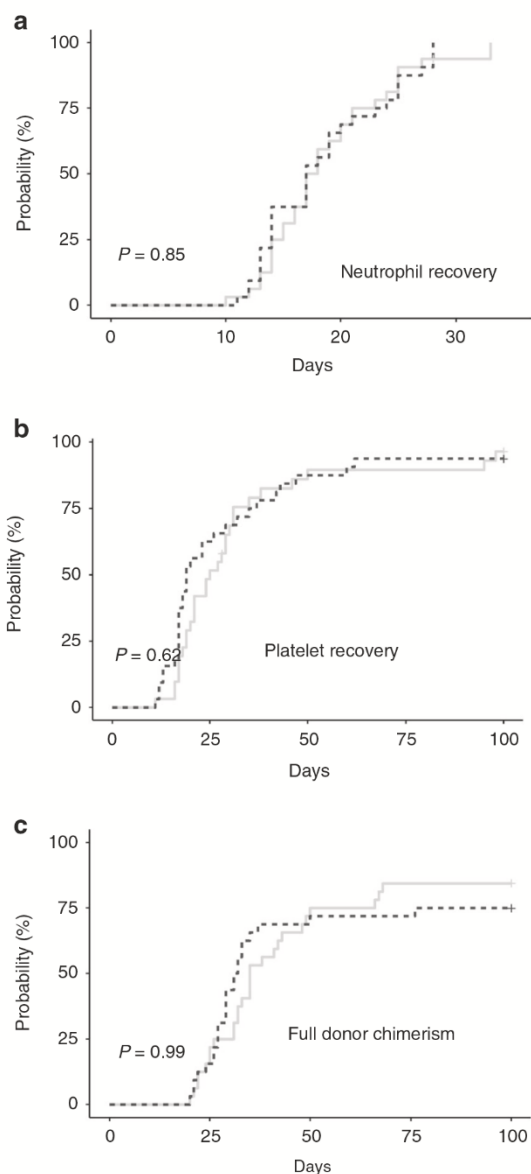


Fig. 1 Cumulative incidence of hematological recovery and full donor chimerism according to UD HSC (cryopreserved versus fresh). The cumulative incidences of **A** neutrophil recovery, **B** platelet recovery, and **C** full donor chimerism are shown for the groups of patients who underwent UD HSCT with either cryopreserved (solid line) or fresh PBSC (dashed line).

received RIC conditioning. Risk factors for GF other than cryopreservation condition have been described [19]. Both cohorts were comparable regarding acute GVHD, preemptive therapy on CMV disease, PFS, and OS at 100 days.

The impact on clinical outcomes of using cryopreserved grafts for HSCT procedures is controversial. Our findings contrast with some studies using frozen PBSC, which concluded that cryopreservation and subsequent transportation of PBSC may impair their engraftment in allogeneic HSCT [10].

However, other studies are in line with ours [5, 9, 11]. Interestingly, one study showed that the outcomes of patients who underwent HSCT with cryopreserved or fresh PBSC were similar in terms of neutrophil and platelet recovery, recurrence, PFS, and OS, although the study focused on MRD HSCT [9]. Our results are also in agreement with those of a recent report stating that cryopreservation of either MRD or UD allografts does not delay hematopoietic recovery, increase the risk of GVHD and PFS, or decrease OS after HSCT using GVHD prophylaxis with PTCy [5]. Furthermore, our finding that cryopreservation was associated with no impact on survival had already been reported in patients who underwent HSCT with UD HSC [11].

Although cryopreservation has undoubted advantages such as securing graft integrity before the start of conditioning, our study has also elicited some warnings. Six cryopreserved grafts were donated, transported, and cryopreserved, but not finally used, which means that 13% of donations remained stored by the end of the study. Interestingly, a study recently carried out by DKMS stem cell donor registry concluded that 5–10% of cryopreserved products will not be eventually transfused [20]. The requirement of quarantine for the donations received from countries where SARS-CoV-2 tests were not mandatory could have increased the odds of relapse or progress among recipients, which in fact happened in three cases, who thus lost their status as HSCT candidates [12]. A corrective policy could be scheduling transplantation and collection very closely in order to proceed with patient conditioning within a few days of UD HSC cryopreservation, time enough for performing mandatory quality controls. Furthermore, one product had to be discarded due to an HLA-typing error in the first HLA test. The HLA confirmatory result was obtained before the patient started conditioning, but, unfortunately, after donor collection. This kind of inconvenience may appear when work is performed under unbearable pressure, in conditions such as those created by COVID-19. This argument prompted us to adopt changes to ensure rigorous quality assurance with risk assessment when contingency plans are activated and cryopreservation is recommended for all products.

Finally, unintended transportation issues occasionally led to cryopreservation of grafts at origin, which resulted in last-minute decisions. One undesired consequence was that one external cryopreserved bag caused an allergic reaction by DMSO due to manual transfusion at an inappropriate rate. There were also packaging issues that might have compromised the safety of HSC. To prevent these problems, the coordination among collection centers, cell processing centers, and TCs must improve, and logistical issues concerning shipment and delivery must be anticipated. Moreover, we consider that the development of international guidelines by reference professional societies addressing the logistics of cryopreservation and transportation is urgently needed for adaption and harmonization with external centers and beyond.

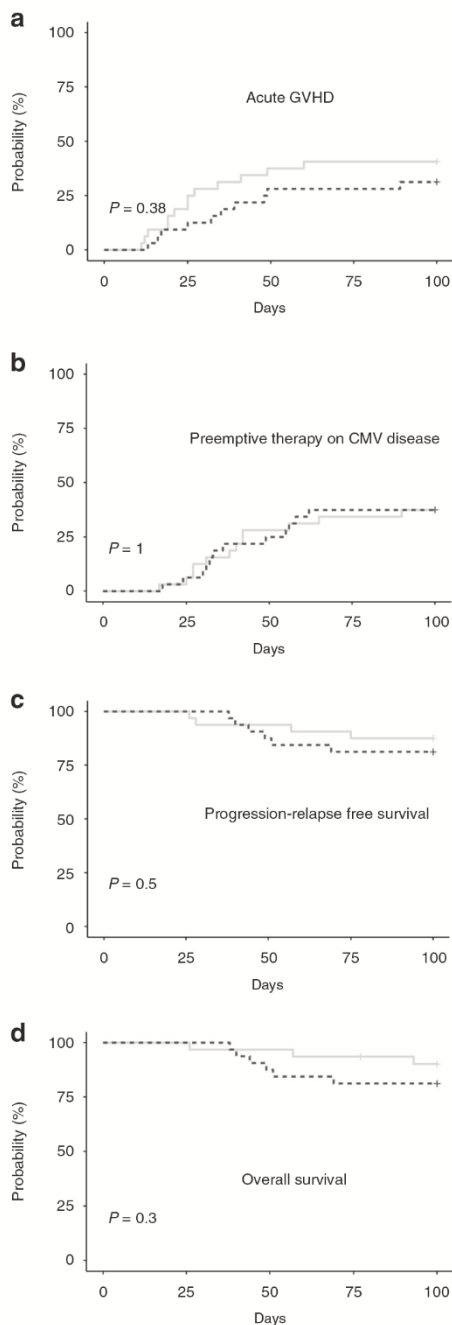


Fig. 2 Cumulative incidence of acute GVHD and preemptive CMV treatment disease, PFS, and OS according to UD HSC (cryopreserved versus fresh). The cumulative incidences of **A** acute graft-versus-host disease (GVHD), **B** preemptive therapy on CMV disease, **C** progression-relapse-free survival, and **D** overall survival are shown for the groups of patients who underwent UD HSCT with either cryopreserved (solid line) or fresh grafts (dashed line).

Our study has limitations: sample size of the cohorts was limited by the short duration of the recruitment period and the follow-up period was also necessarily short. Grafts subjected to major and minor manipulation, as well as BM

grafts, were excluded from the clinical outcomes analyses. Therefore, long-term effects of cryopreservation as well as the influence of manipulation or using BM as graft source must be addressed in future studies.

In summary, to the best of our knowledge, this is the first study to assess the impact of cryopreservation on UD transplantation outcomes during the COVID-19 pandemic. Since no statistical differences were found regarding engraftment, GVHD, preemptive CMV therapy, PFS, and OS, we consider that cryopreservation was a safe decision to maintain the UD HSCT program in TCs. However, further studies are needed. Importantly, wasting donations raises ethical issues, and logistic incidents that could affect product quality or timely delivery must be avoided. For this purpose, improvements in disaster plans led by international guidelines and harmonization in cryopreservation requirements are urgently needed in these complex scenarios. More efforts are required to ensure that all cryopreserved UD HSC are eventually transfused.

Acknowledgements We want to thank Jesus Maroto, Silvia Tuset, and Mar Sanchez for their administrative support, and Ramón Montes for his writing support. We also want to acknowledge BST Cell Therapy Service technical team (Sonia Maroto, Maria Ruz, Yolanda Chacon, Sergio Arteaga, Marina Hortola, and Camila Cardona) and cellular laboratory (Javier Algar, Begoña Amill, Margarita Blanco, Ruth Forner, Daniel Navarro, Aroa Perez, and Isabel Tarrago) for their effort, and external cell processing laboratories (Adoración Hernandez from Blood and Tissue Bank of Granada, Raquel de Paz from Hospital Universitario La Paz, Luis Larrea from Blood and Tissue Bank of Valencia, and Olga Lopez from Hospital Universitario de Salamanca) and external TC (Jaime Sanz from Hospital Universitari La Fe de Valencia). We also thank donors, patients, couriers, Spanish and other registries, and everyone who contributed to make UD HSCT possible in these difficult times. Statistical analysis has been carried out in the Statistics and Bioinformatics unit (UEB) Vall d'hebron Hospital Research Institute (VHIR).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

1. Frey NV, Lazarus HM, Goldstein SC. Has allogeneic stem cell cryopreservation been given the “cold shoulder”? An analysis of the pros and cons of using frozen versus fresh stem cell products in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transpl.* 2006;38:399–405.
2. Szer J, Weisdorf D, Querol S, Foeken L, Madrigal A. The impact of COVID-19 on the provision of donor hematopoietic stem cell products worldwide: collateral damage. *Bone Marrow Transpl.* 2020;23:1–2.
3. Recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) regarding the situation generated by the COVID-19 pandemic. 2020. <https://www.ebmt.org/sites/default/files/>

- 2020-03/EBMT%20COVID-19%20guidelines%20v.4.3%20%282020-03-23%29.pdf.
4. Recommendations of the World Marrow Donor Association (WMDA) regarding donor medical suitability in the situation generated by the COVID-19 pandemic 2021. <https://share.wmda.info/pages/viewpage.action?pageId=344866320>.
 5. Hamadani M, Zhang MJ, Tang XY, Fei M, Brunstein C, Chhabra S, et al. Graft cryopreservation does not impact overall survival after allogeneic hematopoietic cell transplantation using post-transplantation cyclophosphamide for graft-versus-host disease prophylaxis. *Biol Blood Marrow Transpl.* 2020;26:1312–7.
 6. Eckardt JR, Roodman GD, Boldt DH, Clark GM, Alvarez R, Page C, et al. Comparison of engraftment and acute GVHD in patients undergoing cryopreserved or fresh allogeneic BMT. *Bone Marrow Transpl.* 1993;11:125–31.
 7. Stockschröder M, Hassan HT, Krog C, Krüger W, Löfger C, Horstman M, et al. Long-term follow-up of leukaemia patients after related cryopreserved allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol.* 1997;96:382–6.
 8. Shinkoda Y, Ijichi O, Tanabe T, Ishikawa S, Kamitamari A, Nishikawa T, et al. Identical reconstitution after bone marrow transplantation in twins who received fresh and cryopreserved grafts harvested at the same time from their older brother. *Clin Transpl.* 2004;18:743–7.
 9. Kim DH, Jamal N, Saragosa R, Loach D, Wright J, Gupta V, et al. Similar outcomes of cryopreserved allogeneic peripheral stem cell transplants (PBSCT) compared to fresh allografts. *Biol Blood Marrow Transpl.* 2007;13:1233–43.
 10. Lioznov M, Dellbrugger C, Sutteck A, Fehse B, Kroger N, Zander AR. Transportation and cryopreservation may impair haematopoietic stem cell function and engraftment of allogeneic PBSCs, but not BM. *Bone Marrow Transpl.* 2008;42:121–8.
 11. Medd P, Nagra S, Hollyman D, Craddock C, Malladi R. Cryopreservation of allogeneic PBSC from related and unrelated donors is associated with delayed platelet engraftment but has no impact on survival. *Bone Marrow Transpl.* 2013;48:243–8.
 12. Update of October 5, 2020, of the guidelines of the Spanish National Transplant Organization (Spain Ministry of Health, Consumer Affairs and Social Welfare) about the impact of SARS-CoV-2 and COVID-19 on donation and transplantation, reference BV-ES-20200122-11. <http://www.ont.es/infesp/Paginas/COVID-19.aspx>.
 13. Lanza F, Saccardi R, Seghatchian J. New horizons on stem cell cryopreservation through the artificial eyes of CD34 using modern flow cytometry tools. *Transfus Apher Sci.* 2020;59:102785.
 14. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, et al. 1994 consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transpl.* 1995;15:825–8.
 15. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. *Biol Blood Marrow Transpl.* 2015;21:389–401. e1.
 16. Shaw BE, Chapman J, Fechter M, Foeken L, Greinix H, Hwang W, et al. Towards a global system of vigilance and surveillance in unrelated donors of haematopoietic progenitor cells for transplantation. *Bone Marrow Transpl.* 2013;48:1506–9.
 17. Mattsson J, Ringdén O, Storb R. Graft failure after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transpl.* 2008;14:165–70.
 18. Torlen J, Ringden O, Le Rademacher J, Batiwalla M, Chen J, Erkers T, et al. Low CD34 dose is associated with poor survival after reduced-intensity conditioning allogeneic transplantation for acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Biol Blood Marrow Transpl.* 2014;20:1418–25.
 19. Olsson RF, Logan BR, Chaudhury S, Zhu X, Akpek G, Bolwell BJ, et al. Primary graft failure after myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancies. *Leukemia.* 2015;29:1754–62.
 20. Schmidt AH, Buk D, Platz A, van den Brink MRM. Cryopreservation for all is no option in unrelated stem cell transplantation. Comment on Dholaria B, et al. securing the graft during pandemic: are we ready for cryopreservation for all? *Biol Blood Marrow Transpl.* 2020;26:e145–6.

Objectiu 3. Investigar els factors de la col·lecta i el transport que poden influir en els controls de qualitat després de la criopreservació de les CPH d'SP al·logèniques per a TPH.

Títol: Leukocytapheresis variables and transit time for allogeneic cryopreserved HPC: better safe than sorry.

Resum:

Introducció: la criopreservació de CPH de donants al·logènics va permetre assegurar la continuïtat dels programes de TPH durant la pandèmia de COVID-19. Diferents grups han demostrat que no hi ha cap impacte clínic en els resultats dels TPH d'SP de DNE que reben els productes congelats en comparació a aquells pacients que els reben en fresc. No obstant això, els controls de qualitat després de la descongelació d'alguns productes han evidenciat uns resultats preocupants.

Material i mètodes: el propòsit de l'estudi va ser analitzar retrospectivament els factors de la leucaféresi i el transport que podien influenciar en els resultats després de la descongelació, en concret les viabilitats i la clonogenicitat. Es van estudiar els controls de qualitat de les CPH d'SP de donants al·logènics criopreservats en l'LTC del BST i de l'Anthony Nolan entre el novembre del 2019 i el novembre del 2021.

Resultats: es van incloure un total de 155 donacions de CPH d'SP de donants al·logènics. En relació amb les característiques de les leucaféresis, les variables que van tenir un impacte en la recuperació de cèl·lules CD34 i CD3 vives després de la descongelació van ser el volum, la concentració de cèl·lules nucleades/ml i l'hematòcrit. No obstant això, en l'anàlisi multivariant només la recuperació de cèl·lules CD3 vives es va mantenir significativa ($r^2 = 0,373$; $P = < 0,001$). De manera addicional, el temps de trànsit (temps entre el final de col·lecta i la criopreservació) va impactar en l'anàlisi multivariant en la recuperació de cèl·lules CD34 ($r^2 = 0,186$) i CD3 ($r^2 = 0,376$) vives, així com en la recuperació d'UFC-GM ($r^2 = 0,212$).

Progenitors hematopoètics de sang perifèrica: característiques del producte que impacten en el receptor i en els controls de qualitat del processament

Discussió: diluir les leucafèresis per sota de 200×10^6 CN/ml, minimitzar la contaminació per sota del 2% d'hematòcrit del producte i congelar per sota de 250×10^6 CN/ml abans de les 36 hores pot prevenir recuperacions de cèl·lules CD34, CD3 i UFC-GM pobres (< 50 %) quan la criopreservació és necessària.



ARTICLE



Leukocytophoresis variables and transit time for allogeneic cryopreserved hpc: better safe than sorry

Jesus Fernandez-Sojo¹✉, Roger Horton², Joan Cid³, Carmen Azqueta¹, Ana Garcia-Buendia⁴, Elena Valdivia¹, Lluís Martorell¹, Nuria Rubio-Lopez¹, Margarita Codinach⁵, Gemma Aran⁵, Julia Marsal⁶, Alberto Mussetti⁷, Rodrigo Martino⁸, Cristina Diaz-de-Heredia⁹, Christelle Ferra¹⁰, David Valcarcel¹¹, Mónica Linares¹², Agueda Ancochea¹³, Enric García-Rey¹⁴, Nadia García-Muñoz¹⁵, Laura Medina¹⁶, Enric Carreras¹⁷, Juliàna Villa¹⁷, Miquel Lozano³, Daniel Gibson² and Sergio Querol¹

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2022

Cryopreservation was recommended to ensure continuity in allogeneic hematopoietic progenitor cells (HPC) transplantation during the COVID-19 pandemic. Several groups have shown no impact on clinical outcomes for patients who underwent HPC transplantation with cryopreserved products during the first months of this pandemic. However, concerns about quality control attributes after cryopreservation have been raised. We investigated, in 155 allogeneic peripheral blood cryopreserved HPC, leukocytophoresis characteristics influencing viable CD34⁺ and CD3⁺ cells, and CFU-GM recoveries after thawing. Collection characteristics such as volume, nucleated cells (NC)/mL and hematocrit correlated with viable CD34⁺ and CD3⁺ cells recoveries after thawing in univariate analysis but only CD3⁺ cells remained statistically significant in multivariate analysis ($r^2 = 0.376$; $P = < 0.001$). Additionally, transit time also showed correlation with viable CD34⁺ ($r^2 = 0.186$), CD3⁺ ($r^2 = 0.376$) and CFU-GM recoveries ($r^2 = 0.212$) in multivariate analysis. Thus, diluting leukocytophoresis below 200×10^6 NC/mL, avoiding red cells contamination above 2%, cryopreserving below 250×10^6 NC/mL and minimizing transit time below 36 h, prevented poor viable CD34⁺ and CD3⁺ cells, and CFU-GM recoveries. In summary, optimizing leukocytophoresis practices and minimizing transportation time may better preserve the quality attributes of HPC when cryopreservation is indicated.

Bone Marrow Transplantation; <https://doi.org/10.1038/s41409-022-01750-2>

INTRODUCTION

Allogeneic hematopoietic progenitor cells (HPC) are usually transported as fresh products to be transfused without the need for a cryopreservation step [1]. However, cryopreservation has undoubted advantages, such as securing graft integrity before starting the conditioning regimen and the ease of logistics for transplant procurement. On the other hand, there are some concerns about cryopreservation such as products not being used, adverse reactions to DMSO and cell damage [2–4].

In 2020, because of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) pandemic, widespread cryopreservation of allogeneic HPC was recommended by national authorities and international organizations to guarantee the receipt of a product before starting conditioning [5–7]. COVID-19 is still highly active in many countries, and in Europe, there has been an ongoing 6th wave

during the winter of 2021–2022. Although the severity of the disease has decreased due to vaccinations and the omicron variant, the social and medical disease burden is still significant. The emergence of new variants has forced different countries to continually re-appraise travel restrictions and consider the need for HPC cryopreservation [6]. Several groups and registries have shown no differences in engraftment, acute graft versus host disease (GVHD), infections and early post-transplant survival during the first months of the COVID-19 pandemic when comparing cryopreserved versus fresh allogeneic hematopoietic stem cell transplantations (HSCT) [3, 8–11]. Despite these results, concerns about product quality after cryopreservation have been raised [10, 12]. In the setting of cord blood and autologous hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), post thaw graft quality (viability and colony forming units (CFU)) has been

¹Advanced & Cell Therapy Services, Banc de Sang i Teixits, Barcelona, Spain; Transfusion Medicine Group, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Vall d'Hebron Hospital Universitari, Barcelona, Spain. ²Anthony Nolan Cell Therapy Centre, Nottingham Trent University, Nottingham, UK. ³Apheresis & Cellular Therapy Unit, Department of Hemotherapy and Hemostasis ICMHO, Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain. ⁴Data manager and statisticians, cell therapy department, Banc de Sang i Teixits, Barcelona, Spain. ⁵Cell Laboratory, Banc de Sang i Teixits, Barcelona, Spain. ⁶Pediatric Hematology Department, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain. ⁷Adult Hematology Department, Institut Català d'Oncologia-Hospitalet, Barcelona, Spain. ⁸Adult Hematology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, IIB-Sant Pau and Jose Carreras Leukemia Research Institute, Universitat Autònoma of Barcelona, Barcelona, Spain. ⁹Department of Pediatric Hematology and Oncology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Institut de Recerca, Barcelona, Spain. ¹⁰Adult Hematology Department, Institut Català d'Oncologia-Badalona, Barcelona, Spain. ¹¹Adult Hematology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain. ¹²Banc de Sang i Teixits, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; Transfusion Medicine Group, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain. ¹³Banc de Sang i Teixits, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain. ¹⁴Banc de Sang i Teixits, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain. ¹⁵Banc de Sang i Teixits, Hospital Universitari de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. ¹⁶Banc de Sang i Teixits, Hospital Universitari de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain. ¹⁷Spanish Bone Marrow Donor Registry, Josep Carreras Foundation and Leukemia Research Institute, Barcelona, Catalonia, Spain. ✉email: jefernandez@bst.cat

Received: 1 March 2022 Revised: 16 June 2022 Accepted: 27 June 2022
Published online: 08 July 2022

demonstrated to influence recipient engraftment [13–15], but the factors influencing quality control attributes are known and mostly under control [16]. However, limited data are available about the effect of pre-cryopreservation characteristics on post thaw quality control of frozen allogeneic peripheral blood (PB) HPC.

The aim of the present study was to retrospectively investigate collection and transport factors that might influence the quality control attributes after cryopreservation (like cell viability and clonogenicity) of allogeneic PB HPC for transplantation. This assessment may harmonize collection center practices and transportation conditions policies when cryopreservation is recommended.

MATERIALS AND METHODS

Eligibility criteria

This is a collaborative study between Banc de Sang i Teixits (BST), Barcelona, Spain, and Anthony Nolan (AN), Nottingham, UK. Allogeneic related and unrelated, unmanipulated PB HPC that were cryopreserved from November 2019 to November 2021 were retrospectively included in the study. All donors and recipients provided written informed consent prior to collection and transplantation, respectively. The Vall d'Hebron Hospital's Ethics Committee reviewed and approved the study [PR(BS)529/2021].

Apheresis collection

Leukocytapheresis was performed with either citrate dextrose solution A (ACDA) anticoagulant or ACDA + heparin according to collection center protocols and end time of collection was recorded. Products were hand-carried in validated boxes for delivery to processing facilities and kept refrigerated (2–8 °C) for overnight storage. Fresh graft characterization was performed in the associated transplant center (TC) cellular laboratory on leukocytapheresis material with: an automated complete blood count (CBC) using an hematology analyzer (XN550, Sysmex, Kobe, Japan; XE2000, Sysmex UK, Milton Keynes, UK) analysis of nucleated cells (NC) concentration, percentage of mononuclear cells (MNC), hematocrit and platelet concentration; phenotyping by flow cytometry (Navios, Beckman Coulter, Brea, EEUU; BD FACS Canto II, BD UK, Oxfordshire) assessing CD45⁺, CD34⁺ and CD3⁺ cells expression and viability assessment using 7-aminoactinomycin D (7-AAD) staining according to the single-platform International Society for Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) protocol; potency was analyzed with CFU granulocyte-macrophage (GM) assay using Methocult 4434 (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) supplemented with IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, BIONEWE, Nuaille, France). Frozen bone marrow proficiency testing program (stem cell technologies) was performed for quality control of CFU counts.

Cryopreservation

Cryopreservation was performed in two cellular processing laboratories (BST, cell therapy department, and AN Cell Therapy Centre, Nottingham, UK) and was destined for 4 TCs (BST) and 8 TCs (AN).

Prior to cryopreservation, HPC were plasma reduced. The cryopreservation solution was added volume: volume over 10 min at increasing speed, to a final concentration of 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) and human serum albumin in Plasma-Lyte solution into a cryobag (50/250/750 dependent upon aliquot volume; Milteny). Final NC concentration and start time of cryopreservation was recorded. A maximum of 30 min was permitted between initial additions of cryoprotectant solution to initiation of cryopreservation. A controlled-rate/programmable freezer was used to produce a freezing rate of –1 °C/minute until –40 °C, then continuing with a rate of –5 °C/min until –150 °C; storage was performed at less than –150 °C in vapor phase or liquid nitrogen tanks.

Quality control of cryovial reference sample

Three 0.5 mL cryovials of the cells preparation were frozen in parallel with the cryobag, and remained for a minimum of 24 h in the same conditions as the cryobag. Then one cryovial was thawed using a water bath at 37 °C. Red cells lysis and dilution was performed prior to flow cytometry.

The same quality control tests were performed on the cryovial reference sample as in fresh leukocytapheresis, but adjusting flow cytometry gating for thawed cells and following a similar gating strategy as in the ISHAGE protocol [17].

Table 1. Baseline characteristics of patients and donors, and pre and post cryopreservation characteristics of HPC.

Characteristics	
N = 155 cryovial reference samples	
<i>Patients</i>	
Age (years), median (range)	53 (2–70)
Sex, n (%)	
Male	95 (61.3)
Female	60 (38.7)
Weight (kg), median (range)	70 (15–110)
Diagnosis, n (%)	
Acute leukaemia	86 (55.5)
Lymphoma	23 (14.8)
MDS/MPN	22 (14.2)
Others ^a	24 (15.5)
<i>Donors</i>	
Age (years), median (range)	34 (17–66)
Sex, n (%)	
Male	104 (67.1)
Female	51 (32.9)
Weight (kg), median (range)	77 (51–141)
Type of donor, n (%)	
Related	85 (54.8)
Unrelated	70 (45.2)
<i>Collected grafts</i>	
Transit time (hours), median (range)	23.3 (2.6–57)
Overseas, n (%)	2 (1)
Overnight prior cryopreservation, n (%)	96 (62)
Volume (ml), median (range)	318.5 (84.0–782.9)
NC/mL (x10 ⁶), median (range)	176.2 (94.2–559.4)
MNC (%), median (range)	84.5 (51.6–98.0)
Hematocrit, median (range)	1.6 (0.2–6.1)
Platelet/mL (x10 ⁶), median (range)	1385.0 (491.0–3473.0)
<i>Pre-freeze aliquots</i>	
NC x 10 ⁶ /mL median (range)	225.1 (73.5–469.1)
NC x 10 ⁸ cell dose/kg, median (range)	5.7 (1.6–18.3)
CD34 ⁺ x 10 ⁶ cell dose/kg, median (range)	6.0 (0.3–22.1)
CD3 ⁺ x 10 ⁸ cell dose/kg, median (range)	1.8 (0.4–6.1)
CFU-GM x 10 ⁵ /kg, median (range)	9.3 (0.0–67.0)
<i>Cryovial sample</i>	
NC x 10 ⁸ /kg, median (range)	5.6 (1.6–19.9)
Viable CD34 ⁺ x 10 ⁶ /kg, median (range)	4.4 (0.3–19.7)
Viable CD3 ⁺ x 10 ⁸ /kg, median (range)	1.0 (0.1–3.9)
CFU-GM x 10 ⁵ /kg, median (range)	7.9 (0.4–38.0)
Viability, median (range)	
CD45 ⁺ /7-AAD negative (%)	70.3 (26.5–89.4)
CD34 ⁺ /7-AAD negative (%)	89.2 (7.9–100.0)
CD3 ⁺ /7-AAD negative (%)	61.5 (10.1–96.8)

HPC hematopoietic progenitor cells, MDS/MPN myelodysplastic syndrome/ myeloproliferative neoplasms, NC nucleated cells, MNC mononucleated cells, CFU-GM colony-forming units granulocyte/macrophage, 7-AAD 7-Aminoactinomycin D.

^aEleven patients with chronic leukaemia, 6 with myeloma/plasma cell disorders, 4 with secondary acute leukaemia, 2 with inherited disorders, 1 with haemoglobinopathy and 1 with bone marrow failure.

Table 2. Univariate and multivariate linear regression analysis of viable CD34⁺ and CD3⁺ cells, and CFU-GM recoveries on post thaw cryovial of cryopreserved HPC.

Variable	Viable CD34 ⁺ cells recovery				Viable CD3 ⁺ cells recovery				CFU-GM recovery				
	Univariate analysis		Multivariate analysis		Univariate analysis		Multivariate analysis		Univariate analysis		Multivariate analysis		
	r2	RC (95% CI)	P	R2	RC (95% CI)	r2	P	RC (95% CI)	R2	P	RC (95% CI)	R2	P
Female donor	0.009	-3.64 (-9.57 to 2.29)	0.228	0.034	8.60 (.33 to 15.87)	0.021	0.000	-1.93 (-20.20 to 16.33)	0.000	0.835	-1.93 (-20.20 to 16.33)	0.000	0.835
Unrelated donor	0.022	-5.45 (-11.23 to 0.32)	0.064	0.025	-6.90 (-13.80 to -0.00)	0.05	0.072	-29.30 (-46.45 to -12.14)	0.072	0.001	-29.30 (-46.45 to -12.14)	0.072	0.001
Collection volume	0.019	-0.02 (-0.03 to 0.00)	0.088	0.026	-0.03 (-0.05 to 0.00)	0.046	0.012	0.05 (-0.02 to 0.11)	0.012	0.177	0.05 (-0.02 to 0.11)	0.012	0.177
Transit time	0.085	-0.35 (-0.53 to -0.17)	<0.001	0.186	-0.29 (-0.48 to -0.10)	0.003	0.083	-0.41 (-0.63 to -0.19)	0.376	0.004	-0.32 (-0.54 to -0.11)	0.004	0.004
NC/mL collection	0.027	-0.05 (-0.09 to -0.00)	0.041	0.056	-0.08 (-0.14 to -0.03)	0.003	0.056	-0.08 (-0.14 to -0.03)	0.376	0.032	-0.06 (-0.12 to -0.01)	0.010	0.214
% MNC collection	0.033	0.39 (0.05 to 0.69)	0.025	0.026	0.39 (0.05 to 0.73)	0.026	0.004	0.37 (-0.62 to 1.53)	0.004	0.462	0.37 (-0.62 to 1.53)	0.004	0.462
CD45 ⁺ 7-AAD neg collection	0.094	11.85 (5.96 to 17.73)	<0.001	0.186	7.76 (1.61 to 13.92)	0.014	0.088	13.73 (6.66 to 20.80)	0.025	0.053	18.36 (-0.28 to 37.00)	0.025	0.053
CD3 ⁺ 7-AAD neg collection	0.044	6.74 (1.72 to 11.77)	0.009	0.070	10.23 (4.30 to 16.17)	0.001	0.018	12.65 (-2.78 to 28.08)	0.018	0.107	12.65 (-2.78 to 28.08)	0.018	0.107
Hto collection	0.062	-4.35 (-7.06 to -1.64)	0.002	0.142	-7.90 (-11.00 to -4.79)	<	0.376	5.64 (-9.32 to -1.96)	0.035	0.023	-9.87 (-18.34 to -1.40)	0.035	0.023
Platelet/mL collection	0.002	-0.00 (-0.01 to -0.00)	0.604	0.112	-0.00 (-0.01 to 0.00)	0.174	0.026	-0.01 (-0.03 to 0)	0.026	0.05	-0.01 (-0.03 to 0)	0.026	0.05
NC/mL cryo	0.047	-0.06 (-0.10 to -0.02)	0.007	0.186	-0.07 (-0.11 to -0.03)	0.001	0.158	-0.13 (-0.18 to -0.08)	0.376	<0.001	-0.10 (-0.16 to -0.05)	0.011	0.204

CFU-GM colony-forming units granulocyte/macrophage, HPC hematopoietic progenitor cells, RC regression coefficient, CI confidence interval, 7-AAD 7-Aminoactinomycin D, NC nucleated cells, MNC mononucleated cells, Hto hematocrit. Bold values indicate statistical significance.

Definitions

Transit time was considered as the time between the end of the collection procedure to the start of cryopreservation.

Recoveries were calculated as absolute number of NC, viable CD45⁺, CD34⁺, CD3⁺ cells and CFU-GM in the post thaw cryovial divided by absolute number of NC, viable CD45⁺, CD34⁺ and CD3⁺ cells, and CFU-GM in the initial fresh material sample and multiplied by 100.

Poor post thaw viability and clonogenicity were defined as less than 50% of viable CD34⁺ and CD3⁺ cells, and CFU-GM recoveries in a cryovial after thawing.

Study endpoints

We investigated factors, regarding graft characteristics and transit time, influencing the post thaw quality control attributes (viable CD34⁺ and CD3⁺ cells recoveries, and CFU-GM recovery) of allogeneic cryopreserved PB HPC, potentially resulting in reduced graft performance. Additionally, we evaluated the thresholds of those variables that predict poor viability and clonogenicity after cryopreservation.

Statistical analysis

Patient- (age, sex, weight and diagnosis), donor- (age, sex, weight, and type of donor (related or unrelated)), graft- (transit time, volume, NC/mL, % MNC, hematocrit, platelet/mL and CD45⁺, CD34⁺ and CD3⁺ cells viability), cell processing- (NC dose/kg, viable CD34⁺ and CD3⁺ cells dose/kg, CFU-GM/kg and NC/mL at cryopreservation) and post thaw quality control attributes (NC dose/kg, viable CD34⁺ and CD3⁺ cells dose/kg and CFU-GM/kg) were assessed. Median and range or frequency and percentage were used for quantitative and qualitative variables, respectively. The endpoints considered were viable CD34⁺ and CD3⁺ cells and CFU-GM recovery, in a cryopreserved reference sample of HPC. Mann-Whitney U test and Chi-Square test were performed for continuous and categorical variables, respectively.

A multivariate model was added, considering as explanatory variables all those with a *p*-value less than 0.1 in the bivariate analysis, and excluding those that presented collinearity problems. The final model was obtained using the Least Square Method to find the estimated multiple linear regression.

Statistical analysis was performed with the software R Studio (Version 4.1.2). The significance level was set at 0.05.

RESULTS

Baseline characteristics of patients, donors and grafts

Our series comprises a total of 155 cryovial reference samples of allogeneic PB HPC that were cryopreserved from November 2019 to November 2021 (Table 1). Eighteen (12%) leukocytapheresis were performed for pediatric patients. Regarding donors, the median age was 34 years old, mostly men (67%) and 45% of them were unrelated donors. Patient's and donors' characteristics are summarized in Table 1.

We analyzed the graft's characteristics (Table 1). The median time between ending collection and starting cryopreservation was 23.3 h. The median CD45⁺, CD34⁺ and CD3⁺ cells viability at cell processing reception was 99%, 100% and 100%, respectively.

Baseline characteristics of cryopreservation and quality control after thawing

One hundred and thirty-three (86%) and twenty-two (14%) products were processed in BST and AN laboratories, respectively. The median (range) of cells concentration at cryopreservation was 225 (74–469) NC/mL. Only, 16 (10%) leukocytapheresis were frozen with a final NC/mL higher than 250 × 10⁶. The median (range) of CD34⁺ cells dose/kg, CD3⁺ cells dose/kg and CFU-GM/kg in frozen aliquots were 6.0 (0.3–22.1) × 10⁶, 1.8 (0.4–6.1) × 10⁸ and 9.3 (0.0–67) × 10⁵, respectively.

A cryovial reference sample was thawed for each frozen cryobag to assess cell content, viability and clonogenicity (Table 1). The median post thaw cryovial viability of CD45⁺ 7-AAD⁻, CD34⁺ 7-AAD⁻ and CD3⁺ 7-AAD⁻ was 70%, 89% and 62%, respectively. The loss of viable CD34⁺, CD3⁺ cells and CFU-GM after

cryopreservation was 19%, 43% and 14%, respectively (Table 15. Supplementary data). Comparison between the two facilities is showed in supplementary data (Table 25). Non relevant differences between laboratories were found regarding viable CD3⁺ cells and CFU-GM recoveries.

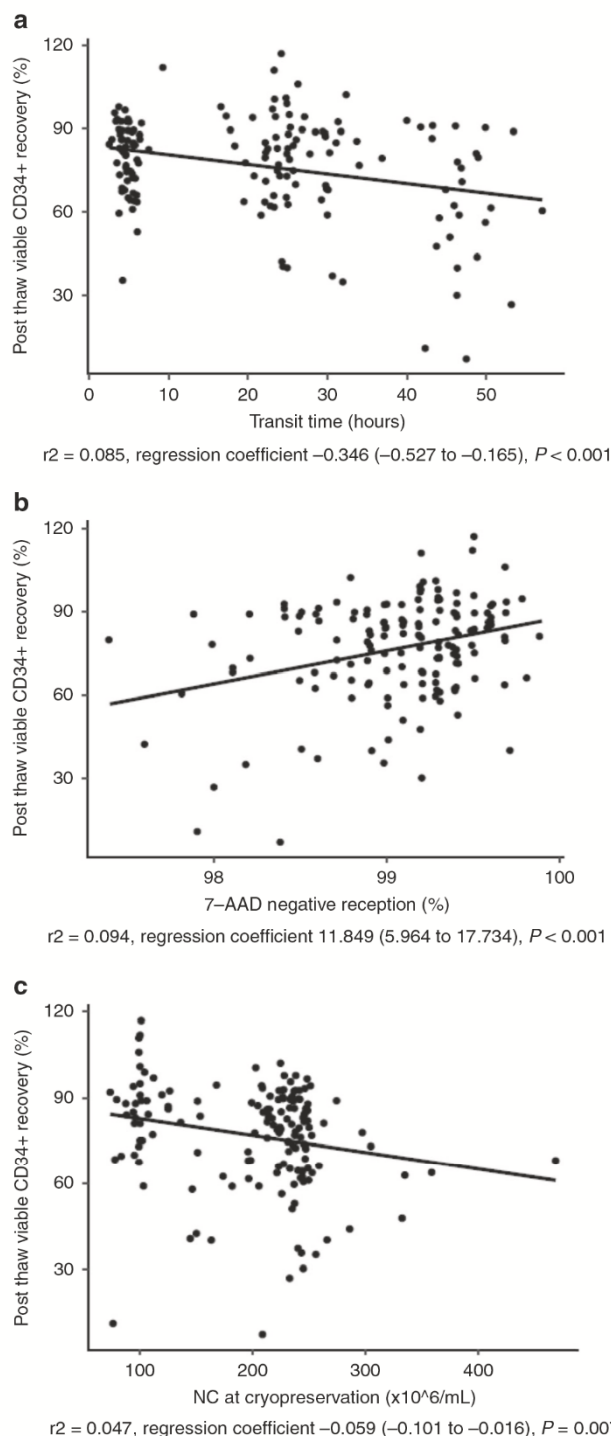


Fig. 1 Variables affecting viable CD34⁺ cells recovery in the cryovial. Viable CD34⁺ cells recovery in the cryovial is plotted against transit time (hours) (a), CD45⁺ cells 7-AAD⁻ (%) at reception (b) and NC/mL ($\times 10^6$) at cryopreservation (c).

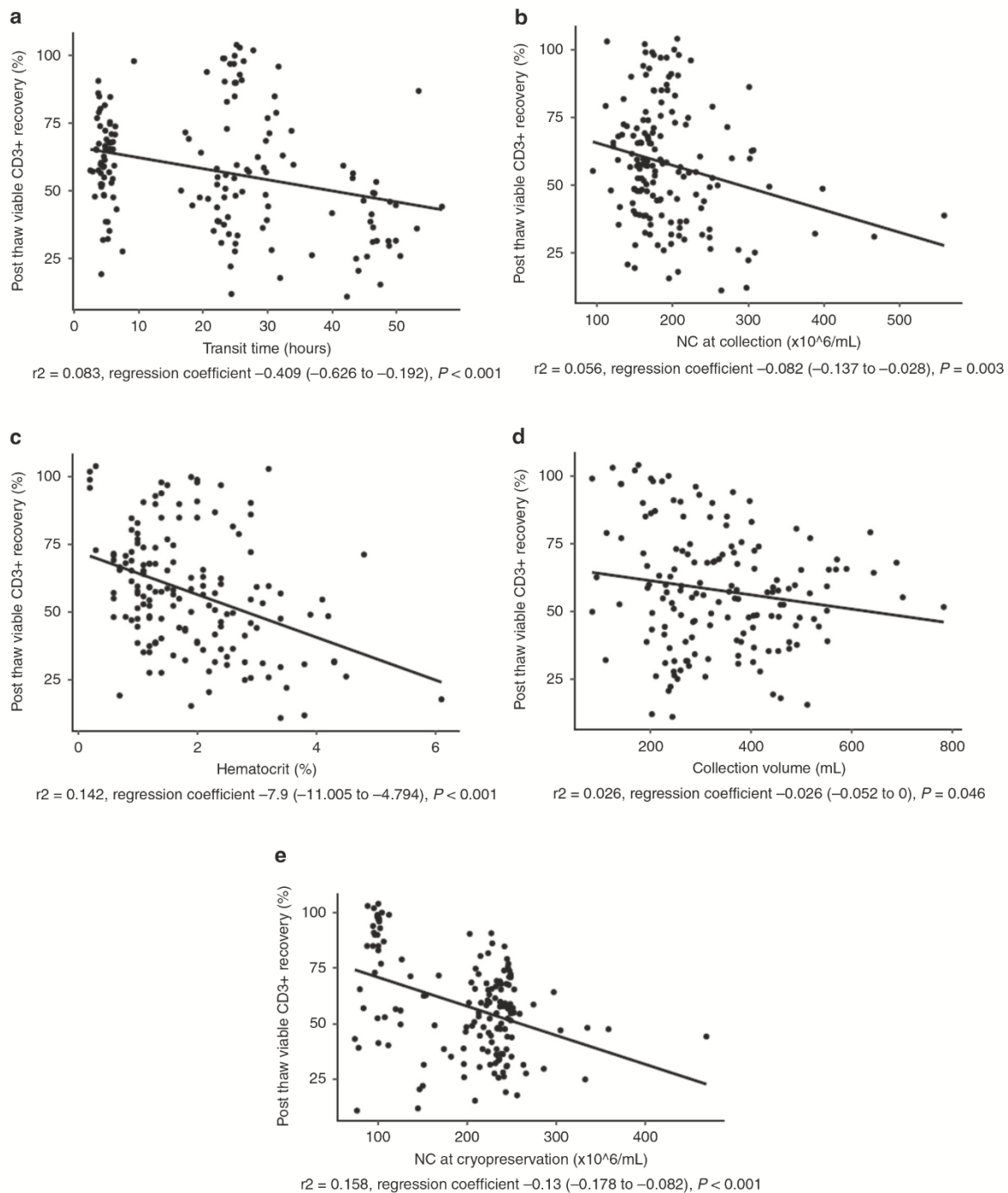


Fig. 2 Variables affecting viable CD3⁺ cells recovery in the cryovial. Viable CD3⁺ cells recovery in the cryovial is plotted against transit time (hours) (a), NC/mL ($\times 10^6$) collection (b), hematocrit (%) (c), collection volume (ml) (d) and NC/mL ($\times 10^6$) at cryopreservation (e).

Variables influencing viable CD34⁺ and CD3⁺ cells recoveries after thawing

We investigated the effects of fresh cell product characteristics and transit time on the post thaw attributes of cryovial reference samples from cryopreserved allogeneic PB HPC. On univariate linear regression analysis, a weak correlation was observed between viable CD34⁺ cells recovery after cryopreservation and

graft attributes such as NC/mL, MNC (%), CD45⁺ 7-AAD⁻ (%) and CD3⁺ 7-AAD⁻ (%). Interestingly, a higher correlation was observed between the above parameters for viable CD3⁺ cells recovery in cryovials than for viable CD34⁺ cells (Table 2). In multivariate analysis, only transit time and the percentage of CD45⁺ 7-AAD⁻ at reception remained statistically significant with viable CD34⁺ cells after thawing. In contrast,

regarding viable CD3⁺ cells recovery, more graft attributes (transit time, collection volume, NC/mL at collection and hematocrit) remained statistically significant (Table 2). Correlation of those variables and viable CD34⁺ and CD3⁺ cells recoveries are shown in Figs. 1 and 2, respectively.

Regarding donor characteristics, female and unrelated donors correlated weakly with viable CD3⁺ cells recovery after thawing in univariate but not multivariate analysis (Table 2).

HPC plasma reduction, considered as NC/mL at cryopreservation, weakly correlated with both viable CD34⁺ and CD3⁺ cells recoveries after thawing on univariate analysis but only with CD3⁺ cells recoveries in multivariate analysis (Table 2 and Fig. 2).

Variables influencing CFU-GM recovery after thawing

Donor characteristics (unrelated donor), graft attributes (transit time, hematocrit and platelet/mL) showed a weak correlation on univariate analysis (Table 2). However, only transit time remained statistically significant in multivariate analysis (Table 2). Weak correlation with transit time and CFU-GM recovery after thawing is shown in Fig. 3.

Viable CD34⁺ cells recovery has a weak correlation albeit significant with CFU-GM recovery ($r_2 = 0.033$; $P = 0.002$). However, even in cases with poor CD34⁺ cells recovery, CFU-GM recovery was observed (Fig. 1S. Supplementary data).

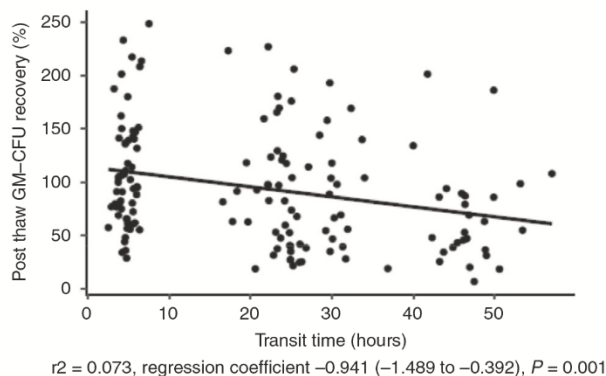


Fig. 3 2. Variables affecting CFU-GM recovery in the criovial. CFU-GM recovery (%) after thawing is plotted against transit time (h).

Dichotomy variables influencing poor viability and poor potency after thawing

Those variables that influenced the viable CD34⁺ and CD3⁺ cells, and CFU-GM recoveries after thawing in multivariate analysis were selected and converted into dichotomy variables.

Exploratory analysis between threshold dichotomy variables and significant poor viability (<50% viable CD34⁺ and CD3⁺ cells recoveries) and poor clonogenicity (<50% CFU-GM recovery) was performed (Table 3). Seven out of twenty-eight (25%) allogeneic PB HSC with more than 36 h from collection until starting cryopreservation had poor viable CD34⁺ cells recovery ($P = 0.001$). Only 36 h was statistically associated in univariate analysis with poor viability and clonogenicity (Table 3). Forty-eight (31%) of leukocytapheresis were collected with a higher concentration than 200×10^6 NC/mL and associated with poor viable CD3⁺ cells recoveries ($P = 0.020$). Fifty-eight (37%) grafts had a higher hematocrit than 2% and were associated with poor viable CD3⁺ cells recoveries ($P = <0.001$). Finally, plasma reduced HPC with a higher NC concentration than 250×10^6 /mL were associated with poor viable CD34⁺ and CD3⁺ cells recoveries in univariate analysis (Table 3).

Four samples showed a very poor viable CD34 + cells recovery (<30%) after thawing. All of them were cryopreserved at more than 42 h old from end of collection. Three samples were frozen as leftover aliquots and they have not been transfused to date. The only patient that underwent HSCT with a with very poor viable CD34 + cells recovery showed neutrophil and platelet engraftment at 17 and 87 days after transplantation, respectively. It reflects a delay in engraftment-mainly in platelets.

DISCUSSION

We retrospectively analyzed pre-freeze variables affecting viability and clonogenicity after thawing of 155 samples of allogeneic cryopreserved PB HPC. In our study, transit time longer than 36 h influenced poor viable CD34⁺ and CD3⁺ cells recoveries and also poor CFU-GM recovery. Interestingly, viable CD3⁺ cells recoveries were affected more by graft attributes such as NC/mL $>200 \times 10^6$, collection volume and hematocrit $>2\%$. Finally, cryopreservation with an NC concentration higher than 250×10^6 /mL was associated with poor viability but without affecting clonogenicity.

Several other observations in our study are worth mentioning. First, our data are consistent with recent scientific literature in terms of viable CD34⁺ cells recovery after thawing; Purtil D and

Table 3. Dichotomy variables resulting in <50% viable CD34⁺ and CD3⁺ cells, and CFU-GM recoveries on postthaw cryovial of cryopreserved HPC.

Variable	<50% viable CD34 ⁺ cell recovery			<50% viable CD3 ⁺ cell recovery			<50% CFU-GM recovery		
	No	Yes	P	No	Yes	P	NO	Yes	P
Transit time, n			0.002			<0.001			0.005
≤ 36 h	121	6		90	37		98	23	
> 36 h	21	7		5	23		15	13	
NC/mL at reception, n			0.035			0.021			0.034
≤200 × 10 ⁶	101	5		72	34		83	19	
>200 × 10 ⁶	41	8		23	26		30	17	
Hto at reception, n			0.005			<0.001			0.142
≤2%	95	3		71	27		74	18	
>2%	47	10		24	33		39	18	
NC/mL at cryopreservation, n			0.040			0.017			0.695
≤250 × 10 ⁶	130	9		89	50		102	31	
>250 × 10 ⁶	12	4		6	10		11	5	

CFU-GM colony-forming units granulocyte/macrophage, HPC hematopoietic progenitor cells, NC nucleated cells, hto hematocrit.

colleagues reported a similar median of 74% CD34⁺ cells recoveries [10]. Other groups found >90% CD34⁺ cells recoveries [18, 19]. However, a central cryopreservation hub published a 42% viable CD34⁺ cells recovery but 94% viability after thaw [20]. It is possible that this may be attributed to the fact that the assessment of cryopreserved material is more difficult even using a standardized ISHAGE protocol. This means that alternative approaches for viable CD34⁺ cells quantification after thawing may help in defining a more reproducible method [17]. Second, CD3⁺ cells recoveries were more sensitive to cryopreservation (lower than 60%), as others groups reported [18, 19]. Interestingly we observed new parameters associated with this impairment such as transit time, collection volume, NC/mL during transport, hematocrit and also with cells concentration at freezing (NC/mL at cryopreservation). Some differences between BST and AN were observed regarding viable CD3⁺ cells without affecting overall results. In our series, BST samples were cryopreserved with longer transit time and higher NC/mL cryopreservation than AN samples, leading to a lower viable CD3⁺ cells recovery.

Third, only transit time was associated with CFU-GM recovery, showing that clonogenicity of stem cells are well protected even when low viability is reported.

Leukocytapheresis is a well-defined and automated process. However, operators can potentially negatively affect product quality attributes by modulating collection parameters such as red blood cells contamination and NC/mL. Our study suggests that long collections, defined as high graft volumes, could result in poor CD3⁺ cells viability after thawing. It may be explained by cell damage due to prolonged centrifugation in the collection device. A higher hematocrit than 2% was also associated with poor CD3⁺ cells viability. Red blood cells contamination may also adversely affect T cells expansion in culture for advanced cell therapies [21]. Our group supports diluting products to a maximum of 200×10^6 NC/mL after collection to preserve viability after thawing, a lower threshold than other groups [12]. In regards to cell processing after collection, plasma reduction of products to a higher than 250×10^6 mL was associated to a poor viability.

Despite different graft attributes factors influencing cells recovery after thawing, only transit time was associated in multivariate analysis with low viability and clonogenicity. In our study, allogeneic HPC cryopreserved more than 36 h after collection (estimated threshold for overseas products) were associated with poor viability as reported by Purtill D and colleagues [10], and with poor CFU-GM recovery. The creation of a central European cryopreservation site for Australian TC's using DKMS registry donors has guaranteed a lower transit time and therefore, better quality control of HPC attributes [20]. Viable CD34⁺/kg and CFU-GM/kg pre and post cryopreservation impacts on engraftment of autologous HSCT and CBU transplantation [14, 22, 23]. However, limited data are available regarding impact of viable CD34⁺/kg and CFU-GM after thawing of cryopreserved allogeneic PB HPC. The COVID-19 pandemic made it necessary to cryopreserve allogeneic HPC, and mostly groups have shown no differences regarding engraftment and clinical outcomes versus fresh allogeneic HSCT [3, 8–11]. Probably, despite cell losses after cryopreservation, enough viable CD34⁺ cells dose and CFU-GM are usually transfused because a good mobilization is achieved from healthy donors, and therefore no clinical impact has been shown. However, even in those healthy donors, approximately 2% of them are at risk of poor mobilization [24] and the difference in weight between recipient and donor exists in allogeneic HSCT. So, cryopreservation of allogeneic HPC could potentially result in reduced graft performance in those situations. Therefore, good control of collection variables (transit time, NC/mL at transportation, collection volume and hematocrit) and transit time could better preserve the viability and clonogenicity after cryopreservation.

Nevertheless, our study has some limitations, first of all because of its retrospective design. Second, we focus our analysis on

the CD34⁺ and CD3⁺ cells populations. Third, 2 different cell processing laboratories were involved but with the same cryopreservation and quality control methodology. Finally, CFU assays require training and experience to reduce variability. In spite of both laboratories are running external proficiency testing, CFU assessment is a temperamental assay and due to technician variation in identifying and counting colonies, pre and post processing inconsistencies and consequently interlaboratory performance variations can be expected as our study showed [14]. However, this issue is not affecting the general results nor our conclusions.

In summary, to the best of our knowledge, this is the first study to assess the impact of pre-freeze characteristics not only on CD34⁺ cells viability after thawing, but also on T cells lymphocytes and clonogenicity in allogeneic PB HPC. In our study, transit time longer than 36 h was associated with poor viability and clonogenicity after thawing. Diluting leukocytapheresis below 200×10^6 NC/mL, avoiding red blood cells contamination higher than 2% hematocrit and cryopreserving with lower than 250×10^6 NC/mL may increase viability especially for CD3⁺ cells. These results may help to harmonize collection centers and transit time policies when cryopreservation is recommended.

DATA AVAILABILITY

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

REFERENCES

1. Frey NV, Lazarus HM, Goldstein SC. Has allogeneic stem cell cryopreservation been given the "cold shoulder"? An analysis of the pros and cons of using frozen versus fresh stem cell products in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transpl.* 2006;38:399–405.
2. Schmidt AH, Buk D, Platz A, van den Brink MRM. Cryopreservation for All Is No Option in Unrelated Stem Cell Transplantation. Comment on Dholaria B, et al. Securing the Graft During Pandemic: Are We Ready for Cryopreservation for All? *Biol Blood Marrow Transpl.* 2020;26:e145–6.
3. Fernandez-Sojo J, Azqueta C, Valdivia E, Martorell L, Medina-Boronat L, Martinez-Llonch N, et al. Cryopreservation of unrelated donor hematopoietic stem cells: the right answer for transplantations during the COVID-19 pandemic? *Bone Marrow Transpl.* 2021;56:2489–96.
4. Kim DH, Jamal N, Saragosa R, Loach D, Wright J, Gupta V, et al. Similar outcomes of cryopreserved allogeneic peripheral stem cell transplants (PBSCT) compared to fresh allografts. *Biol Blood Marrow Transpl.* 2007;13:1233–43.
5. Update of October 5th, 2020, of the guidelines of the Spanish National Transplant Organization (Spain Ministry of Health, Consumer Affairs and Social Welfare) about the impact of SARS-CoV-2 and COVID-19 on donation and transplantation, reference BV-ES-20200122-11. <http://www.ont.es/infesp/Paginas/COVID-19.aspx>.
6. Recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) regarding the situation generated by the COVID-19 pandemic. 2020 <https://www.ebmt.org/sites/default/files/2020-03/EBMT%20COVID19%20guidelines%20v.4.3%20%282020-03-23%29.pdf>
7. Recommendations of the World Marrow Donor Association (WMDA) regarding donor medical suitability in the situation generated by the COVID-19 pandemic 2021. <https://share.wmda.info/display/DMSR/Coronavirus+++COVID-19#/>
8. Maurer K, Kim HT, Kuczumski TM, Garrity HM, Weber A, Reynolds CG, et al. Impact of Cryopreservation and Transit Times of Allogeneic Grafts on Hematopoietic and Immune Reconstitution. *Blood Adv.* 2021;5:5140–9.
9. Abstracts from the 2021 ASH Annual Meeting and Exposition. Devine S. 2846:2021.
10. Purtill D, Hutchins C, Kennedy G, McClean A, Fraser C, Shaw PJ, et al. Good Engraftment but Quality and Donor Concerns for Cryopreserved Hemopoietic Progenitor Cell Products Collected During the COVID-19 Pandemic. *Transpl Cell Ther.* 2021;27:1022.e1–e6.
11. Valentini CG, Chiusolo P, Bianchi M, Metafani E, Orlando N, Giammarco S, et al. Coronavirus disease 2019 pandemic and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a single center reappraisal. *Cytotherapy* 2021;23:635–40.
12. Purtill D, Antonenas V, Chiappini P, Tong D, O'Flaherty E, Bajel A, et al. Variable CD34⁺ recovery of cryopreserved allogeneic HPC products: transplant implications during the COVID-19 pandemic. *Blood Adv.* 2020;4:4147–50.

13. Avery S, Shi W, Lubin M, Gonzales AM, Heller G, Castro-Malaspina H, et al. Influence of infused cell dose and HLA match on engraftment after double-unit cord blood allografts. *Blood* 2011;117:3277–85.
14. Yang H, Acker JP, Cabuhat M, Letcher B, Larrat L, McGann LE. Association of post-thaw viable CD34⁺ cells and CFU-GM with time to hematopoietic engraftment. *Bone Marrow Transpl.* 2005;35:881–7.
15. Lee S, Kim S, Kim H, Baek EJ, Jin H, Kim J, et al. Post-thaw viable CD34(+) cell count is a valuable predictor of haematopoietic stem cell engraftment in autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Vox Sang.* 2008;94:146–52.
16. Purtil D, Smith K, Devlin S, Meagher R, Tonon J, Lubin M, et al. Dominant unit CD34+ cell dose predicts engraftment after double-unit cord blood transplantation and is influenced by bank practice. *Blood* 2014;124:2905–12.
17. Lanza F, Saccardi R, Seghatchian J. New horizons on stem cell cryopreservation through the artificial eyes of CD34 using modern flow cytometry tools. *Transfus Apher Sci.* 2020;59:102785.
18. Berens C, Heine A, Müller J, Held SA, Mayer K, Brossart P, et al. Variable resistance to freezing and thawing of CD34-positive stem cells and lymphocyte subpopulations in leukapheresis products. *Cytotherapy* 2016;18:1325–31.
19. Fisher V, Khoo H, David-Ocampo V, Byrne K, Pavletic S, Bishop M, et al. Analysis of the recovery of cryopreserved and thawed CD34+ and CD3+ cells collected for hematopoietic transplantation. *Transfusion* 2014;54:1088–92.
20. Wiercinska E, Schlipfenbacher V, Bug G, Bader P, Verbeek M, Seifried E, et al. Allogeneic transplant procurement in the times of COVID-19: Quality report from the central European cryopreservation site. *J Transl Med.* 2021;19:145.
21. Reddy OL, Stroncek DF, Panch SR. Improving CAR T cell therapy by optimizing critical quality attributes. *Semin Hematol.* 2020;57:33–38.
22. Yoo KH, Lee SH, Kim HJ, Sung KW, Jung HL, Cho EJ, et al. The impact of post-thaw colony-forming units-granulocyte/macrophage on engraftment following unrelated cord blood transplantation in pediatric recipients. *Bone Marrow Transpl.* 2007;39:515–21.
23. Castillo N, Garcia-Cadenas I, Barba P, Martino R, Azqueta C, Ferra C, et al. Post-thaw viable CD45+ cells and clonogenic efficiency are associated with better engraftment and outcomes after single cord blood transplantation in adult patients with malignant disease. *Biol Blood Marrow Transpl.* 2015;21:2167–72.
24. Ings SJ, Balsa C, Leverett D, Mackinnon S, Linch DC, Watts MJ. Peripheral blood stem cell yield in 400 normal donors mobilised with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): impact of age, sex, donor weight and type of G-CSF used. *Br J Haematol.* 2006;134:517–25.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors want to thank Jesus Maroto and Silvia Tuset for their administrative support. Luciano Rodriguez for his manuscript review. We also want to acknowledge BST Cell Therapy Service technical team (Sonia Maroto, Maria Ruz, Yolanda Chacon, Sergio Arteaga, Marina Hortola, and Camila Cardona) and cellular laboratory (Silvia Torrents, Javier Algar, Begoña Amill, Margarita Blanco, Ruth Forner, Isabel Tarrago, Mireia Lloret, Mariam Jallow and Fatima Shettyarand) for their effort. We would like to thank the scientific team at Anthony Nolan for their efforts in processing these donations (Pam Sami, Farzana Shah, Liam Wynn, Monika Jurgielewicz, Marnie Wilson, Zara Chiverton, Whitney Holden, Mimi Nolan and Jordan Wright) as well as those who helped with the signoff and issue (Compliance and Release team, Quality Team and Medical team) Also, we thank donors, patients, couriers, Spanish and other registries, and everyone who contributed to make HSCT possible.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design of the study: J.F., R.H., S.Q. Acquisition of data: J.F., A.G., Analysis and interpretation of data: J.F., R.H., S.Q. Drafting or revising the manuscript: J.F., R.H., J.C., C.A., A.G., E.V., L.M., N.R., M.C., G.A., J.M., A.M., R.M., C.D., C.F., D.V., M.L., A.A., E.G., N.G., L.M., E.C., J.V., M.L., D.G., S.G. All authors have approved the final article.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41409-022-01750-2>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Jesus Fernandez-Sojo.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

7 DISCUSSIÓ

És ben conegut que la dosi de cèl·lules CD34+/kg administrada en el TPH autòleg s'associa no només a una recuperació hematopoètica més ràpida, sinó també a una millor SG i SLM. Històricament, l'efecte de la composició del producte ha estat avaluada abans de la congelació. Això és degut al fet que no hi ha tanta variabilitat interlaboratori, ja que el tipus de mostra analitzada és en fresc i, per tant, no ha estat sotmesa a la congelació. No obstant això, tal com s'ha descrit a la introducció, la criopreservació pot malmetre la viabilitat i la funcionalitat de les CPH. Per tant, hipotèticament, l'avaluació de la qualitat postdescongelació s'hauria de correlacionar millor amb els resultats del TPH autòleg, ja que és el producte final el que s'administra al pacient.

Cal remarcar que donar resposta a aquesta hipòtesi és complex pels motius següents:

— Hi ha variabilitat entre laboratoris de processament cel·lular en el tipus de solució de criopreservació emprada i el tipus de mostra per al control de qualitat.

— Hi ha variabilitat entre laboratoris que fan els tests de viabilitat i potència en relació amb la manera com es manega la mostra del control de qualitat, si es fa compensació de la mostra, a quina temperatura es manté, en quin moment es fa l'estudi i com s'adapten les guies de la ISHAGE, ja que aquestes es basen en mostres en fresc [106].

Tots aquests factors esmentats fan que sigui tot un repte avaluar la composició d'un producte després de la descongelació; per això, l'objectiu del nostre primer treball va ser correlacionar la composició cel·lular i funcional d'un producte abans i després de la descongelació amb els resultats clínics del TPH autòleg.

El nostre primer estudi es va dur a terme dintre de la Catalan Stem Cell Therapy Alliance, un grup col·laboratiu compost per 11 unitats de TPH de nou hospitals de Catalunya i un únic laboratori de processament cel·lular. Es va analitzar un total de 329 pacients receptors d'un TPH autòleg (178 amb diagnòstic d'LNH i 151 d'MM) durant el període que va del març del 2014 al desembre del 2016. Es va analitzar la composició del producte (cel·lularitat i viabilitat per a 7-AAD) precongela

postdescongelació (cel·lularitat, viabilitat per a 7-AAD i potència) amb dades d'SG i SLM. En el grup d'LNH, la dosi de cèl·lules CD34+/kg després de la descongelació va ser l'única variable que es va mantenir significativa en l'anàlisi multivariant, i el lílindar de $2-2,3 \times 10^6$ cèl·lules CD34+/kg vives va ser l'associat amb una millor SG i SLM, respectivament. Per contra, cap variable de la composició del producte abans i després de la descongelació no va ser significativa en l'anàlisi multivariable del grup d'MM. Els tests de funcionalitat (UFC-GM) no es van correlacionar amb uns millors resultats clínics.

Els resultats del nostre estudi són comparables amb l'estudi dut a terme pel grup de Turunen, en què va demostrar que una dosi superior a $2,5 \times 10^6$ cèl·lules CD34+/kg vives després de la descongelació s'associava a una millor SG i SLM en 129 pacients amb diagnòstic d'LNH sotmesos a un TPH autòleg [81]. Altres grups han descrit que dosis més altes de cèl·lules CD34+/kg en l'afèresi poden associar-se a uns millors resultats clínics [73, 105, 106]. No obstant això, aquests autors no han tingut en compte la pèrdua de viabilitat en la població de CD34+ després de la congelació, que en la nostra sèrie, i en la literatura, és del 20-30 % aproximadament [109]. La majoria d'estudis corroboren els nostres resultats assegurant que la dosi de cèl·lules CD34+/kg administrada en els TPH autòlegs de malalts amb diagnòstic d'MM no té cap impacte en els resultats d'SG i SLM [77, 78]. No obstant això, el grup de Raschle i col·laboradors sí que va demostrar que pacients amb concentracions més altes de cèl·lules CD34+ en el moment de la recollida tenen una millor SG. Tot i que els autors consideren que es necessiten més estudis per explicar aquesta correlació, consideren que altres factors relacionats amb la malaltia podrien justificar una millor mobilització i, per tant, uns millors resultats al TPH.

Per altra banda, en la nostra sèrie la quantitat de limfòcits en el producte tant abans com després de la criopreservació no va tenir cap impacte en els resultats clínics del TPH autòleg. Això contrasta amb altres treballs publicats per autors com Porrata [110]. A més, la quantitat d'UFC-GM tampoc no va tenir cap impacte clínic. Cal remarcar que en tots els productes administrats es va objectivar una dosi d'UFC-GM

òptima ($> 1 \times 10^5/\text{kg}$); per tant, és probable que tenir un test de potència conforme, independent de la dosi, assegurí l'empelt sense aportar cap benefici clínic superior com el que sí que s'ha objectivat en altres fonts cel·lulars com l'SCU [84].

El nostre segon treball d'aquesta tesi doctoral va tenir com a objectiu avaluar l'impacte de la criopreservació en el TPH d'SP de DNE, política instaurada sobtadament arran de la pandèmia de COVID-19 per assegurar la disponibilitat del producte abans de començar el condicionament del pacient. Aquesta recomanació es va prendre sense la possibilitat d'estudis aleatoritzats i controlats que assegurassin el no impacte de la congelació en aquest context no emparentat. Hi ha grups que han investigat aquest efecte de la congelació en el context del TPH al·logènic familiar, malgrat que majoritàriament també es fa en fresc en aquesta modalitat de trasplantament. La majoria d'aquests estudis han demostrat que els resultats de recuperació hematopoètica, recaiguda, SLM i SG són similars amb l'ús de productes criopreservats respecte de productes en fresc [90, 92]. No obstant això, en el context del TPH al·logènic familiar, es pot controlar perfectament la logística i el temps entre l'afèresi i la criopreservació, aspectes de difícil control amb les CPH no emparentades. Addicionalment, els motius de la criopreservació en els donants familiars és més conegut i, per tant, reportat a la literatura.

L'emergència de la COVID-19 causada pel SARS-CoV-2 i l'evolució següent a pandèmia global van provocar una disrupció en el transport de les donacions de CPH entre països. L'aparició sobtada de restriccions que comprometien el fet de disposar dels productes en fresc i el risc del donant a adquirir la COVID-19 un cop el pacient ja comença el condicionament van conduir que les societats científiques recomanessin la criopreservació de tots els productes [111-113]. No obstant això, es disposava d'una escassa evidència en aquest context no familiar, desconeixent el motiu de la criopreservació, que podia representar un biaix en els resultats clínics [90, 93, 94]. L'LTC del BST, com que presta servei a set hospitals de Catalunya amb programa de TPH al·logènic no familiar, ràpidament podia disposar d'experiència per mostrar evidències a la comunitat científica. Per aquest motiu, el nostre grup va comparar els

resultats clínics (empelt, quimerisme, MECH aguda, teràpia preventiva contra CMV, SLM i SG) dels pacients sotmesos a un TPH al·logènic no familiar congelat (N = 32) durant la pandèmia de COVID-19 amb una cohort històrica de pacients que van rebre un TPH d'SP al·logènic de DNE en fresc (N = 32).

Els resultats del nostre estudi van suggerir que la criopreservació de les CPH d'SP de DNE no va afectar negativament l'empelt de neutròfils (17 dies) ni de plaquetes (19 dies en el grup de producte en fresc respecte de 25 dies en el grup de producte criopreservat, $P = 0,192$). No obstant això, aquesta tendència no significativa de més temps per a l'empelt de plaquetes en els pacients que van rebre productes criopreservats ja va ser suggerida pel grup de Kim i col·laboradors, tot i que van avaluar donacions familiars. Aquest grup va observar que en la cohort de pacients que van rebre el producte congelat es va requerir més temps (29 dies respecte de 18 dies dels pacients que van rebre el producte en fresc, $P = 0,046$) per aconseguir més de 100.000 plaquetes/ μ l, fet que també es va associar a una recuperació més baixa d'UFC megacariocítiques [90]. El programa de donació de medul·la del Japó va publicar la seva experiència de criopreservació de CPH durant l'època de la COVID-19. Aquest grup format per Kanda i col·laboradors va incloure 118 donacions de CPH d'SP no familiars criopreservades i les van comparar amb una cohort històrica de 435 pacients que van rebre en fresc el producte. La mediana de temps per a l'empelt de neutròfils i plaquetes va ser de 16 i 26 dies, respectivament, en el grup de pacients que van rebre el producte congelat. Aquestes dades són pràcticament iguals a la nostra sèrie, amb l'excepció que aquest treball del Japó sí que va trobar diferències significatives en comparar els temps d'empelt de neutròfils i plaquetes amb el grup amb producte en fresc. Cal remarcar, però, que en aquest estudi no hi va haver diferències de dosis de cèl·lules CD34+/kg entre el grup amb producte criopreservat respecte del grup amb producte en fresc. A la nostra sèrie, de manera intencionada per la previsió de pèrdua de cel·lularitat, es va congelar una dosi de cèl·lules CD34/kg més alta en el grup amb producte criopreservat. Aquesta causa i el nombre de malalts reclutats en el nostre estudi podrien justificar aquestes diferències respecte de l'estudi de Kanda [114].

En la nostra sèrie, la presència d'MECH aguda al cap de 100 dies en el grup que va rebre les CPH al·logèniques d'SP de DNE congelades respecte del grup que les va rebre en fresc va ser del 41 % i 31 % ($P = 0,380$), respectivament. L'estudi de Facchin i col·laboradors va comparar 31 malalts que van rebre un TPH d'SP de DNE criopreservats durant els primers mesos de la pandèmia de COVID-19 amb una cohort històrica, aparellada, de 23 pacients. La ràtio d'MECH aguda > grau 1 va ser més alta que la nostra sèrie (un 60 % del grup amb producte criopreservat respecte d'un 56,5 % del grup amb producte en fresc), però sense diferències significatives entre ambdós grups. En relació amb els resultats de supervivència, en el nostre treball la ràtio d'SLM i SG al cap de 100 dies va ser del 88 % i el 90 % en el grup amb producte criopreservat, respectivament, sense diferències significatives en el grup amb producte en fresc ($P = 0,500$ i $P = 0,300$, respectivament). En l'estudi de Facchin, el període de reclutament va ser més llarg i tampoc no van trobar diferències significatives en relació amb l'SLM i l'SG al cap de l'any [115].

Tot i que la congelació va ser segura per als malalts, com va demostrar el nostre grup i altres, es van posar de manifest algunes alertes com la no utilització del 13 % dels productes criopreservats, similar a altres grups en el període inicial de la COVID-19 [103]. El motiu principal va ser la pèrdua d'indicació de TPH en els receptors per recaiguda o progressió de la malaltia. Addicionalment, en la nostra experiència es van descriure desviacions derivades per la criopreservació com a reaccions adverses a la infusió del DMSO per incompatibilitat de la bossa a l'equip de transfusió, cosa que va obligar a fer l'administració en xeringues, per errors d'etiquetatge o per manca de mostres representatives del producte. L'autor Purtill D i col·laboradors també van descriure desviacions fins en el 29 % dels productes, com ara productes malmesos durant el transport, baixa dosi cel·lular, etiquetatge inadequat, pèrdua de mostres representatives dels productes i pèrdua de documentació [104]. Un altre estudi publicat pel programa nacional de donació de medul·la dels Estats Units va registrar un no ús de CPH congelades del 2,4 % (222 de 9.294 productes) en el període de temps entre el 17 de març de 2020 i el 30 de juny de 2021. Les raons van ser variades, com ara mort del pacient, decisió del pacient, qualitat pobra del producte, presència de colls,

baixa viabilitat o contaminació microbiològica, entre d'altres [116]. Cal tenir present que la proporció de productes no infosos disminueix amb el temps, probablement perquè els CC i els CT s'adapten a la nova situació de criopreservació durant la COVID-19. L'estudi anterior de Farhadfar i col·laboradors té un període de reclutament més llarg que la nostra sèrie, que va ser del març a l'octubre del 2020, que representa únicament el període inicial de la COVID-19 i, per tant, sense temps d'adaptació a aquesta nova situació [116].

El grup liderat per Purtill i col·laboradors va alertar de la baixa viabilitat detectada en alguns productes criopreservats amb més de 36 hores des de la col·lecta [102, 103]. Aquesta alerta va conduir el nostre grup a fer el tercer i últim treball d'aquesta tesi doctoral per analitzar els factors precongelaació (composició del producte col·lectat i trànsit de temps) que influeixen en una recuperació més baixa de cèl·lules CD34+, CD3+ i UFC-GM després de la descongelació.

Tal com s'ha discutit a la introducció, la criopreservació pot malmetre la cel·lularitat i la viabilitat de les CPH. Diferents autors han posat de manifest la seva preocupació pels resultats dels controls de qualitat després de la descongelació quant a la viabilitat de la població de CD34+ i els factors que poden influir en aquests resultats, com el temps des de la col·lecta fins a la congelació i la concentració cel·lular de l'afèresi [102, 103]. El nostre estudi es va dur a terme juntament amb el laboratori de processament de l'Anthony Nolan, ja que fan els mateixos controls de qualitat (cel·lularitat, viabilitat i UFC-GM) que el nostre laboratori de processament del BST. Es van analitzar 155 CPH al·logèniques d'SP criopreservades i es va objectivar una recuperació de cèl·lules CD34+ vives després de la descongelació del 74 %. Aquests resultats són concordants amb altres autors com Purtill i col·laboradors, però contrasten amb altres estudis que reporten unes recuperacions de cèl·lules CD34+ vives baixes del 42 %, però una viabilitat del 94 % [117]. Aquesta discrepància de resultats posa de manifest la manca d'harmonització en el control per citometria de la mostra descongelada entre laboratoris, cosa que fa necessària la implementació consensuada d'abordatges citomètrics en aquestes mostres descongelades.

El nostre tercer i últim treball va confirmar que concentracions de CN superiors a $200 \times 10^6/\text{ml}$ i hematòcrits més alts del 2 % es poden associar a una recuperació més baixa de cèl·lules CD34+ i CD3+ després de la criopreservació. Aquests dos factors es poden modular durant el procés de leucocitafèresi. El nostre grup recomana la dilució de les CPH obtingudes per SP quan la concentració és superior a $200 \times 10^6/\text{ml}$, lliandar inferior al descrit per altres grups que recomanen la dilució de productes amb concentracions de CN superiors a $300 \times 10^6/\text{ml}$ [103]. La contaminació d'hematies dels productes d'afèresi es pot controlar parcialment modulant la posició de la interfase dels separadors cel·lulars. Ja està descrit per altres autors que la presència d'hematies interfereix en l'expansió de cèl·lules T per teràpies avançades; per tant, és coherent que la viabilitat de les cèl·lules CD3+ se'n pugui veure afectada [118]. L'altre resultat interessant a comentar del nostre estudi és que la població de CD3+ va ser més sensible a factors de concentració, hematòcrit > 2 % i concentració de CN a la criopreservació que la població de CD34+. Aquest fet també ha estat confirmat prèviament per altres autors [104]. Addicionalment, un temps superior a 36 hores des de la col·lecta fins a la criopreservació es va associar a una recuperació pobra (< 50 %) de CD3+ després de la descongelació. Aquesta troballa explica el motiu pel qual l'autor Fisher i col·laboradors van objectivar diferències de recuperacions de cèl·lules CD3+ positives després de la descongelació en comparar les donacions de productes familiars respecte a les donacions de DNE, que requereixen un temps superior de transport. Tot i que, com s'ha descrit anteriorment, la congelació no ha mostrat cap impacte en els resultats post TPH com l'MECH ni en l'efecte de l'empelt contra la leucèmia, sí que sembla que la població de CD3+ és més sensible a la congelació, sobretot en productes amb un retard de la congelació. Els productes destinats a TPH d'SP tenen un alt contingut de cèl·lules CD3+; per tant, aquesta manca d'impacte clínic dels productes congelats podria ser degut a aquest motiu.

Un punt molt important a destacar, i que pot explicar per què productes amb viabilitats molt baixes poden presentar un bon empelt, és que les UFC-GM es van mantenir conservades fins i tot en casos amb viabilitats molt baixes en la nostra sèrie. En el nostre laboratori, malgrat que els tests de potència requereixen temps i

capacitació, es fan en tots els productes des de fa més de vint anys. Això és d'una gran importància per valorar l'ús amb garantia de productes amb baixes viabilitats. L'única variable que va impactar en la recuperació d'UFC-GM després de descongelades va ser un temps superior a 36 hores entre la finalització de la leucafèresi al·logènica i la congelació. Aquesta evidència d'impacte del temps fins a la congelació en la recuperació d'UFC ja s'havia posat de manifest en l'estudi fer per Jansen i col·legues, però l'anàlisi es va fer en mostres que no van seguir un control de congelació assistencial i amb un volum petit. En el nostre treball, per primer cop, es confirma també en els controls de qualitat de productes de gran volum criopreservats amb CRC. Superar aquest llindar de temps de 36 hores no és habitual en donacions entre països europeus, però sí en països com Austràlia quan reben productes d'altres continents. Per pal·liar aquesta situació, es va crear un centre de criopreservació central europeu a Alemanya fent servir donants del registre DKMS i garantint la màxima qualitat dels productes destinats per Austràlia mitjançant la congelació precoç dels productes en origen [117].

Finalment, un fet important a destacar va ser que tant en el nostre segon treball com en d'altres duts a terme per Purtil i col·laboradors es van objectivar manques d'empelt en malalts sotmesos a TPH al·logènic d'SP que van mostrar controls de qualitat conformes [103]. Cal tenir present que hi ha altres causes clíniques que afecten l'empelt, com ara el tipus de condicionament, el tipus de donant, la malaltia i les complicacions post TPH. Per tant, és probable que l'impacte de la congelació sigui deleteri en aquells productes d'alt risc (moltes hores fins a la criopreservació, alta concentració de CN, alt hematòcrit) que addicionalment continguin una quantitat de cèl·lules CD34+/kg baixa.

LIMITACIONS DELS RESULTATS DELS ESTUDIS

Els tres estudis publicats en aquesta tesi doctoral tenen les limitacions següents:

1. El disseny retrospectiu dels treballs.

2. El control de qualitat després de la descongelació, principalment la citometria, és complex i no està estandarditzada la metodologia de la seva anàlisi.

3. La manca d'inclusió d'algunes subpoblacions cel·lulars com NK+, CD8+, CD4+ o CD3+ en l'anàlisi de la composició del producte i dels resultats clínics del TPH autòleg, que, com han demostrat altres autors, tenen un impacte clínic [80].

4. La població d'estudi en el treball en què es va comparar el TPH al·logènic d'SP no familiar criopreservat respecte del fresc va ser limitada pel curt període de reclutament, donada la urgència de demostrar la seguretat d'aquesta política de criopreservar tots els productes.

5. Els tests de potència (UFC-GM), que poden ser de gran utilitat davant de productes amb baixes viabilitats, requereixen entrenament i presenten variabilitat interlaboratori. En l'actualitat, aquests tests habitualment es fan per a validacions o estudis d'investigació, tot i que el nostre grup en fa en l'àmbit assistencial.

FORTALESES DELS RESULTATS DELS ESTUDIS

Les fortalezes dels nostres tres treballs són:

1. L'anàlisi de la composició i la qualitat del producte descongelat es fa en un nombre elevat de productes processats pel mateix laboratori de processament i, per tant, els resultats són robustos.

2. Permeten evidenciar que la criopreservació de les CPH d'SP de donant no familiars és segura garantint l'empelt i els resultats clínics del TPH. Aquests resultats han estat pioners en aquest context donat que fins a la pandèmia de COVID-19 es feia majoritàriament en fresc.

3. Aspectes controlables relacionats amb la leucafèresi i el temps de transport permeten garantir en la majoria dels casos uns controls de qualitat després de la descongelació conforme.

4. La potència *in vitro* (UFC-GM) de les CPH al·logèniques criopreservades es manté fins i tot en casos amb una baixa viabilitat de les CPH i, per tant, és de gran utilitat per valorar l'alliberament de productes amb viabilitats baixes.

PERSPECTIVES DE FUTUR

El control de qualitat després de la descongelació sembla que es correlaciona millor no només amb l'empelt en un TPH autòleg, sinó també amb els resultats clínics en pacients amb limfoma. No obstant això, aquest control és complex per múltiples raons ja descrites anteriorment. De cara al futur cal establir consensos internacionals amb criteris mínims de com fer l'anàlisi citomètrica de les mostres descongelades, tal com està disponible en les mostres en fresc.

La decisió de congelar tots els productes davant de l'aparició de la pandèmia de COVID-19 va ser segura quant als resultats clínics dels pacients receptors d'un TPH al·logènic no familiar. No obstant això, caldrà garantir que aquests resultats es mantenen també a llarg termini mitjançant el seguiment de l'empelt, la malaltia i l'SG. De manera addicional, durant la pandèmia de COVID-19 es van posar de manifest desviacions relacionades amb la criopreservació, com ara bosses malmeses, manca de criovials per fer el control de qualitat en destinació i reaccions adverses a la infusió per l'ús de bosses de congelació diferents, entre d'altres. Aquestes troballes fan necessari l'establiment de consensos o guies internacionals que descriguin els requisits mínims davant de la necessitat de congelació dels productes que s'hagin de transportar entre laboratoris de processament.

Els factors precongelació com la leucafèresi i el trànsit de temps poden afectar els controls de qualitat després de la descongelació. No obstant això, la correlació d'aquests factors en l'impacte dels controls de qualitat és moderada. Per tant, es

requereixen futurs estudis per investigar les causes de controls subòptims quan els factors precongelaçió han estat ben controlats.

A partir de la pandèmia de COVID-19, molts grups, incloent-hi el nostre, han analitzat l'impacte de la criopreservació en els resultats del TPH al·logènic. No obstant això, no hi ha treballs que hagin analitzat l'impacte de la congelaçió de les infusions de limfòcits de donant en comparació quan es fa en fresc. Aquests productes tenen una quantitat baixa de CD3+ fixa en fresc i precongelaçió, però, com s'ha descrit anteriorment, la població de CD3+ és més sensible a la criopreservació.

8 CONCLUSIONS

Aquesta tesi doctoral permet arribar a les conclusions següents:

1. Una **dosi de cèl·lules CD34+/kg vives després de la descongelació** superior a **$2-2,3 \times 10^6$** s'associa a una **millor SG i SLM** en pacients a qui s'ha diagnosticat **limfoma**, però no en MM sotmesos a un TPH autòleg.
2. Les **UFC-GM** permeten **assegurar l'empelt** en els pacients sotmesos a TPH autòleg. Quan s'evidencia un creixement, considerat a partir d' 1×10^5 UFC-GM/kg, unes xifres més altes **no** sembla que aportin **cap benefici clínic** en els resultats del TPH autòleg.
3. La quantitat de **limfòcits** en els productes destinats a TPH autòleg **no** es **correlaciona** amb uns **millors resultats en el TPH autòleg** en pacients a qui s'ha diagnosticat limfoma i MM en la nostra sèrie.
4. La **criopreservació** de CPH al·logèniques d'SP de DNE **no té cap impacte clínic negatiu** en els resultats del TPH quant a la velocitat d'empelt, SG, SLM, MECH i teràpia preventiva anti CMV.
5. La **criopreservació** de CPH al·logèniques de DNE va comportar un **no ús del 13 %** dels productes congelats durant els primers mesos de la pandèmia de COVID-19.
6. La recomanació de **criopreservació** de tots els productes de teràpia cel·lular durant la pandèmia de **COVID-19** va generar **desviacions** relacionades amb la diferent **metodologia** de criopreservació entre laboratoris i problemes d'**etiquetatge, empaquetament i controls de qualitat**. Aquests fets posen de manifest la **manca de guies i consensos** internacionals davant la necessitat de congelació.
7. La **dilució** de les **leucafèresis** per mantenir una concentració **$< 200 \times 10^6$ CN/ml** i la modulació de la interfase per aconseguir un **hematòcrit inferior al 2 %** **minimitzen** el risc de **viabilitats baixes** en les poblacions de CD34+ i CD3+ **després de la descongelació**.

8. Un temps superior a **36 hores** des de la finalització d'una leucafèresi al·logènica **fins a la seva criopreservació** impacta en una **recuperació** de **cèl·lules vives** CD34+, CD3+ i **UFC-GM** inferiors al **50 % després de la criopreservació**.

9. La **potència *in vitro*** després de la criopreservació de les CPH al·logèniques es **manté** fins i tot en mostres amb **viabilitats baixes**. Aquests tests de funcionalitat permeten l'**alliberament** de productes de teràpia cel·lular davant de situacions de baixa recuperació de cèl·lules CD34+ vives després de la descongelació.

En la vida no hi ha res que calgui témer; tan sols cal comprendre-ho.

Marie Curie, física francesa d'origen polonès (1867-1934)

9 BIBLIOGRAFIA

1. Thomas ED, Lochte HL Jr, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med.* 1957; 257 (11): 491-6.
2. Thomas ED, Lochte HL Jr, Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest.* 1959; 38 (10 Pt 1-2): 1709-16.
3. Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet.* 1968; 2 (7583): 1366-9.
4. Bach FH, Albertini RJ, Joo P, Anderson JL, Bortin MM. Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet.* 1968; 2 (7583): 1364-6.
5. De Koning J, Van Bekkum DW, Dicke KA, Dooren LJ, Rádl J, Van Rood JJ. Transplantation of bone-marrow cells and fetal thymus in an infant with lymphopenic immunological deficiency. *Lancet.* 1969; 1 (7608): 1223-7.
6. Thomas ED, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson L, Neiman PE et al. Bone-marrow transplantation (second of two parts). *N Engl J Med.* 1975; 292 (17): 895-902.
7. Blume KG, Beutler E, Bross KJ, Chillar RK, Ellington OB, Fahey JL et al. Bone-marrow ablation and allogeneic marrow transplantation in acute leukemia. *N Engl J Med.* 1980; 302 (19): 1041-6.
8. Prentice HG, Blacklock HA, Janossy G, Gilmore MJ, Price-Jones L, Tidman N et al. Depletion of T lymphocytes in donor marrow prevents significant graft-versus-host disease in matched allogeneic leukaemic marrow transplant recipients. *Lancet.* 1984; 1 (8375): 472-6.
9. Santos GW, Tutschka PJ, Brookmeyer R, Saral R, Beschorner WE, Bias WB et al. Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. *N Engl J Med.* 1983; 309 (22): 1347-53.

10. Hansen JA, Clift RA, Thomas ED, Buckner CD, Storb R, Giblett ER. Transplantation of marrow from an unrelated donor to a patient with acute leukemia. *N Engl J Med.* 1980; 303 (10): 565-7.
11. Bensinger WI, Weaver CH, Appelbaum FR, Rowley S, Demirer T, Sanders J et al. Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood.* 1995; 85 (6): 1655-8.
12. Körbling M, Przepiorka D, Huh YO, Engel H, van Besien K, Giralt S et al. Allogeneic blood stem cell transplantation for refractory leukemia and lymphoma: potential advantage of blood over marrow allografts. *Blood.* 1995; 85 (6): 1659-65.
13. Schmitz N, Dreger P, Suttorp M, Rohwedder EB, Haferlach T, Löffler H et al. Primary transplantation of allogeneic peripheral blood progenitor cells mobilized by filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor). *Blood.* 1995; 85 (6): 1666-72.
14. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med.* 1989; 321 (17): 1174-8.
15. Sorrow ML, Sandmaier BM, Storer BE, Franke GN, Laport GG, Chauncey TR et al. Long-term outcomes among older patients following nonmyeloablative conditioning and allogeneic hematopoietic cell transplantation for advanced hematologic malignancies. *JAMA.* 2011; 306 (17): 1874-83.
16. Aversa F, Tabilio A, Terenzi A, Velardi A, Falzetti F, Gianni C 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 (11): 3948-55.

17. Aversa F, Tabilio A, Velardi A, Cunningham I, Terenzi A, Falzetti F 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.
18. McFarland W, Granville NB, Dameshek W. Autologous bone marrow infusion as an adjunct in therapy of malignant disease. *Blood.* 1959; 14 (5): 503-21.
19. Clifford P, Clift RA, Duff JK. Nitrogen-mustard therapy combined with autologous marrow infusion. *Lancet.* 1961; 1 (7179): 687-90.
20. Pegg DE, Humble JG, Newton KA. The clinical application of bone marrow grafting. *Br J Cancer.* 1962; 16 (3): 417-35.
21. Kurnick NB. Autologous and isologous bone marrow storage and infusion in the treatment of myelo-suppression. *Transfusion.* 1962; 2: 178-87.
22. Richman CM, Weiner RS, Yankee RA. Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood.* 1976; 47 (6): 1031-9.
23. Abrams RA, Glaubiger D, Appelbaum FR, Deisseroth AB. Result of attempted hematopoietic reconstitution using isologous, peripheral blood mononuclear cells: a case report. *Blood.* 1980; 56 (3): 516-20.
24. Dührsen U, Villeval JL, Boyd J, Kannourakis G, Morstyn G, Metcalf D. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood.* 1988; 72 (6): 2074-81.
25. Socinski MA, Cannistra SA, Elias A, Antman KH, Schnipper L, Griffin JD. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man. *Lancet.* 1988; 1 (8596): 1194-8.
26. Gianni AM, Siena S, Bregni M, Tarella C, Stern AC, Pileri A et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to harvest circulating haemopoietic stem cells for autotransplantation. *Lancet.* 1989; 2 (8663): 580-5.
27. Kanteti R, Miller K, McCann J, Roitman D, Morelli J, Hurley C et al. Randomized trial of peripheral blood progenitor cell vs bone marrow as hematopoietic support for high-dose chemotherapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma

- and Hodgkin's disease: a clinical and molecular analysis. *Bone Marrow Transplant*. 1999; 24 (5): 473-81.
28. Vose JM, Sharp G, Chan WC, Nichols C, Loh K, Inwards D et al. Autologous transplantation for aggressive non-Hodgkin's lymphoma: results of a randomized trial evaluating graft source and minimal residual disease. *J Clin Oncol*. 2002; 20 (9): 2344-52.
 29. Weiss RB, Rifkin RM, Stewart FM, Theriault RL, Williams LA, Herman AA et al. High-dose chemotherapy for high-risk primary breast cancer: an on-site review of the Bezwoda study. *Lancet*. 2000; 355 (9208): 999-1003.
 30. Weiss RB, Gill GG, Hudis CA. An on-site audit of the South African trial of high-dose chemotherapy for metastatic breast cancer and associated publications. *J Clin Oncol*. 2001; 19 (11): 2771-7.
 31. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. 1990; 75 (3): 555-62.
 32. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Cesaro S, Dreger P et al. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually. *Bone Marrow Transplant*. 2016; 51 (6): 786-92.
 33. Maximow A. Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. *Folia Haematol*. 1909; 8: 125-34.
 34. Transplant activity survey [internet]. European Society for Bone and Marrow Transplantation (EBMT) [consultat febrer de 2023]. Disponible a: <https://www.ebmt.org/registry/transplant-activity-survey>
 35. Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol*. 2002; 30 (9): 973-81.

36. Sung AD, Grima DT, Bernard LM, Brown S, Carrum G, Holmberg L et al. Outcomes and costs of autologous stem cell mobilization with chemotherapy plus G-CSF vs G-CSF alone. *Bone Marrow Transplant.* 2013; 48 (11): 1444-9.
37. Saraceni F, Shem-Tov N, Olivieri A, Nagler A. Mobilized peripheral blood grafts include more than hematopoietic stem cells: the immunological perspective. *Bone Marrow Transplant.* 2015; 50 (7): 886-91.
38. Mohty M, Hübel K, Kröger N, Aljurf M, Apperley J, Basak GW et al. Autologous haematopoietic stem cell mobilisation in multiple myeloma and lymphoma patients: a position statement from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2014; 49 (7): 865-72.
39. Stiff PJ, Micallef I, Nademanee AP, Stadtmauer EA, Maziarz RT, Bolwell BJ et al. Transplanted CD34(+) cell dose is associated with long-term platelet count recovery following autologous peripheral blood stem cell transplant in patients with non-Hodgkin lymphoma or multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011; 17 (8): 1146-53.
40. Giralt S, Costa L, Schriber J, Dipersio J, Maziarz R, McCarty J et al. Optimizing autologous stem cell mobilization strategies to improve patient outcomes: consensus guidelines and recommendations. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014; 20 (3): 295-308.
41. Duong HK, Savani BN, Copelan E, Devine S, Costa LJ, Wingard JR et al. Peripheral blood progenitor cell mobilization for autologous and allogeneic hematopoietic cell transplantation: guidelines from the American Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014; 20 (9): 1262-73.
42. Wuchter P, Ran D, Bruckner T, Schmitt T, Witzens-Harig M, Neben K et al. Poor mobilization of hematopoietic stem cells-definitions, incidence, risk factors, and impact on outcome of autologous transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010; 16 (4): 490-9.
43. Devine SM, Flomenberg N, Vesole DH, Liesveld J, Weisdorf D, Badel K et al. Rapid mobilization of CD34+ cells following administration of the CXCR4 antagonist

- AMD3100 to patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 2004; 22 (6): 1095-102.
44. Nervi B, Link DC, DiPersio JF. Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. *J Cell Biochem.* 2006; 99 (3): 690-705.
45. Fruehauf S, Veldwijk MR, Seeger T, Schubert M, Laufs S, Topaly J et al. A combination of granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF) and plerixafor mobilizes more primitive peripheral blood progenitor cells than G-CSF alone: results of a European phase II study. *Cytotherapy.* 2009; 11 (8): 992-1001.
46. Moog R. Apheresis techniques for collection of peripheral blood progenitor cells. *Transfus Apher Sci.* 2004; 31 (3): 207-20.
47. Abrahamsen JF, Stamnesfet S, Liseth K, Hervig T, Bruserud O. Large-volume leukapheresis yields more viable CD34+ cells and colony-forming units than normal-volume leukapheresis, especially in patients who mobilize low numbers of CD34+ cells. *Transfusion.* 2005; 45 (2): 248-53.
48. Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, editors. *The EBMT handbook: Hematopoietic stem cell transplantation and cellular therapies.* Cham (CH): Springer; 2019. 7a ed. 17, Processing, cryopreserving, and controlling the quality of HSCs: p. 127-129.
49. Directiva 2006/86/CE de la Comisión, de 24 de octubre de 2006, por la que se aplica la Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a los requisitos de trazabilidad, la notificación de las reacciones y los efectos adversos graves y determinados requisitos técnicos para la codificación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, núm. 294, (24-10-2006).
50. Li A, Kusuma GD, Driscoll D, Smith N, Wall DM, Levine BL et al. Advances in automated cell washing and concentration. *Cytotherapy.* 2021; 23 (9): 774-86.
51. Reich-Slotky R, Colovai AI, Semidei-Pomales M, Patel N, Cairo M, Jhang J et al. Determining post-thaw CD34+ cell dose of cryopreserved haematopoietic

- progenitor cells demonstrates high recovery and confirms their integrity. *Vox Sang.* 2008; 94 (4): 351-7.
52. Rowley SD. Hematopoietic stem cell processing and cryopreservation. *J Clin Apher.* 1992; 7 (3): 132-4.
 53. Mazur P. Principles of cryobiology. A: Fuller BJ, Lane N, Benson EE, editors. *Life in the frozen state.* Boca Raton (US): CRC Press; 2004. p. 3-66.
 54. Shu Z, Heimfeld S, Gao D. Hematopoietic SCT with cryopreserved grafts: adverse reactions after transplantation and cryoprotectant removal before infusion. *Bone Marrow Transplant.* 2014; 49 (4): 469-76.
 55. Benekli M, Anderson B, Wentling D, Bernstein S, Czuczman M, McCarthy P. Severe respiratory depression after dimethylsulphoxide-containing autologous stem cell infusion in a patient with AL amyloidosis. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 25 (12): 1299-301.
 56. Dhodapkar M, Goldberg SL, Tefferi A, Gertz MA. Reversible encephalopathy after cryopreserved peripheral blood stem cell infusion. *Am J Hematol.* 1994; 45 (2): 187-8.
 57. Hoyt R, Szer J, Grigg A. Neurological events associated with the infusion of cryopreserved bone marrow and/or peripheral blood progenitor cells. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 25 (12): 1285-7.
 58. Styler MJ, Topolsky DL, Crilley PA, Covalsky V, Bryan R, Bulova S et al. Transient high grade heart block following autologous bone marrow infusion. *Bone Marrow Transplant.* 1992; 10 (5): 435-8.
 59. Windrum P, Morris TC, Drake MB, Niederwieser D, Ruutu T; EBMT Chronic Leukaemia Working Party Complications Subcommittee. Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT centres. *Bone Marrow Transplant.* 2005; 36 (7): 601-3.
 60. Beaujean F, Hartmann O, Kuentz M, Le Forestier C, Divine M, Duedari N. A simple, efficient washing procedure for cryopreserved human hematopoietic stem cells prior to reinfusion. *Bone Marrow Transplant.* 1991; 8 (4): 291-4.

61. Lemarie C, Calmels B, Malenfant C, Arneodo V, Blaise D, Viret F et al. Clinical experience with the delivery of thawed and washed autologous blood cells, with an automated closed fluid management device: CytoMate. *Transfusion*. 2005; 45 (5): 737-42.
62. Real Decreto-ley 9/2014, de 4 de julio, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos. *Boletín Oficial del Estado*, núm. 165, (05-07-2014).
63. Patah PA, Parmar S, McMannis J, Sadeghi T, Karandish S, Rondon G et al. Microbial contamination of hematopoietic progenitor cell products: clinical outcome. *Bone Marrow Transplant*. 2007; 40 (4): 365-8.
64. Milone G, Mercurio S, Strano A, Leotta S, Pinto V, Battiato K et al. Adverse events after infusions of cryopreserved hematopoietic stem cells depend on non-mononuclear cells in the infused suspension and patient age. *Cytotherapy*. 2007; 9 (4): 348-55.
65. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother*. 1996; 5 (3): 213-26.
66. Pegg DE. Viability assays for preserved cells, tissues, and organs. *Cryobiology*. 1989; 26 (3): 212-31.
67. Borel Rinkes IH, Toner M, Sheeha SJ, Tompkins RG, Yarmuch ML. Long-term functional recovery of hepatocytes after cryopreservation in a three-dimensional culture configuration. *Cell Transplant*. 1992; 1 (4): 281-92.
68. de Boer F, Dräger AM, Pinedo HM, Kessler FL, van der Wall E, Jonkhoff AR et al. Extensive early apoptosis in frozen-thawed CD34-positive stem cells decreases threshold doses for haematological recovery after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2002; 29 (3): 249-55.

69. Rowley SD, Piantadosi S, Santos GW. Correlation of hematologic recovery with CFU-GM content of autologous bone marrow grafts treated with 4-hydroperoxycyclophosphamide. Culture after cryopreservation. *Bone Marrow Transplant.* 1989; 4 (5): 553-8
70. Hall KM, Rich IN. Bioluminescence assays for assessing potency of cellular therapy products. A: Areman EM, Loper K, editors. *Cellular therapy: Principles, methods and regulations.* Bethesda (US): AABB; 2009. p. 581-91.
71. Schmitz N, Beksac M, Hasenclever D, Bacigalupo A, Ruutu T, Nagler A et al.; European Group for Blood and Marrow Transplantation. Transplantation of mobilized peripheral blood cells to HLA-identical siblings with standard-risk leukemia. *Blood.* 2002; 100 (3): 761-7.
72. Siena S, Bregni M, Brando B, Belli N, Lansdorp PM, Bonadonna G et al. Flow cytometry to estimate circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation: comparative analysis of different CD34 monoclonal antibodies. *Haematologica.* 1991; 76 (4): 330-3.
73. Kiss JE, Rybka WB, Winkelstein A, deMagalhaes-Silverman M, Lister J, D'Andrea P et al. Relationship of CD34+ cell dose to early and late hematopoiesis following autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1997; 19 (4): 303-10.
74. Allan DS, Keeney M, Howson-Jan K, Popma J, Weir K, Bhatia M et al. Number of viable CD34(+) cells reinfused predicts engraftment in autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2002; 29 (12): 967-72.
75. Gordan LN, Sugrue MW, Lynch JW, Williams KD, Khan SA, Wingard JR et al. Poor mobilization of peripheral blood stem cells is a risk factor for worse outcome in lymphoma patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma.* 2003; 44 (5): 815-20.
76. Bolwell BJ, Pohlman B, Rybicki L, Sobecks R, Dean R, Curtis J et al. Patients mobilizing large numbers of CD34+ cells ('super mobilizers') have improved

- survival in autologous stem cell transplantation for lymphoid malignancies. *Bone Marrow Transplant.* 2007; 40 (5): 437-41.
77. Raschle J, Ratschiller D, Mans S, Mueller BU, Pabst T. High levels of circulating CD34+ cells at autologous stem cell collection are associated with favourable prognosis in multiple myeloma. *Br J Cancer.* 2011; 105 (7): 970-4.
78. Klaus J, Herrmann D, Breitzkreutz I, Hegenbart U, Mazitschek U, Egerer G et al. Effect of CD34 cell dose on hematopoietic reconstitution and outcome in 508 patients with multiple myeloma undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Eur J Haematol.* 2007; 78 (1): 21-8.
79. Bai L, Xia W, Wong K, Reid C, Ward C, Greenwood M. Factors predicting haematopoietic recovery in patients undergoing autologous transplantation: 11-year experience from a single centre. *Ann Hematol.* 2014; 93 (10): 1655-64.
80. Turunen A, Valtola J, Partanen A, Ropponen A, Kuittinen O, Kuitunen H et al. Autograft cellular composition and outcome in NHL patients: results of the prospective multicenter GOA study. *Leuk Lymphoma.* 2020; 61 (9): 2082-2092.
81. Porrata LF, Burgstaler EA, Winters JL, Jacob EK, Gastineau DA, Suman VJ et al. Immunologic autograft engineering and survival in non-Hodgkin lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016; 22 (6): 1017-1023.
82. Yang H, Acker JP, Cabuhat M, Letcher B, Larratt L, McGann LE. Association of post-thaw viable CD34+ cells and CFU-GM with time to hematopoietic engraftment. *Bone Marrow Transplant.* 2005; 35 (9): 881-7.
83. Yoo KH, Lee SH, Kim HJ, Sung KW, Jung HL, Cho EJ et al. The impact of post-thaw colony-forming units-granulocyte/macrophage on engraftment following unrelated cord blood transplantation in pediatric recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2007; 39 (9): 515-21.
84. Castillo N, García-Cadenas I, Barba P, Martino R, Azqueta C, Ferrà C et al. Post-thaw viable CD45+ cells and clonogenic efficiency are associated with better engraftment and outcomes after single cord blood transplantation in adult

- patients with malignant diseases. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015; 21 (12): 2167-72.
85. Shinkoda Y, Ijichi O, Tanabe T, Ishikawa S, Kamitamari A, Nishikawa T et al. Identical reconstitution after bone marrow transplantation in twins who received fresh and cryopreserved grafts harvested at the same time from their older brother. *Clin Transplant*. 2004; 18 (6): 743-7.
86. Stockschröder M, Krüger W, tom Dieck A, Horstmann M, Altnöder M, Löliger C et al. Use of cryopreserved bone marrow in unrelated allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1996; 17 (2): 197-9.
87. Lasky LC, Van Buren N, Weisdorf DJ, Filipovich A, McGlave P, Kersey JH et al. Successful allogeneic cryopreserved marrow transplantation. *Transfusion*. 1989; 29 (2): 182-4.
88. Eckardt JR, Roodman GD, Boldt DH, Clark GM, Alvarez R, Page C et al. Comparison of engraftment and acute GVHD in patients undergoing cryopreserved or fresh allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant*. 1993; 11 (2): 125-31.
89. Frey NV, Lazarus HM, Goldstein SC. Has allogeneic stem cell cryopreservation been given the 'cold shoulder'? An analysis of the pros and cons of using frozen versus fresh stem cell products in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2006; 38 (6): 399-405.
90. Kim DH, Jamal N, Saragosa R, Loach D, Wright J, Gupta V et al. Similar outcomes of cryopreserved allogeneic peripheral stem cell transplants (PBSCT) compared to fresh allografts. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007; 13 (10): 1233-43.
91. Parody R, Caballero D, Márquez-Malaver FJ, Vázquez L, Saldaña R, Madrigal MD et al. To freeze or not to freeze peripheral blood stem cells prior to allogeneic transplantation from matched related donors. *Eur J Haematol*. 2013; 91 (5): 448-55.
92. Medd P, Nagra S, Hollyman D, Craddock C, Malladi R. Cryopreservation of allogeneic PBSC from related and unrelated donors is associated with delayed

- platelet engraftment but has no impact on survival. *Bone Marrow Transplant.* 2013; 48 (2): 243-8.
93. Lioznov M, Dellbrügger C, Sputtek A, Fehse B, Kröger N, Zander AR. Transportation and cryopreservation may impair haematopoietic stem cell function and engraftment of allogeneic PBSCs, but not BM. *Bone Marrow Transplant.* 2008; 42 (2): 121-8.
94. Hamadani M, Zhang MJ, Tang XY, Fei M, Brunstein C, Chhabra S et al. Graft cryopreservation does not impact overall survival after allogeneic hematopoietic cell transplantation using post-transplantation cyclophosphamide for graft-versus-host disease prophylaxis. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2020; 26 (7): 1312-1317.
95. Hubel A, Carlquist D, Clay M, McCullough J. Liquid storage, shipment, and cryopreservation of cord blood. *Transfusion.* 2004; 44 (4): 518-25.
96. Guttridge MG, Soh TG, Belfield H, Sidders C, Watt SM. Storage time affects umbilical cord blood viability. *Transfusion.* 2014; 54 (5): 1278-85.
97. Jestice HK, Scott MA, Ager S, Tolliday BH, Marcus RE. Liquid storage of peripheral blood progenitor cells for transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1994; 14 (6): 991-4.
98. Moroff G, Seetharaman S, Kurtz JW, Greco NJ, Mullen MD, Lane TA et al. Retention of cellular properties of PBPCs following liquid storage and cryopreservation. *Transfusion.* 2004; 44 (2): 245-52.
99. Antonenas V, Garvin F, Webb M, Sartor M, Bradstock KF, Gottlieb D. Fresh PBSC harvests, but not BM, show temperature-related loss of CD34 viability during storage and transport. *Cytotherapy.* 2006; 8 (2): 158-65.
100. Jansen J, Nolan PL, Reeves MI, Akard LP, Thompson JM, Dugan MJ et al. Transportation of peripheral blood progenitor cell products: effects of time, temperature and cell concentration. *Cytotherapy.* 2009; 11 (1): 79-85.
101. Fry LJ, Giner SQ, Gomez SG, Green M, Anderson S, Horder J et al. Avoiding room temperature storage and delayed cryopreservation provide better postthaw

- potency in hematopoietic progenitor cell grafts. *Transfusion*. 2013; 53 (8): 1834-42.
102. Purtill D, Antonenas V, Chiappini P, Tong D, O'Flaherty E, Bajel A et al. Variable CD34+ recovery of cryopreserved allogeneic HPC products: transplant implications during the COVID-19 pandemic. *Blood Adv*. 2020; 4 (17): 4147-50.
103. Purtill D, Hutchins C, Kennedy G, McClean A, Fraser C, Shaw PJ et al. Good engraftment but quality and donor concerns for cryopreserved hemopoietic progenitor cell products collected during the COVID-19 pandemic. *Transplant Cell Ther*. 2021; 27 (12): 1022.e1-1022.e6.
104. Berens C, Heine A, Müller J, Held SA, Mayer K, Brossart P et al. Variable resistance to freezing and thawing of CD34-positive stem cells and lymphocyte subpopulations in leukapheresis products. *Cytotherapy*. 2016; 18 (10): 1325-31.
105. Fisher V, Khuu H, David-Ocampo V, Byrne K, Pavletic S, Bishop M et al. Analysis of the recovery of cryopreserved and thawed CD34+ and CD3+ cells collected for hematopoietic transplantation. *Transfusion*. 2014; 54 (4): 1088-92.
106. Lanza F, Saccardi R, Seghatchian J. New horizons on stem cell cryopreservation through the artificial eyes of CD34, using modern flow cytometry tools. *Transfus Apher Sci*. 2020; 59 (3): 102785.
107. Carlsten M, Jädersten M, Hellström A, Littmann K, Melén CM, Junlén HR et al. The Karolinska experience of autologous stem-cell transplantation for lymphoma: a population-based study of all 433 patients 1994-2016. *Exp Hematol Oncol*. 2019; 8: 7.
108. Yoon DH, Sohn BS, Jang G, Kim EK, Kang BW, Kim C et al. Higher infused CD34+ hematopoietic stem cell dose correlates with earlier lymphocyte recovery and better clinical outcome after autologous stem cell transplantation in non-Hodgkin's lymphoma. *Transfusion*. 2009; 49 (9): 1890-900.
109. Lee S, Kim S, Kim H, Baek EJ, Jin H, Kim J et al. Post-thaw viable CD34(+) cell count is a valuable predictor of haematopoietic stem cell engraftment in autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Vox Sang*. 2008 Feb; 94 (2): 146-52.

110. Porrata LF, Litzow MR, Inwards DJ, Gastineau DA, Moore SB, Pineda AA et al. Infused peripheral blood autograft absolute lymphocyte count correlates with day 15 absolute lymphocyte count and clinical outcome after autologous peripheral hematopoietic stem cell transplantation in non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant.* 2004; 33 (3): 291-8.
111. Szer J, Weisdorf D, Querol S, Foeken L, Madrigal A. The impact of COVID-19 on the provision of donor hematopoietic stem cell products worldwide: collateral damage. *Bone Marrow Transplant.* 2020; 55 (10): 2043-4.
112. Coronavirus disease COVID-19: EBMT recommendations. Update March 23, 2020 [internet]. 2020. Disponible a: <https://www.ebmt.org/sites/default/files/2020-03/EBMT%20COVID-19%20guidelines%20v.4.3%20%282020-03-23%29.pdf>.
113. WMDA donor medical suitability recommendations [internet]. Coronavirus - SARS-CoV-2 & COVID-19. Disponible a: <https://share.wmda.info/pages/viewpage.action?pageId=344866320>.
114. Kanda Y, Doki N, Kojima M, Kako S, Inoue M, Uchida N et al. Effect of cryopreservation in unrelated bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation in the era of the COVID-19 pandemic: An update from the Japan Marrow Donor Program. *Transplant Cell Ther.* 2022; 28 (10): 677.e6.
115. Facchin G, Savignano C, Battista ML, Isola M, De Martino M, Petruzzellis G et al. Impact of cryopreservation of peripheral blood stem cells (PBSC) in transplantation from matched unrelated donor (MUD). *J Clin Med.* 2022; 11 (14): 4114.
116. Farhadfar N, Newman J, Novakovich J, Barten J, Ndifon ET, Oakes J et al. Neither COVID-19, nor cryopreservation, prevented allogeneic product infusion: A report from the National Marrow Donor Program. *Front Immunol.* 2022; 13: 937900.
117. Wiercinska E, Schlipfenbacher V, Bug G, Bader P, Verbeek M, Seifried E et al. Allogeneic transplant procurement in the times of COVID-19: Quality report from the central European cryopreservation site. *J Transl Med.* 2021; 19 (1): 145.
118. Reddy OL, Stroncek DF, Panch SR. Improving CAR T cell therapy by optimizing critical quality attributes. *Semin Hematol.* 2020; 57 (2): 33-38.