

**SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA**

Ph.D. értekezések

2525.

TASNÁDY SZABOLCS

Klinikai hematológia

című program

Programvezető: Dr. Masszi Tamás, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Masszi Tamás, egyetemi tanár

A Vírus specifikus T-sejt terápiákhoz kötődő áramlási citometriás vizsgálatokból származó tapasztalatok

Doktori értekezés

Tasnády Szabolcs

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Masszi Tamás Ph.D., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Hevessy Zsuzsa Ph.D., egyetemi docens
Dr. Barna Gábor Ph.D., tudományos munkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Pénzes István†, D.Sc., professor emeritus
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Szaleczky Erika Ph.D., főorvos
Dr. Pállinger Éva Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2021

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	6
1.Bevezetés	8
1.1 Allogén őssejt transzplantáció.....	9
1.2 Immunszuppresszió.....	10
1.3 Immunrekonstitúció	10
1.4 Vírusinfekciók, vírus reaktivációk, és hagyományos kezelésük.....	13
1.4.1 Adenovírus (ADV)	13
1.4.2 BK vírus (BKV).....	14
1.4.3 Humán Cytomegalovírus (CMV)	15
1.4.4 Epstein-Barr vírus (EBV)	16
1.5 Immunológiai háttér	16
1.5.1. Citokinek termelődése, az interferon gamma	17
1.5.2. Az interferon gamma (IFN- γ)	17
1.6. Klinikai léptékű VST szelekciók összehasonlítása	20
1.7 Az átfedő peptidkönyvtár tesztelésének szükségessége.....	22
1.8 Az Immunomagnetikus szeparálás.....	22
1.8.1 A mágneses gyöngy	23
1.8.2 A mágneses oszlop.....	23
1.8.3 A mágnes	23
1.8.4 A szelekciók fajtái a jelölt sejt alapján	23
2. Célkitűzések	26
3. Módszerek	28
3.1 Páciensek.....	28
3.2 A donorok.....	28

3.3 Az átfedő peptidkönyvtárak	29
3.4 A donorszűrés folyamata.....	31
3.4.1 A minta előkészítése	31
3.4.2 A flow cytometriás vizsgálat	32
3.5 A vírus-specifikus T sejtek szelekciója.....	37
3.5.1 CCS folyamat áttekintése.....	37
3.5.2 A sejtek gyűjtése	38
3.5.3 A sejszelekcióhoz használt műszer.....	38
3.5.4 A nagyléptékű (large scale) vírus-specifikus T sejt szelekció	39
3.5.5. A nagyléptékű szelekció folyamata	40
3.5.6 A végfrakciók flow cytometriás vizsgálata	41
3.6 Statisztikai analízis.....	45
4. Eredmények.....	47
4.1 A páciensekkel és az indikációkkal kapcsolatos eredmények	47
4.2 Donorszűréssel kapcsolatos eredmények.....	48
4.2.1. A donor jelöltek (potenciális donorok) neme és életkora	48
4.2.2 A donorjelöltekben mért keringő VST arány és az alkalmas donorok aránya .	49
4.2.3 A keringő VST arány és az alkalmas donorok aránya korcsoportonként.....	51
4.2.4 A donorszűrés eredményeinek összevetése az szerológia vizsgálatokkal	56
4.3 A készítménnyel kapcsolatos eredmények.....	57
4.3.1. A target frakció sejtösszetétele	57
4.3.2 Az „over-feeding” vizsgálata.....	62
4.3.3 Korreláció a periférián keringő VST arány és a target frakció tisztasága valamint VST tartalma között.....	64
4.4 Klinikai követés	66
5. Megbeszélés	68

5.1 A vírus specifikus T sejt terápia helye a klinikumban	68
5.2 A donorszűrés eredményeinek áttekintése	68
5.3. A keringő VST arány és a donációra alkalmas egyének aránya vírusonként	69
5.4 A keringő VST arány és az donornak alkalmas egyének aránya a donorok életkora szerint	70
5.5. A sejt készítmény mérésével kapcsolatos eredmények áttekintése.....	71
5.6. Over-feeding	73
5.7 Összevetés a szerológiai eredményekkel	74
5.8 További lehetőségek.....	74
6. Következtetések.....	76
7. Összefoglalás	79
8. Summary.....	81
9. Irodalomjegyzék	82
10. Saját publikációk jegyzéke	91
Az értekezéshez kapcsolódó közlemények	91
Az értekezéshez nem kapcsolódó közlemények	92
11. Köszönetnyilvánítás	93

Rövidítések jegyzéke

ADV – Adenovírus	HVG – host versus graft reakció
APC - Allophycocyanin	IFN- γ – Interferon-gamma
BKV – BK vírus	Ig – Immunglobulin
cMNC - folytonos mononukleáris sejtgűjtés (Continuous Mononuclear Cell Collection)	IL - interleukin
CMV- Cytomegalovírus	IVIG – intravénás immunglobulin
DNS - dezoxiribonukleinsav	LBP - lipopoliszacharid kötő protein (Lipopolysaccharide binding protein)
EBMT - Európai Csontvelő transzplantációs Társaság	LPS - lipopoliszacharid
EBV - Epstein-Barr vírus	MHC - fő hisztokompatibilitási komplex (Major Histocompatibility Complex)
EDTA - etilén-diamin-tetraecetsav	MUD - matched unrelated donor
FITC - Fluorescein isothiocyanate	PBMC – perifériás vér mononukleáris sejtek
FSC - előreszórt fény (forward scatter)	PBS - Foszfáttal pufferolt sóoldat (Phosphate-buffered saline)
G-CSF granulocytá kolónia stimuláló faktor (Granulocyte colony-stimulating factor)	PBSC - perifériás vérképző őssejt (Peripheral Blood Stem Cell);
GMP - Good manufacturing practices	PCR – polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
GVH - Graft versus host reakció	PE - phycoerytrin
GvHD - graft versus host betegség	PerCP - Peridinin chlorophyll
HC - hemorrhagiás cystitis	PTLD - poszttranszplantációs lymphoproliferatív megbetegedés
HLA – Humán Leukocita Antigén	QC - quality control
HSCT - haematopoetikus vérképző őssejt átültetése;	

SSC -oldalra szórt fény (side scatter)

Treg – regulátor T sejtek

TCL - cytotoxikus T sejtek, CD8+ T sejtek

TRM – transzplantációval összefüggő halálozás (transplant related mortality)

TCR – T-sejt antigén receptor

VST – vírus specifikus T sejt

Th sejtek - helper T sejtek, CD4+ T sejtek

1.Bevezetés

A haematopoetikus vérképző őssejt átültetés (HSCT) már régóta alkalmazott módszer - Magyarországon is - egyes vérképző szerveket érintő szerzett és veleszületett betegségek kezelésére(1). A módszer lényege, hogy a szervezetben lévő CD34+ un. hematopoietikus vérképző őssejtek (HSC) kerülnek átültetésre, melyből kialakul a recipiens szervezetének új vérképzése. Magát az átültetést a betegség nyugalmi állapotában (remisszió) végzik. A transzplantáció előtt a betegek nem megfelelő, vagy leukémiás vérképzését illetve daganatos sejtjeit sugár- és/vagy kemoterápiás kezeléssel elpusztítják (kondicionálás), majd az egészséges őssejteket infúzióval juttatják be a recipiens szervezetébe Autológ transzplantáció esetén a páciens saját őssejtjeit nyerik ki, és a kezelés idejére fagyasztva tárolják, allogén transzplantáció esetén pedig a sejtek forrása egy önkéntes donor. (2).

Az európai statisztikai hivatal adatai szerint a HSCT-k száma évről évre növekszik. Magyarországon a 2014-2018-as időszakban ez átlagosan 9,5%-os évi emelkedést jelentett, a 2018-as évben 438 HSCT-vel. Megvizsgálva a transzplantációval összefüggő mortalitást (TRM), az allogén HSCT-t követő első 30 napos időszakot tekintve a betegek legnagyobb arányban fertőzések következtében veszítették életüket, és 100 napos időtartamot figyelembe véve is az infekció a második leggyakoribb halálok, megelőzve a GvHD-t (1,3,4).

A hagyományos infekciók kezelésére használatos módszerek mellett az elmúlt években több új eljárás is megjelent, és vált klinikai környezetben is alkalmazhatóvá.

Ezen módszerek egyike az immunomagnetikus sejtszeparálás, mely a T sejtek vírusspecifikus citokin szekréciójával kombinálva lehetővé teszi ezen sejtek elválasztását a többi sejtől.

Jelen értekezés témája a vírus specifikus T-sejtek (VST) terápiás szelekcióját kísérő donor kiválasztási folyamatok bemutatása, a sejt készítmény minőségellenőrzését magába foglaló áramlási citometriás vizsgálatok jellemzése.

Az elmúlt 5 év tapasztalataink összegzésével lehetőségünk nyílik a terápiához azt a donort kiválasztani, akinek a sejtjeit felhasználva a lehető legtöbb VST sejtet tudunk nyerni a szelekció során. Továbbá az adatok korcsoportokra vetített elemzésével

lehetéssé válik a potenciális donorok előszűrése, kiválasztva a donorjelöltek közül azokat, aki legnagyobb eséllyel lesznek alkalmasak donornak, így az eddiginél hatékonyabbá téve a donorszűrés folyamatát. Az értekezés bemutat egy mágneses sejtszelekciós eljárást is, mellyel a vírus specifikus T sejtek rövid idő alatt és megfelelő hatékonysággal kinyerhetők, akár azonnali terápiás célokra.

1.1 Allogén őssejt transzplantáció

Az őssejt transzplantáció széles körben alkalmazott terápiás módszer, különféle malignitások kezelésére. Magyarországon az utóbbi években a vidéki városokban is működő autológ őssejt-transzplantációs központoknak köszönhetően az allogén transzplantációk száma emelkedett a budapesti centrumban, emellett ezen transzplantációk indikációjának listája is bővült, valamint az életkor behatároló szerepe is csökkent (1).

Az alkalmazott graftok típusában is változások történtek: kezdetben a csontvelő eredetű vérképző őssejtek használata dominált, ezt napjainkban megelőzi a perifériás vérből apheresis során legyűjtött vérképző őssejtek alkalmazása, jelenleg a transzplantációk kb. 80%-a perifériás őssejttel történik. Ennek folyamánya a krónikus graft versus host betegség (GvHD) magasabb kockázata (4,5), és a GvHD elleni kezelés hosszabbodása (6). GvHD akkor alakul ki, mikor a transzplantáció során a donor T sejtjei a recipiens szervezetével való Humán Leukocita Antigén (HLA) antigénkülönbségeket felismerve aktiválódnak. A betegség elsősorban a bőrt, a májat és a beleket támadja (2). A GvHD kialakulásának feltételeit már több, mint 40 éve leírták: a graft tartalmazzon immunológiai értelemben kompetens sejteket, a recipiens sejtjei fejezzenek ki olyan szöveti antigéneket, melyekkel a donor nem rendelkezik, és a recipiens szervezete legyen immunszuppresszált állapotban, hogy a transzplantált sejtekkal szemben ne léphessen fel hatékonyan.(7)

Az allogén HSCT esetén a donorkiválasztásában komoly korlátozó tényező, hogy a páciensek kevesebb, mint 35%-ának van HLA egyező testvér donora (8). A TCR- $\alpha\beta$ + / CD19+ sejtek (TCR: T-sejt antigén receptor) ex vivo depléciójával lehetőség

nyílt haploidentikus donorok őssejtjeinek felhasználására (pl. szülő – gyermek közötti transzplantáció).

1.2 Immunszuppresszió

Az allogén transzplantáció során meg kell akadályozni a gazdaszervezet graft ellenes reakcióját (HVG – host versus graft) és a beültetett sejtek befogadó szervezet elleni reakcióját is (ez a korábban is említett GVH – graft versus host reakció). Immunszuppresszív – azaz immunrendszert gátló – szereket kap a recipiens a transzplantációt megelőzően, a beültetett sejtek kilökődésének meggátlására. A transzplantációt követő immunszuppresszió szerepe a GvHD megelőzése és kezelése (9).

1.3 Immunrekonstitúció

Az immunrekonstitúció az immunrendszer sejtjeinek újból meginduló képződését és működésének visszaállását jelenti. Ennek során az immunrendszer különböző elemei más más dinamikával térnek vissza, nem sokkal a megtapadást (engraftment) követően. A folyamat néhány hónaptól akár két évig is eltarthat (1. ábra, forrás:(10)).

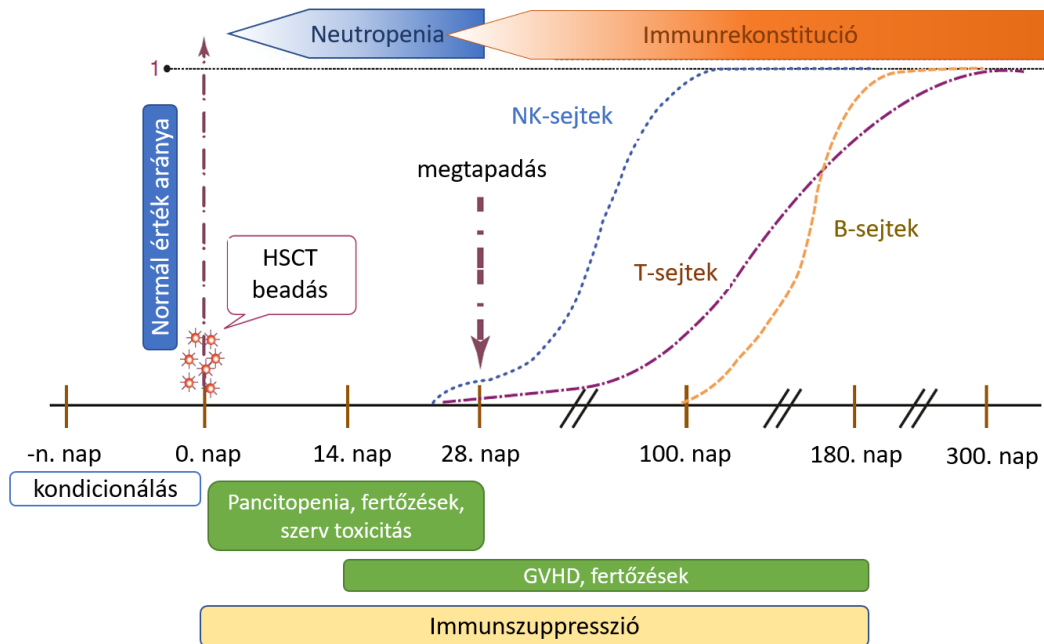
Elsőként a veleszületett immunitás elemei térnek vissza. A monocyták gyakran csak 1-2 nappal előzik meg a neutrofileket. A neutrofilek megjelenése a megtapadást jelző arany-standard, mely definíció szerint 3 egymást követő napon mért, több, mint 500sejt/ μ L neutrofilet jelent. A limfociták közül elsőként a természetes ölósejtek (NK, azaz Natural Killer sejtek) térnek vissza.

Az adaptív immunitás elemének tekinthető T sejtek visszatérése a transzplantáció sikerességének egyik sarokköve. A T sejtek felelősek a graft-versus-malignitás (GVM) hatásért, segítik a megtapadást, illetve a HSCT-t követő opportunistá virális és gombás fertőzések leküzdésében is kiemelt szerepük van.

A transzplantációt követő T sejtszám emelkedés két okra vezethető vissza: egyrészt a grafttal a szervezetbe juttatott, donor eredetű érett T sejtek perifériás expanziójára, másrészt a donor őssejtekből kiinduló de novo T sejt keletkezésre, utóbbi része az

immunrekonstitúciónak. A transzplantációt követő T sejt proliferáció még jellemzően az elsőként írt okra vezethető vissza, így a virális fertőzések leküzdésében is jellemzően inkább ezek a sejtek dominálnak az első hónapokban. A manipulálatlan allogén graftok esetében a CD8+ sejt populáció gyorsabban tér vissza (2-8 hónap), mint a CD4+ sejtek, ez utóbbiak száma is optimális esetben több mint 200sejt/ μ L a 6. hónapban, és a számuk a normál tartományt a HSCT utáni első évben éri csak el. A dendritikus sejtek az antigén prezentáló funkciójuknál fogva az adaptív immunitás rendkívül fontos részét képezik. Transzplantációt követően a mennyiségüket befolyásoló tényezők nem teljesen ismertek. A kezdeti visszatérésük gyors, majd szignifikánsan csökken, a normál szintet csak évek múltán éri el. A B sejtek mennyisége a transzplantációt követően rendkívül alacsony, és jellemzően donor eredetűek.

Az irodalom a B sejtek visszatérésének azt tekinti, mikor több mint 20 sejt/ μ L detektálható, de ez csak mennyiségi értékek, mely nem veszi figyelembe a B sejtek érettségét. Az IgM (Ig-Immunglobulin) termelődés jelenik meg elsőként, melyet az IgG termelődés követ, ennek megjelenése nagyon változó, a transzplantációt követő 3-12. hónapban következhet be (10).



1. ábra Immunrekonstitúciót befolyásoló tényezők HSCT-t követően. A transzplantációt követően a neutrofilek számának növekedése jelzi a megtapadást. Ebben az időben jellemző az NK sejtek számának növekedése, majd a T sejtek expanziója, mely ekkor még jellemzően donor eredetű, és fontos szerepük van a transzplantációt követő infekciók elleni küzdelemben. A B sejtek térnek vissza leglassabban, és melyek kezdetben jellemzően még éretlen sejtalakok.

Az immunrekonstitúció dinamikája, módja nagy mértékben függ a transzplantációhoz felhasznált graft eredetétől és összetételétől. A G-CSF-fel (granulocytá kolónia stimuláló faktor - Granulocyte colony-stimulating factor) mobilizált grafttal transzplantált betegek esetében például a T-sejt rekonstitúció gyorsabban zajlott le, mint a csontvelő eredetű hematopoetikus őssejteket kapott pácienseknél, viszont a magasabb arányú naív T-sejtek jelenléte gyakrabban okozott krónikus graft versus host betegséget. Ezzel szemben a csontvelő segítségével transzplantáltak esetében a konvencionális dendritikus sejtek aránya volt magasabb 3 hónappal a transzplantáció után (11). A hematopoetikus őssejt transzplantáció során – legtöbb esetben - nem csak a CD34+ sejteket juttatjuk be a grafttal, hanem a donor immunrendszerének elemeit is, azonban a hosszútávon működő immunrendszer a donor őssejtjeiből alakul ki. A fentiek mellett a

recipiens T- és B-sejtes immunitásának kialakulását számos tényező befolyásolja: a GvHD, az immunszuppresszív kezelés és a fertőzések mind gátolják az immunrekonstitúciót. (12)

1.4 Vírusinfekciók, vírus reaktivációk, és hagyományos kezeléseik

Az őssejttranszplantációt követő időszakban a transzplantáltak több okból kifolyólag csökkent immunitással kell szembeszálljanak a fertőzésekkel. A kondicionáló kezelésként alkalmazott kemo- vagy sugárterápia, illetve bizonyos esetekben ezek kombinációja károsítja a celluláris és humorális immunitást egyaránt, illetve elhúzódo immunrekonstitúcióhoz vezet (12).

Az őssejttranszplantációkat követően a vírusinfekciók, illetve a vírus reaktivációk komoly, esetenként végzetes kimenetelű komplikációt jelenthetnek (13–15). A különböző vírusok a transzplantációt követően más-más időszakban és eltérő gyakorisággal jelennek meg. A vírusfertőzések, és vírus reaktivációk előfordulása számos faktor függvénye lehet: a transzplantáció típusa fontos tényező, hiszen a perifériás vérben keringő őssejtek legyűjtésével nyert graft a csontvelőhöz képest tízszer több T- és B-sejtet tartalmaz (16). A különböző, ex vivo graft manipulációk szintén befolyásolják a graft összetételét. A TCR $\alpha\beta/\gamma\delta$ és CD19 depletált graftok használatával ugyan csökkenthető a GvHD kockázata, de a vírusok elleni védekezés fegyvertára is lecsökken. Emellett a donor és a recipiens korábban akvirált vírusfertőzései és az alkalmazott immunszuppresszív kezelés is hatással van a vírus reaktivációra.

1.4.1 Adenovírus (ADV)

Az adenovírusok az *Adenoviridae* családba tartozó vírusok gyűjtőneve, örökítőanyaguk kettős szálú dezoxiribonukleinsav (DNS). ADV fertőzés minden korcsoportban megjelenhet, de többnyire gyermekkorban zajlik, változatos tünetekkel.

Transzplantációt követően a felnőttek 15%-ánál jelent meg (17), gyermekeknél ez a korábbi közlemények szerint 80% is lehet (18), újabb közlemények alacsonyabb arányról számolnak be (19), de mindent egybevetve a gyermekeknél magasabb a

fertőzés megjelenése. A fertőzés leggyakoribb manifesztációja a haemorrhagiás cystitis, de előfordul pneumonia, gastroenteritis és hepatitis is (20).

Konszenzus alakult ki a klinikusok körében a HSCT-n átesett páciensek kockázati csoportokra bontásáról. Eszerint alacsony kockázatú csoportot jelent az autológ HSCT, közepes kockázatot a T sejt repletáció, rokon donoros transzplantáció és a GvHD mentes allogén transzplantáltak, míg magas kockázatúkat a nem egyező HLA HSCT transzplantáltak, GvHD miatt kezelt betegek, gyermek recipiensek és legmagasabb kockázatú csoportba tartozik a refrakter GvHD, a köldökzsínórvérrel transzplantáltak, a haploidentikus HSCT és a T sejt depletált allogén HSCT) (21)

A legmagasabb kockázatú csoportnál a hetenkénti ADV monitorozás javasolt legalább a transzplantációt követő 6. hónapig. A megelőző terápia kezdése kockázati besorolástól függően 100-1000 kópia/mL érték fölött javasolt (22). A megelőző kezeléseket nehezíti, hogy a jelenleg egyedülként használt terápiás szer, a cidofovir magas toxicitású, emellett az immunosuppresszánsok adagjának csökkentése is kiemelt fontosságú lehet.

1.4.2 BK vírus (BKV)

A BK vírus egy kettős szálú DNS vírus. Nevét az 1971-es első páciens monogrammjáról kapta, akinek a vizeletéből izolálták (23). A *Polyomaviridae* családba tartozik, a JC vírussal együtt. A BK vírus elterjedése széleskörű: különböző vizsgálatok 80-90% fölé helyezik a prevalenciáját (24): Angliában 83% (25), 71% Németországban (26), Olaszországban szintén 83% (27) A különbségek oka a módszerek és a pozitivitásként megadott határértékek eltérése.

A primer fertőződés legtöbbször gyermekkorban tünetmentesen zajlik. Ezután, lappangva több szervben is megtalálható marad, jellemzően a vesében. Immunodeficiens pácienseknél a vírus reaktiválódhat, akár halálos kimenetelű betegséget okozva (28).

Transzplantációt követően a páciensek 15,9%-ánál észleltek BKV fertőzést, és ez a páciensek 5,5%-ánál volt súlyos lefolyású.(29) A BK vírus szerepet játszhat a haemorrhagiás cystitis (HC) kialakulásában allogén HSCT után, de nem egyértelmű a korreláció, mert a vírusterhelés mellett a graft forrása (csontvelő vagy PBSC), a

kondicionáláshoz használt szer, és a GvHD státusz is okozhat HC-t (30,31), de van példa olyan kutatásra, mely egyértelműen kapcsolatot talál a BK vírus kópiaszám és a HC kialakulása között (32).

A transzplantációt követő BKV fertőzések ellen jelenleg nincs célzott antivirális szer. A reaktiváció kezelésének bevett módja az immunszuppresszió csökkentése (33).

1.4.3 Humán Cytomegalovírus (CMV)

A CMV a herpeszvírusok - Herpesviridae családjába, a beta-Herpesvirinae alcsaládba tartozó DNS vírus.

Transzplantációt követően a CMV infekció az egyik legkomolyabb komplikációt okozó fertőzés (20). A szeropozitív páciensek 60-70%-ánál jelentkezik CMV fertőzés (34). Abban az esetben, ha szeronegatív páciens szeropozitív donortól kap HSC transzplantációt, 30% eséllyel kap CMV fertőzést, és rosszabb mortalitási esélyekkel néz szembe bakteriális és gombás fertőzésekkel (35).

A CMV fertőzés-reaktiváció sokféle lehet. Előfordulhat tünetmentes virémia, de okozhat többszervi megbetegedést is (pneumonia, gastroenteritis, encephalitis, oesophagitis, retinitis) (36)

A CMV fertőzés korai felismeréséhez a kulcs a vírus DNS-ének PCR-ral történő detektálása. Az elsődleges antivirális szer a ganciclovir illetve a foscarnet. Ez utóbbi hatékonysága is igazolt, de gyakorlati okokból (prehidratáció és elektrolit monitorozás szükségessége) inkább második vonalbeli szerként alkalmazzák (21). A transzplantációt követő 100. nap előtti CMV fertőzés (detektálható DNS vagy antigén) észlelésekor javasolt legalább 2 hetes megelőző terápia, egész a DNS detektálhatóságának megszűnéséig, illetve a 100. napig, tekintettel a fertőzés kiújulásának gyakoriságára (37).

A refrakter CMV fertőzés sok esetben visszavezethető olyan mutációkra, melyek gyógyszer rezisztenciát okoznak (38), ilyen például az UL97 gén mutációja, mely ganciclovir rezisztenciát okoz, illetve az UL54 gén mutációja, mely ganciclovir, foscarnet illetve cidofovir rezisztenciát is okozhat (39).

1.4.4 Epstein-Barr vírus (EBV)

Az EBV szintén kettős szálú DNS vírus, világszerte elterjedt, a felnőtt populációban 90-95%-os az előfordulása (40,41). A vírus a fertőzést akut fázisát követően továbbra is a szervezetben marad, és reaktivációt okozhat (41).

Transzplantációt követően a manipulálatlan allogén graftot kapott transzplantáltak 25-37%-ánál figyeltek meg fertőzést (42). Leírtak esetet, mikor transzplantációt követően EBV fertőzés meningo-encephalitis-t okozott (43), de a fertőzés, illetve a reaktiváció komolyabb kockázata az EBV indukálta poszt-transzplantációs lymphoproliferatív megbetegedés (PTLD). Az EBV indukálta PTLD többnyire a HSCT-t követő első hónapban jelenik meg, polimorf, poliklonális lymphoproliferációként, és malignus, monoklonális lymphomává progrediál megfelelő kezelés hiányában. (20).

A PTLD megelőzésére az EBV kópiaszám növekedésével a monoklonális CD20 antitest, a rituximab hatásos. Nincs definiált vágóérték a kópiaszám tekintetében a kezelés megkezdésére, de egy tanulmány szerint a milliliterenkénti 1000 gEq vírusrészecske esetén már szignifikánsan nagy a PTLD kockázata, és érdemes megkezdeni a kezelést (44). A rituximab terápia, főként megelőző kezelésként hatékony az esetek döntő többségében, de kb az esetek 20%-ában önmagában kevésnek bizonyul. Ilyenkor az immunosuppresszánsok csökkentése segíthet, ám bizonyos refrakter esetekben még ez is kevésnek bizonyul (45).

1.5 Immunológiai háttér

Az adaptív immunrendszer részeként a vírusfertőzést követően az aktívan immunizált szervezetben T és B memóriasejtek és ellenanyagok alakulnak ki, melyek évekkal a fertőzés után is kimutathatók, így a szervezet tulajdonképpen *emlékszik* a kórokozóra.

A terápiás célra szelektált T sejtek szelekciójának az alapja, hogy ezek a sejtek citokineket termelnek, ezek közül is az interferon-gamma (IFN- γ) a kulcs az immunomagnetikusan szeparáláshoz.

1.5.1. Citokinek termelődése, az interferon gamma

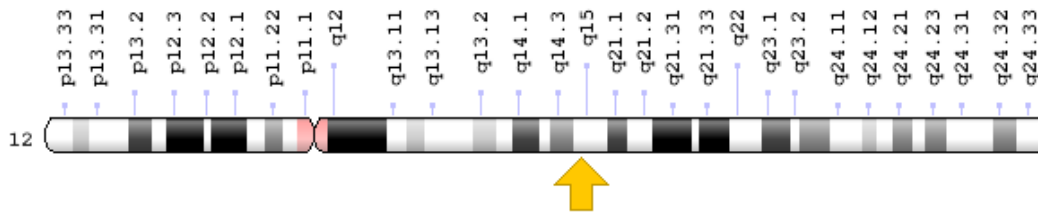
Az első citokineket a 20. század közepén írták le, szerkezetüket tekintve glikoproteidek, melyek molekulatömege 10 és 40 kDa közé tehető. Jelenleg több mint száz citokint ismerünk, a pontos azonosításuk, és funkciójuk jellemzése a 80-as években indult. A citokinek jelentős részét limfociták termelik (limfokinek). A citokinek csoportjába tartoznak az interleukinek (IL) is, melyek a leukociták között létesítenek kapcsolatot, illetve az interferonok is.

A citokinek membránreceptorokhoz kötődve fejtik ki hatásukat, melyekhez nagy affinitással kötődnek, és egy jelátviteli kaszkádot indítanak be a sejtben. A citokinek hatása lehet *autokrin* (a sejt saját működését befolyásolja az általa termelt citokinnel) *parakrin* (mikor egy másik sejtre fejt ki hatást) és *endokrin* (ha a keletkezéstől távol eső szervre hat). A citokinek jelentős része immunsejteken fejt ki hatását, azok aktivációját, érését, proliferációját illetve differenciálódását serkenti vagy gátolja, ezáltal szabályozva az immunválaszt.

1.5.2. Az interferon gamma (IFN- γ)

Az IFN- γ fontosságát számunkra az adja, hogy ez a glikoproteid képezi az immunomagnetikusszelekció alapját, és emiatt a donorszűrésben is kulcsszerepe van.

Az emberi szervezetben az IFN- γ -t kódoló gén a 12-es kromoszómán található, a hosszú (q) karon, a 15-ös pozícióban (2. ábra, forrás: (46)). A gén egy 146 aminosavból álló terméket kódol, ez a poszttranszlációs módosítások során egy 15kDa méretű láncokból álló homodimerré alakul (47).



2. ábra Az interferon gammát kódoló gén helyzete a 12-es kromoszóma hosszú karján

IFN- γ -t termelnek a természetes ölősejtek (NK – Natural Killer), CD8+ citotoxikus T-limfociták (CTL – Cytotoxic T-Lymphocyte), a CD4+ segítő T-limfociták (Th – Helper T-Lymphocyte), és a $\gamma\delta$ T-sejtek. Az IFN- γ sokrétű hatását az 1.táblázat mutatja be (9).

1. táblázat az IFN- γ különböző sejtekre kifejtett hatása sejttípusonkénti bontásban

sejttípus	hatás
CD4+ Th2 sejt	↓proliferáció, ↓IL-4 és IL-5 termelés
Makrofág	↑MHC-II-expresszió (MHC - Major Histocompatibility Complex), ↑mikrobaölő aktivitás
NK sejt	↑citotoxikus aktivitás
B-sejt	↑differenciáció, ↑komplementet aktiváló, Fc- receptorhoz kötődő IgG alosztályok, ↓IgE
CD8+ Tc-sejt	citotoxikus effektor sejttéérés
endotélsejtek	↑MHC-II

A fenti felsorolásban lévő sejtek közül a T sejtek képesek közvetlenül reagálni az általunk alkalmazott stimulusra (erről később, a peptid könyvtár leírásánál lesz szó), tekintettel arra, hogy az NK sejtek nem képezik az adaptív immunitás részét, nem antigén specifikusak.

A T sejtek a csontvelőben képződnek, pontosabban, az előalakjaik csontvelői eredetűek. A tímuszba vándorolva érnek immunkompetens T sejtté. A T sejtek rendelkeznek egy olyan receptor struktúrával, mely képes a fajlagos antigénfelismerésre. A receptor struktúra neve TCR (T cell receptor). A TCR szerkezete alapján két csoportra oszthatjuk

a T sejteket: TCR $\alpha\beta$ és TCR $\gamma\delta$ T sejtekére. Az $\alpha\beta$ oldalláncokkal rendelkező sejtek teszik ki a T sejtek 90-95%-át, a $\gamma\delta$ oldalláncokkal rendelkező sejtek az 5-10%-át.

A TCR $\alpha\beta$ sejtek tovább csoportosíthatóak. A CD4 receptort hordozó T sejtek az MHCII molekulával asszociált peptidet ismerik fel. az elnevezésük CD4+ vagy helper T sejt (Th), illetve a CD8 receptort hordozó T sejtek, melyek az MHC I molekulával asszociált peptidet ismerik fel, ezek a CD8+, vagy cytotoxikus T sejtek (Tc).

A CD4+ T-sejtek (Th) differenciálódással különböző effektor sejtekké alakulnak. Ezek a Th1, Th2, Th17 és Treg sejtek. Különböző patogénekkal szemben más-más Th effektor sejtek hatásosak.

- Th1 T sejtek: elsősorban olyan lymphokinetet termelnek, melyek a makrofág aktivációban, illetve a citotoxikus és gyulladásos reakciókban vesznek részt (IL-2, IFN γ , TNF α), az immunválaszt tehát a citotoxikus irányba tolják el. Ez a sejttípus elsősorban a dendritikus sejtek (DC) által bemutatott peptideket ismerik fel. A szerepük az intracelluláris kórokozók, így a vírusok ellen a legnagyobb. A Th1 sejtekből származó IFN γ és TNF α erős antivirális hatással rendelkezik, és az általuk termelt IL-2 elősegíti a B és T limfociták osztódását.
- Th2 T sejtek: az általuk termelt limfokinek a B sejtek aktiválásában és ellenanyagtermelő sejttéérésében vesznek részt (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10), ezáltal a humorális irányba tolván az immunválaszt. A Th2 sejtek elsősorban a B sejtek által bemutatott peptideket ismerik fel. Szerepük az extracelluláris patogénekkal szembeni védekezésben fontos.
- Th17 T sejtek az IL-17 citokinetet termelik, erős gyulladáskeltő hatással rendelkeznek. Ezek a sejtek elsősorban a makrofágok által bemutatott antigén eredetű peptideket ismerik fel. Szerepük a gyulladásos folyamatokon kívül az extracelluláris patogénekkal szembeni védekezésben fontos.
- Regulátor T sejtek (Treg) szintén a CD4+ sejtpopulációba tartoznak. Ezek a sejtek a természetes és az adaptív immunrendszer működését szuppresszálják, a többi T sejtet aktiváló stimulusokra anergiával reagálnak, gátolják a Th1 sejteket.

A CD8+ T sejtek (Tc) citotoxikus aktivitással rendelkeznek, olyan sejteket pusztítanak el, melyeken az MHC I molekulával asszociáltan endogén antigénből származó peptid

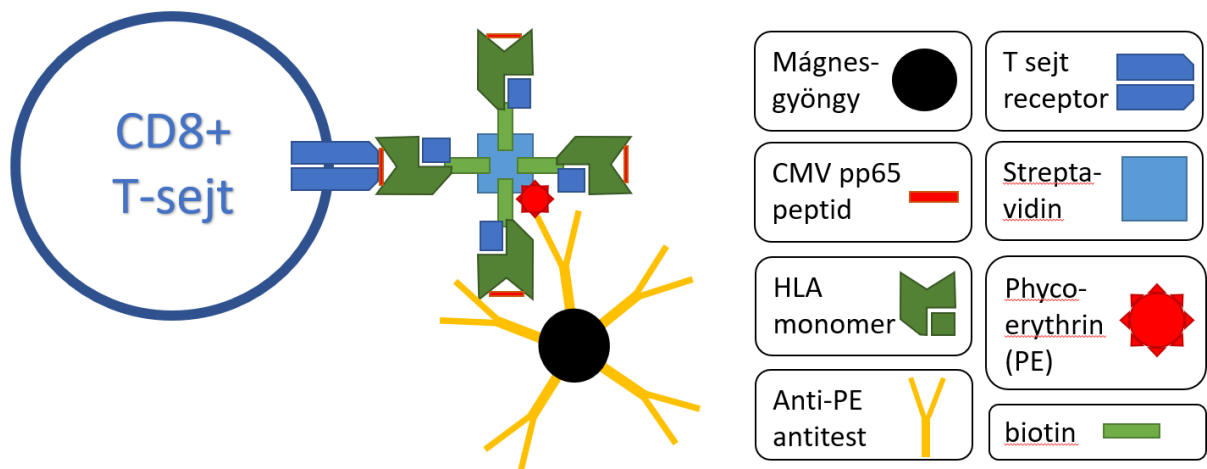
jelenik meg. A citotoxikus T sejtek esetében akár egyetlen TCR komplex által közvetített stimulus kiválthatja a sejtben tárolt mediátorok felszabadulását (9).

1.6. Klinikai léptékű VST szelekciók összehasonlítása

A vírus specifikus T sejteket adoptív transzferének ötlete nem újkeletű: a 90-es években már írtak le terápiás céllal adott VST-sejtekkel végzett klinikai beavatkozásokat.(48,49)

Eleinte a citotoxikus T sejtek ex vivo szelekciója CMV-vel fertőzött fibroblasztok segítségével (48,49), illetve 1:200 arányban hígított lizátummal történt (50), az eredeti csontvelődonor sejteinek használatával. Ezek a módszerek nagyon idő és forrásigényesek voltak, mert a tenyésztéshez szükséges feltételek (helyiség, steril fülke, inkubátor, megfelelő szellőztetés) mind költségesek, és meg kell feleljenek a GMP (Good manufacturing practices) kritériumoknak. A megfelelően növekvő sejtvonalak kiválasztása, majd további tenyésztése a szükséges sejtmennyiség eléréséhez ezzel a módszerrel heteket vett igénybe.

Később voltak próbálkozások a citotoxikus T sejtek más metodikával való szeparálására az ún tetramer technológiával (51). A szelekcióhoz itt a donorokéval egyező HLA (MHC I) fehérjét és víruspeptidet (pl CMV pp65) tartalmazó komplexet (tetramer) használtak, melyek tulajdonképpen „elkapják” a víruspeptidre specifikus T sejteket. Az affinitás növelése érdekében a reagensben négy HLA-peptid monomert kapcsolnak össze – erre utal a tetramer elnevezés -, melyek egyetlen célsejtbe kötődnek. Ezeket az egységeket streptavidinhez kötődő négy biotin alegység fogja össze tetramerekké, melyet egy phycoerytrin (PE) protein-pigmenttel jelöltek. A tetramerek a CMV specifikus T sejt receptoron keresztül a célsejtbe kötődtek, majd a tetramereken lévő PE egységekhez egy szuper-paramágneses mikro-gyönggyel konjugált anti-PE antitest kapcsolódott (3. ábra, forrás:(51)). Ezek a jelölt, CMV specifikus T-sejtek aztán egy mágneses szeparátoron átvezetve kitapadtak, és elválaszthatóak. A módszer gyors, de hátulütője, hogy egyetlen virális epitópot használ, és csak olyan donoroknál használható, akik a leggyakoribb HLA típusokkal rendelkeznek, és ebben az esetben sem garantált a terápia hatásossága(52,53).



3. ábra HLA-tetramer szelekció sémája. Egy Streptavidin molekula biotinon keresztül kapcsol össze négy HLA monomert, melyekbe illeszkedik a CMV-re jellemző peptid, amihez a T sejt receptor csatlakozik. A komplex PE jelölt, melyhez egy antitestekkel ellátott mágneses gyöngy képes kötődni

Egy másik módszerrel lehetséges egyszerre többféle, adott vírusra specifikus T sejtek tenyésztése. Ehhez kiméra adenovírus vektorokkal rendelkező EBV transzformált B sejt vonalakat használtak. Ez lehetőséget teremtett arra is, hogy az adenovírus specifikus T sejtek az epitópok szélesebb spektrumát ismerjék fel. A módszer hátránya a költségessége mellett, hogy a terápiásan felhasználható sejtek generálása több hetet vesz igénybe (54), viszont lefagyaszttva tárolhatóak, „off the shelf” termékként értékesíthetőek (55,56).

Az általunk is használt módszernél a T sejtek virális stimulusra adott interferon-gamma (IFN- γ) szekréciós válasza alapján történik a szeparálás. Ennek részletezése a módszerek részben található. Ennek az eljárásnak nagy előnye, hogy gyors, a donor alkalmasságának igazolása után gyakorlatilag csak a rutin donorkivizsgálási folyamatot kell megvárni. Ideális donor az eredeti őssejtdonor lehetne, de ez sokszor akadályokba ütközik, és nem feltétlen alkalmas az adott vírus elleni terápiához (szeropozitivitás hiánya, nem felel meg a donorszűrésen).

Naív T sejtekből is lehetséges vírus-specifikus T-sejtek előállítás, és különleges, gázátengedő, gyors expanziós sejtenyésztők használatával (G-Rex: Gas-permeable

Rapid Expansion cultureware), mely esetben a CTL sejtek expanziója megsokszorozódik, és rövidebb időt, 9-12 napot igényel a folyamat (57,58).

A vírus specifikus T sejtek szelekciója a költségesebb eljárások közé tartozik, de már az Európai Vér- és Csontvelőtranszplantációs Társaság (EBMT) is kiemelte, hogy különösen a fertőzések korai felismerésére és kezelésére szükséges megfelelő forrásokat biztosítani (3).

1.7 Az átfedő peptidkönyvtár tesztelésének szükségessége

Az általunk végzett VST-sejt szelekció egyik kulcsfontosságú lépése a T-sejtek stimulálása egy virális peptid-lánccal (ennek leírása későbbiekben a metodika fejezetben található). Erre a stimulusra nem minden donorjelölt reagál, illetve a stimulusra adott reakció erőssége is eltér egyénenként. Ezért szükséges a potenciális donorok perifériás vérmintájának előzetes tesztelése az átfedő peptidkönyvtár (peptivátor) segítségével. A peptivátor jelenlétében IFN- γ termeléssel reagáló T sejtek az adott vírusra specifikus T sejteknek felelnek meg, ezek megfelelő arányú jelenléte esetén a szűrt egyén donornak alkalmas. Mivel a VST szelekciós eljárás az IFN- γ termelő T sejtek jelenlétén alapszik, a donorok előszűrése nem kihagyható lépés, ezt nem helyettesítheti a szerológiai vizsgálat. Peptivátor vírusokra, illetve epitópokra specifikusan elérhető. Az általunk alkalmazott 4 vírus elleni T sejtek stimulálására szolgáló peptidkönyvtárakon kívül elérhetőek egyéb vírusokra jellemző készítmények, ideértve a SARS-CoV-2 vírust is.

1.8 Az Immunomagnetikus szeparálás

Az immunomagnetikus szeparálás során a sejteket mágneses gyönggyel kötött antitestekkel jelöljük, és mágneses tér segítségével elválasztjuk a sejtuszuspenzió többi részétől. Az általunk használt módszert 1990-ben szabadalmaztatta a Miltenyi Biotec „MACS” néven. Ennek a különlegessége a mágneses oszlopban rejlik, mely lehetővé teszi a hatékonyabb elválasztást.

1.8.1 A mágneses gyöngy

Az antitestekhez kötött mágneses gyöngyök 50nm nagyságúak. Összetételüket tekintve dextrán-vas oxid szemcsékből állnak. Ennek az anyagnak fontos tulajdonsága, hogy paramágneses, tehát önmagában nem mutat mágneses tulajdonságokat, csak ha erős mágneses térbe kerül. A mágneses tulajdonságait azonban elveszíti, ha az erős mágneses térből kikerül. Ha ez nem következne be, tehát, megmaradnának a mágneses tulajdonságai, a szelektált sejtek összecsapzódhatnának. A mágneses gyöngyök elég kis méretűek, hogy stabil kolloid oldatot alkossanak, így könnyen kezelhetőek automatizált rendszerekben is. A dextrán- vas oxid szemcsék szinte teljesen inerteek, nem toxikusak, és biológiai úton lebomlanak.

1.8.2 A mágneses oszlop

Az oszlop kisméretű ferromágneses gömbökből áll, melyek között a tér, amin a sejtek áthaladnak, egy átlagos lymphocita méretének húszszorosa, így a jelöletlen sejtek könnyedén átjutnak az oszlopon. A ferromágneses gömbök tízezerszeresére növelik a mágnesesség erejét, aminek köszönhetően a sejtek jelöléséhez kevesebb mágneses gyöngyöt tartalmazó antitest is elegendő, azaz minimális jelölés is elegendő a jó hatásfokú szeparáláshoz.

1.8.3 A mágnes

Az állandó mágnes úgy került kialakításra, hogy az egyszer használatos oszlopot bele lehessen helyezni és a mágnes előre-hátra mozgatásával a mágneses teret az oszlop körül ki és be tudjuk kapcsolni. A jelöletlen sejtek áthaladása után a jelölt sejteket is le tudjuk mosni az oszlop ferromágneses gömbjeiről egy erősebb pufferárammal (59).

1.8.4 A szelekciók fajtái a jelölt sejt alapján

Alapvetően három féle elválasztási módszert használhatunk az immunomagnetikus szeparálásnál. Ezt nagyrészt a szelektálandó sejtek fajtája, illetve a célzott frakció összetétele határozza meg (4. ábra).

- Pozitív szelekció (dúsítás)

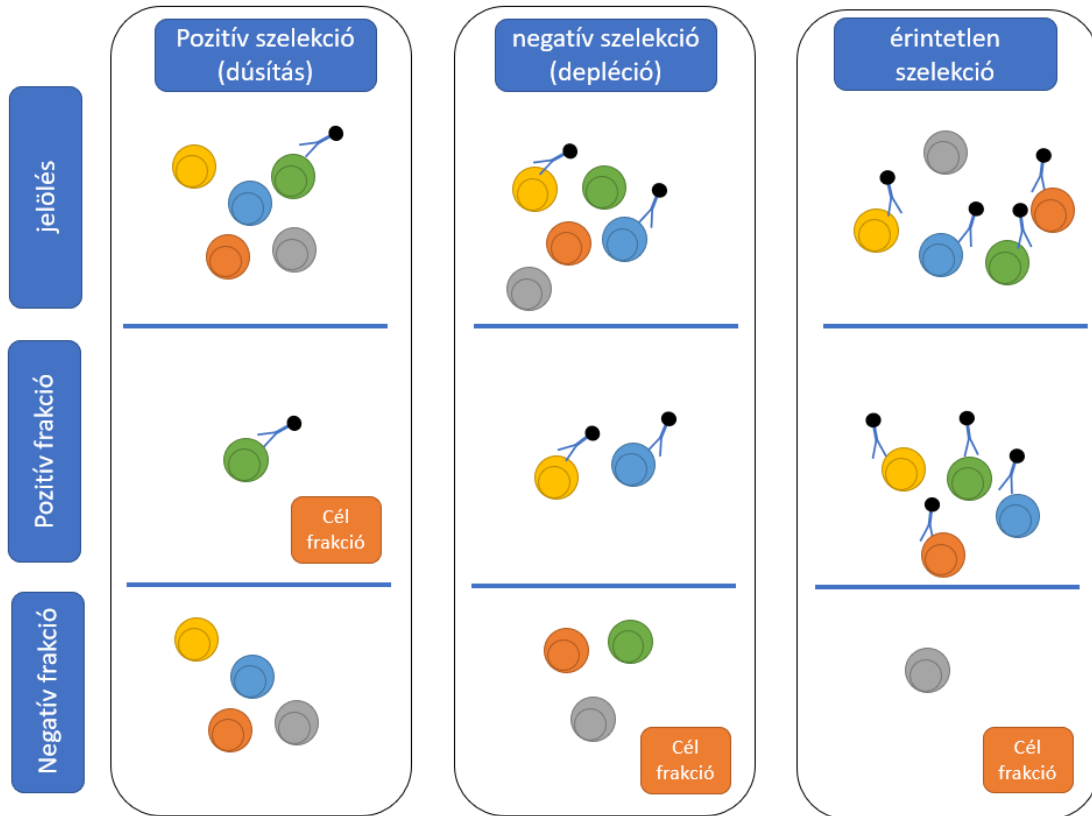
A pozitív szelekció esetén az elválasztandó, azaz a későbbiekben felhasználni kívánt sejteket jelöljük, így azok tapadnak ki a mágneses tér hatására az oszlopon. A jelölt frakció neve a pozitív frakció, tehát ez esetben a pozitív frakció sejtjeit tekintjük a célfrakciónak. A pozitív szelekcióval a kívánt sejtek arányát megnövelve, feldúsítjuk azokat.

- Negatív szelekció (depléción)

A negatív szelekció esetén a nemkívánatos sejteket jelöljük a mágneses antitestekkel, így azok tapadnak ki az oszlopon. Ebben az esetben a célsejteket az oszlopon szabadon átfolyó frakció, a negatív frakció tartalmazza. A negatív szelekcióval depletáljuk a készítményből a fölösleges, vagy ártalmas sejteket. Erre példa a haploidentikus transzplantációk esetén alkalmazott TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD19⁺ depléción.

- Érintetlen (untouched) szelekció

Ez a fajta szelekció tulajdonképpen a negatív szelekció egy fajtája, azzal a különbséggel, hogy nem csak egy sejt vonalat jelölünk, hanem egy sejt típus kivételével az összeset. Így egy nagyon tiszta készítményt kapunk, ami csak a kívánt sejteket tartalmazza, hasonlóan a pozitív szelekcióhoz, de fontos különbség, hogy a célsejtjeinket semmilyen behatás nem éri, hiszen hozzájuk nem kötődött antitest, szabadon átjutottak az oszlopon.



4. ábra A különböző immunomagnetikus szeparálások. minden esetben egy kiindulási,frakció (az ábrán a jelölés sorban) szétválasztása történik pozitív és negatív frakcióra. A jelölt sejtek határozzák meg a szelekció típusát: pozitív, negatív illetve érintetlen.

2. Célkitűzések

A vírus specifikus T sejtekkel történő kezelés témakörében általunk feldolgozott öt év során egy olyan terápiás eljárásban segédkeztünk, mely még napjainkban sem széleskörben elterjedt módszer a transzplantáción átesett páciensek vírusfertőzésének eliminálásában. Ennek kapcsán a laboratóriumunk feladata volt, hogy a terápiához sejtet donáló jelöltek mintáján elvégezzük a szükséges vizsgálatokat, mellyel megállapítható, hogy ki lehet alkalmas donornak. Ideális esetben ez az eredeti, transzplantációhoz össejtet adó személy lenne, de a gyakorlatban ez sokszor akadályba ütközik, ezért a recipiens családjának, esetleg barátainak segítségét kértük. Ennek eredményeként egyedülállóan nagy számú donorszűrést végeztünk, melyhez hasonlóra az irodalomban nem találtunk példát.

Feltételezhető volt, hogy a donorok perifériás keringésében található VST sejtek mennyisége kihatással lehet a készítményben feldúsítva található VST sejtekére. A nagy mennyiségű donorjelölt vizsgálatával pedig azt reméltük kideríteni, hogy a korcsoporti bontás vizsgálatával, igazodva az irodalomban talált adatokhoz, a különböző korú donorjelöltek eltérő eséllyel lesznek alkalmasak donornak, ami által lehetségessé válik a donorok előszűrése, így kisebb eséllyel kell a szűrésből olyan egyént kihagyni, aki potenciálisan jó donor lehet. Kis számú donornál rendelkezésünkre álltak a vírusszerológiai eredmények, amely lehetőséget adott a két módszer összevetésére.

A beadásra szánt készítmény vizsgálatával lehetőségünk nyílt a készítmény tisztaságának vizsgálatára, és az esetleges aspecifikus jelölődések, a túlzott citokintermelés miatt esetleg fellépő „over-feeding” feltárására.

Adataink feldolgozásával célul tűztük ki, hogy:

1. Megvizsgáljuk, milyen az egészséges magyar lakosság körében a keringő vírus (ADV, BKV, CMV, EBV) specifikus T sejtek átlagos aránya a perifériás vérben, és a vizsgált egyének mekkora hányada alkalmas donornak
2. Korcsoportonként is meghatározzuk, hogy az egyes vírusok esetén milyen VST arányok jellemzőek a donorjelölt egészséges egyének vérében és hogy az egyes korosztályokban a donorjelöltek hány százaléka alkalmas donornak

3. A rendelkezésünkre álló vírusszerológiai adatokkal összevetve a donorszűrési eredményeket, összehasonlítjuk az általunk alkalmazott módszer pontosságát a napi rutinban használt vizsgálattal.
4. Elemezzük, hogy van-e összefüggés a donor vérében mért VST arány és a készítmény VST tartalma között, azaz a megfelelő donorok kiválasztásánál van-e jelentősége a donorszűréskor alkalmazott stimulusra adott sejtes válasz mértéke, és a szelekció során létrehozott sejt készítmény minősége, sejt tartalma között
5. Megvizsgáljuk, hogy van-e számottevő "over-feeding" hatás, azaz van-e összefüggés a donor keringő VST sejtaránya és a készítményben detektálható CD3-/IFN- γ + fenotípusú sejtek száma között, melyek a sejtfelszínen aspecifikusan IFN- γ -t kötő non-T sejteknek felelnek meg.

A fenti kérdésekre adott válaszok segíthetnek a donorkiválasztási folyamatban. A laboratóriumok szerte az országban leterheltek, és a rendelkezésre álló információkkal lehetséges a potenciális donorok előszűrése, kiválasztva azokat a jelölteket, akik nagyobb eséllyel lesznek alkalmasak donornak, illetve kirotálva azokat, akik kisebb eséllyel reagálnak megfelelően a peptivátor stimuláló hatására.

3. Módszerek

A bevezetésben taglalt, elméleti háttér bemutatása után az általunk használt módszereket, a könnyebb érthetőség kedvéért néha átfedésben az ott leírtakkal jelen fejezetben taglaljuk, esetenként lényegesen részletesebben, specifikusabban.

3.1 Páciensek

A VST terápia recipiensei legtöbb esetben olyan, többnyire összejt transzplantáción (CBU: 2 eset, MUD-PBSC:26 eset, csontvelő:6 eset, haploidentikus:15 eset, HLA-identikus testvér: 12 eset, nem transzplantált (SCID+HLH): 1 eset) átesett betegek voltak, akinél a konvencionális antivirális terápiás eljárások nem voltak elégségesek. Az antivirális terápiák eredményességének monitorozása a szervspecifikus fertőzések esetében szövettani vizsgálattal történt, illetve polimeráz láncreakció (PCR) segítségével a vérplazma és vizelet mintákból. Nem használtunk határértéket a kópiaszámra vonatkozóan, vagy írott protokollt, a kezelőorvos belátására volt bízva, hogy mikor kéri a terápiát. A vizsgálat 5 éve alatt 63 betegnél (gyermek: n=17, felnőtt: n=46) 74 VST kezelés történt.

Volt olyan páciens, aki egyszerre több vírus elleni készítményt kapott, illetve olyan is, aki több egymást követő időpontban kapott vírus ellenes T-sejteket.

3.2 A donorok

A VST kezelés indikációjának felállítása után az első lépés a megfelelő donor kiválasztása. A legideálisabb donor természetesen az eredeti, HLA egyezést mutató összejtdonor lenne. Ez a legtöbb esetben több akadályba ütközött. Az egyik ezek közül, hogy az eredeti összejtdonor nem feltétlen rendelkezik a megfelelő T sejt immunválasszal a vírussal szemben. A másik problémát az egyező, nem rokon donorok (matched unrelated donor -MUD) nehézkes mozgósítása jelenti, legtöbb esetben ugyanis ezek a donorok külföldön élnek.

Minden esetben a pácienseket kértük meg, hogy a rokonaik, ismerőseik segítségét kérjék, hogy jelentkezzenek donornak. Ez a család elkötelezettsége miatt gyors reagálást

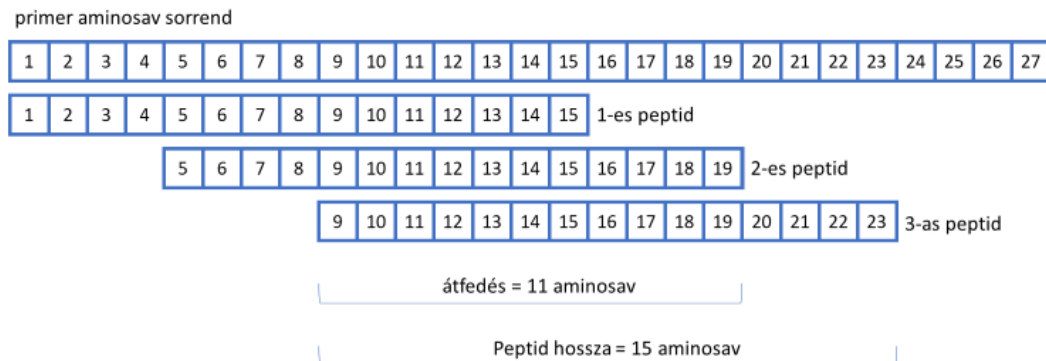
jelenthet, és ideális esetben a donorszűréstől számított harmadik napon már sor kerülhet a sejtszelekcióra. A legtöbb esetben 8 donor kivizsgálása történt egyszerre, jó esélyt biztosítva arra, hogy találunk a jelentkezők között egy adott vírus ellen immunizált személyt. A rokonok esetében nagyobb, de a barátok, ismerősök esetében csekély az esély a HLA egyezésre, ezért a donor kiválasztásánál előnyben részesítettük a közeli rokonokat, illetve a jobb HLA egyezés esetén nagyobb az esély a beadott T sejtek in vivo expanziójára is (60). HLA tipizálás nem történt a donorkivizsgálás során, ennek az oka, hogy nagy mértékben késleltette volna az eljárást. Az elmúlt 5 évben 2 esetben fordult elő, hogy az eredeti donor sejteit használtuk fel a terápiás célú VST szelekcióhoz, a többi betegnél ún. harmadik személy, legtöbbször családtag volt a donor.

A jelentkezők eligazítását az őssejtdonorok kivizsgálására szakosodott személyzet végezte, ők voltak a felelősek a potenciális donorok tájékoztatásáért, illetve a megfelelő adminisztratív feladatok (pl beleegyező nyilatkozatok) elvégzéséért is. Ugyanez a csapat végezte a vérvételt is. Az általunk végzett vizsgálat mellett minden donor átesett a meghatározott donorkivizsgálás részét képező vérkép, rutin labor- és vírus vizsgálatokon. A donoroktól személyenként 2×6ml, EDTA-val (Etilén-diamin-tetraecetsav) alvadásgátolt vért vettek az általunk végzett kivizsgáláshoz, a sejtek peptivátorral való teszteléséhez. A tényleges donor kiválasztásánál az alábbi tényezőket vettük figyelembe: a keringő VST sejtek aránya, rokonsági fok (feltételezett nagyobb HLA-egyezés), életkor, nem, abszolút lymphocyta szám, vénák állapota (leukaferezishez), alaphetegségek, esetleges kóros laboratóriumi eltérések.

3.3 Az átfedő peptidkönyvtárak

A VST-k szelekciójának első lépcsője, hogy a sejteket olyan stimulusnak tegyük ki, amelyre csak és kizárólag azok a T sejtek reagálnak, melyek specifikusak az adott virális fehérjére. Ennek az általunk használt eszköze egy átfedő peptidkönyvtár, az úgynevezett peptivátor. Ez a név egy, a Miltenyi Biotec által fejlesztett és forgalmazott, szintetizált peptid-készletet takar, és tulajdonképpen aminosav láncokat tartalmaz. Ezeket az aminosav láncokat egyenként 15 aminosav összekapcsolásával hozták létre, melyek egymással 11 aminosav átfedést mutatnak (5. ábra, forrás:(61)), így lefedve az

adott vírusfehérje primer aminosav sorrendjét. Ez az aminosavlánc hossz, ilyen mértékű átfedéssel optimalizálja mind a CD4+ (helper), mind a CD8+(cytotoxikus) T sejtek stimulációját (61,62).



5. ábra Az átfedő peptidkönyvtár (peptivátor) szerkezetének sémája. 15 aminosav hosszúságú peptidláncok 11 aminosav átfedést mutatnak.

A CMV esetében a peptivátor a 65 kDa-os belső mátrix foszfoproteint (lower matrix phosphoprotein) fehérjéit fedi le (63,64), mivel ez az immunológiailag domináns struktúrprotein (65).

Az adenovírusnál a hexon kapszid protein fehérjeláncait tartalmazza a peptivátor, mivel a kutatások során ez bizonyult az immundomináns fehérjének, és több, szerotípusokban konzervatíván fennmaradt C terminális epitópot tartalmaz (66,67).

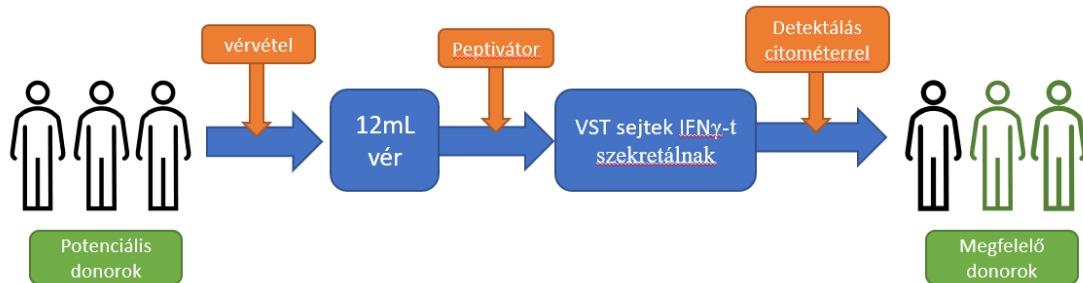
Az Epstein-Barr vírus esetében BZLF-1 et és EBNA-1 (Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen) peptivátorokat használunk. A BZLF-1 egy, a fertőzés litikus (lytic) ciklusára jellemző fehérje, és nagyobb arányban mutatnak a CD4+(helper) T sejtek választ ellene, mint az EBNA-1 ellen. Az EBNA-1 fehérje felismerése a T sejtek által viszont a fertőzés korai szakaszában lehet jelentős, és a fehérje döntően CD8+ T sejt választ vált ki (68,69).

A BK vírus elleni VSTek szelekciójánál 4 féle peptivátort alkalmaztunk. A VP1 és VP2 melyek kaszpid proteinek, és a litikus ciklus későbbi szakaszában jellemzőek. Az LT a nagyméretű T antigén fehérje, az ST a kisméretű T antigén fehérje peptivátora, melyek

a litikus szakasz korábbi részére jellemzőek. Főként a VP1, az LT és az ST peptivátort írták le jó stimulálóként (70).

3.4 A donorszűrés folyamata

A donorszűrés során a perifériás vörsejtek peptivátorral való ex vivo stimulálása történik, majd áramlási citometriás módszerrel megmérjük az INF- γ termelő CD4+ és CD8+ T sejtek arányát az adott populációban (6. ábra). A vizsgálat 5 éves időtartama alatt 916 donorszűrést végeztünk.



6. ábra A donorszűrés folyamatának áttekintése. A donorok vérére a peptivátorral stimulálva a szekretált interferon gamma alapján detektálhatjuk a VST sejteket.

3.4.1 A minta előkészítése

A mintaelőkészítés a Miltényi Biotec reagensait használva, a cég által fejlesztett protokoll alapján történt. 12 ml EDTA-val alvadésgátolt vér feldolgozása történt az áramlási citometriás laboratóriumban. Az első lépés a mononukleáris sejtek elválasztása, gradiens centrifugálással, ficoll segítségével. Ehhez a PBS-sel (Foszfáttal pufferolt sóoldat, Phosphate-buffered saline) kétszeresére hígított perifériás vért óvatosan a ficoll tetejére rétegezzük, melyhez 50mL-es falcon csöveket használtunk. 30 perc 400g-n történő centrifugálás után a mononukleáris sejtréteget óvatosan leválasztottuk, és az így nyers sejtuszpenziót PBS-sel kétszer mostuk.

A mononukleáris sejtek sejtszámának meghatározása egy Sysmex KX-21 rutindiagnosztikában használt vérkép automatával történik, az utolsó mosási lépés előtt, így beállítható a kívánt, 10^7 sejt/mL koncentráció a reszuszpendálás során.

A sejteket ezután a megfelelő tálcára (plate) pipettázzuk. A tálcán szárítottan található a peptivátor bevonat (coat), melynek mennyisége lyukanként 0.06 nmol (0,01 μg). A 10^7 sejt/ml koncentrációjú mintáinkból a gyártói utasítás szerint 100 μL szükséges a jelöléshez, így lyukanként 10^6 sejtet inkubálunk, és a peptid koncentráció 0,6 nmol/mL lesz. A kis térfogat miatt a sejtszám és a peptid koncentráció emelése növelné a cross-feeding kockázatát (71). A peptivátort tartalmazó lyuk mellett egy negatív kontrollként szolgáló, peptivátort nem tartalmazó lyukba is pipettázunk azonos mennyiségű és koncentrációjú a mintát. Ezt követően a sejteket inkubátorba helyezzük, és 37°C hőmérsékleten tartjuk két órán keresztül.

A következő lépésben a sejtekhez Brefeldin A-t adunk, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ koncentrációban. (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oldatból 10 μL). A Brefeldin-A a *Penicillium brefeldianum* gombából izolált lakton, mely meggátolja a béta-COP Golgit burkoló fehérjék kapcsolódását, ezáltal gyakorlatilag zárja a Golgi apparátust (72), így a peptivátor hatására termelődött citokinek a sejten belül maradnak, nem kerülnek szekretálásra.

Az újabb 4 óra inkubálási idő lejárta után a sejtek jelölése történik az áramlási cytometriás vizsgálathoz.

3.4.2 A flow cytometriás vizsgálat

A flow cytometriás mérést egy Becton-Dickinson CANTO II típusú, 10 csatornás készüléken végeztük. Ezt megelőzően a sejtek Miltenyi Biotec protokoll szerinti jelölése történt fluoreszcens festékekkel konjugált monoklonális antitestekkel, melyekkel a CD4^+ és CD8^+ T sejteket azonosítottuk és ezen belül az $\text{INF-}\gamma$ szekretáló vírus specifikus T sejtek arányát határoztuk meg.

A sejtfelszíni jelöléshez a Miltenyi Biotec *Rapid Cytokine Inspector (CD4/CD8 T Cell)* Kit-jét használtuk, mely a következő markereket tartalmazza: CD3, CD4, CD8, CD14, CD20. A klónokat és a fluoreszcens csatornákat a 2. táblázat mutatja.

2. táblázat A donorszűrés során használt antitestek. A táblázat az adott marker esetén használt fluoreszcens festéket, az antitest klónját és izotípusát tünteti fel.

Sejtfelszíni marker	fluoreszcens csatorna	klón	izotípus
CD3	VioBlue	BW264-56	egér-IgG2a
CD4	APC	VIT4	egér-IgG2a
CD8	FITC	BW135/80	egér-IgG2a
CD14	PerCP	TÜK4	egér-IgG2a
CD20	PerCP	LT20	egér-IgG1

A fenti markereknek a két T sejt populáció beazonosításában és a monocyta és B sejt populáció elkülönítésében van szerepe. A donorszűréshez alkalmazott markerek a következők (73):

- A **CD3**-at 5 különböző lánc alkotja (gamma, delta, epszilon, dzéta, éta). A T sejtekben a CD3 közvetíti az aktivációs szignált a T sejt antigén receptorról (TCR)(74). Az általunk használt antitest-klón az epszilon lánchoz kötődik. Az antigén kötődés után a TCR-CD3 komplex sejtfelszíni sűrűsége csökken (75), az áramlási citométerrel detektált jel erőssége alacsonyabb lesz ezeknél a sejteknél. Ennek a mérési file-ok analízisének, a kapuk beállításánál van komoly szerepe.
- A **CD4** egy 55kD molekulásúlyú glycoprotein, amely az immunoglobulinok superfamiliájába tartozik. A CD4 egy transzmembrán molekula, mely négy extracelluláris domémből áll. Azok a TCR alfa/béta receptorral rendelkező T sejtek expresszálják, a thymocyta állapottól kezdődően, melyekről hiányzik a CD8 receptor. A CD4+ T sejtek a **segítő (helper) T sejtek** (Th sejtek)
- A **CD8** 32-34kD közötti molekulásúlyú heterodimer láncok alkotta receptor. A T sejtek érése során a CD8 közvetlenül a CD4 expresszálódása után jelenik meg (76), a thymocyta stádiumban. A CD8+ T sejtek a **cytotoxikus T sejtek**. (CTL)
- A **CD14** egy 55kD molekulásúlyú glikozil-foszfatidilinozitol kapcsolt membrán glikoprotein, az LPS (bakteriális lipopoliszacharid)/LBP (lipopoliszacharid kötő

protein)komplex receptoraként funkcionál. A **monocyták** intenzíven expresszálják, míg a promonocytákon alacsonyabb az intenzitása.

- A **CD20** egy 33-37kD közti polipeptid receptor, mely direkt módon regulálja a transzmembrán Ca forgalmat, és a protein kináz C szubsztrátja, ezáltal fontos szerepe van a B sejt aktiváció regulációjában. A **B sejtek** a CD19 és a CD10 receptorokat követően expresszálják (77).

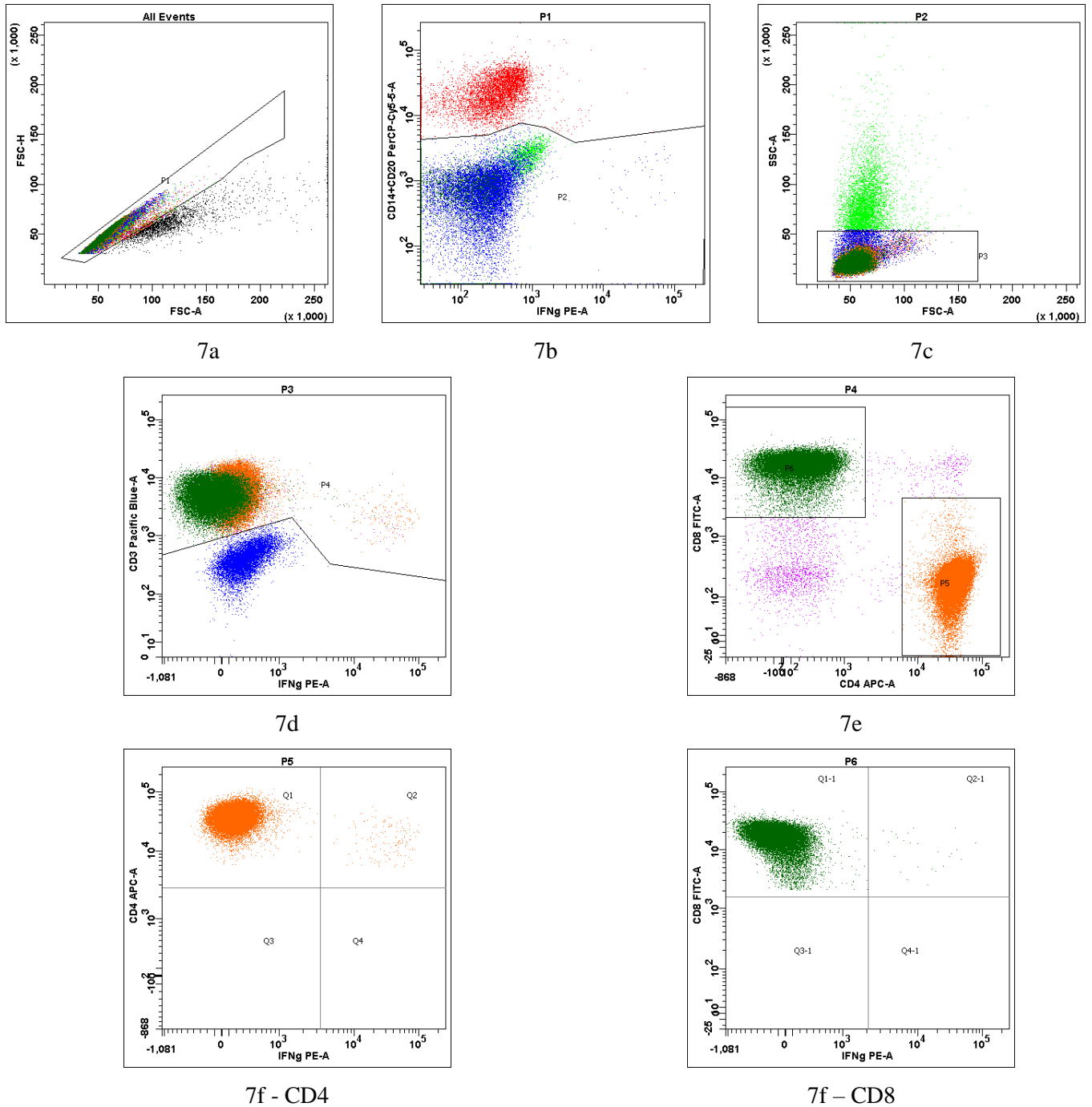
Az analízis célja annak meghatározása, hogy a T sejt szubpopulációkon belül a sejtek hány százaléka termel IFN- γ -t a virális stimulus hatására. A Brefeldin-A miatt a termelődött IFN- γ , ami normálisan szekretálódna, a sejtbe zárva, intracellulárisan marad, így klasszikus, sejtfelszíni jelöléssel nem láthatóak. Az IFN- γ – PE (phycoerythrin) antitestek kötődéséhez ezért a sejthártyát átjárhatóvá kell tenni.

A gyártó leírását követve a következő lépéseket végeztük el: sejtfelszíni markereket tartalmazó koktélból és az IFN- γ -PE antitestből 10-10 μ L mennyiséget 30 μ L pufferrel hígítunk létrehozva a jelölő koktélt. Ezt közvetlenül a lyukba pipetázva végezzük a jelölést, majd 10 perces, sötétben, szobahőn történő inkubálás után adjuk hozzá az InsideFix reagenst, ami lényegében 3,7%-os formaldehid oldat. Ez hivatott fixálni a sejtfelszíni markereket a következő, 20 perces, szobahőmérsékleten, sötétben történő inkubálás alatt. Ezt követően adjuk hozzá a rendszerhez a detergenst tartalmazó Inside Perm reagenst, mellyel 10 percig inkubálunk, sötétben, szobahőmérsékleten. Ez a reagens a sejthártyát átjárhatóvá teszi, permeabilizálja, lehetővé téve az IFN- γ elleni jelölt antitest citokinekhez kötődését. Végül a sejteket 12mm-es polisztirol kémcsőbe pipetázva, egy mosási lépés és reszuszpendálás után elvégeztük a mérést flow cytométeren. Ezeket a lépéseket a peptivátorral nem kezelt negatív kontroll sejtek esetében is végrehajtottuk.

A mérés során a mononukleáris sejtekből rögzített események száma átlagosan 248 000 volt. A maximálisan lemérhető események számát limitálta az hosszadalmas mintaelőkészítésnél, és a centrifugálási lépéseknél fellépő sejtvesztés.

Az analízis során követtük a gyártó által előírt kapuzási protokollt, a beállított kapuk sorrendje a következő volt (7. ábra):

1. Első lépésben a duplikátumok (összetapadt sejtek) kizárása történt, az előreszórt fény (FSC) paraméterek görbe alatti területének a görbe magasságával való összevetésével (*FSC-A vs FSC-H, 7a*)
2. A duplikátumok kizárásával nyert populáció tagjain a CD14 és CD20 negatív eseményekre állítottunk kaput, ezzel eltávolítva az analízis további részeiből a B-sejteket és a monocytákat (*CD14+CD20 vs IFN- γ , 7b*)
3. Az előző lépésben kapott populáció tagjait megjelenítve a lymphocytákra állítunk kaput, a fényszórási tulajdonságok alapján (oldalt szórt fény - *SSC-A vs FSC-A 7c*)
4. Ezután az előző kapu eseményeit alapul véve a CD3+ eseményekre, azaz a T sejtekre kapuzunk a CD3 és az IFN- γ markerek alapján. Itt fontos az IFN- γ szerepe, mivel több esetben az IFN- γ + sejtek CD3 expressziója csökkent intenzitást mutat, ez adja a kapu X tengely felé mutató alakját. (*CD3 vs IFN- γ , 7d*)
5. A T sejtek megjelenítése a CD4 és CD8 markerek szerint kijelöli a CD4+ helper, és CD8+ cytotoikus T sejteket. (*CD8 vs CD4, 7e*)
6. Az analízis utolsó lépéseként a CD4, illetve a CD8 populációkon belül kijelöljük a kettős pozitív, azaz a CD4 illetve CD8 markerre és az INF- γ markerre egyaránt jelölődő sejteket. (*CD8 vs IFN- γ ; CD4 vs IFN- γ , 7f*)



7. ábra A donorszűrésnél használt kapuzási stratégia. a - duplikátumok kizárása. b - B sejtek és monocyták kizárása. c – lymphocyták kapuzása. d – T sejtekre állított kapu. e – CD4 és CD8 pozitív T sejtek kapuzása. f - IFN- γ pozitív sejtek kapuzása

Az analízis végén a CD4+ helper T-sejt és a CD8+ cytotoxikus T-sejt populációkon belül adjuk meg az IFN- γ pozitív sejtek arányát (78), a kapott értéket a negatív kontroll esetében mért értékkel korrigálva.

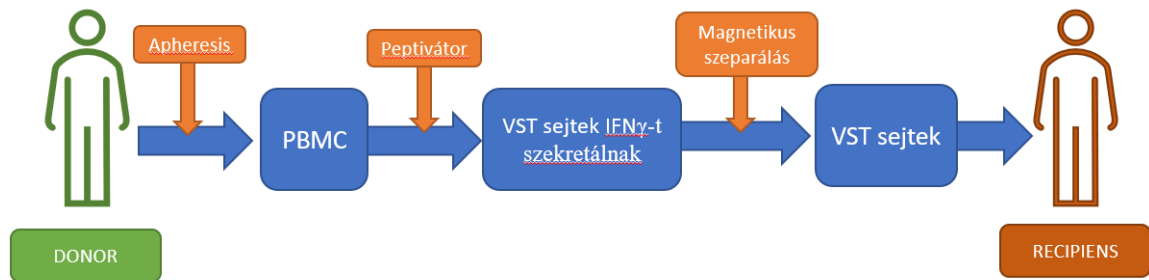
A donorjelöltet akkor tekintettük alkalmas donornak, ha a perifériás vérükben a lymphocyták száma elérte a 1000sejt/ μ L koncentrációt, és legalább az egyik T sejt alpopuláción populáción belül az IFN- γ termelő sejtek aránya elérte a 0,01%-ot (78). A donor kiválasztásnál figyelembe vettük a rokonsági fokot, az általános egészségi állapotot, és a perifériás vénák elérhetőségét. Egy esetben döntött úgy a kiválasztott donor, hogy visszavonja a donációra való jelentkezését.

42 donorjelölt esetében rendelkezésünkre álltak a szerológiai laboratórium által mért CMV és EBV ellenes antitest vizsgálat eredményei, mely lehetőséget teremtett a két módszer összevetésére.

3.5 A vírus-specifikus T sejtek szelekciója

3.5.1 CCS folyamat áttekintése

A vírus specifikus T sejtek azonosítása és szeparálása citokin termelésük alapján történik egy speciális eljárással, melynek során a szekretált citokint a sejtfelszínhez kötik, erre utal a „cytokine capture system (CCS)” elnevezés. A szelekció során az apheresissel legyűjtött sejt készítményben lévő T sejtek a peptidvázor hatására citokineket kezdenek termelni, mely sejteket így immunomagnetikus gyöngyökkel jelölhetünk, és elválaszthatjuk a többi sejtől, egy VST dús sejt tömeget létrehozva, mely a recipiensnek beadva segíti a vírusinfekció elleni küzdelmet (8. ábra).



8. ábra A VST szelekció áttekintése. A kiválasztott donor mononukleáris sejtjeinek legyűjtése után a peptivátor hatására azok IFN- γ -t szekretálnak, aminek segítségével a VST sejtek szeparálhatóak, és terápiás céllal felhasználhatóak.

3.5.2 A sejtek gyűjtése

A sejszelekciót perifériás mononukleáris sejtekből (PBMC) kiindulva kezdjük. A PBMC-t apheresissel nyerik a donorból. Ennek során a donorok vérének legyűjtik, a kívánt komponens visszatartásával a többit visszajuttatják a donor szervezetébe. Alkalmanként 1×10^9 fehérvérsejt (FVS) került gyűjtésre, folytonos mononukleáris sejtgyűjtés (Continuous Mononuclear Cell Collection - cMNC) programon, Terumo Specta Optia apheresis készülék segítségével.

3.5.3 A sejszelekcióhoz használt műszer

A műszer, melyet a VST szelekcióhoz használunk, a CliniMACS Prodigy nevet viseli.

Ez egy sejtkezelési platform, amely szolgál teljesen automatizált és zárt rendszerű rugalmas platform, mellyel lehetséges különböző sejtípusok mágneses szeparálása, expánziója, kezelése, változatos sejtkezelési protokollok szerint (79–81).

A műszer egyik integráns része a sejtkezelési egység. Ezzel lehetséges a sejtek mosása, de akár a tenyésztése is. Ezek a lépések egy egyszer használatos kamrában zajlanak, mely a csőrendszer részét képezi. A másik fontos integrált összetevő a mágneses elválasztási egység, mely gyakorlatilag bármilyen sejtípus elválasztását végre tudja hajtani.

A sejtfeldolgozási programok széles spektruma található meg a készülékre előre telepítve, így a vírus specifikus T sejtek szelekciója is, de hétköznapiabb sejtelőkészítési lépések is, mint a töményítés, vagy a grádiens centrifugálás. Lehetőség van ezen metodikák személyre szabására is. A metodikák változó hosszúságúak, a szükséges idő függ a jelölő anyagok – markerek – számától, az esetleges sejttenyésztési lépésektől, de lehetőség van bizonyos lépések késleltetésére is, ha ezt a folyamatok időzítése megkívánja. A különböző programok a műszeren található szelepek nyitásával és zárásával irányítják a folyadék útját, melyet egy perisztaltikus pumpa hajt. A mágneses szeparátor egység egy központi mágnesegységet tartalmaz, melybe illeszkedik a szeparáló oszlop, melyen keresztülhalad a folyadék. A mágneses egység egy mozgatható állandó mágneset foglal magába, melyet előre-hátra pozícionálva tudja ki és bekapcsolni a mágneses teret az oszlop körül, így irányítva a mágneses nanogyöngyökkel jelölt sejtek visszatartását illetve átengedését.

A rendszer egyszerhasználatos, cserélhető, zárt rendszerű egységekkel működik. Ennek a részei a csővezetékek, a feldolgozandó sejteket tartalmazó zsákok, és a célfrakciók zsákjai, de ugyanilyen egyszerhasználatos egység a centrifuga-kamra, az oszlopok, és a hőmérséklet szabályozó egység is. A rendszer sterilitásának megőrzése érdekében a csatlakozásokat steril módon lehet összeforrasztani, illetve van lehetőség kis mintavevő zsákok használatára is, melyek könnyedén leforraszthatók, így nem kell megbolygatni a nagy egységeket.

A műszer legelterjedtebb felhasználását a különböző dúsítási és depletálási folyamatok jelentik. Az immunomagnetikus szeparálás segítségével gyakorlatilag bármilyen sejtet - akár több sejtvonalat is egyszerre- elválaszthatunk a többitől. A rendszer képes ezekkel a szeparált sejtekkel további folyamatokat végezni (pl CAR-T sejtek generálása).

A kiindulási anyagok lehetnek leukaferézis produktumok, csontvelő, vagy olvasztott sejt készítmények is.

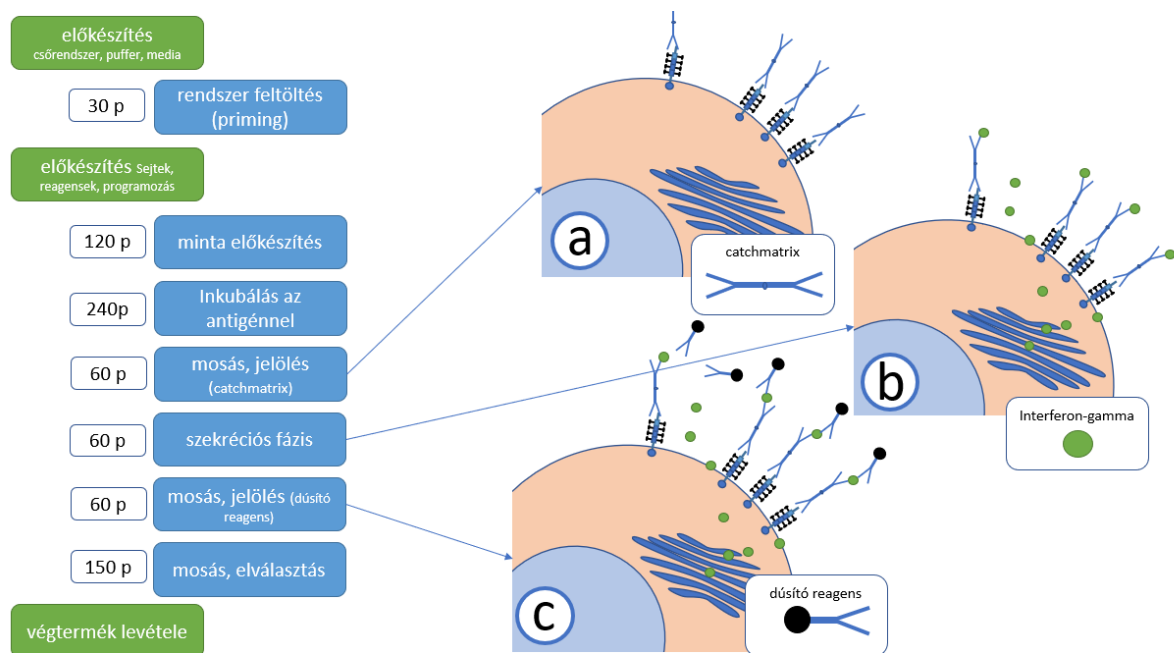
3.5.4 A nagyléptékű (large scale) vírus-specifikus T sejt szelekció

CCS-hez használt reagensek:

- catchmatrix reagens: monoklonális rágszáló anti-IFN- γ antitest, monoklonális rágszáló anti-CD45 antitesttel konjugálva, Poloxamerrel stabilizált PBS/EDTA pufferben
- dúsító reagens: dextrans-vas oxid gyönggyel konjugált rágszáló monoklonális anti- IFN- γ antitest, Poloxamerrel stabilizált PBS/EDTA pufferben

3.5.5. A nagyléptékű szelekció folyamata

A leukoferezis produktum sejtszáma minden esetben 10^9 fehérvérsejt értékre kerül beállításra. Ez a folyamat léptékének felső határa, a standardizált sejtszám egyszersmind lehetővé teszi a különböző szelekciók összehasonlítását. A CliniMACS Prodigy rendszer az előkészítési folyamatok után emberi beavatkozás nélkül futtatja le a programot, melynek lépéseit a 9. ábra szemlélteti. A teljes folyamat hozzávetőlegesen 12 órát vesz igénybe, ezalatt az operátornak nem kell beavatkozni a folyamatba.



9. ábra A Cytokine Capture rendszer működése. A konjugált antitest páros a CD45 receptorhoz kötődve a szabad oldalával képes „elkapni” a termelődött IFN- γ -t, majd ehhez a citokinhez kötődik a mágneses gyöngy (dúsító reagens) melynek segítségével végbemehet a szeparálás.

Három fontos lépést kell kiemelni:

- jelölés a catchmatrixszal: a catchmatrix egy konjugált antitest-páros. Az egyik oldala a CD45 receptorhoz, tehát gyakorlatilag minden fehérvérsejthez kötődik, míg a másik oldala a termelődött citokineket (IFN- γ) köti meg. (9/a ábra)
- A szekréción fázis: míg donorszűrés során a termelődött IFN- γ a Brefeldin-A hatására a sejtbe zárva maradt, itt szabadon szekretálódik, és a sejt felszínre kötött catchmatrixhoz kötődik. (9/b ábra)
- A következő jelölési lépés során a mágneses gyöngyökkel jelölt antitestek az IFN- γ -hoz kötődnek, így lehetővé téve azok elválasztását. (9/c ábra)

3.5.6 A végfrakciók flow cytometriás vizsgálata

A végtermékek előállítása után három frakcióból történik flow cytometriás vizsgálat. Ezek a QC, a pozitív és a negatív frakciók. Mindegyik frakcióból ugyanazok a vizsgálatok kerülnek elvégzésre.

QC frakció:

Ahogy a neve is utal rá, a minőség-ellenőrzés (quality control) miatt fontos ennek a frakciónak a mérése. Közvetlenül az immunomagnetikusan szeparálás előtt a rendszer felajánlja a mintavétel lehetőségét a már inkubált, jelölt sejt készítményből. Ennek a mérése a szelekció hatékonyságának megítélésében fontos.

Target frakció:

Ez a frakció, melyben feldúsítva találjuk a VST sejteket. Mind a mennyisége, mind a fehérvérsejt koncentrációja nagyon alacsony. Ez a frakció kerül beadásra.

Non Target frakció:

A jelöletlen sejtek frakciója, gyakorlatilag ide kerül minden olyan sejt, mely nem kötődött a mágneses oszlophoz, tehát nem szekretált IFN- γ -t.

Ezt követően a fenti frakciókban két különböző eljárással vizsgáljuk a sejtek mennyiségét és összetételét. Az egyik a lymphocyta szubpopulációk arányának és abszolút számának meghatározására szolgál, a Becton-Dickinson által forgalmazott „TruCount” cső használatával. Ennek a lényege, hogy az analízishez használt csőben található egy polisztirol gyöngy, mely folyadék hatására a gyártó által definiált mennyiségű apró gyöngyre esik szét. Pontos mintamennyiséget pipetázva a csőbe, a lemért eseményszám és a lemért gyöngyök száma alapján kiszámolható a sejtek pontos koncentrációja, a következő képlet segítségével:

$$\text{sejtkoncentráció} = \frac{\text{sejtek száma a vizsgálandó populációban}}{\text{mért gyöngyök száma}} \times \frac{\text{gyöngyök száma a csőben}}{\text{a minta térfogata}}$$

A gyöngyös metodika használatát az indokolja, hogy a legfontosabb frakció, a target frakció sejtszáma esetenként olyan alacsony, hogy a laboratóriumban található vérképzőautomata már nem tud megbízható eredményt adni a sejtkoncentráció tekintetében.

A másik eljárással – a donorkivizsgáláshoz hasonlóan – az IFN- γ termelő sejtek arányát határozzuk meg a T sejt alpopulációkban.

Ebben az esetben a termelődött, jelölendő citokinek nem a sejt belsejében vannak, hanem a catchmatrix „feltartja” azokat a sejt felszínén. Ennek köszönhetően nincs szükség az intracelluláris jelölésre. A felhasznált markerek eltérnek a donorszűrészkor használtaktól, részletezésük a 3. táblázatban látható.

3. táblázat A végfrakciók flowcytometriás vizsgálatához használt antitestek. A táblázat az adott marker esetén használt fluoreszcens festéket, az antitest klónját és izotípusát tünteti fel.

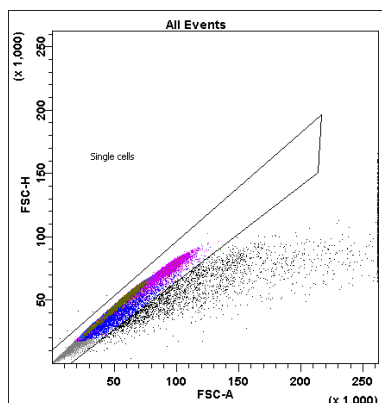
Sejtfelszíni marker	fluoreszcens csatorna	klón	izotípus
CD3	FITC	BW264-56	egér-IgG2a
CD4	APC	VIT4	egér-IgG2a
CD8	APC Vio770	BW135/80	egér-IgG2a
CD14	VioGreen	TÜK4	egér-IgG2a
CD20	VioGreen	LT20	egér-IgG1
CD45	VioBlue	5B1	egér-IgG2a
IFN-γ	PE	45-15	egér-IgG1

A fenti markerekből a protokoll szerinti mennyiséggel egy jelölőkocktelt készítünk (10 μ L/frakció). A jelölőkocktélhoz 10 μ L 7-Aminoactinomycin D-t (7-AAD) adunk, ami egy DNS-hez kötődő fluoreszcens festék. A holt/apoptotikus sejtek membránja átjárhatóvá válik, így a 7AAD szabadon bejut, megfestve az örökítő anyagot, ezáltal láthatóvá téve ezeket a sejteket. A felhasznált markerek a donorszűréshez hasonlóan lehetővé teszik a monocyták és B sejtek kipapuzását ill. a CD4+/CD8+ T sejt populációban az IFN- γ termelő sejtek arányának meghatározását. A donorszűréshez képest többletet jelent, hogy az apoptotikus és elpusztult sejtek jelölésével ezek zavaró hatásától megszabadulunk, hiszen a 12 órás szelektálási folyamat során sejtpusztulással is számolni kell.

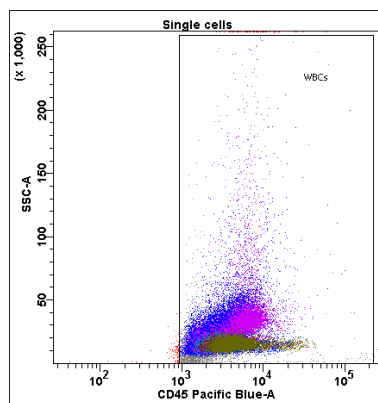
Az analízis során követtük a gyártó által előírt protokollt, a beállított kapuk sorrendje a következő volt (10. ábra):

1. Első lépésben a duplikátumok kizárása történt, az előreszórt fény paraméterek görbe alatti területének a görbe magasságával való összevetésével (*FSC-A vs FSC-H, 10a*)
2. Második lépésben a CD45+ eseményekre állítottunk kaput, ami a fehérvérsejtek markere (*CD45 vs SSC, 10b*)

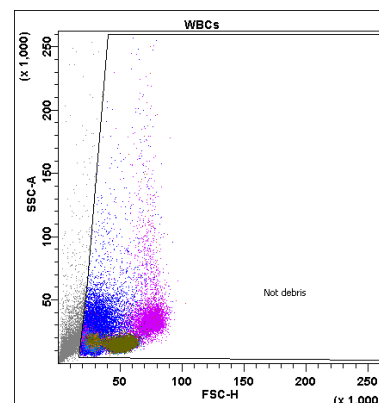
3. Az előző lépésben kapott populáció tagjait megjelenítve a törmelékek kizárására állítunk kaput, a fényszórási tulajdonságok alapján (*SSC-A vs FSC-A, 10c*)
4. A következő lépésben a halott, illetve apoptotikus sejtek kizárásával álltunk kaput a 7-AAD negatív eseményekre (*7-AAD vs SSC-A, 10d*)
5. Ezután az élő fehérvérsejteket alapul véve a CD3+ eseményekre, azaz a T sejtekre állítunk kaput, a CD3 és az IFN- γ markerek alapján. Itt is fontos az IFN- γ szerepe, mivel több esetben az IFN- γ + sejtek CD3 expressziója csökkent intenzitást mutat, ez adja a kapu X tengely felé mutató alakját. (*CD3 vs IFN- γ , 10e*)
6. A CD3+ populáció tagjain a CD14 és CD20 negatív eseményekre állítottunk kaput, ezzel eltávolítva az analízis további részeiből a B-sejteket és a monocytákat (*CD14+CD20 vs FSC, 10f*)
7. A T sejtek megjelenítése a CD4 és CD8 markerek szerint kijelöli a CD4+ helper, és CD8+ cytotoikus T sejteket. (*CD8 vs CD4, 10g*)
8. Az analízis utolsó lépéseként a CD4, illetve a CD8 populációkon belül kijelöljük a kettős pozitív, azaz a CD4 illetve CD8 markerre és az IFN- γ markerre egyaránt jelölődő sejteket. (*CD8 vs IFN- γ ; CD4 vs IFN- γ , 10h*)



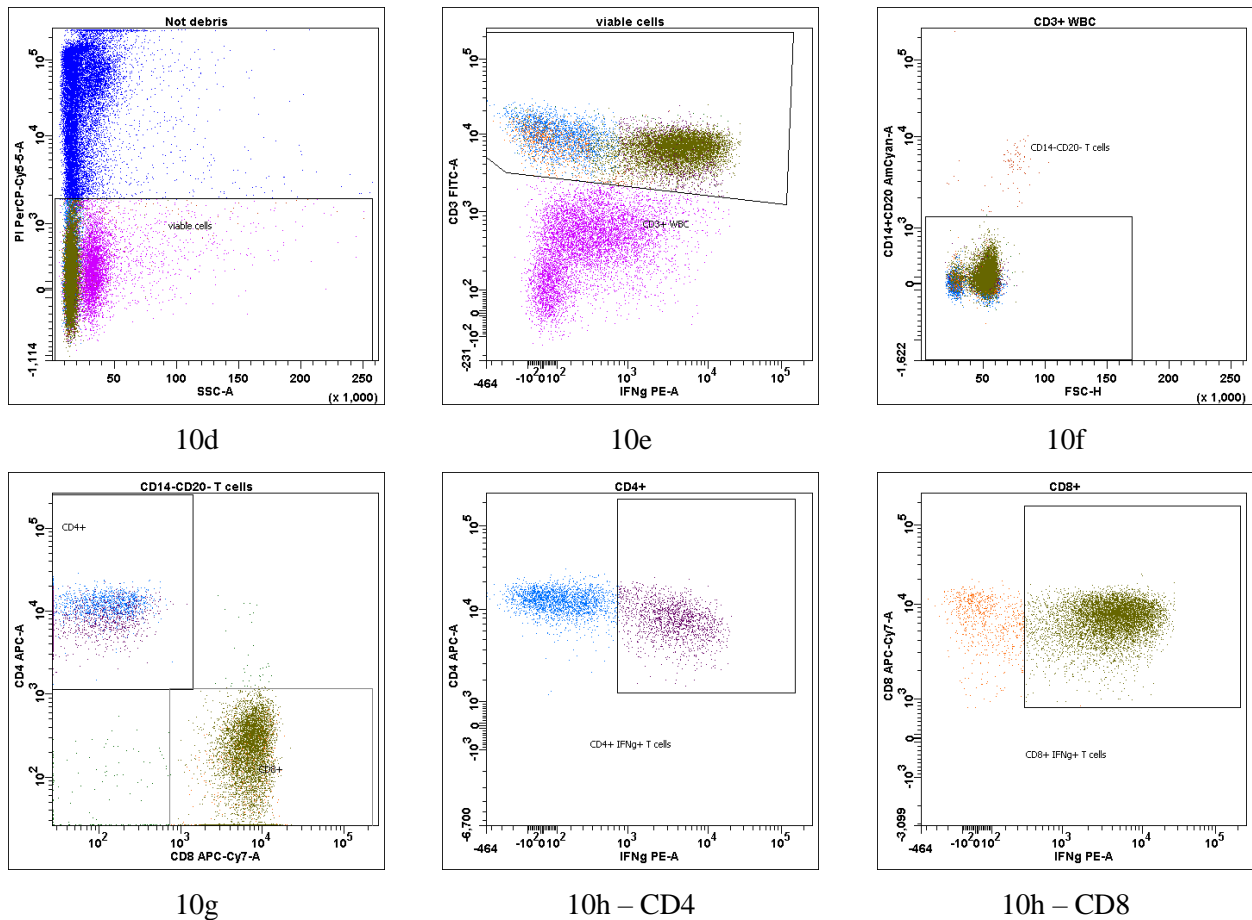
10a



10b



10c



10. ábra A szelektációs termékek flow-cytometriás analízise. a - duplikátumok kizárása. b – CD45+ fehérvérsejtek kapuzása. c – törmelék kizárása. d – holt sejtek kizárása. e - T sejtekre állított kapu. f – B sejtek és monocyták kizárása. g – CD4 és CD8 pozitív T sejtek kapuzása. h - IFN- γ pozitív sejtek kapuzása

Az analízis végén a CD4+ helper T-sejt és a CD8+ cytotoxikus T-sejt populációkon belül határozzuk meg az IFN- γ pozitív sejtek arányát, ez adja meg a készítmény tisztaságát (purity) (78). Ez az egyik legfontosabb mérőszám. Azok a T sejtek, melyek nem termelnek IFN- γ -t, potenciálisan GvHD-t okozhatnak (alloreaktív T sejtek).

3.6 Statisztikai analízis

A statisztikai analízishez a Microsoft Excel (kiegészítve a Analysis ToolPak bővítménnyel), valamint az IBM SPSS statistics 25 szoftvereket használtuk. A

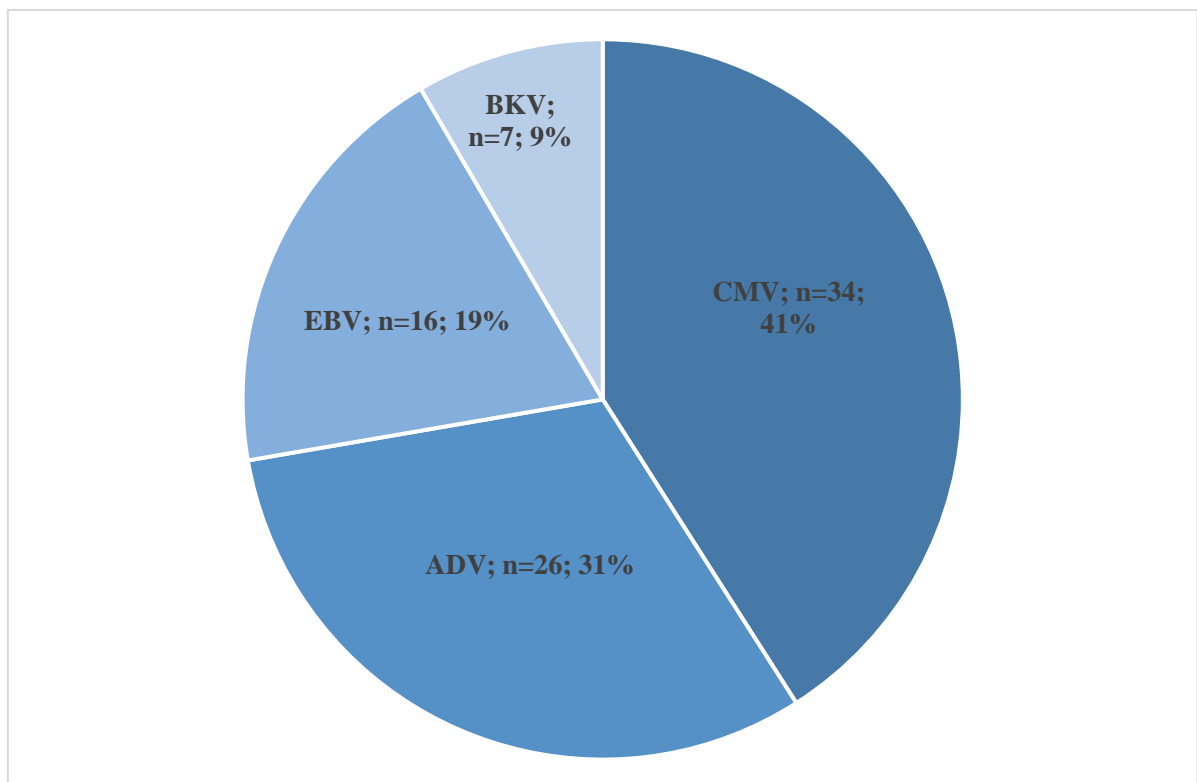
korrelációk vizsgálatához Spearman-féle rangkorrelációs analízist használtunk, melynek előnye a Pearson féle korrelációvizsgálathoz képest, hogy a kieső adatok nem zavarják, és nem csak lineáris kapcsolatot tud leírni (82). Az adatoknál a normáleloszlás vizsgálatához Shapiro-Wilk tesztet használtunk.

4. Eredmények

4.1 A páciensekkel és az indikációkkal kapcsolatos eredmények

A 2015 elejétől 2019 végéig tartó időszakban 74 esetben végeztünk sikeres VST szelekciós eljárást, 63 páciens részére (36 férfi, 27 nő). 4 esetben a készítmény technikai okok (műszermeghibásodás) miatt nem volt alkalmas a beadásra.

34 esetben volt szükség CMV specifikus T sejtekre, 26 esetben ADV, 16 esetben EBV és 7 esetben BK vírus elleni T sejtekre. Ez a felsorolás magában foglalja azt a 9 esetet, amikor párhuzamosan két vírusra specifikus peptidátorral kellett stimulálni a sejteket, multi-vírus specifikus T sejtek generálásához. Ezen belül CMV és ADV elleni VST-ekre 4 esetben volt szükség, CMV és EBV elleni szimultán kezelésre pedig 5 esetben (11.ábra).



11. ábra A különböző vírusok elleni T sejt terápiák megoszlása, 2015 elejétől 2019 végéig tartó időszakban.

4.2 Donorszűréssel kapcsolatos eredmények

A 2015-2019-ig terjedő időszakban összesen 636 önkéntes donor jelölnél végeztünk 916 vizsgálatot. Ahogy a számok is sugallják, több esetben előfordult, hogy egy donornak párhuzamosan több vírus, vagy több epitóp elleni T-sejt vizsgálatot végeztünk. A 916 donorszűrés vírusonkénti megoszlása az alábbi volt: 290 vizsgálat történt CMV elleni VST kimutatásra, 212 tesztet végeztünk ADV elleni VST detektálására. EBV specifikus T sejt meghatározásra 152 esetben, míg BKV elleni VST mérésre 262 esetben került sor.

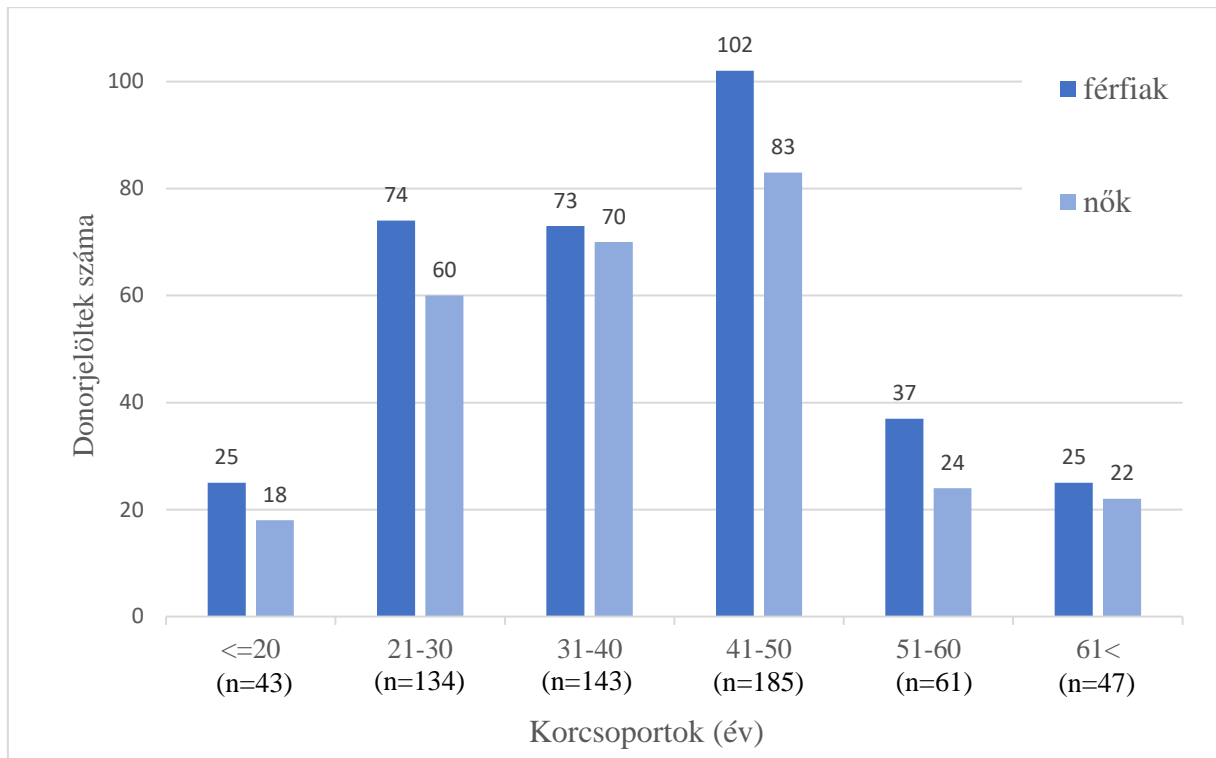
A donorszűrésekhez használt rigid protokoll nem adott lehetőséget arra, hogy a mért eseményszámot az áramlási citometriás mérések esetében megkívánt mértékben növeljük, az elvárt érzékenységgel összhangban. A gyártó által adott kit csak a donor alkalmasságát hivatott megítélni, nem annak milyenségét. A mért eredmény lényege, hogy tartalmaz-e cut-off értéket meghaladó mennyiségben VST-t az adott minta, ill. hogy az egyes mérési sorozatokban hogy viszonyulnak egymáshoz a szűrt egyének eredményei, és melyik donorjelölt vérében mutatható ki a legtöbb vírus specifikus T sejt. Az érzékenység fokozására megfelelő módszer lenne kétszeres mennyiségű sejt egyidejű stimulálása ugyanattól a donortól, de ezzel a költségek is duplázódnának, ami nem megengedhető, tekintettel arra, hogy a feltett kérdésre a vizsgálat így is megadja a választ.

4.2.1. A donor jelöltek (potenciális donorok) neme és életkora

A potenciális donorok többsége, 351 fő volt férfi, és 285 nő. Az életkor a szűrt donorok 96%-ánál volt ismert. Ez alapján számítva, az átlag életkor 39,27 év a férfiaknál (12-71), 39,08 év a nőknél (16-69).

A potenciális donorokat akik esetében ismert volt az életkor (n=613), hat korcsoportra osztottuk: 20 évnél fiatalabb, 21 és 60 év között tíz évente egy-egy csoport, és a hatodik a 61 év fölöttiek. A donorok legjelentősebb hányada (30%-a) a 41-50 éves korcsoportból került ki (összesen 185 fő), őket követték a 31-40 év közöttiek (143 fő), majd a 21-30 közöttiek (134 fő) majd az 51-60 közöttiek (61 fő). A legidősebb korosztály

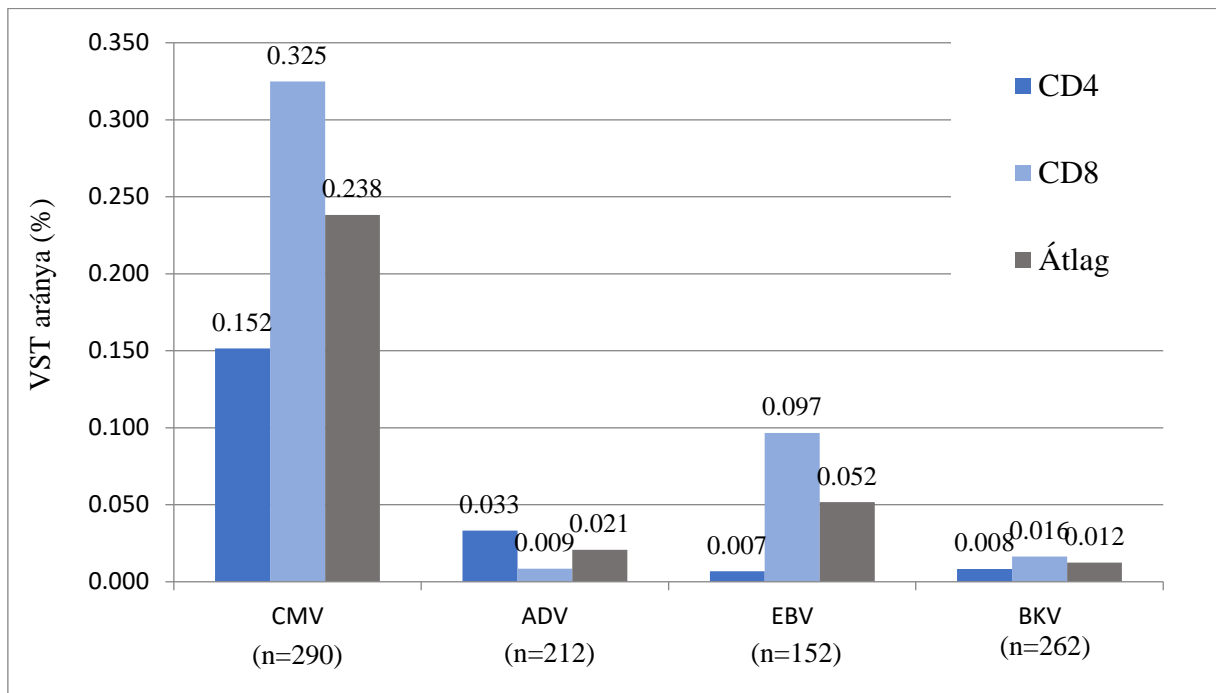
tagjait (47 fő), a legfiatalabbak követték (43 fő) (12. ábra). Összesítve elmondható, hogy a szűrt donorok 75%-a 20-50 közötti korosztályból került ki.



12. ábra A donornak jelentkezett, és szűrésen átesett személyek eloszlása, nem és életkor szerint csoportosítva

4.2.2 A donorjelöltekben mért keringő VST arány és az alkalmas donorok aránya

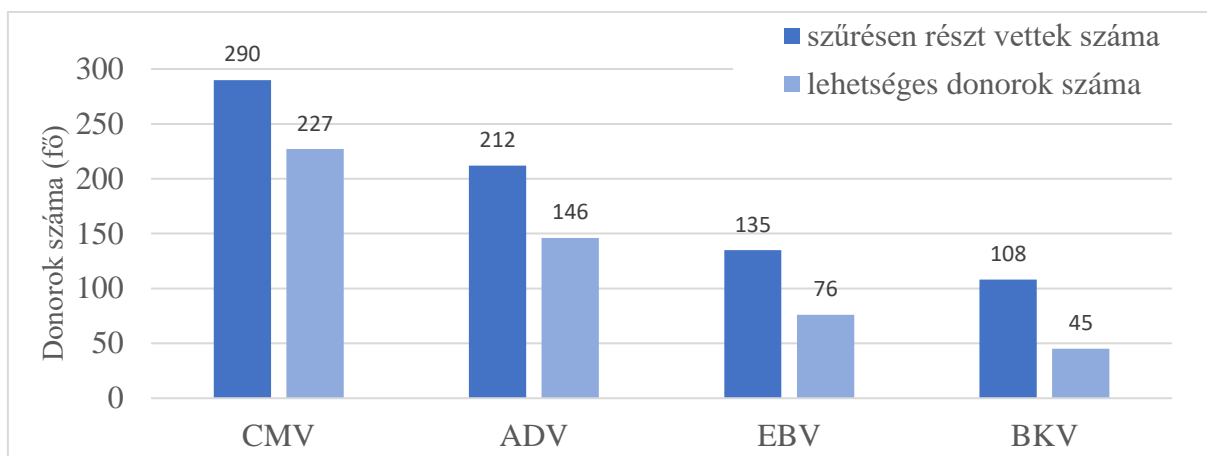
A potenciális donorok körében, minden vírust és minden T sejt szubpopulációt átlagolva a VST arányt 0,081%-nak kapjuk. Ez a különböző vírusok esetében a következő: A legmagasabb arányban a CMV specifikus T sejteket találtuk a potenciális donorok vérében, 0,325%-ban a CD8+ és 0,152%-ban a CD4+ T sejtek esetében. Az EBV specifikus sejteknél is a CD8+ T sejtek dominanciája figyelhető meg, 0,097%, míg a CD4+ sejtek lényegesen alacsonyabb, 0,007%-os arányban tartalmaznak VST-eket. Az ADV specifikus sejteknél megfordult a trend, a CD4+ T sejtek körében 0,033% a specifikus sejtek aránya, míg a CD8+ sejtek 0,009%-a mutatott pozitívítást. A sort a BKV specifikus sejtek zárják, itt ismét a CD8+ sejtek dominálnak, 0,016%-kal, és 0,008% a CD4+ VST -ek aránya a helper T sejtek körében (13. ábra).



13. ábra A donorszűrések eredményeként talált VST sejtek aránya a T sejt populációkban, vírusonkénti bontásban.

Az eredmények ismeretében megvizsgáltuk azt is, hogy a szűrt donorjelöltek közül hányan alkalmasak donornak, azaz hány potenciális donornak van legalább az egyik T sejt populációban 0,01% fölötti VST értéke. Mindent egybevetve, a 636 szűrésen részt vett donorjelöltből 428 fő volt alkalmas donor, legalább az egyik vizsgált vírus, CD4 és/vagy CD8 sejtek tekintetében. Ez a résztvevők 70%-a.

290 főnél végeztünk vizsgálatot CMV specifikus T sejtekre, ebből 227 fő bizonyult alkalmas donornak (78,3%). Adenovírus elleni szűrésen 212 főt vizsgáltunk, és 146 fő lehetett volna alkalmas donornak (68,9%). EBV elleni T sejt vizsgálatra 135 fő jelentkezett, közülük 76 donornak volt a terápiához elégséges sejtje (56,3%). A BKV szűréshez 108 fő jelentkezett, az alkalmas donorok száma ebben az esetben 45 volt (41,7%) (14. ábra).



14. ábra A donorszűrésen részt vett donorjelöltek és az alkalmas donorok száma a keringő VST arány alapján. A donorjelöltet akkor tekintettük alkalmasnak, ha a CD4 vagy CD8 T sejt frakción belül a VST sejtek aránya elérte a 0,01%-ot.

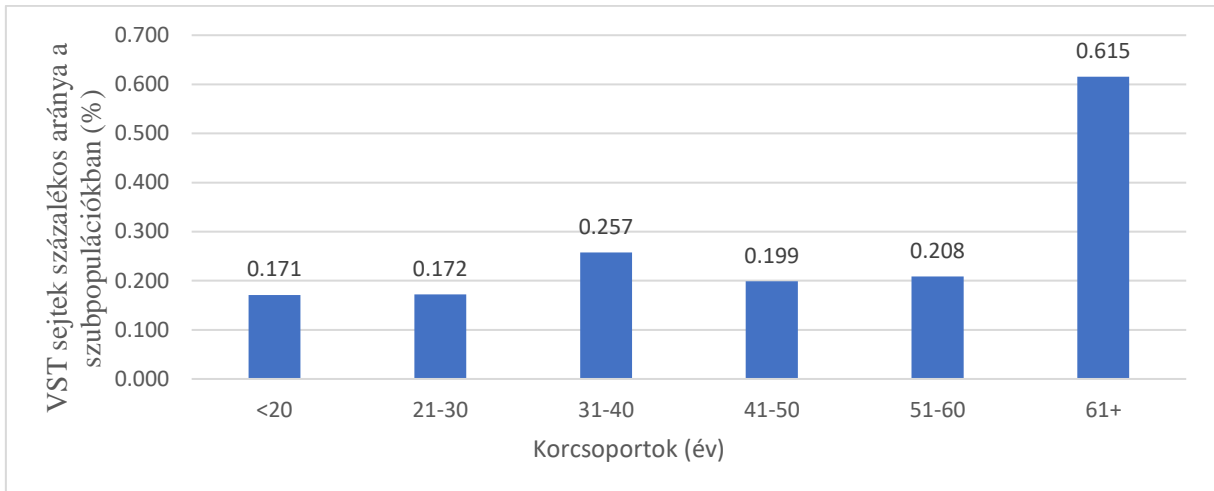
4.2.3 A keringő VST arány és az alkalmas donorok aránya korcsoportonként

Mind a négy vírus esetében külön- külön is megvizsgáltuk, hogy a különböző korcsoportok esetében milyen a VST-ek átlagos százalékos aránya a T sejt szubpopulációkban, illetve azt, hogy a 0,01%-os határértéket alapul véve, a különböző vírusok elleni kezeléshez a donorok hány százaléka lenne alkalmas donornak.

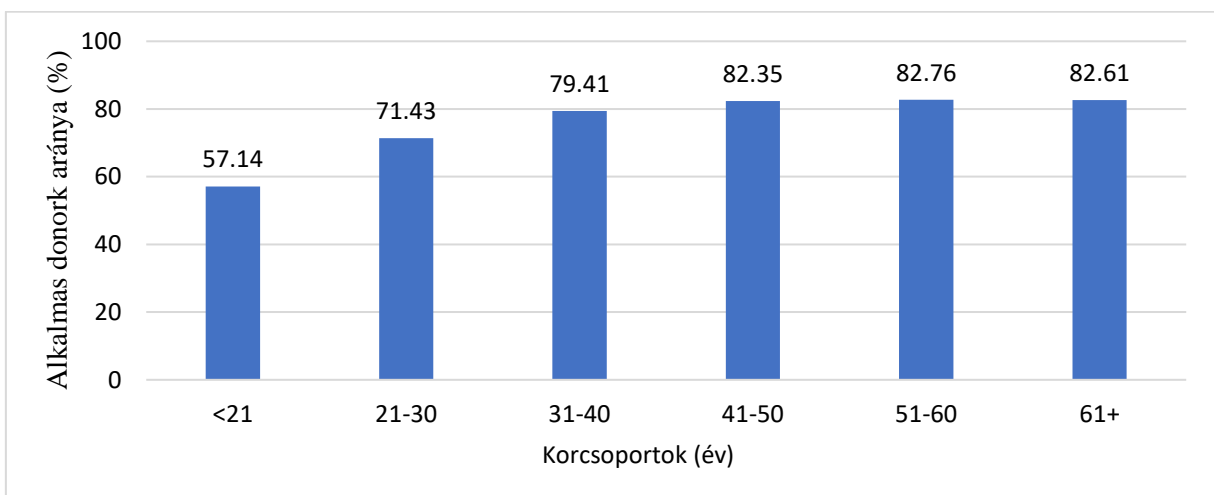
4.2.3.1 CMV specifikus donorvizsgálatok

A 15. ábrán mutatjuk be, hogy a különböző korcsoportok esetében milyen mértékű volt az átlagos VST arány a donorjelöltek perifériás mintájában. a 31-40 közötti korcsoport kiugró, 0,257%-os értéke mellett emelkedő trendet mutatnak a méréseink. A 61 év fölöttiek esetében látványosan magasabb a VT sejtek aránya, mint a fiatalabb korosztály esetén, 0,615%.

A potenciális donorok százalékos aránya minden korcsoportban magas, és emelkedő tendenciát mutat a kor előrehaladtával. Legalacsonyabb arányban, 57,14%-ban a 21 év alattiak között találhatunk donorokat, míg ez az arány az 51 és 60 év közöttieknél volt a legmagasabb, 82,76%, a 61 év fölötti korosztály minimálisan maradt el mögöttük, ahol ez az arány 82,61% volt. (16. ábra).



15. ábra A CMV specifikus VST sejtek átlagos aránya a T sejt szubpopulációkban, korcsoporti bontásban



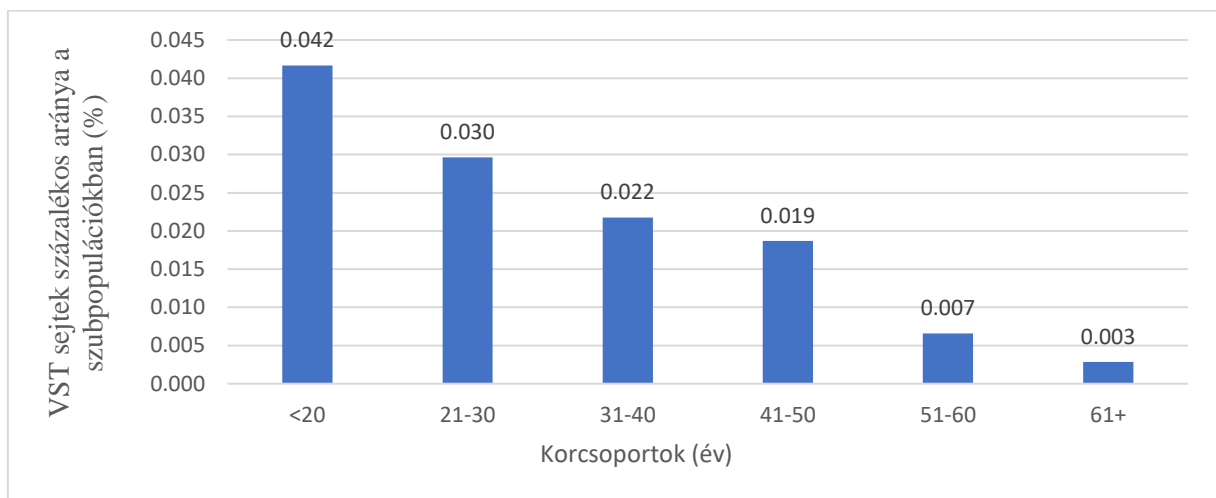
16. ábra A CMV specifikus VST terápiához alkalmas donorok aránya a donorjelöltek között, korcsoporti bontásban

4.2.3.2 ADV specifikus donorvizsgálatok

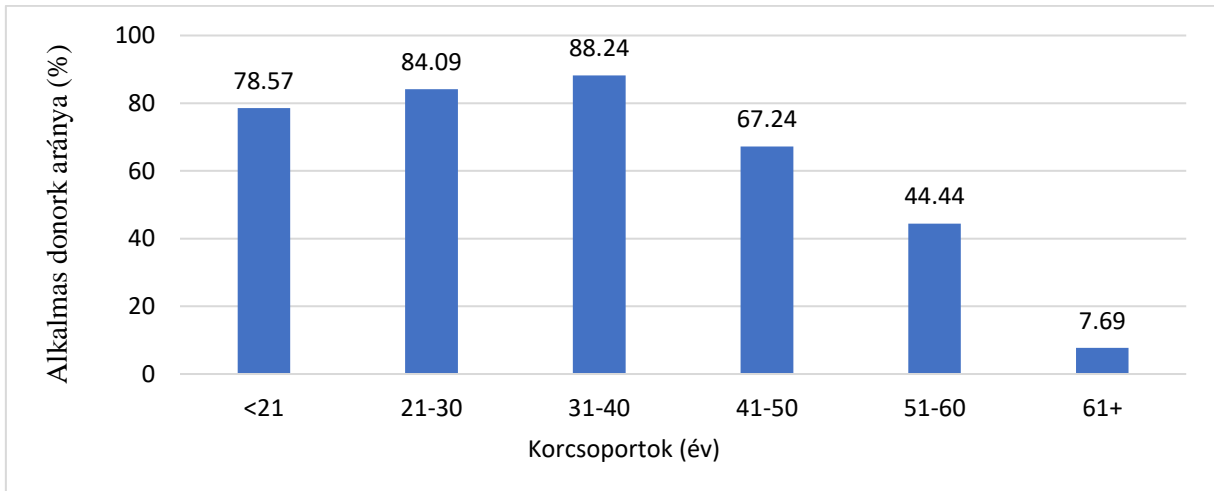
Az Adenovírus esetében a CMV-vel éppen ellentétes trendet figyelhetünk meg: a legfiatalabb korcsoportban volt a legmagasabb a VST-ek aránya a T sejt alosztályokban. Az átlagos VST arány a 20 év alatti korcsoportban volt a legmagasabb, 0,042%, a 21-30, 31-40 és 41-50 éves korcsoportokban kis különbséget tapasztaltunk míg az 51-60 és 60 év feletti korcsoportokban az átlagos VST arány nem érte el a donációhoz szükséges

0,01%-os határértéket. A legalacsonyabb átlagos VST arány 0,003% volt a 61 év feletti korcsoportban (17. ábra).

Az alkalmas donorok arányáról elmondható, hogy az első négy korcsoportban a vizsgálaton résztvettek döntő többsége (66,24-87,24%) alkalmas donornak, ez a legmagasabb arányban a 31-40 éves korcsoport tagjaira érvényes. Efölött azonban egyértelműen csökkenő trendet látunk, a 61 év fölöttieknek csak a 7,69%-a lenne alkalmas a donációra (18. ábra).



17. ábra Az ADV specifikus VST sejtek átlagos aránya a T sejt szubpopulációkban, korcsoporti bontásban

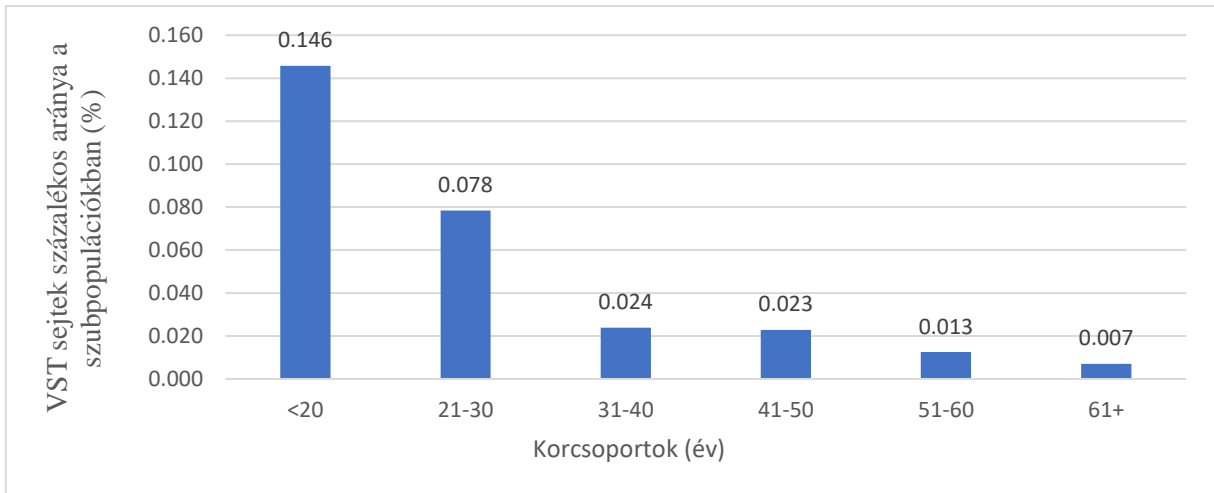


18. ábra Az ADV specifikus VST terápiához alkalmas donorok aránya a donorjelöltek között, korcsoporti bontásban

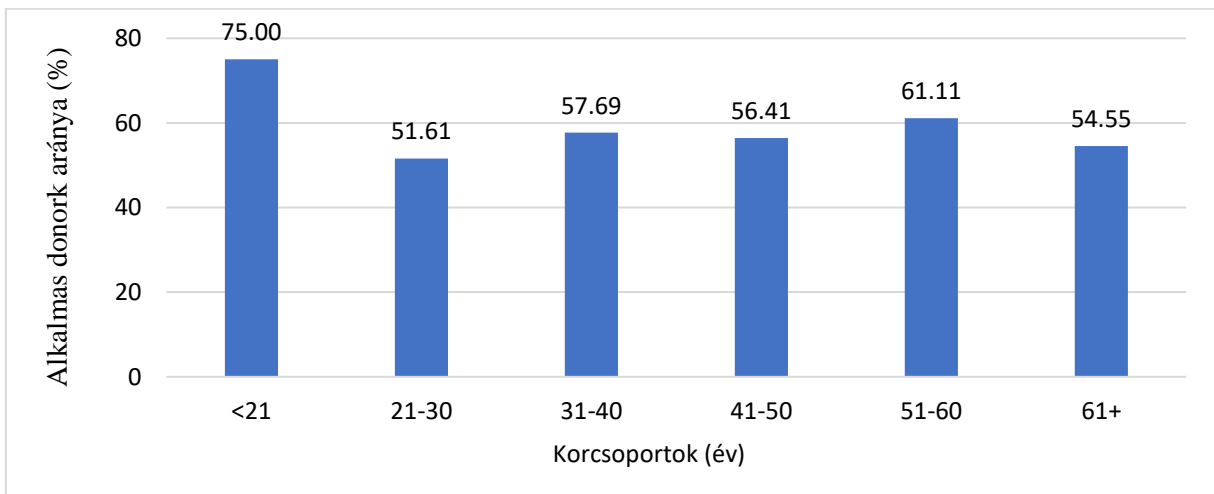
4.2.3.3 EBV specifikus donorvizsgálatok

Ennél a vírusnál hasonló trendet láthatunk, mint az ADV esetében, itt is a fiatalabb korcsoportokban mértük a legnagyobb VST arányt a T sejt alosztályokban, de magasabb százalékos értékekkel. A 20 év alattiak körében 0,146% a VST arány, ami majdnem a felére csökken a 21-30 évesek korcsoportjában, és további csökkenést mutat, egészen 0,007%-ig a 61 év fölöttiek esetében (19. ábra).

Az alkalmas donorok százalékos arányában nem látszik egyértelműen a csökkenő trend, de a legmagasabb arányban a 21 év alattiak között találhatunk megfelelő donort, a jelöltek 75%-ának a mintájában detektáltunk legalább 0,01% VST sejtet a T sejt alosztályok legalább egyikében. A többi korosztálynál ez 51,61% és 61,11% között változik (20. ábra).



19. ábra Az EBV specifikus VST sejtek átlagos aránya a T sejt szubpopulációkban, korcsoporti bontásban

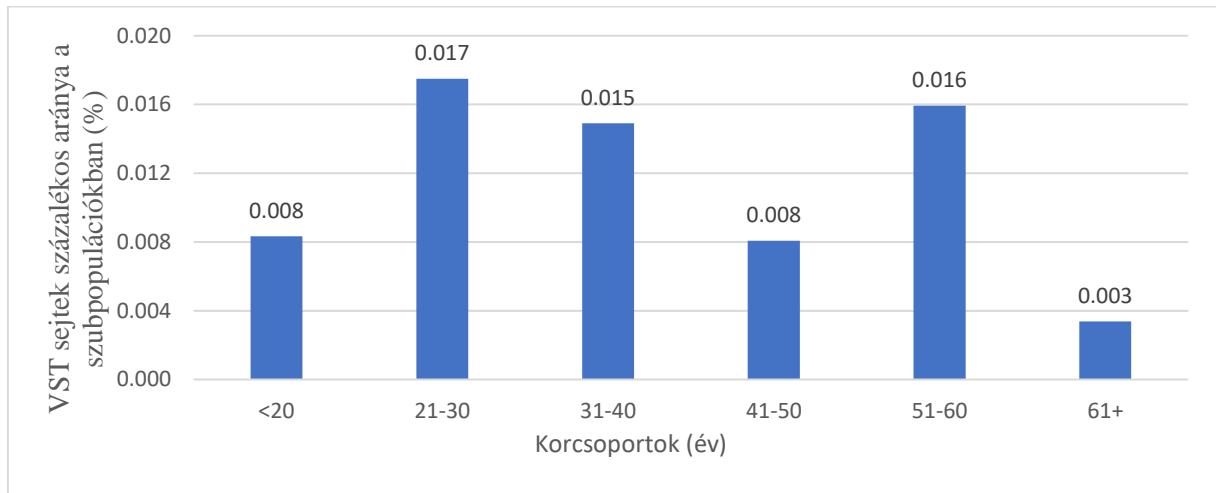


20. ábra Az EBV specifikus VST terápiához alkalmas donorok aránya a donorjelöltek között, korcsoporti bontásban

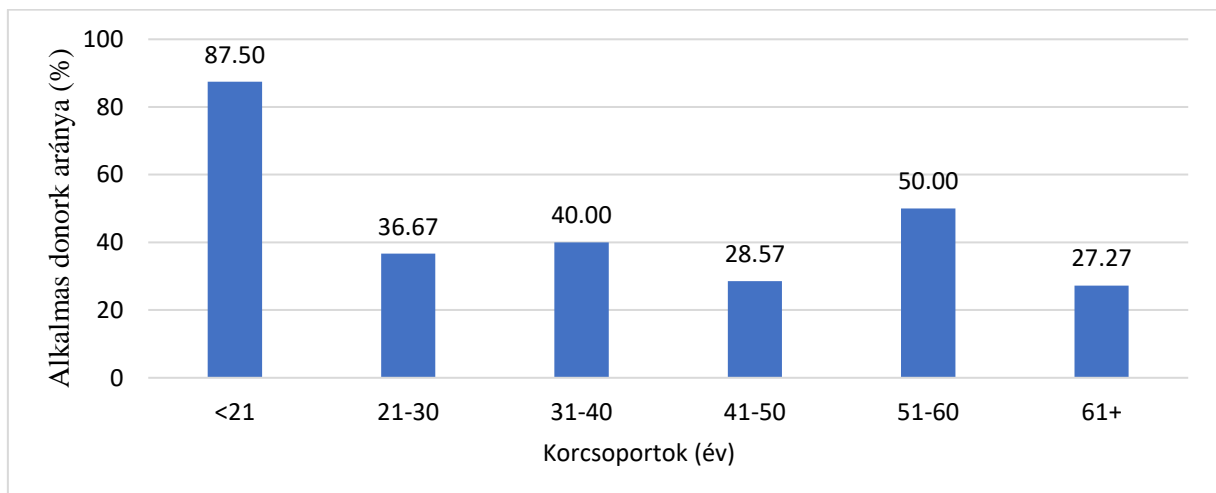
4.2.3.4 BKV specifikus donorvizsgálatok

BKV esetében kaptuk a legalacsonyabb átlagos VST arányokat a T sejt alosztályokban. A 21-30 év közti, a 31-40 év közti és az 51-60 év közti korcsoportok eredménye volt kiemelkedő, esetükben az átlagérték meghaladta a határértéket, de a többi korcsoportban ez nem teljesült (21. ábra).

Ennek fényében nem meglepő, hogy az alkalmas donorok aránya a szűrésen résztvevtek között is itt a legalacsonyabb. Csak két korcsoportban éri el az 50%-ot, a 21 év alattiak, és az 51-60 év közöttiek esetében, csökkenő trendet mutatva (22. ábra).



21. ábra A BKV specifikus VST sejtek átlagos aránya a T sejt szubpopulációkban, korcsoportok bontásban

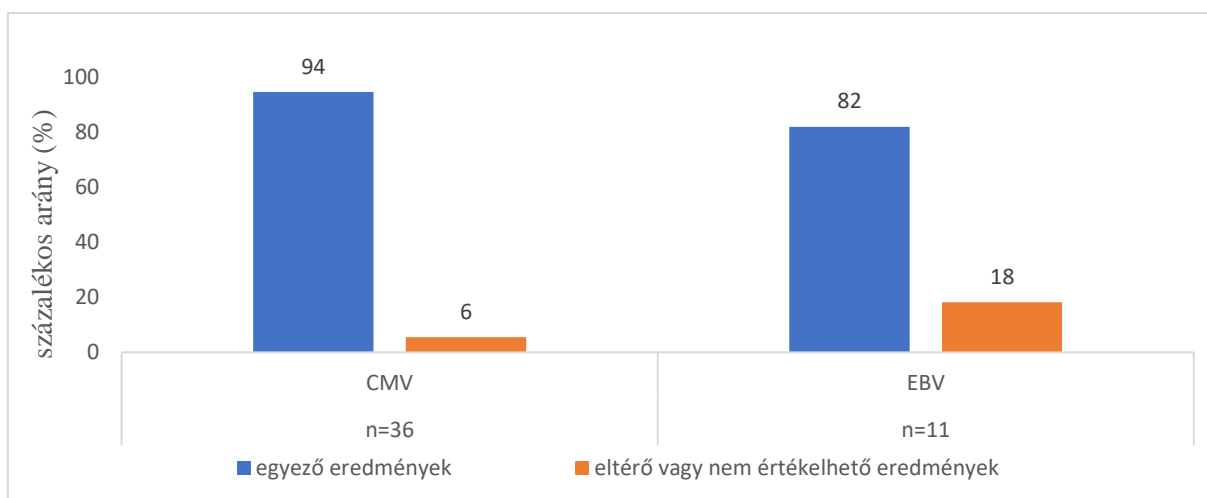


22. ábra A BKV specifikus VST terápiához alkalmas donorok aránya a donorjelöltek között, korcsoportok bontásban

4.2.4 A donorszűrés eredményeinek összevetése az szerológia vizsgálatokkal

43 donorjelölt esetében álltak rendelkezésünkre a vírusszerológiai eredmények. 36 esetben történt a szűrés CMV, és 11 esetben EBV specifikusan, ebből négy esetben egy

donortól mindkettőre. A vírusszerológiai vizsgálat és a VST mérés egyező eredményt adott a CMV tekintetében 34/36 esetben, azaz 94%-ban mindkét módszerrel pozitivitást láttunk. Két esetben a szerológiai vizsgálat negatívnak mutatkozott, míg a VST mérés alapján a donorjelölt alkalmasnak bizonyult a terápiához. Fordított helyzetet (negatív T sejt eredmény és pozitív szerológia) nem detektáltunk. EBV esetében a 11-ből 9 esetben (81%) találtunk egyező pozitív eredményt. A fennmaradó két esetben a szerológiai vizsgálat nem adott egyértelmű eredményt (kétes), így azokat nem tudtuk érdemben összevetni az adatainkkal (23. ábra).



23. ábra Vírusszerológiai eredmények összevetése a flow cytometriás donorszűrés eredményeivel. CMV esetén 94%-ban, EBV esetén 81%-ban találtunk mindkét módszerrel pozitív eredményt. A fennmaradó esetekben a flow cytometria pozitív eredményt adott, míg a szerológiai eredmény negatív vagy kétes volt.

4.3 A készítménnyel kapcsolatos eredmények

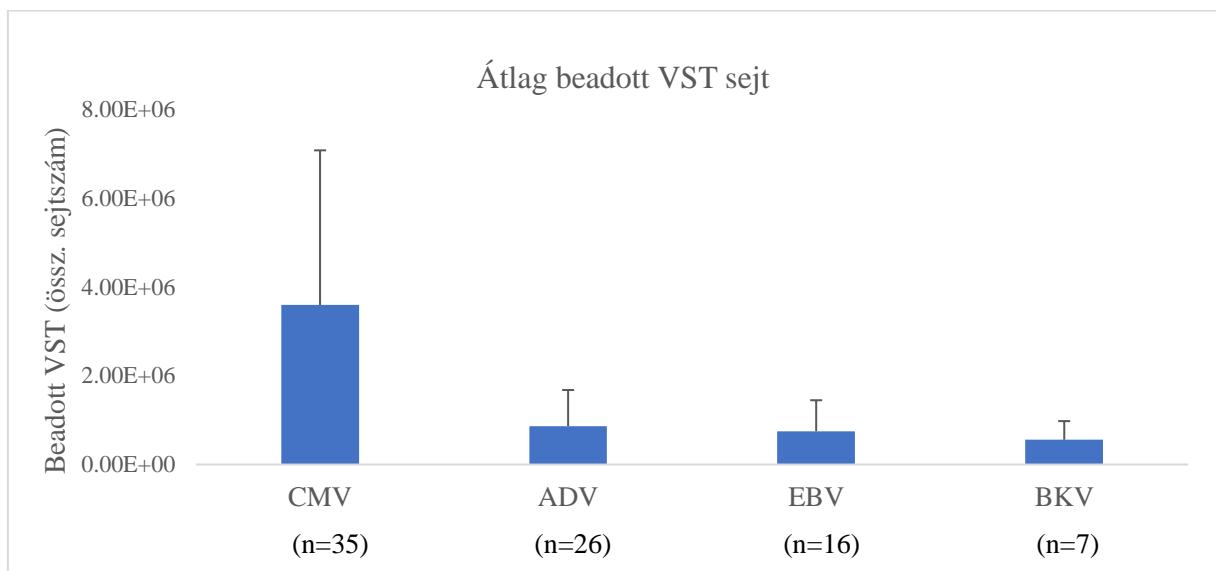
A vizsgálódásainkkal a célfrakciók közül a target frakció koncentráltunk, mivel ennek van klinikai jelentősége: ez a beadandó készítmény, ez a frakció tartalmazza a feldúsított IFN- γ termelő, azaz vírus specifikus T sejteket.

4.3.1. A target frakció sejtösszetétele

A target frakció átlagos térfogata 7,67mL volt. Legkevesebb 5,68mL, legtöbb 8,60mL került beadásra. A fehérvérsejt koncentráció átlagosan 0,60 G/L.

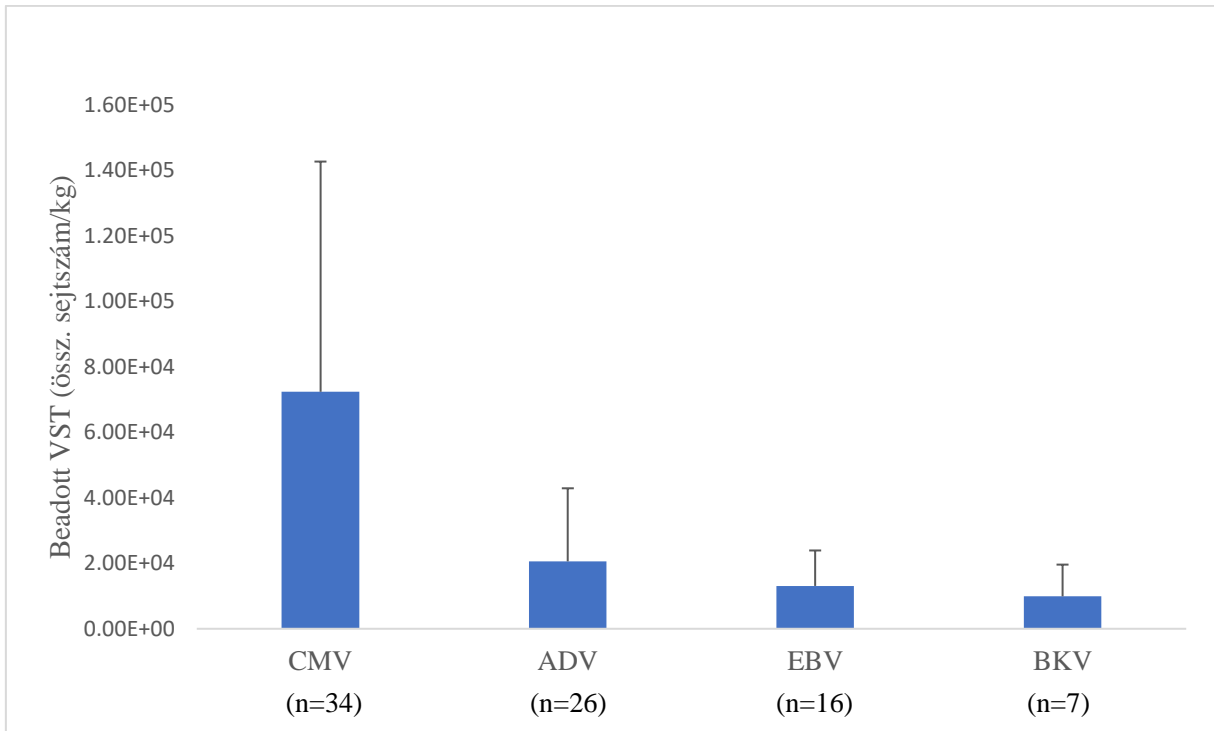
4.3.1.1 A készítmény VST mennyisége

A összsejtszám a target frakcióban átlagosan $4,58 \times 10^6$ sejt volt. A VST sejtek átlagos száma $9,10 \times 10^5$ volt, minden beadhatóan minősített készítményt számolva ($n=75$). A különböző vírusokra lebontva elmondhatjuk, hogy a CMV elleni T sejtek szelekciójakor nyertünk ki legtöbb, $3,59 \times 10^6$ sejtet. Ezt követte az ADV elleni T sejtek száma, $8,65 \times 10^5$ T sejt, majd az EBV specifikus T sejtek száma $7,49 \times 10^5$ volt. Legkisebb mennyiségben a BK vírus ellen tudunk T sejteket generálni, ezek száma $5,58 \times 10^5$ volt (24. ábra).



24. ábra A target frakcióban található VST sejtek átlagos száma, vírusról, jelölve, hogy hány terápiára került sor az adott vírus vonatkozásában.

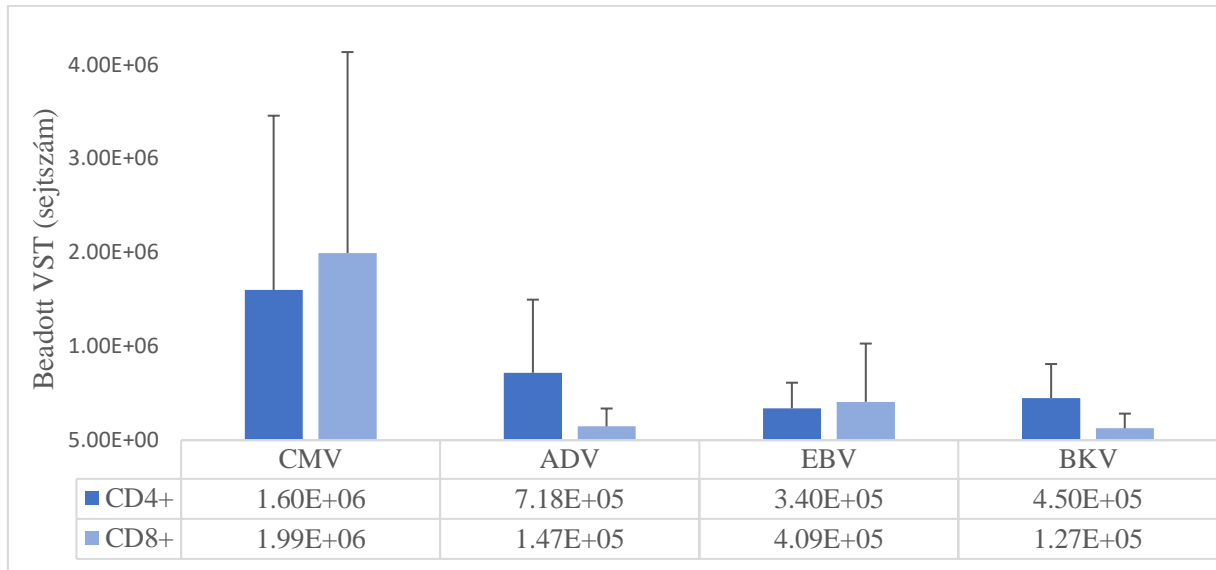
A testsúlykilogrammokra számítva, az összes beadott VST sejt átlaga $3,66 \times 10^4$ sejt/kg. CMV esetében $7,15 \times 10^4$, ADV esetében $2,06 \times 10^4$ /kg, EBV esetében $1,31 \times 10^4$ /kg értéket kaptunk, míg BK vírus ellen $9,89 \times 10^3$ /kg VST-t tudunk beadni (25. ábra).



25. ábra A target frakcióban található VST sejtek átlagos száma testsúlykilogrammonként, vírusonként, jelölve, hogy hány terápiára került sor az adott vírus vonatkozásában.

4.3.1.2 A CD4 és CD8 sejtek megoszlása a VST sejtek körében a készítményben

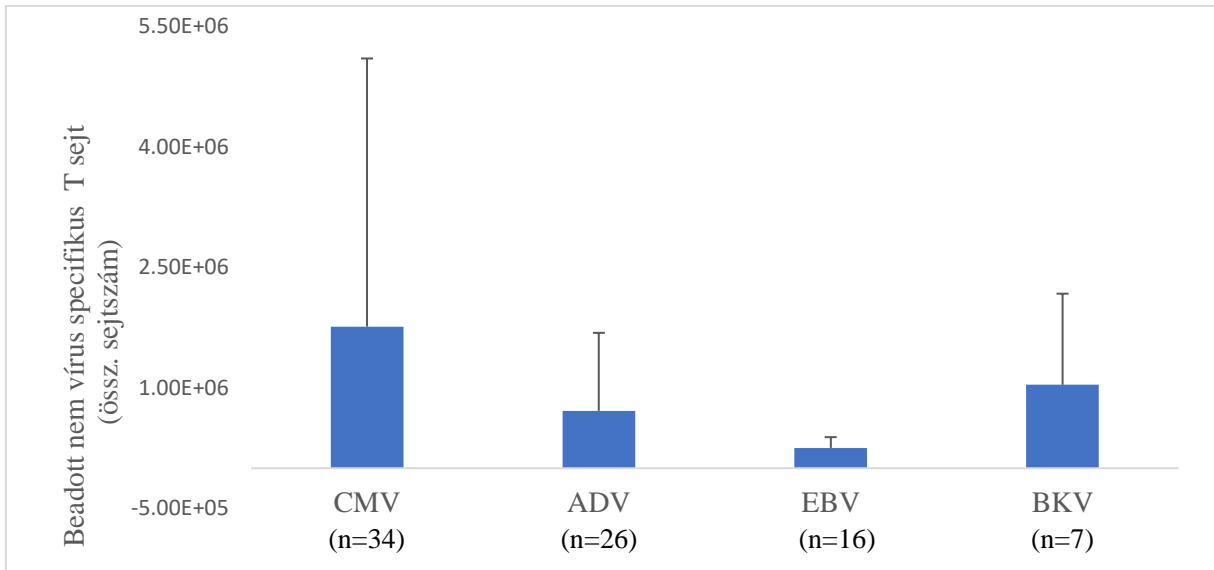
Mind a négy vírus vonatkozásában vizsgáltuk a VST sejtek CD4+ és CD8+ T-sejt alosztályok dominanciáját. A cytotoxikus (CD8+) T sejtek magasabb aránya figyelhető meg a CMV és EBV specifikus T sejtek esetén, míg az ADV és a BKV elleni T sejteknél a helper T-sejtek (CD4+) aránya volt magasabb (26. ábra).



26. ábra A CD4+ és CD8+ T sejtek átlagos mennyiségének megoszlása a VST-k körében a target frakcióban, vírusonként

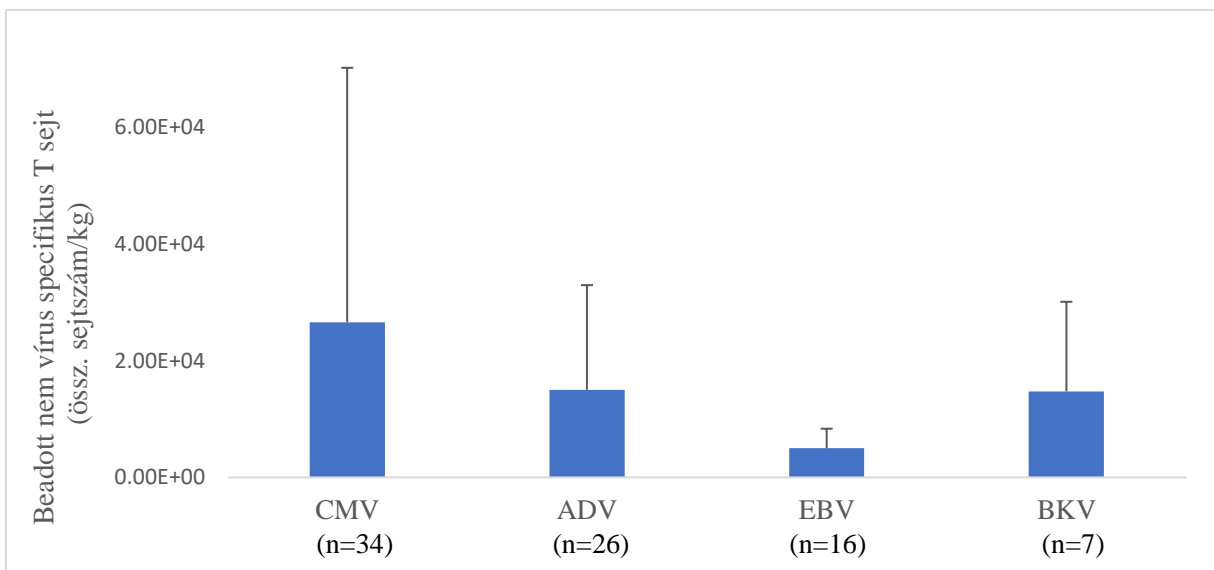
4.3.1.3 Az IFN- γ negatív T sejtek mennyisége a készítményben

Fontos tényező a VST sejtek mellett beadott, nem vírus specifikus T sejtek száma is (IFN-gamma negatív T sejtek), hiszen ezek a sejtek potenciálisan GvHD-t okozhatnak, így számuk minél alacsonyabban tartása kívánatos. Az összes készítményt figyelembe véve az átlagos, nem vírus specifikus (potenciálisan alloreaktív) T-sejt szám $9,95 \times 10^5$ volt. A különböző vírusok elleni szelekciós eljárásokban eltérő mennyiségeket láttunk: a legnagyobb számban a CMV elleni terápiáknál volt kimutatható, átlagosan $1,76 \times 10^6$ T sejt, ezt a BKV követte $1,13 \times 10^6$ T sejtrel. Az ADV esetében átlag $9,71 \times 10^5$ sejtet tartalmazott a készítmény, és végül a legkevesebb az EBV esetén tapasztalt $2,53 \times 10^5$ alloreaktív T sejt volt. (27. ábra)



27. ábra A nem vírus-specifikus T sejtek átlagos száma a target frakcióban, vírusonként jelölve, hogy hány terápiára került sor az adott vírus vonatkozásában.

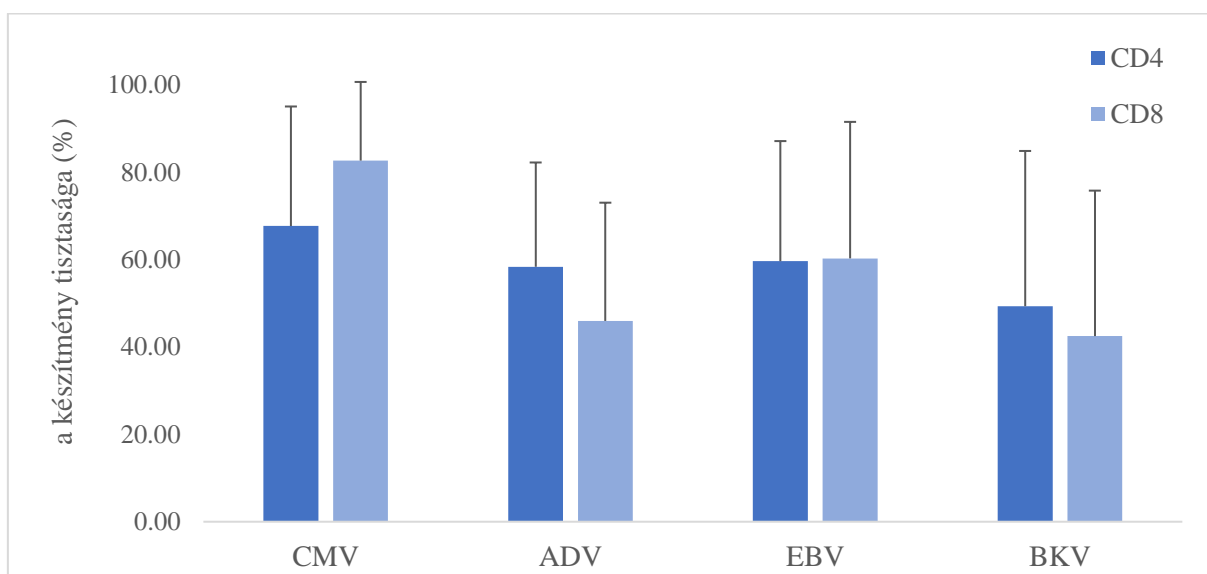
Testsúlykilogrammonként számítva a potenciálisan alloreaktív T sejtek mennyisége az összes készítmény tekintetében átlagosan $1,67 \times 10^4/\text{kg}$ volt. A CMV esetében találtuk a legmagasabb, $2,66 \times 10^4/\text{kg}$ értéket, ezt az ADV elleni terápiák esetében mért $1,50 \times 10^4/\text{kg}$ nem-VST sejt követte. A BKV target frakciójában $1,47 \times 10^4/\text{kg}$, az EBV esetében pedig $4,99 \times 10^3/\text{kg}$ volt a potenciálisan alloreaktív T sejtek száma (28.ábra).



28. ábra A nem vírus-specifikus T sejtek átlagos száma a target frakcióban, vírusonként, testsúlykilogrammonként

4.3.1.4 A készítmény tisztasága

A Vírus specifikus és a nem vírus specifikus (potenciálisan alloreaktív) sejtek arányából kiszámolható a készítmény tisztasága, azaz az összes CD4+ illetve CD8+ sejtek számán belül a VST sejtek százalékos aránya. Ez jó összehasonlíthatóságot tesz lehetővé a különböző vírusok elleni terápiák közt, és a szórása alacsonyabb, mint a korábbi vizsgálatok esetében. A legnagyobb tisztaságot a CMV és EBV elleni készítmények mutatták kb 60-80%-kal (CMV: CD4: 67,70%; CD8: 82,68% EBV: CD4: 59,64%; CD8: 60,29%), míg az adenovírus esetében 45-60% (CD4: 58,37%; CD8: 45,97%), BK vírus esetében 40-50% (CD4: 49,34%; CD8: 42,49%) tartományban volt a készítmények tisztasága. (29. ábra)



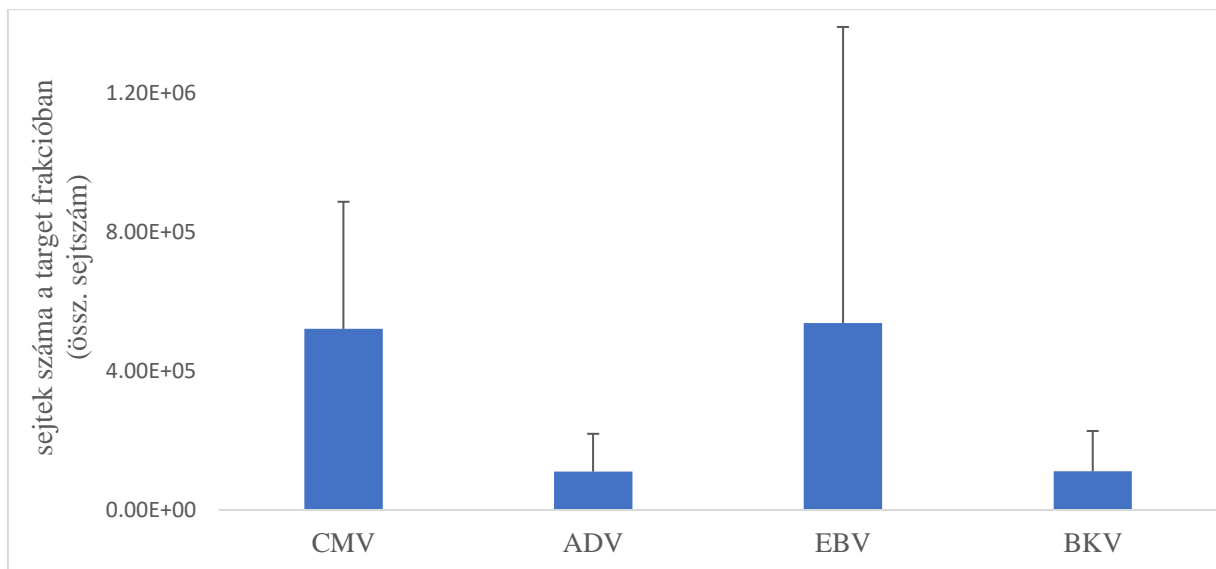
29. ábra A CD4+ illetve CD8+ sejtek számán belül a VST sejtek százalékos aránya azaz a készítmények átlagos tisztasága, vírusonként

4.3.2 Az „over-feeding” vizsgálata

Az over-feeding angol kifejezés által fedett jelenség olyan esetben jöhet létre, mikor a szekretált citokinek mennyisége nagyon magas. A CD45 receptor minden fehérvérsejten megtalálható, kisebb-nagyobb mértékben, így a catchmatrix (anti CD45 – anti IFN- γ kettős antitest) minden fehérvérsejthez tapadhat, különösebb specificitás nélkül.

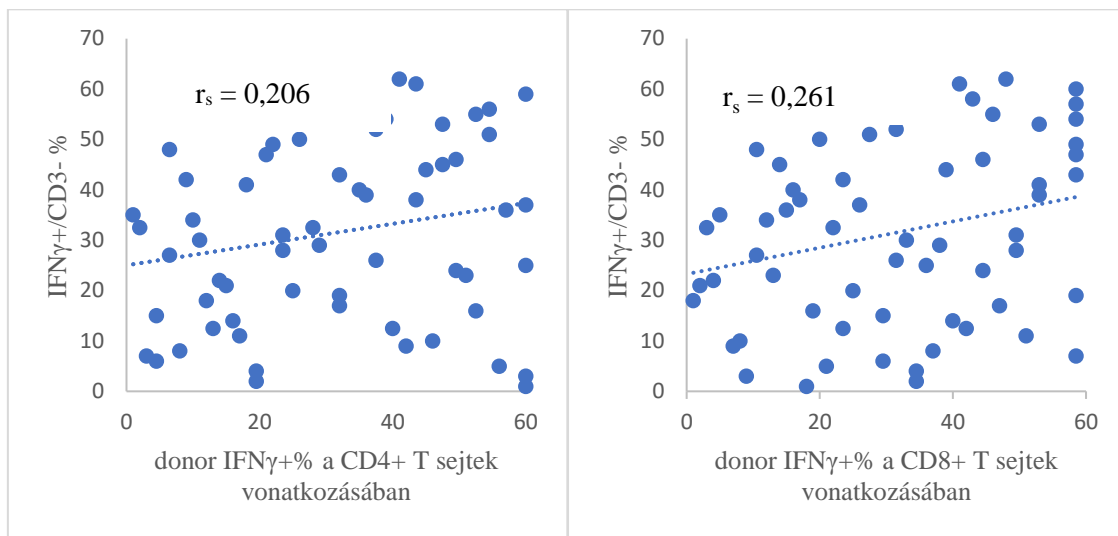
Ez magában hordozza azt a lehetőséget is, hogy a T sejtek által, és a T sejtek mellett egyéb sejtek, pl az NK sejtek által szekretált citokinek nem csak a vírus ellen memóriával rendelkező T sejtek, hanem az NK sejtekhez, vagy egyéb fehérvérsejtekhez is tapadhat, a sejt felszínen expresszálandó CD45 receptorhoz kötött catchmatrixon keresztül, amihez utána a mágneses gyönggyel rendelkező citokin ellenes antitest kötődik. Ilyen módon, elképzelhető, hogy azokban az esetekben, mikor a donor T sejtjei nagy arányban szekretálnak citokinek, megnőhet ez a nem specifikus kötődés, így az egyéb, nem szándékosan szelektált egyéb sejtek aránya is, rontva ezzel a készítmény tisztaságát. Ezen álpozitív populációt a mérési file-ok újabb analizésével elemeztük, a CD3-/IFN- γ non-T populációra állítva egy kaput.

A látszólag IFN- γ termelő nem-T sejt populáció vizsgálatával a következő eredményeket kaptuk: átlagosan a CD3- élő sejtek 18,35%-ban mutattak IFN- γ pozitivitást, ez átlagosan $3,5 \times 10^5$ sejtet jelent. Vírusonkénti bontásban, legnagyobb mennyiségben a CMV és EBV elleni sejtselektációkor találkozhattunk ilyen sejtekkel, $5,21 \times 10^5$ és $5,39 \times 10^5$ számban, A BKV esetében $1,11 \times 10^5$, és az ADV esetében $1,10 \times 10^5$ sejt volt detektálható (30. ábra).



30. ábra Átlagos IFN- γ +/CD3- sejtszám a target frakcióban, vírusrólként

Megvizsgáltuk, hogy a perifériás vérben keringő VST arányok és az IFN- γ +/CD3- sejtek mennyisége között van-e összefüggés, feltételezve, hogy a nagyobb mértékű IFN- γ termelő sejtarány fokozhatja az IFN- γ nem specifikus kötődését egyéb sejtekhez. Ehhez a Spearman-féle rangkorrelációs szám (r_s) kiszámítását használtuk. Ez a CD4+ sejtek vonatkozásában 0,206, a CD8+ sejtek esetében pedig 0,261 volt (31. ábra), azaz nem mutatkozott összefüggés a keringő IFN- γ termelő sejtarány és a készítményben mért aspecifikus IFN-g kötődés között.



31. ábra Korreláció vizsgálat a periférián keringő VST arány és a target frakcióban található IFN-g+/CD3- sejtek aránya között. A tengelyeken a rangkorrekciós helyzet szerepel. A Spearman-féle rangkorrelációs szám (r_s) nem utal szoros összefüggésre.

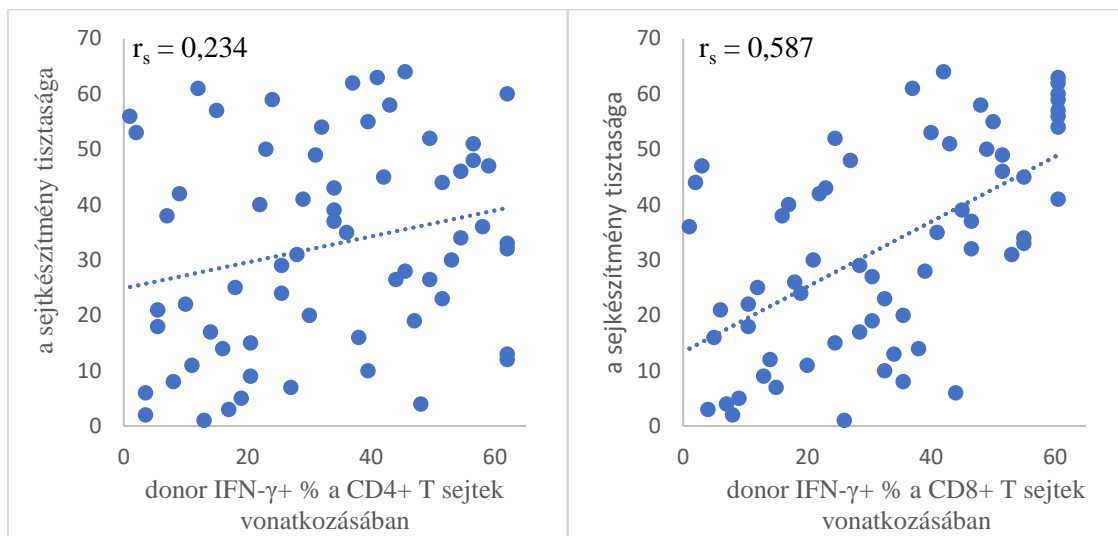
4.3.3 Korreláció a periférián keringő VST arány és a target frakció tisztasága valamint VST tartalma között

A periférián keringő VST sejtek T sejt populációkon belüli százalékos arányát vetettük össze a sejt készítmény tisztaságával, és a sejt készítményben lévő, IFN- γ termelő T sejtek mennyiségével, a helper (CD4+) és cytotoxikus (CD8+) T sejt populációkat külön-külön elemezve.

Az összevetésből technikai okokból ki kellett hagynunk azokat a szelekciós eljárásokat, melyek során egyszerre több vírus elleni T sejteket szelektáltunk, mivel ezeknél az eljárásoknál végeredményként csak azt tudjuk detektálni, hogy összesen mennyi VST

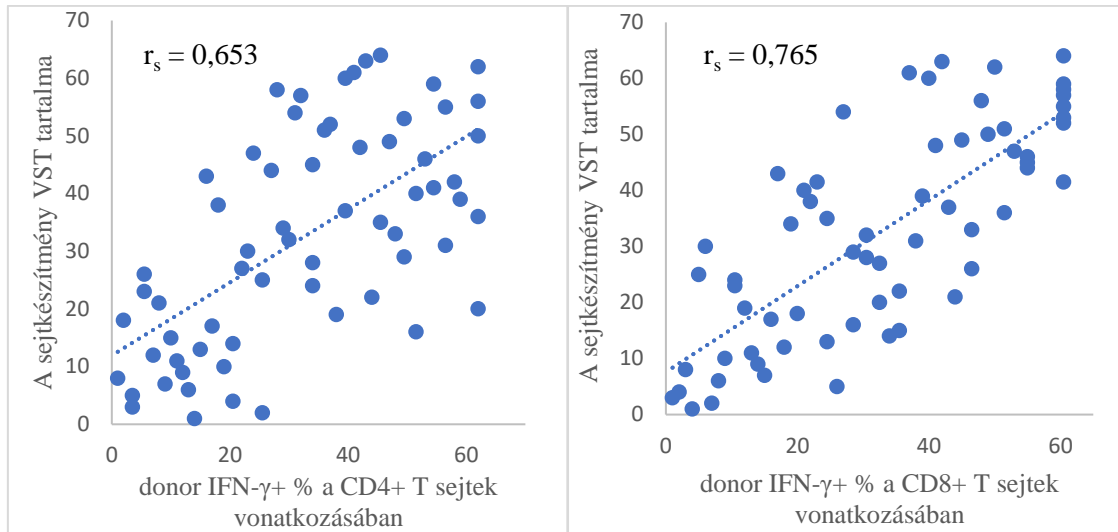
található a target frakcióban, azt nem, hogy ezek közül mennyi specifikus az egyik, és mennyi a másik vírusra. Ki kellett hagynunk ebből az analízisből egy olyan esetet, amikor a cytométer meghibásodása miatt nem tudtuk meghatározni a helper és a citotoxikus T sejteket, így az az érték nem lett volna összehasonlítható.

Az összes, analízisbe vonható szelekciós eljárást figyelembe véve, a periférián keringő - tehát a donorszűréskor detektált – VST sejtek aránya és a készítmény tisztasága közötti összefüggést jellemző Spearman-féle rangkorrelációs szám (r_s) értéke 0,234 volt a CD4+ sejtek esetében, és 0,587 a CD8+ T sejtek vonatkozásában (32. ábra).



32. ábra Korreláció vizsgálat a periférián keringő VST arány és a target frakció tisztasága között. A tengelyeken a rangkorrekciós helyzet szerepel. A Spearman-féle rangkorrelációs szám (r_s) kis mértékű összefüggésre utal.

Ehhez hasonlóan vizsgáltuk a periférián keringő VST sejtek arányának korrelációját a target frakcióban detektálható VST sejtek számával. Az összevethetőséget az adja, hogy a szelekció kiindulási frakciója mindig azonos, 1×10^9 sejtet tartalmazott. Az r_s érték a CD4+ sejtek esetében 0,653, a CD8+ sejtek esetében pedig 0,765 volt (33. ábra).



33. ábra Korreláció vizsgálat a periférián keringő VST arány és a target frakció VST tartalma között. A tengelyeken a rangkorrekciós helyzet szerepel. A Spearman-féle rangkorrelációs szám (r_s) közepesen erős (CD4+ T sejtek esetében) és erős pozitív korrelációt (CD8+ T sejtek esetében) mutat.

4.4 Klinikai követés

Az alkalmazott VST terápia hatékonyságának vizsgálata nem része jelen értekezésnek. A beadott sejtek egy esetben sem okoztak GvHD-t, illetve, nem súlyosbították az esetleg meglévőt.

A 63 páciensből 38 hunyt el, közülük hét főnél volt egyértelműen az eredeti vírusfertőzéshez köthető az elhalálozás. Ez a VST terápiaiban részesült, standard antivirális terápiára nem, vagy nem jól reagáló páciensek 11%-a. Mindez azt mutatja, hogy az általunk vizsgált betegcsoport tagjai a VST terápianak köszönhetően, a korábbi kezelések szuboptimális hatása miatt kialakult súlyosabb vírusreaktívációt közel az irodalomban leírt arányban győzték le (3).

Azon páciensek, akik sikeresen leküzdötték a fertőzést, illetve, akiknél a halálozási ok nem köthető a vírushoz, testsúlykilogramorra vonatkoztatva magasabb arányban kaptak VST sejteket, mint azok, akiket a vírusfertőzés következtében veszítettünk el. ($4.49 \times 10^4/\text{kg}$ vs $3.87 \times 10^4/\text{kg}$). Statisztikailag nem szignifikáns (Welch-féle t próbával számolva $p=0.793$) a különbség a két csoport által kapott VST

testsúlykilogrammonkénti száma között, de egyértelmű tendencia látható a magasabb sejtszám és a klinikai hatás, illetve túlélés között. Ez, bár önmagában nem igazolja a klinikai hatékonyságot, de utalhat arra, hogy a nagyobb mennyiségű VST sejt jobb esélyeket biztosíthat a vírusfertőzés legyőzéséhez.

5. Megbeszélés

5.1 A vírus specifikus T sejt terápia helye a klinikumban

Az allogén őssejt transzplantációt követő első időszakban a betegek túlélésének szempontjából a különböző infekciók jelentik a legjelentősebb kockázati tényezőt. A hagyományos kezelések gyakran nem hozzák a várt eredményt, és a vírus kópiaszámok tovább emelkednek. A vírusellenes kezelésre nem reagáló betegek esetében ma már lehetőség van a vírus specifikus T sejtek adoptív transzferére.

Az 1990-es évek elejétől kezdődően indult a vírus specifikus T sejtek terápiás célú felhasználása, és az évek alatt a fejlesztéseknek köszönhetően már egyre több centrumban elérhető, ez a terápiás módszer, melynek célja az immunkompromittált páciensek vírusok elleni küzdelmének segítése akár az őssejt donortól, akár harmadik személytől (third party) származó T sejtek segítségével. A kezdeti években főként in vitro tenyésztési eljárásokkal generált sejteket alkalmaztak, és ezek létrehozása költséges, és nem utolsó sorban nagyon időigényes volt. Az általunk is alkalmazott IFN- γ szekréción alapuló Cytokine Capture System (CCS) technológia ezzel szemben mononukleáris sejtekből 12 óra alatt állítja elő a vírus-specifikus T sejtek terápiás felhasználásra alkalmas frakcióját. A feldúsított sejtek mennyisége csekély, de már testsúly kilogrammonkénti $3,4 \times 10^3$ VST is elérheti a kívánt terápiás hatást, mivel a beadott sejtek további expanziója történik a szervezetben (83,84).

5.2 A donorszűrés eredményeinek áttekintése

A szűrés lényege, hogy a kiválasztott donor rendelkezik-e olyan T sejtekkel, melyek az adott vírus-epitóp alapján készített peptivátorral stimulálhatók, arra IFN- γ termeléssel reagálnak, mivel ez lesz a szelektációs eljárás alapja. A keringő VST arányt a CD4+ és CD8+ T sejt populáción belül határoztuk meg minden vírus esetén. Amennyiben a VST-k aránya egy adott határértéket meghalad ($> 0,01\%$), a szűrt donorjelöltet donációra alkalmasnak tekintettük, ha a donoroknál általában szükséges egyéb feltételek is teljesültek. A szerológiai teszt ezt a szűrést nem váltja ki, mert az ellenanyagok jelenléte nem garantálja, hogy az adott vírus epitópra reagáló T sejtek is vannak a szervezetben.

A vizsgálat 5 éve alatt 636 donorjelölt vizsgálatát végeztük el, ennek során 916 alkalommal történt flow cytometriás teszt a keringő vírus specifikus T sejtek kimutatására. Életkori megoszlásukat tekintve a vizsgált donorjelöltek háromnegyede a 20-50 közötti korosztályba tartozott, ezen belül a 40-50 év közötti korosztály aránya volt a legmagasabb (az összes vizsgált egyén 30%-a).

A továbbiakban a célkitűzések szerinti tematikában a 636 donorjelölt véréből elvégzett 916 donorszűrés eredményét és a 63 betegnek beadott 74 készítmény adatait foglaljuk össze.

5.3. A keringő VST arány és a donációra alkalmas egyének aránya vírusonként

Vizsgálataink azt igazolták, hogy a CD4+ és CD8+ populációban mért vírus specifikus T sejtek aránya CMV esetén volt a legmagasabb (0,152% és 0,325%), mely megfelelő korrelációt mutat az ugyancsak IFN- γ szekréción alapuló VST mérések irodalmi eredményeivel (0,56% \pm 0,7%) (85). EBV esetén igen alacsony CD4+ VST arányt mértünk (0,007%), míg a CD8+ átlagos VST arány ennek több, mint tízszerese volt (0,097%). Irodalmi adatok hasonló VST nagyságrendet közölnek EBV esetén (range: 0,01-0,04%). (61). Adenovírusra vonatkozó méréseinknél 0,033% ill. 0,009% VST-t találtunk a CD4+ ill. CD8+ populációban, ez alacsonyabb, mint az irodalomban leírt eredmények (range 0,03–0,39% a CD4+ populációban) (86). BKV esetén igen alacsony átlagos CD4+ VST arányt mértünk (0,008%), a CD8+ VST frekvencia ennek kb kétszerese volt (0,016%).

A különböző vírusok tekintetében eltérő a helper (CD4+) és a cytotoxikus (CD8+) VST sejtek dominanciája. Eredményeink azt mutatják, hogy CMV, EBV és BKV esetén elsődlegesen CD8+ T sejtek biztosítják az immunitást, míg az ADV specifikus T sejtek körében nagyobb arányban figyelhetők meg CD4+ helper T sejtek. A CD8+ T sejt dominancia EBV infekciónál ismert tény, CMV kapcsán pedig változó adatokat közöl az irodalom: vannak tanulmányok, ahol saját eredményeinkkel szemben a CD4+ T sejtek, máshol a CD8+ T sejtek dominanciáját írták le (84,85). ADV esetén a CD4+ vírus specifikus T sejtek túlsúlyát más tanulmányok eredményei is alátámasztják (86).

Megvizsgáltuk, hogy a szűrt donorjelöltek hány százaléka alkalmas donornak, azaz milyen arányban mutatható ki 0,01%-ot meghaladó VST arány a CD4+ vagy a CD8+ populációban. Összesítve a 636 donorjelöltből 445 fő felelt meg ennek a kritériumnak (70%). CMV esetén a szűrt egyének 78,3%-a rendelkezett cut-off értéket meghaladó VST aránnyal (227/290), mely jó egyezést mutat azzal az epidemiológiai adattal, hogy felnőtt korra az egyének 80-90%-a átesik CMV fertőzésen. Adenovírus elleni VST-re szűrve a donorjelöltek 68,9%-a mutatott határérték fölötti T sejt számot. EBV esetén a 135 egyénből 76-nál tudtunk 0,01%-ot meghaladó VST-t kimutatni (146/202). Ez 56,3%, ami alacsonyabb, mint a felnőtt populációban leírt kb. 90%-os EBV átfertőzöttség. Ennek magyarázata lehet, hogy jelen tanulmányban szinte kizárólag az EBNA elleni T sejteket mutattuk ki, és ritkán vizsgáltunk más EBV antigének ellen megjelenő T sejteket. BKV esetén 41,7% volt az alkalmas donороk aránya (45/108).

5.4 A keringő VST arány és az donornak alkalmas egyének aránya a donorok életkora szerint

Fenti eredményeinket korosztályonként is elemeztük: megvizsgáltuk, hogy a vérben kimutatható vírus specifikus T sejt arány és a donornak alkalmas személyek aránya hogyan változik korcsoportonként az egyes vírusok vonatkozásában. Ehhez a donorokat 10 éves időszakok alapján korcsoportokba osztottuk.

A CMV specifikus T sejtek adására jelentkező donorok között az életkor szempontjából életkorral emelkedő trendet figyeltünk meg a keringő VST arány tekintetében (legmagasabb értékeket a 61 év feletti és a 30-40 év közötti korosztályban mértünk). A 60 felettekben mért magasabb érték egyezést mutat azokkal az irodalmi adatokkal, melyek időskorban új CMV specifikus CD8+ T sejt klónok jelenlétéről számolnak be. (87,88). Az életkorral emelkedő, IFN- γ termelő T sejtek aránya anyagunkban is megfigyelhető, ennek megfelelően a lehetséges donorok aránya is egyértelmű emelkedést mutat: 40 év fölött a szűrt egyének több, mint 80%-a alkalmas donornak. az utolsó három korcsoportban közel egyforma értéket adva. Az ADV és az EBV esetében a CMV-vel ellentétben az életkor előrehaladtával csökkenő tendenciát mutat a vérben a vírus specifikus T sejtek aránya, a legmagasabb értékeket a 20 év alatti korosztályban mértük mindkét vírusról. Ez megfelelhet az immunrendszer „öregedésének”, ami ismert

immunológiai jelenség. Ennek megfelelően a donornak alkalmas egyének aránya is csökken az életkorral, ADV esetében 20-40 év között a szűrt egyének több, mint 80% -a alkalmas donornak, idősebbeknél ez jelentősen csökken, 44%-ra, majd 7.6%-ra. EBV esetében 20 év alattiak 75%-a volt alkalmas donornak, idősebb korosztályban ez az arány 50-60% között stagnál. Az ADV esetében hasonló trendet találunk az irodalmi adatokban is, eltérő, kevésbé árnyalt korcsoporti beosztással (3 korcsoport összesen) (86).

A BKV fertőzés többnyire fiatal korban következik be, és a szeroprevalencia az életkor előrehaladtával növekedést mutat (89). A méréseink ezt nem igazolják, de meg kell jegyezni, hogy a BK vírussal kapcsolatban végeztük a legkevesebb donorszűrést, így előfordulhat, hogy egy kiugró érték vagy az alacsony mintaszám torzítja az eredményeket.

5.5. A sejt készítmény mérésével kapcsolatos eredmények áttekintése

A terápiára szánt végtermék IFN- γ + T-sejt tartalmára vonatkozó adatok: A készítmények sejtszáma $1,79 \times 10^6$ sejt ($3,66 \times 10^4$ VST/kg) volt, átlagolva az összes target frakció sejtszámát. CMV esetében volt elérhető a legmagasabb VST szám ($3,6 \times 10^6$ sejt). ADV esetében $8,65 \times 10^5$, EBV esetén $7,49 \times 10^5$ VST számot mértünk, míg a BK vírus elleni készítményekben volt a legalacsonyabb a specifikus T sejtek száma ($5,58 \times 10^5$). Ezek az eredmények a perifériás vérben mért kiindulási értékek ismeretében érthetőek, hiszen CMV esetén volt a legmagasabb a keringő VST szám, BK vírus esetén pedig legalacsonyabb. A testsúlykg-ra számolt VST értékek a 10^3 - 10^4 tartományba estek, mely más centrumok adataival korrelál és megfelelő klinikai hatást biztosít (72-75)

Megvizsgáltuk a készítmények összetételét CD4+ és CD8+ sejtek vonatkozásában a VST populáción belül. A vérben kapott eredményekhez hasonlóan CMV és EBV esetében a készítményben is a CD8+ vírus specifikus T sejtek domináltak, míg az ADV és BKV elleni készítményekben a CD4+ T sejtek túlsúlyát észleltük. CD4+ T sejt dominancia mutatkozott a végtermékben BKV esetén, annak ellenére, hogy a vérben az esetek többségében a CD8+ VST sejtek nagyobb arányát láttuk. (Ez feltehetően a

Prodigyben zajló large scale aktiváció magyarázhatja, a peptivátor ilyen körülmények között vélhetően elsődlegesen a CD4+ T sejteket aktiválta).

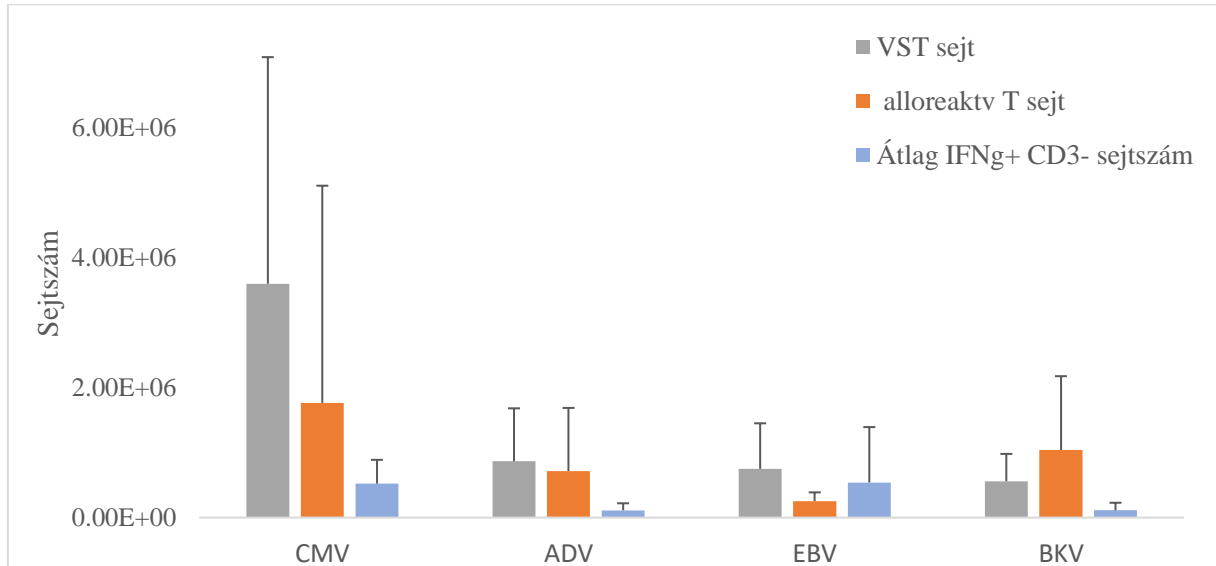
Meghatároztuk a készítmények alloreaktív T sejt tartalmát (IFN- γ negatív T sejtek) is, melyek mellékhatásként GvHD-t okozhatnak. Az összes készítményt átlagolva számuk $9,95 \times 10^5$ volt ($2,66 \times 10^4$ sejt/kg). Legmagasabb számot a CMV és BKV elleni készítményekben mértünk ($1,76 \times 10^6$ ill. $1,04 \times 10^6$), míg ADV és EBV esetén 1 log-gal alacsonyabb volt a számuk ($7,15 \times 10^5$ és $2,53 \times 10^5$). Testsúly kg-ra számolva a beadott készítményekben az alloreaktív T sejt szám nem haladta meg a kritikus 5×10^4 -en értéket.

A fenti adatokból kiszámolható volt a target frakció tisztasága (VST arány a teljes T sejt populáción belül). Ez a CMV és EBV készítmények esetén volt a legmagasabb (60-80%), míg, adenovírus esetén 45-60%-nak, BKV esetében pedig 40-50%-nak adódott. A készítmény tisztaságát a korábban említett szoftverfrissítés negatívan befolyásolhatta, hiszen szignifikáns különbség mutatkozott a frissítés előtti és utáni alloreaktív T sejtek mennyisége, és ezáltal a tisztaság értékek között is, annak ellenére, hogy a VST sejtek száma között nem volt lényegi különbség.

Vizsgálataink során összevetettük a periférián keringő VST arányt a készítmény tisztaságával és a készítményben található VST számmal, a CD4+ és CD8+ populáción belül. A korreláció vizsgálata során a sejt készítmény tisztaságával nem, vagy csak kis mértékben mutatott összefüggést a periférián detektálható VST arány, de az abszolút sejtszámok vonatkozásában már közepesen erős korrelációt láthattunk a CD4+ T sejtek esetében ($r_s=0,653$, moderate positive correlation) és erős pozitív korrelációt a CD8+ T sejteknél ($r_s=0,765$, high positive correlation).

A target frakció sejtösszetételét mutatja a 34. ábra. Láthatjuk, hogy a BK vírus kivételével minden esetben magasabb arányban voltak a VST sejtek, mint az alloreaktív, potenciálisan GvHD-t okozó sejtek. Azokban az esetekben, mikor a potenciálisan alloreaktív T sejtek száma túl magas volt (meghaladta a GvHD határt), a készítmény több részre lett bontva, és GvHD határ alatti mennyiségben beadott sejteken felüli részek fagyasztásra kerültek, esetleges későbbi felhasználás céljából. A GvHD határ

meghatározása minden esetben a klinikus feladata volt, többnyire 5×10^4 sejt testsúlykilogrammonként (90,91).



34. ábra A target frakció összetétele, vírusonként. Vírus specifikus T sejtek, (potenciálisan) alloreaktív T sejtek és IFN- γ termelő nem T sejtek száma

5.6. Over-feeding

Megvizsgáltuk a készítmények IFN- γ +/CD3- T sejt tartalmát, melyek az IFN- γ -t aspecifikusan kötő sejteknek felelnek meg, és a készítményben kontaminációt jelentenek. A jelenség háttere, hogy a CCS technika magában rejti azt az eshetőséget, hogy azok a sejtek is szelektálásra kerüljenek, melyek nem termelnek IFN- γ -t, de a CD45-höz aspecifikusan kötődő citokin miatt a mágneses szeparáció során az oszlopon maradnak, a target frakció többi sejtjével együtt (a CD45 receptor használatának gazdasági okai vannak: a gyártó így a kitet kis módosításokkal más típusú sejtek szelektációjához is értékesítheti). Ennek a hatásnak a vizsgálatára külön analizáltuk a target frakció mérési eredményeit: a CD3 negatív élő nem-T sejtek 18,35%-ban mutattak IFN- γ pozitivitást, ez átlagosan $3,5 \times 10^5$ sejtet jelent a készítményekben, ami messze elmarad a VST sejtek számától. Ezeket az adatokat vetettük össze a periférián keringő VST arányokkal, mivel a feltevésünk az volt, hogy ahol a magasabb arányban detektálunk VST-t a periférián, ott nagyobb az IFN- γ termelődés és emiatt magasabb

lesz az aspecifikus kötődésű, IFN- γ +/CD3- sejtek aránya a készítményben. A Spearman-féle korrelációs szám azonban ezt az összefüggést kizárta.

5.7 Összevetés a szerológiai eredményekkel

A vírusszerológával való összevetést nehezítette, hogy csak kevés donorjelölt esetében készült szerológiai vizsgálat is. A két módszerrel kapott eredmények CMV esetében 94%-ban, EBV esetében 82%-ban mutattak egyezést a pozitív eredmények tekintetében. Négy esetben a mérésünk talált VST sejtet, míg a szerológia negatív volt (CMV, n=2), vagy kétes eredményt adott (EBV, n=2). Mindez arra utal, hogy VST szelekció előtt a keringő VST arány meghatározása szükséges és nem kihagyható lépés, a donorok kiválasztását emiatt sem alapozhatjuk a szerológiai eredményre, de fontos megjegyezni, hogy a VST vizsgálat a peptivátor működését hivatott szimulálni, tesztelni, nem csak a vírus elleni immunmemóriát igazolja.

5.8 További lehetőségek

A dolgozat a terápiákhoz kapcsolódó, klinikai felhasználás által megkövetelt vizsgálatok elemzéséből született. Nem volt lehetőségünk kiegészítő vizsgálatok, vagy a protokolltól eltérő markerek használatára, kiegészítő mérések elvégzésére. Mindamelllett, a sejtszelekciós eljárások laboratóriumi vizsgálatával a téma több lehetőséget is rejt, ilyenek például (a teljesség igénye nélkül):

- Elképzelhető, hogy az inkubációs idő növelésével a donorszűrés során a sejtekbe zárva az IFN- γ mennyisége nő, így magasabb PE intenzitás, esetleg több IFN- γ + sejt kerülhet detektálásra. Ilyen vizsgálatot érdemes lenne 4-6-12-24 órás kinetikai mérésorozatokkal végezni.
- A peptivátorok koncentrációjának növelésével is potenciálisan növelhetővé válhat a teremlő IFN- γ mennyisége
- A szerológiai vizsgálatok kiterjesztésével (minden potenciális donornál, minél több érintett vírussal) összehasonlíthatnánk, hogy a donorszűréshez használt módszer érzékenyebben mutat-e ki egy korábbi vírusfertőzést, illetve így a szervezet vírus ellenes memóriáját is vizsgálhatnánk.

- A végtermék elemzésével megfigyelhető lenne, hogy az aspecifikus kötődés milyen sejteket érint a T sejtek mellett. Az IFN- γ teremlődés jellemző lehet az NK sejtekre is, így elképzelhető, hogy ezek a sejtek nagyobb mennyiségben szelektálódnak ki a T sejtek mellett, mint a többi, nem célzott sejt.
- Azon T sejtek esetében, melyek nem mutatnak IFN- γ termelést, azaz a potenciálisan alloreaktív T sejtek esetében lehetőség lenne CD45RA és CD45RO receptor vizsgálatra. Ennek segítségével meg tudnánk adni a naív T sejtek arányát (CD45RA+ sejtek), így csökkentve azoknak a T sejteknek a számát, melyeket a vizsgálat hiányában biztonsági okból alloreaktívnek tekintünk és az alacsonyabb tisztaságú készítményekből nagyobb mennyiséget tekinthetnénk biztonságosan beadhatónak.
- Ezek a markervizsgálatok esetleg arra is fényt deríthetnek, van -e, és ha igen, milyen mennyiségben olyan T sejt, mely ugyan IFN- γ pozitivitást mutat, de nem a peptidátorra való specificitása miatt, hanem mert egy másik T sejt által termelt citokint kötött meg, és ez alapján szelektálódott ki (pl. CD45RA+/IFN- γ + sejtek, melyek látszólag citokin termelő naív T sejtek).
- Klinikailag fontos tovább lépést jelentene a beadott VST sejtek mennyiségének követése a keringésben, pl történik-e in vivo expansió, meddig mutathatók ki a terápiásan bejuttatott VST-k. A sejtek igen alacsony aránya miatt ennek fő limitációját a módszer szenzitivitása jelenti.

6. Következtetések

A dolgozat főbb megállapításai a következők:

6.1. Munkánk során a 636 donor véreből 916 VST kimutatásra szolgáló funkcionális flow cytometriás tesztet végeztünk egészséges egyéneknél, négy vírusra vonatkozóan. Kimutattuk, hogy a keringő VST arányok a CMV esetében voltak a legmagasabbak a CD4 ill. CD8 populáción belül. Az EBV és ADV VST eredmények köztes értékeket adtak, BKV elleni vírus specifikus T sejt arány volt a legalacsonyabb.

6.2. Megállapítottuk, hogy a CMV, EBV és BKV esetén a vírus specifikus T sejtek döntően CD8+ T sejtek, míg BKV esetén a CD4+ T sejtek dominanciáját találtuk a VST-k között.

6.3. Vizsgálataink eredményei azt igazolták, hogy az összes jelentkezők 70%-a alkalmas donornak a vírus specifikus T-sejt terápiához a 0,01%-ot meghaladó VST arány alapján. Ezt az átlagot figyelembe véve - és saját tapasztalatunkkal megerősítve - egy páciens számára 8 fő vizsgálatára kiterjedő donorszűréssel is találunk alkalmas donort. Leírtuk, hogy vírusonkénti bontásban a donornak alkalmas egyének aránya a szűrt donorjelöltek között CMV esetén volt a legmagasabb (78%) és BKV esetén a legalacsonyabb (41%)

6.4 Megvizsgáltuk a keringő VST arányt és a donornak alkalmas egyének arányát a donorok életkorának függvényében és megállapítottuk, hogy CMV esetében az életkor emelkedésével magasabb volt az alkalmas donorok aránya, míg EBV és ADV esetén ezzel ellentétes trend mutatkozott. Donorszűrési vizsgálataink igazolják, hogy nem egyforma eséllyel találunk adott vírus elleni T sejt terápiához megfelelő donort minden korcsoportból. CMV-nél egyértelműen kimutatható az idősebb korosztályok dominanciája, tehát, ha CMV specifikus terápiához keresünk donort, idősebb donorjelöltek szűrése javasolt. ADV és az EBV esetében a fordított tendencia miatt a fiatalabbak között érdemes a megfelelő donort keresni. Ezek alapján adott vírus esetén a donor életkorát is célszerű figyelembe venni a szűrés tervezésénél. BKV esetén nem egyértelműek a megfigyeléseink, részben az alacsony esetszám miatt.

6.5 Hatvanhárom páciens kezeléséhez használt 74 VST készítmény adatait feldolgozva megállapítottuk, hogy a készítmények VST tartalma a 10^5 - 10^6 nagyságrendbe esett (10^3 - 10^4 /kg), mely a terápiás hatás kifejtéséhez elegendő sejtet jelent. Legmagasabb VST sejtszámot CMV készítmények esetén találtunk, legalacsonyabbat BKV esetén.

6.6. Méréseink alapján a CMV és EBV elleni készítményekben a CD8+ VST sejtek domináltak, míg ADV és BKV elleni végtermékben a CD4+ VST sejtek túlsúlyát igazoltuk.

6.7. A készítmények alloreaktív T sejt tartalmát elemezve megállapítottuk, hogy ezek száma átlagosan a 10^5 - 10^6 tartományban van (10^3 - 10^4 /kg), a legmagasabb értékeket CMV és BKV elleni készítményekben írtunk le. A beadott készítmények alloreaktív T sejt tartalma minden esetben a GvHD határ alatt volt (akár a készítmény porciózásával), így a kezelés GvHD-t nem okozott ill. nem súlyosbított.

6.8 Megvizsgáltuk a keringő VST arány és a készítmény VST tartalma közötti korrelációt: a CD8+ T sejt populációban erős pozitív összefüggést, a CD4+ T sejt populációban közepesen erős pozitív korrelációt igazoltunk. Azaz minél magasabb arányban tartalmaz a donorok vére VST sejteket, annál nagyobb mennyiségben tartalmaz a sejt készítmény is VST sejteket. Ez alapján a donor kiválasztásakor érdemes figyelembe venni a perifériás vérben keringő VST sejtek arányát. A kiindulási VST arány a vérben azonban nem mutatott korrelációt a készítmény tisztaságával.

6.9 Az „over-feeding” jelenséget vizsgálva analizáltuk a készítményben a CD3-/IFN- γ + nem-T sejtek arányát, melyek az interferont aspecifikusan kötő sejteknek felelnek meg. Összevetve a periférián keringő VST sejtek arányát a készítményben detektálható, CD3-/IFN- γ + sejtek arányával azt a következtetést vontuk le, hogy a donorok perifériáján mérhető VST arányok nem állnak összefüggésben az aspecifikusan szelektált nem-T-sejtekkel, így nem kell tartanunk attól, hogy a donor esetleges magas VST aránya és fokozott IFN- γ termelése hozzájárulna az aspecifikus kötődéshez és ezzel a graft tisztaságának csökkentéséhez.

6.10 A szerológiai vizsgálat és a VST kimutatás összevetésével azt találtuk, hogy a potenciális donorok egy részénél (6-18%) az antitest vizsgálat negatív vagy kétes eredményt adott, míg a VST kimutatás pozitív volt. Ez arra hívja fel a figyelmet, hogy

VST szelekció előtt a donor kiválasztásához mindenképpen szükséges a keringő VST arány meghatározása, ez nem váltható ki szerológiai vizsgálattal.

A fentieket összegezve vizsgálataink során az alábbi új megállapításokat tettük:

1. Intézetünkben az elmúlt 5 évben kiemelkedően nagyszámú, több mint 600 egészséges donorjelölt szűrése történt vírus specifikus T sejt donáció céljából. Korábban ilyen jelentős számú VST donorszűrésre vonatkozó adatot nem közöltek az irodalomban.

2. Ennek kapcsán új megfigyelés, hogy a keringő VST arány életkor függvényében változik: CMV esetében emelkedő, EBV és ADV esetén csökkenő arányt igazoltunk a kor előrehaladtával.

3. Közép-Európában először alkalmaztuk a CCS technológiával működő Prodigy CliniMACS immunomagnetikus sejtszeparálást a VST-k szelektálására.

4. A készítmények vizsgálatával igazoltuk, hogy a vérben kimutatott keringő VST arány szoros korrelációt mutat a készítmény VST tartalmával, de a tisztaságával nem. Azt is leírtuk, hogy a keringő magasabb VST arány és az ezzel járó nagyobb fokú IFN- γ szekréció nem okoz aspecifikus IFN- γ kötődést egyéb sejtek felszínén (over-feeding), így ez nem rontja a készítmény tisztaságát.

5. Tekintettel arra, hogy kereskedelmi forgalomban már kapható átfedő peptidkönyvtár a SARS-CoV-2 vírus különböző fehérjestruktúráihoz is, a módszer alkalmas lehet VST sejtek szelekciójára ez ellen a vírus ellen is, de megjegyzendő, hogy az általunk használt eljárás igen költséges, szembeállítva például a plazmadonációval.

Összegezve: A donorszűrésre és a készítmények vizsgálatára használt funkcionális flow cytometriás teszt klinikai szempontból megfelelő a VST arány mérésére: a donorszűrés eljárás során választott donor minden esetben alkalmasnak bizonyult a terápiás eljárás lefolytatására, és a sejteik segítségével megfelelő minőségű, terápiásan hatékony sejt számú készítmény volt előállítható, így az értekezésben bemutatott laboratóriumi módszer a klinikai gyakorlatban jól használható a szelekciós eljárások során.

7. Összefoglalás

Allogén HSCT-t követően a vírus specifikus T-sejt (VST) terápia új és hatékony kezelési stratégia, melynek elvét és gyakorlati lépéseit foglalja össze az értekezés laboratóriumi oldalról. Tanulmányunkban 63 beteg részesült ebben a kezelésben CMV, EBV, ADV vagy BKV reaktiváció miatt. Ennek kapcsán a megfelelő VST számmal rendelkező ún. third-party donor kiválasztásához 636 donorjelölt adatait dolgoztuk fel, akiknél 916 szűrőtesztet végeztünk. A szűréshez alkalmazott módszer egy funkcionális flow cytometriás teszt volt, melynek során vírus epitópok jelenlétében az IFN- γ szekréciót mutató T sejteket detektáltuk. A keringő VST arányt figyelembe véve a vizsgált egyének átlagosan 70%-a mutatott 0,01%-nál nagyobb IFN- γ + T sejt arányt a CD4 vagy CD8 populáción belül, mely a donáció feltétele volt. A lehetséges donorok arányát az életkor függvényében is megvizsgáltuk minden vírus esetében. CMV vonatkozásában az életkorral emelkedett a VST érték és donornak alkalmas egyének aránya, míg ellentétes trend igazolódott az EBV, ADV esetében. A készítmények előállításához az automatizált, zárt rendszerű, Prodigy CliniMACS készüléket használtuk Közép-Európában elsőként, mellyel 12 óra alatt VST végtermék nyerhető T sejtek immunmágneses szeparálásával. A készítmények elemzésével igazoltuk, hogy a target frakció VST sejtszáma minden esetben elégséges volt a terápiás hatáshoz (10^3 - 10^4 /kg), míg az ún. alloreaktív T sejtek száma nem haladta meg a GvHD-t okozó kritikus értéket. A vérben mért kiindulási VST arány és a készítmény VST tartalma között szoros korrelációt találtunk, különösen a CD8+ VST-k esetében, ami arra utal, hogy a donor választásnál érdemes figyelembe venni a keringő VST arányt. Megvizsgáltuk az IFN- γ -t aspecifikusan kötő, kontamináló nem-T sejtek mennyiségét is a végtermékben, és igazoltuk, hogy arányuk nem függ a kiindulási VST aránytól. Eredményeinket összegezve elmondhatjuk, hogy a VST kezeléshez szükséges donorszűrésnek megbízható és gyors módja a funkcionális flow cytometria teszt, mellyel biztonsággal kiválasztható a megfelelő sejtszámmal rendelkező donor és megbízhatóan mérhető a sejt készítmény összetétele is. Vizsgálataink az irodalomban egyedülálló módon, több mint 600 donoron végzett közel 1000 donorszűrés eredményét dolgozzák fel, így az értekezés anyaga segítséget jelenthet a vírus specifikus T sejt

terápiát megelőző donorszűrési folyamatokban, és sejt készítmények adatainak értékelésében.

8. Summary

Administration of virus specific T cells (VST) is a new and effective therapeutic strategy. This writing-summarises the principle, and the practical steps of the generation of VST cells, from the laboratory side. In our study, 63 patients had received this kind of treatment, because of CMV, EBV, ADV or BKV reactivation. For choosing the right donor, we screened 636 persons, performing 916 screening tests. The screening method was a functional flow cytometry based assay in which T cells showing IFN- γ secretion were detected in the presence of viral epitopes. Considering the circulating VST ratio, an average of 70% of the subjects showed an IFN- γ + T cell ratio greater than 0.01% within the CD4 or CD8 population, which was the criterion of donation. The proportion of potential donors in the light of age groups was also examined for each virus. For CMV, the VST value and the proportion of individuals suitable for donation increased with age, while the opposite trend was confirmed for EBV, ADV. The automated, closed-system CliniMACS Prodigy was used for the first time in Central Europe to produce the product in 12 hours by immunomagnetic separation of T cells. The analysis of the end product confirmed that the VST cell number of the target fraction was sufficient for the therapeutic effect in all cases (10^3 - 10^4 /kg), while the number of alloreactive T cells did not exceed the critical value of causing GvHD. We found a strong correlation between the VST ratio in the blood and the VST content of the product, especially for CD8+ VSTs, which draws attention to the fact that it is worth considering the circulating VST ratio when choosing a donor. We also examined the amount of non-T cells that binds non-specifically to IFN- γ in the final product, causing contamination confirming that their ratio did not depend on the initial VST ratio. Summarizing our results, we can say that the functional flow cytometry test is a reliable and fast way of donor screening for VST treatment with which the donor having the appropriate cell number can be safely selected and the composition of the cell preparation can be reliably measured. Our study is based on the results of nearly 1000 donor screenings performed on more than 600 donors is unique in the literature, so the findings of the dissertation can be helpful in donor screening processes prior to virus-specific T cell therapy and in the evaluation of the end product.

9. Irodalomjegyzék

1. Bátai Á, Reményi P, Réti M, Barta A, Gopcsa L, Lengyel L, Torbágyi É, Csukly Z, Karászi É, Tordai A, Andrikovics H, Balassa K, Tasnády S, Masszi T. (2017) Allogén vérképzősejt-átültetés Magyarországon. *Orv Hetil.*;158(8):291–7.
2. László, Maródi. Véreképző őssejt transzplantáció. In: *Gyermekgyógyászat. Medicina Kiadó*; 2013. o. 904–11.
3. Styczyński J, Tridello G, Koster L, Iacobelli S, van Biezen A, van der Werf S, Mikulska M, Gil L, Cordonnier C, Ljungman P, Averbuch D, Cesaro S, de la Camara R, Baldomero H, Bader P, Basak G, Bonini C, Duarte R, Dufour C, Kuball J, Lankester A, Montoto S, Nagler A, Snowden JA, Kröger N, Mohty M, Gratwohl A. (2020) Death after hematopoietic stem cell transplantation: changes over calendar year time, infections and associated factors. *Bone Marrow Transplantation.*;55(1):126–36.
4. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Cesaro S, Dreger P, Duarte RF, Dufour C, Kuball J, Farge-Bancel D, Gennery A, Kröger N, Lanza F, Nagler A, Sureda A, Mohty M. (2016) Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually. *Bone Marrow Transplant.*;51(6):786–92.
5. Alousi A, Wang T, Hemmer MT, Spellman SR, Arora M, Couriel DR, Pidala J, Anderlini P, Boyiadzis M, Bredeson CN, Cahn J-Y, Cairo MS, Gadalla SM, Hashmi SK, Gale RP, Kanda J, Kamble RT, Kharfan-Dabaja MA, Litzow MR, Ringden O, Saad AA, Schultz KR, Verdonck LF, Waller EK, Yared JA, Holtan SG, Weisdorf DJ. (2019) Peripheral Blood versus Bone Marrow from Unrelated Donors: Bone Marrow Allografts Have Improved Long-Term Overall and Graft-versus-Host Disease-Free, Relapse-Free Survival. *Biol Blood Marrow Transplant*, 25(2):270–8.
6. Flowers MED, Martin PJ. (2015) How we treat chronic graft-versus-host disease. *Blood*;125(4):606–15.
7. Kaushansky K, Lichtman MA, Prchal JT, Levi MM, Press OW, Burns LJ, Caligiuri M. Hematopoietic Cell Transplantation. In: *Williams Hematology*. 9. McGraw-Hill Education; 2016. o. 353–83.
8. Storb R. HSCT: Historical Perspective. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, szerkesztő. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. 7. Cham (CH): Springer; 2019. o. 3–9.
9. Erdei A, Sármyay G, Prechl J. Transzplantációs immunológia. In: *Immunológia. Medicina Könyvkiadó Zrt*; 2012. o. 571–81.
10. Talekar MK, Olson T. Immune Reconstitution After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. In: Brown VI, szerkesztő. *Hematopoietic Stem Cell*

Transplantation for the Pediatric Hematologist/Oncologist. Cham: Springer International Publishing; 2018. o. 371–83.

11. Waller EK, Logan BR, Fei M, Lee SJ, Confer D, Howard A, Chandrakasan S, Anasetti C, Fernando SM, Giver CR. (2019) Kinetics of immune cell reconstitution predict survival in allogeneic bone marrow and G-CSF-mobilized stem cell transplantation. *Blood Adv*,13;3(15):2250–63.
12. Mehta RS, Rezvani K. (2016) Immune reconstitution post allogeneic transplant and the impact of immune recovery on the risk of infection. *Virulence*, 7(8):901–16.
13. Ariza-Heredia EJ, Nesher L, Chemaly RF. (2014) Cytomegalovirus diseases after hematopoietic stem cell transplantation: a mini-review. *Cancer Lett.* 0;342(1):1–8.
14. Rutella S, Rumi C, Laurenti L, Pierelli L, Sora' F, Sica S, Leone G. (2000) Immune reconstitution after transplantation of autologous peripheral CD34+ cells: analysis of predictive factors and comparison with unselected progenitor transplants. *Br J Haematol.* 108(1):105–15.
15. Rutella S, Locatelli F. (2011) Strategies to harness immunity against infectious pathogens after haploidentical stem cell transplantation. *Am J Transl Res.* 3(5):404–21.
16. Storek J, Dawson MA, Storer B, Stevens-Ayers T, Maloney DG, Marr KA, Witherspoon RP, Bensinger W, Flowers ME, Martin P, Storb R, Appelbaum FR, Boeckh M. (2001) Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood*, 97(11):3380–9.
17. Gustafson I, Lindblom A, Yun Z, Omar H, Engstrom L, Lewensohn-Fuchs I, Ljungman P, Broliden K. (2008) Quantification of adenovirus DNA in unrelated donor hematopoietic stem cell transplant recipients. *Journal of Clinical Virology*, 43(1):79–85.
18. Myers GD, Bollard CM, Wu M-F, Weiss H, Rooney CM, Heslop HE, Leen AM. (2007) Reconstitution of adenovirus-specific cell-mediated immunity in pediatric patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 39(11):677–86.
19. Alexandersson A, Koskenvuo M, Tiderman A, Lääperi M, Huttunen P, Saarinen-Pihkala U, Anttila V-J, Lautenschlager I, Taskinen M. (2019) Viral infections and immune reconstitution interaction after pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Infect Dis (Lond).*, 51(10):772-778
20. Ljungman P. *Viral Infections in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. Allogeneic Stem Cell Transplantation.* Springer, 2009: 505–32.
21. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J, Wingard JR, Young J-AH, Boeckh MJ, Boeckh MA, (2009) Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol Blood Marrow Transplant.*15(10):1143–238.

22. Lindemans CA, Leen AM, Boelens JJ. How I treat adenovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Blood*. 2010. 0;116(25):5476–85.
23. Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. (1971) New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet*. 1(7712):1253–7.
24. Zanella M-C, Cordey S, Kaiser L. (2020) Beyond Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus: a Review of Viruses Composing the Blood Virome of Solid Organ Transplant and Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Clin Microbiol Rev.*, 33(4).
25. Gardner SD.(1973) Prevalence in England of antibody to human polyomavirus (B.k.). *Br Med J.*, 1(5845):77–8.
26. Rziha HJ, Bornkamm GW, zur Hausen H. (1978) BK virus: I. Seroepidemiologic studies and serologic response to viral infection. *Med Microbiol Immunol.*, 165(2):73–81.
27. Portolani M, Marzocchi A, Barbanti-Brodano G, La Placa M.(1974) Prevalence in Italy of antibodies to a new human papovavirus (BK virus). *J Med Microbiol.*, 7(4):543–6.
28. Replogue MD, Storch GA, Clifford DB. (2001) BK Virus: A Clinical Review. *Clin Infect Dis.*, 33(2):191–202.
29. Rorije NMG, Shea MM, Gowri S, Hammond SP, Ho VT, Baden LR, Antin JH, Soiffer RJ, Marty FM. (2014) BK Virus Disease after Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Cohort Analysis. *Biol Blood Marrow Transplant.*, 20(4):564-70
30. Giraud G, Bogdanovic G, Priftakis P, Remberger M, Svahn B-M, Barkholt L, Ringden O, Winiarski J, Ljungman P, Dalianis T. (2006) The incidence of hemorrhagic cystitis and BK-viremia in allogeneic hematopoietic stem cell recipients according to intensity of the conditioning regimen. *Haematologica.*, 91(3):401–4.
31. Erard V, Kim HW, Corey L, Limaye A, Huang M-L, Myerson D, Davis C, Boeckh M. (2005) BK DNA viral load in plasma: evidence for an association with hemorrhagic cystitis in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Blood.*, 106(3):1130–2.
32. Erden A, Ateş C, Uslu A, Ataca Atilla P, Dolapçı I, Tekeli A, Topçuoğlu P. (2020) Prospective Analysis of Hemorrhagic Cystitis and BK Viremia in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Turk J Haematol.*, 37(3):186–92.
33. Ambalathingal GR, Francis RS, Smyth MJ, Smith C, Khanna R. (2017) BK Polyomavirus: Clinical Aspects, Immune Regulation, and Emerging Therapies. *Clin Microbiol Rev.*, 30(2):503–28.
34. Hebart H, Einsele H. (2004) Clinical aspects of CMV infection after stem cell transplantation. *Hum Immunol.*, 65(5):432–6.

35. Nichols WG, Corey L, Gooley T, Davis C, Boeckh M. (2002) High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection. *J Infect Dis.*, 185(3):273–82.
36. Boeckh M, Geballe AP. (2011) Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J Clin Invest.*, 121(5):1673–80.
37. Boeckh M, Gooley TA, Myerson D, Cunningham T, Schoch G, Bowden RA. (1996) Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment after allogeneic marrow transplantation: a randomized double-blind study. *Blood.*, 88(10):4063–71.
38. Boeckh M, Ljungman P. (2009) How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood.*, 113(23):5711–9.
39. Campos AB, Ribeiro J, Boutolleau D, Sousa H. (2016) Human cytomegalovirus antiviral drug resistance in hematopoietic stem cell transplantation: current state of the art. *Rev Med Virol.* 26(3):161–82.
40. Sarwari NM, Khoury JD, Hernandez CMR. (2016) Chronic Epstein Barr virus infection leading to classical Hodgkin lymphoma. *BMC Hematol.*, 16:19.
41. Kerr JR. (2019) Epstein-Barr virus (EBV) reactivation and therapeutic inhibitors. *Journal of Clinical Pathology.*, 72(10):651–8.
42. Esser JWJ van, Holt B van der, Meijer E, Niesters HGM, Trensche R, Thijsen SFT, Loon AM van, Frassoni F, Bacigalupo A, Schaefer UW, Osterhaus ADME, Gratama JW, Löwenberg B, Verdonck LF, Cornelissen JJ. (2001) Epstein-Barr virus (EBV) reactivation is a frequent event after allogeneic stem cell transplantation (SCT) and quantitatively predicts EBV-lymphoproliferative disease following T-cell-depleted SCT. *Blood.*, 98(4):972–8.
43. DelleMijn PL, Brandenburg A, Niesters HG, van den Bent MJ, Rothbarth PH, Vlasveld LT. (1995) Successful treatment with ganciclovir of presumed Epstein-Barr meningo-encephalitis following bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant.*, 16(2):311–2.
44. Kinch A, Oberg G, Arvidson J, Falk KI, Linde A, Pauksens K. (2007) Post-transplant lymphoproliferative disease and other Epstein-Barr virus diseases in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation after introduction of monitoring of viral load by polymerase chain reaction. *Scand J Infect Dis.*, 39(3):235–44.
45. Al Hamed R, Bazarbachi AH, Mohty M. (2020) Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disease (EBV-PTLD) in the setting of allogeneic stem cell transplantation: a comprehensive review from pathogenesis to forthcoming treatment modalities. *Bone Marrow Transplant.*, 55(1):25–39.
46. Reference GH. IFNG gene [Internet]. Genetics Home Reference.. Elérhető: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/IFNG>

47. Salerno F, Paolini NA, Stark R, von Lindern M, Wolkers MC. (2017) Distinct PKC-mediated posttranscriptional events set cytokine production kinetics in CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 114(36):9677–82.
48. Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, Li CR, Agha ME, Greenberg PD. (1992) Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science.*, 257(5067):238–41.
49. Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, Finch RJ, Watanabe KS, Thomas ED, Riddell SR. (1995) Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med.*, 333(16):1038–44.
50. Einsele H, Roosnek E, Rufer N, Sinzger C, Riegler S, Löffler J, Grigoleit U, Moris A, Rammensee H-G, Kanz L, Kleihauer A, Frank F, Jahn G, Hebart H. (2002) Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood.*, 99(11):3916–22.
51. Keenan RD, Ainsworth J, Khan N, Bruton R, Cobbold M, Assenmacher M, Milligan DW, Moss PA. (2001) Purification of cytomegalovirus-specific CD8 T cells from peripheral blood using HLA-peptide tetramers. *Br J Haematol.*, 115(2):428–34.
52. Doubrovina E, Oflaz-Sozmen B, Prockop SE, Kernan NA, Abramson S, Teruya-Feldstein J, Hedvat C, Chou JF, Heller G, Barker JN, Boulad F, Castro-Malaspina H, George D, Jakubowski A, Koehne G, Papadopoulos EB, Scaradavou A, Small TN, Khalaf R, Young JW, O'Reilly RJ. (2012) Adoptive immunotherapy with unselected or EBV-specific T cells for biopsy-proven EBV+ lymphomas after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood.*, 119(11):2644–56.
53. O'Reilly RJ, Prockop S, Hasan AN, Koehne G, Doubrovina E. (2016) Virus-specific T-cell banks for „off the shelf” adoptive therapy of refractory infections. *Bone Marrow Transplant.*, 1163–72.
54. Leen AM, Myers GD, Sili U, Huls MH, Weiss H, Leung KS, Carrum G, Krance RA, Chang C-C, Molldrem JJ, Gee AP, Brenner MK, Heslop HE, Rooney CM, Bollard CM. Monoculture-derived (2006) T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals. *Nat Med.*, 12(10):1160–6.
55. Saglio F, Hanley PJ, Bollard CM. (2014) The time is now: moving toward virus-specific T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation as the standard of care. *Cytotherapy.*, 16(2):149–59.
56. Heslop HE, Leen AM. (2013) T-cell therapy for viral infections. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.*, 2013:342–7.
57. Barrett AJ, Bollard CM. (2015) The coming of age of adoptive T-cell therapy for viral infection after stem cell transplantation. *Ann Transl Med.*, 3(5):62.

58. Vera JF, Brenner LJ, Gerdemann U, Ngo MC, Sili U, Liu H, Wilson J, Dotti G, Heslop HE, Leen AM, Rooney CM. (2010) Accelerated production of antigen-specific T cells for preclinical and clinical applications using gas-permeable rapid expansion cultureware (G-Rex). *J Immunother.*, 33(3):305–15.
59. MACS Cell Separation (brochure). Miltenyi Biotec. 2017;
60. Neuenhahn M, Albrecht J, Odendahl M, Schlott F, Dössinger G, Schiemann M, Lakshmipathi S, Martin K, Bunjes D, Harsdorf S, Weissinger EM, Menzel H, Verbeek M, Uharek L, Kröger N, Wagner E, Kobbe G, Schroeder T, Schmitt M, Held G, Herr W, Germeroth L, Bonig H, Tonn T, Einsele H, Busch DH, Grigoleit GU. (2017) Transfer of minimally manipulated CMV-specific T cells from stem cell or third-party donors to treat CMV infection after allo-HSCT. *Leukemia.*, 31(10):2161–71.
61. Kiecker F, Streitz M, Ay B, Cherepnev G, Volk H-D, Volkmer-Engert R, Kern F. (2004) Analysis of antigen-specific T-cell responses with synthetic peptides--what kind of peptide for which purpose? *Hum Immunol.*, 65(5):523–36.
62. Zandvliet ML, van Liempt E, Jedema I, Veltrop-Duits LA, Willemze R, Guchelaar H-J, Falkenburg JHF, Meij P. (2010) Co-ordinated isolation of CD8(+) and CD4(+) T cells recognizing a broad repertoire of cytomegalovirus pp65 and IE1 epitopes for highly specific adoptive immunotherapy. *Cytotherapy.*, 12(7):933–44.
63. Pande H, Baak SW, Riggs AD, Clark BR, Shively JE, Zaia JA. (1984) Cloning and physical mapping of a gene fragment coding for a 64-kilodalton major late antigen of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 81(15):4965–9.
64. Kern F, Bunde T, Faulhaber N, Kiecker F, Khatamzas E, Rudawski I-M, Pruss A, Gratama J-W, Volkmer-Engert R, Ewert R, Reinke P, Volk H-D, Picker LJ. (2002) Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individuals. *J Infect Dis.*, 185(12):1709–16.
65. Wills MR, Carmichael AJ, Mynard K, Jin X, Weekes MP, Plachter B, Sissons JG. (1996) The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol.*, 70(11):7569–79.
66. Tang J, Olive M, Pulmanusahakul R, Schnell M, Flomenberg N, Eisenlohr L, Flomenberg P. (2006) Human CD8+ cytotoxic T cell responses to adenovirus capsid proteins. *Virology.*, 350(2):312–22.
67. Veltrop-Duits LA, Heemskerk B, Sombroek CC, van Vreeswijk T, Gubbels S, Toes REM, Melief CJM, Franken KLMC, Havenga M, van Tol MJD, Schilham MW. (2006) Human CD4+ T cells stimulated by conserved adenovirus 5 hexon peptides recognize cells infected with different species of human adenovirus. *Eur J Immunol.*, 36(9):2410–23.

68. Bogedain C, Wolf H, Modrow S, Stuber G, Jilg W. (1995) Specific cytotoxic T lymphocytes recognize the immediate-early transactivator Zta of Epstein-Barr virus. *J Virol.*, 69(8):4872–9.
69. Precopio ML, Sullivan JL, Willard C, Somasundaran M, Luzuriaga K. (2003) Differential kinetics and specificity of EBV-specific CD4+ and CD8+ T cells during primary infection. *J Immunol.* 2003., 170(5):2590–8.
70. Blyth E, Clancy L, Simms R, Gaundar S, O’Connell P, Micklethwaite K, Gottlieb DJ. (2011) BK virus-specific T cells for use in cellular therapy show specificity to multiple antigens and polyfunctional cytokine responses. *Transplantation.*, 92(10):1077–84.
71. Campbell JDM. (2003) Detection and enrichment of antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells based on cytokine secretion. *Methods.*, 31(2):150–9.
72. Helms JB, Rothman JE. (1992) Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature.*, 360(6402):352–4.
73. Ortolani C. Antigens. In: *Flow Cytometry of Hematological Malignancies*. John Wiley & Sons, Ltd; 2011. o. 1–157.
74. Weissman AM, Hou D, Orloff DG, Modi WS, Seuanez H, O’Brien SJ, Klausner RD. (1988) Molecular cloning and chromosomal localization of the human T-cell receptor zeta chain: distinction from the molecular CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 85(24):9709–13.
75. Valitutti S, Müller S, Salio M, Lanzavecchia A. (1997) Degradation of T Cell Receptor (TCR)–CD3- ζ Complexes after Antigenic Stimulation. *J Exp Med.*, 185(10):1859–64.
76. Xiong J, Armato MA, Yankee TM. (2011) Immature single-positive CD8+ thymocytes represent the transition from Notch-dependent to Notch-independent T-cell development. *Int Immunol.*, 23(1):55–64.
77. Uckun FM. (1990) Regulation of human B-cell ontogeny. *Blood.*, 76(10):1908–23.
78. Icheva V, Kayser S, Wolff D, Tuve S, Kyzirakos C, Bethge W, Greil J, Albert MH, Schwinger W, Nathrath M, Schumm M, Stevanovic S, Handgretinger R, Lang P, Feuchtinger T. (2013) Adoptive Transfer of Epstein-Barr Virus (EBV) Nuclear Antigen 1-Specific T Cells As Treatment for EBV Reactivation and Lymphoproliferative Disorders After Allogeneic Stem-Cell Transplantation. *Journal of Clinical Oncology.*, 31(1):39–48.
79. Priesner C, Esser R, Tischer S, Marburger M, Aleksandrova K, Maecker-Kolhoff B, Heuft H-G, Goudeva L, Blasczyk R, Arseniev L, Köhl U, Eiz-Vesper B, Klöß S. (2016) Comparative Analysis of Clinical-Scale IFN- γ -Positive T-Cell Enrichment Using Partially and Fully Integrated Platforms. *Frontiers in Immunology.*, 7(393).

80. Kumaresan P, Figliola M, Moyes JS, Huls MH, Tewari P, Shpall EJ, Champlin R, Cooper LJM. (2015) Automated Cell Enrichment of Cytomegalovirus-specific T cells for Clinical Applications using the Cytokine-capture System. *J Vis Exp.*, (104):e52808.
81. Bunos M, Hümmer C, Wingenfeld E, Sorg N, Pfirrmann V, Bader P, Seifried E, Bönig H. (2015) Automated isolation of primary antigen-specific T cells from donor lymphocyte concentrates: results of a feasibility exercise. *Vox Sang.*, 109(4):387–93.
82. Mukaka M. (2012) A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J.*, 24(3):69–71.
83. Pello OM, Innes AJ, Bradshaw A, Finn S-A, Uddin S, Bray E, Olavarria E, Apperley JF, Pavlů J.(2017) BKV-specific T cells in the treatment of severe refractory haemorrhagic cystitis after HLA-haploidentical haematopoietic cell transplantation. *Eur J Haematol.*, 98(6):632–4.
84. Peggs KS, Thomson K, Samuel E, Dyer G, Armoogum J, Chakraverty R, Pang K, Mackinnon S, Lowdell MW. (2011) Directly Selected Cytomegalovirus-Reactive Donor T Cells Confer Rapid and Safe Systemic Reconstitution of Virus-Specific Immunity Following Stem Cell Transplantation. *Clinical Infectious Diseases.*, 52(1):49–57.
85. Feuchtinger T, Opherk K, Bethge WA, Topp MS, Schuster FR, Weissinger EM, Mohty M, Or R, Maschan M, Schumm M, Hamprecht K, Handgretinger R, Lang P, Einsele H. (2010) Adoptive transfer of pp65-specific T cells for the treatment of chemorefractory cytomegalovirus disease or reactivation after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood.*, 116(20):4360–7.
86. Sester M, Sester U, Alarcon Salvador S, Heine G, Lipfert S, Girndt M, Gärtner B, Köhler H. (2002) Age-related decrease in adenovirus-specific T cell responses. *J Infect Dis.*, 185(10):1379–87.
87. Schwanninger A, Weinberger B, Weiskopf D, Herndler-Brandstetter D, Reitingner S, Gassner C, Schennach H, Parson W, Würzner R, Grubeck-Loebenstien B. (2008) Age-related appearance of a CMV-specific high-avidity CD8+ T cell clonotype which does not occur in young adults. *Immun Ageing.*, 5:14.
88. Jackson SE, Sedikides GX, Okecha G, Poole EL, Sinclair JH, Wills MR. (2017) Latent Cytomegalovirus (CMV) Infection Does Not Detrimentally Alter T Cell Responses in the Healthy Old, But Increased Latent CMV Carriage Is Related to Expanded CMV-Specific T Cells. *Front Immunol.*, 8:733.
89. Zhong S, Zheng H-Y, Suzuki M, Chen Q, Ikegaya H, Aoki N, Usuku S, Kobayashi N, Nukuzuma S, Yasuda Y, Kuniyoshi N, Yogo Y, Kitamura T. (2007) Age-Related Urinary Excretion of BK Polyomavirus by Nonimmunocompromised Individuals. *J Clin Microbiol.*, 45(1):193–8.

90. Roy DC, Lachance S, Cohen S, Delisle J, Kiss T, Sauvageau G, Busque L, Ahmad I, Bernard L, Bambace N, Boumédine RS, Guertin M, Rezvani K, Mielke S, Perreault C, Roy J. (2019) Allogeneic T-cell immunotherapy after haploidentical haematopoietic stem cell transplantation without severe acute graft-versus-host disease (GVHD) in the absence of GVHD prophylaxis. *Br J Haematol.*, 186(5):754–66.
91. Lewalle P, Triffet A, Delforge A, Crombez P, Selleslag D, De Muynck H, Bron D, Martiat P. (2003) Donor lymphocyte infusions in adult haploidentical transplant: a dose finding study. *Bone Marrow Transplant.*, 31(1):39–44.

10. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezéshez kapcsolódó közlemények

Tasnády Sz, Karászi É, Szederjesi A, Bihari G, Juhász Z, Hardi A, Kriván G, Kállay K, Reményi P, Sinkó J, Mikala G, Réti M, Masszi T (2020) Identification of the best-suited donor for generating virus-specific T cells. *Vox Sang.*, 115(1):18–26.

Bátai Á, Reményi P, Réti M, Barta A, Gopcsa L, Lengyel L, Torbágyi É, Csukly Z, Karászi É, Tordai A, Andirkovics H, Balassa K, Tasnády Sz, Masszi T. (2017) Allogén vérképzőőssejt-átültetés Magyarországon. *Orv Hetil.* 158(8):291–7

Kállay K, Kassa C, Réti M, Karászi É, Sinkó J, Goda V, Stréhn A, Csordás K, Horváth O, Szederjesi A, Tasnády Sz, Hardi A, Kriván G. (2018) Early Experience With CliniMACS Prodigy CCS (IFN-gamma) System in Selection of Virus-specific T Cells From Third-party Donors for Pediatric Patients With Severe Viral Infections After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J Immunother.*, 41(3):158–63.

Az értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

Mikala G, Cegledi A, Csacsovski O, Petö M, & Szemlaky Zs, Udvardy M, Tasnády Sz, Kozma A, Reményi P, Vályi-Nagy I (2018) Minimal residual disease negativity after molecularly targeted venetoclax therapy of secondary plasma cell leukemia with translocation T(11;14) 2018, konferencia kiadvány: 23rd Congress of the European Hematology Association At: HemaSphere., 2(1) 994

Rendeiro AF, Krausgruber T, Fortelny N, Zhao F, Penz T, Farlik M, Schuster LC, Neme A, Tasnády S, Réti M, Mátrai Z, Alpár D, Bödör C, Schmidl C, Bock C. (2020) Chromatin mapping and single-cell immune profiling define the temporal dynamics of ibrutinib response in CLL. *Nature Communications.*, 11(1):577.

Gángó A, Alpár D, Galik B, Marosvári D, Kiss R, Fésüs V, Aczél D, Eyüpoğlu E, Nagy N, Nagy Á, Krizsán S, Reiniger L, Farkas P, Kozma A, Ádám E, Tasnády S, Réti M, Matolcsy A, Gyenesei A, Mátrai Z, Bödör C. (2020) Dissection of subclonal evolution by temporal mutation profiling in chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib. *Int J Cancer.*, 146(1):85–93.

11. Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Masszi Tamás Professor Úrnak, hogy felvett a Szent László Kórház áramlási citometriás laboratóriumába, és kezdetektől fogva támogatta tudományos tevékenységemet, tapasztalatával, ötletekkel, tanácsokkal, források biztosításával, és később a témavezetői feladatokat is elvállalta, bokros teendői ellenére is mindig biztosított számomra konzultációs lehetőségeket.

Az áramlási citometriás laboratórium munkatársainak, precíz, pontos munkavégzésükért, sokszor éjszakába, ügyeletbe nyúló fáradozásaikért. Juhász Zsófinak, Nagy Ginette-nek, Jelinek Áginak, akik a legtöbb időt töltötték el a VST sejtek mérésével, Dr. Udvardy Miklósnak, aki sokat formált a tudományos szemléletemen, gondolkodásmódomon. és Dr. Szánthó Eszternek, aki a statisztikai metodikák kapcsán adott kitűnő tanácsokat.

Köszönöm a Hematológiai és Óssejt Transzplantációs osztály valamennyi orvosának és ápolónőjének, ápolójának és munkatársának kiváló munkáját, segítségét. Szeretném kiemelni Dr. Mikala Gábort, Dr. Mátrai Zoltánt és Dr. Farkas Zitát. akik mentoráltak, és nagyban hozzájárultak a tudományos életben való szereplésemhez, valamint Dr. Fodor Anikót, aki a klinikai adatokkal kapcsolatban nyújtott segítséget.

Különös tekintettel köszönettel tartozom az Apherezis Részleg, és az őssejt labor munkatársainak, akik a sejtek előkészítését, feldolgozását végezték. Hálával tartozom a részleg vezetőjének, Dr. Réti Marienne-nek, aki kulcsszerepet játszott a magyarországi graft manipulációs technikák és a vírus-specifikus T sejt terápiák beállításában, meghonosításában. Az ő tanácsait is bátran kérhettem, segített felkészülni az előadásokra, cikkek írása során is sokszor nyújtott segítséget.

A VST terápiák másik kulcsfigurája Dr. Kriván Gergely, és gyermekhematológus kollégái, külön kiemelve Dr. Kállay Krisztiánt, aki a VST terápiák klinikai hatásának vizsgálatával nagyban hozzájárult a dolgozat megszületéséhez.

És végül, külön szeretnék köszönetet mondani Dr. Karászi Évának. Az áramlási citometriás vizsgálatok metodikáját, értékelését mellette kezdtem el tanulni. Ő volt az,

aki az értekezés alapját jelentő vizsgálati metodikát beállította, kezdetekben ellenőrizte, javította, ahol szükséges volt. Segítette a tudományos munkámat, poszterek, előadások, cikkek írásában mindig támaszkodhattam rá, sokszor éjszakába nyúlóan javította, kommentálta, bővítette a kézirataimat, csakúgy, mint ezt a dolgozatot. Nem lehetek elég hálás neki.