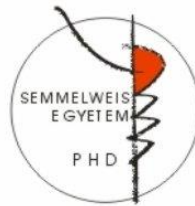


A Vírus specifikus T-sejt terápiakhoz kötődő
áramlási citometriás vizsgálatokból származó
tapasztalatok

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

1.Bevezetés

A haematopoetikus vérképző őssejt átültetés (HSCT) már régóta alkalmazott módszer egyes vérképző szerveket érintő szerzett és veleszületett betegségek kezelésére. Megvizsgálva a transzplantációval összefüggő mortalitást, 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.

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. A részlegünkön négy különböző vírus (ADV, BKV, CMV, EBV) elleni terápiára került sor.

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

2. Célkitűzések

A vírus specifikus T sejtekkel történő kezelés 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 összejtet 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.

Adataink feldolgozásával célul tűztük ki, hogy:

1. Megvizsgáljuk, milyen az egészséges magyar lakosság körében a keringő vírus specifikus T sejtek átlagos aránya a perifériás vérben, és a vizsgált egyének mekkora hányada alkalmas donornak. Mindezt korcsoporti bontásban is áttekintjük.
2. A rendelkezésünkre álló vírusszerológiai adatokkal összevetve a donorszűrés eredményeket, összehasonlítjuk az általunk alkalmazott módszer pontosságát a napi rutinban használt vizsgálattal.

3. 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

4. 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 sejt felszínen 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

Páciensek: a VST terápia recipiensei legtöbb esetben olyan, többnyire őssejt transzplantáción átesett betegek voltak, akinél a konvencionális antivirális terápiás eljárások nem voltak elégségesek.

A donorok: a VST kezelés indikációjának felállítása után az első lépés a megfelelő donor kiválasztása. A legideálisabb donor természetesen az eredeti, HLA egyezést mutató őssejtdonor lenne. Ez a legtöbb esetben több akadályba ütközött, ezért 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 sejtszelekciónak. 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.

Az átfedő peptidkönyvtárak: a VST-k szelekciónak első lépésője, hogy a sejteket olyan stimulussal tegyük ki, amelyre csak és kizárólag azok a T sejtek reagálnak, melyek specifikusak az adott vírus fehérjére. Ennek az általunk használt eszköze egy átfedő peptidkönyvtár (peptivátor), mely tulajdonképpen az adott vírusra jellemző aminosav láncokat tartalmaz.

A donorszűrés folyamata: a donorszűrés során a perifériás vérsejtek peptivátorral való ex vivo stimulálása történik,

majd áramlási citometriás módszerrel megmérjük az INF- γ termelő CD4+ és CD8+ T sejtek arányát az adott populációban. 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 INF- γ termelő sejtek aránya elérte a 0,01%-ot. A donor kiválasztásnál figyelembe vettük a rokonsági fokot, az általános egészségi állapotot, és a perifériás vénák elérhetőségét.

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

A vírus-specifikus T sejtek szelekciója: A vírus specifikus T sejtek azonosítása és szeparálása citokin termelésük alapján történik egy speciális eljárással, egy automatizált, zárt rendszerű készülékben, melynek során a szekretált citokint a sejtfelszínhez kötik. A szelekció során az apheresissel legyűjtött sejt készítményben lévő T sejtek a peptivátor hatására citokineket kezdenek termelni, mely sejteket így immunomagnetikus gyöngyökkel jelölhetünk, és elválaszthatjuk a többi sejttől, egy VST dús sejttömeget

létrehozva, mely a recipiensnek beadva segíti a vírusinfekció elleni küzdelmet.

A végtermékek előállítását követően három frakcióból történik flow cytometriás vizsgálat. Ezek a kontroll (QC), a pozitív és a negatív frakciók. Mindegyik frakcióból ugyanazok a vizsgálatok kerülnek elvégzésre.

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). Ez az egyik legfontosabb mérőszám. Azok a T sejtek, melyek nem termelnek IFN- γ -t, potenciálisan GvHD-t okozhatnak (alloreaktív T sejtek).

4. Eredmények

A vizsgált időszakban 34 esetben volt szükség CMV specifikus T sejtekre, 26 esetben ADV, 16 esetben EBV és 7 esetben BK vírus elleni T sejtekre.

Donorszűréssel kapcsolatos eredmények: 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 potenciális donorok többsége, 351

fő volt férfi, és 285 nő. Az átlag életkor 39,3 év a férfiaknál, 39,3 év a nőknél.

A potenciális donorokat hat korcsoportra osztottuk: 20 évnél fiatalabb, 21 és 60 év között tíz évente egy-egy csoport, és a hatodik a 61 év fölöttiek.

A donorjelöltek körében, minden vírust és minden T sejt szubpopulációt átlagolva a VST arányt 0,081%-nak kaptuk. A legmagasabb arányban a CMV specifikus T sejteket találtuk a potenciális donorok vérében, míg BKV esetén volt a legalacsonyabb a keringő VST arány. Az eredmények ismeretében megvizsgáltuk azt is, hogy a szűrt donorjelöltek közül, 0,01% vágóértékkel számolva a résztvevők hány százaléka volt alkalmas donornak. CMV esetében ez a jelentkezők 78,3%-a. ADV esetében 68,9%-a, EBV specifikus T sejtek donációjára a jelentkezők 56,3%-a mutatkozott alkalmasnak, míg BKV esetében ez az arány 41,7% volt. Korcsoportonként vizsgáltuk a perifériás vérben a T sejt szubpopulációkon belül a detektálható VST sejtek arányát, és a potenciális donorok százalékos arányát is. CMV esetén a keringő VST arány az életkorral emelkedett, míg EBV és ADV esetében az életkorral csökkenő tendenciát találtunk.

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.

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

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 sejtet. Ezt követte az ADV elleni T sejtek száma, majd az EBV specifikus T sejtek száma. Legkisebb mennyiségben a BK vírus ellen tudunk T sejteket generálni. A testsúlykilogrammokra számítva, az összes beadott VST sejt átlaga $3,66 \times 10^4$ sejt/kg.

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. Az összes készítményt figyelembe véve az átlagos, nem vírus specifikus (potenciálisan alloreaktív) T-sejt szám $9,95 \times 10^5$ volt ($1,67 \times 10^4$ /Kg).

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, míg az adenovírus esetében 45-60%, BK vírus esetében 40-50% tartományban volt a készítmények tisztasága.

Az „over-feeding” vizsgálata: Az over-feeding angol kifejezés által fedett jelenség olyan esetben jöhet létre, mikor a szekretált citokinek mennyisége nagyon magas, így potenciálisan nem-VST sejtek szelekcióját okozhatják. Átlagosan a CD3- élő sejtek 18,35%-ban mutattak IFN- γ pozitivitást, ez $3,5 \times 10^5$ sejtet jelent. 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. Vizsgálataink nem igazoltak ilyen korrelációt, azaz az általunk alkalmazott rendszerben nem kell számolnunk az over-feeding hatással.

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 sejtkészítmény tisztaságával, és a sejtkészítményben lévő, IFN- γ termelő T sejtek mennyiségével. Az összevethetőséget az adja, hogy a szelekció kiindulási frakciója mindig azonos, 1×10^9 sejtet tartalmazott. A vérben keringő VST arány korrelációt mutatott a target frakció VST tartalmával, a tisztasággal összevetve azonban nem találtunk összefüggést.

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 terápiában részesült, standard antivirális terápiára nem, vagy nem jól reagáló páciensek 11%-a. Mindez azt mutatja, hogy az általunk vizsgált betegcsoport tagjai a VST terápiának köszönhetően, a korábbi kezelések szuboptimális hatása miatt kialakult súlyosabb vírusreaktívációt közel az irodalomban leírt arányban győzték le.

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. Statisztikailag nem szignifikáns ($p=0.793$) 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.

Következtetések

- Kimutattuk, hogy a keringő VST arányok a CMV esetében voltak a legmagasabbak. Az EBV és ADV VST eredmények köztes értékeket adtak, BKV elleni vírus specifikus T sejt arány volt a legalacsonyabb.
- 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.
- 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. Vírusonkénti bontásban a donornak alkalmas egyének aránya a szűrt donorjelöltek között CMV esetén volt a legmagasabb (78%) és BKV esetén a legalacsonyabb (41%)
- 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.
- 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 sejttszámot CMV készítmények esetén találtunk, legalacsonyabbat BKV esetén. Méréseink alapján a CMV és EBV elleni készítményekben a CD8+ VST sejtek domináltak, míg ADV és BKV elleni végtermékekben a CD4+ VST sejtek túlsúlyát igazoltuk. 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.

- 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.
- Az „over-feeding” jelenséget vizsgálva analizáltuk a készítményben a CD3-/IFN- γ + nem-T sejtek arányát. 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.

- 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:

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.

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.

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 szekrécia nem okoz aspecifikus IFN- γ kötődést egyéb sejtek felszínén (over-feeding), így ez nem rontja a készítmény tisztaságát.

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 sejtszámú készítmény volt előállítható, így az értekezésben bemutatott laboratóriumi módszer a klinikai gyakorlatban jól használható a szelekciós eljárások során.

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, Csacsovszki 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, Nemeš 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, Eyüpoglu 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.