

Herstellung und Anwendung antiviraler T-Zellen von verwandten und unverwandten Third-Party-Spendern zur Behandlung viraler Komplikationen in immungeschwächten Patienten und Prävention schwerer Verläufe bei künftigen Pandemien

Zusammenfassung

Infektionen oder Reaktivierungen durch persistierende und lytische Viren stellen in immungeschwächten Patienten schwerwiegende Komplikationen dar. Der adoptive Transfer virusspezifischer T-Zellen eines geeigneten Spenders ist eine wirksame Strategie zur raschen Wiederherstellung der antiviralen T-Zell-vermittelten Immunität im Empfänger, die wenig toxisch ist und kein erhöhtes Risiko der Entwicklung einer Graft-versus-Host Erkrankung birgt. Die Coronavirus-Pandemie 2019, ausgelöst durch SARS-CoV-2-Infektionen (engl. Severe-Acute-Respiratory-Syndrome-Coronavirus-Type-2), zeigte ebenfalls, dass der Einsatz virusspezifischer T-Zellen von rekonvaleszenten Spendern schwere Verläufe verhindern kann. Die Entwicklung und Implementierung von Third-Party-Spenderregistern (engl. Third-Party Donor, TPD) und Zellbanken ermöglichen eine Identifizierung potenzieller Human-Leukozyten-Antigen (HLA) (teil-)passender Spender und die schnelle Bereitstellung virusspezifischer T-Zellen zur klinischen Anwendung.

Summary

Infections or reactivations due to persistent and lytic viruses present serious complications in immunocompromised patients. Adoptive transfer of virus-specific T cells (VSTs) from a suitable donor is an effective strategy to rapidly restore antiviral T cell immunity in the recipient without toxicity or increased risk of developing Graft-versus-Host Disease. The 2019 coronavirus pandemic, caused by severe-acute-respiratory-syndrome-coronavirus-type-2 (SARS-CoV-2) infections, also demonstrated that VSTs from convalescent donors can prevent severe disease courses. Development and implementation of third-party donor (TPD) registries and cell banks enable rapid identification of potential donors and the provision of (partially) human leukocyte antigen (HLA)-matched VSTs for clinical application.

EINLEITUNG

Nach allogener hämatopoetischer Stammzell- (HSZT) oder solider Organtransplantation (SOT) kommt es häufig zu schweren und lebensgefährlichen viralen Komplikationen. Hierbei handelt es sich mehrheitlich um Infektionen oder Reaktivierungen durch persistierende Herpesviren, wie dem humanen Zytomegalievirus (engl. Cytomegalovirus, CMV), dem Epstein-Barr-Virus (EBV) und dem humanen Herpesvirus 6 (HHV6) sowie durch lytische Viren, wie dem humanen Adenovirus (AdV) und dem humanen Polyomavirus Typ-1 (HPyV-1, BKPyV, BKV). Zahlreiche Studien und Fallberichte zeigen, dass das Ausmaß der Infektion und das Outcome entscheidend von dem Grad und der Dauer der Immunsuppression sowie der Geschwindigkeit der immunologischen Rekonstitution abhängig sind¹⁻⁴. Zudem ist die T-Zell-Immunität für eine wirksame und nachhaltige Kontrolle der Viren entscheidend^{5,6}.

Die beiden wichtigsten Strategien der CMV-Prävention bei transplantierten Patienten sind die antivirale Prophylaxe und die präemptive Therapie (engl. Preemptive Therapy, PET)⁷. Im Rahmen einer Transplantation werden bei Hochrisikokonstellationen routinemäßig antivirale Medikamente zur Prophylaxe oder Behandlung von Virusinfektionen und Reaktivierungen verabreicht. Die PET hingegen umfasst die routinemäßige Überwachung der CMV-Replikation im Vollblut oder Plasma mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) und die Einleitung einer antiviralen Therapie, wenn eine CMV-Virämie auftritt^{7,8}. In der Vergangenheit wurden im Rahmen von PET bei Auftreten von CMV-Infektionen und CMV-Erkrankungen Ganciclovir, Valganciclovir oder Foscarnet eingesetzt, um eine längere Medikamentenexposition zu vermeiden und so die unerwünschte myelosuppressive oder nephrotoxische Wirkung dieser Mittel zu reduzieren⁹. Es hat sich jedoch gezeigt, dass die PET das Risiko einer Neutropenie und einer akuten Nieren-

schädigung erhöht, was letztlich das Sterberisiko und die Inanspruchnahme von Gesundheitsressourcen erhöht^{8,10}. Seit der Zulassung von Letemovir für die Prophylaxe von CMV-Infektionen bei CMV-seropositiven erwachsenen HSZT-Empfängern durch die FDA (engl. Food and Drug Administration) im Jahr 2017 und die EMA (engl. European Medicines Agency) im Jahr 2018 ist diese bei erwachsenen allogenen HSZT-Empfängern, die CMV-seropositiv sind und/oder einen CMV-seropositiven Spender haben, zum Behandlungsstandard geworden¹¹. Allerdings wurde nach Behandlungsende ab Tag 100 nach HSZT eine erhöhte Inzidenz der späten CMV-Reaktivierung und CMV-bedingten Sterblichkeit beobachtet¹². In einer klinischen Phase-II/III-Studie an HSZT- und SOT-Patienten mit und ohne resistenter CMV-Infektion konnten kürzlich vielversprechende Ergebnisse mit dem antiviralen Medikament „Maribavir“, welches die CMV UL97-Proteinkinase hemmt, in Form einer Beseitigung der CMV-Virämie sowie Symptomkontrolle erzielt werden^{13,14}.

In der Behandlung der EBV-assoziierten Lymphoproliferativen Erkrankung nach Transplantation (engl. Post-Transplant Lymphoproliferative Disease, PTLD) und anderer viraler Komplikationen ist die Reduzierung der Immunsuppression der erste Behandlungsschritt. Allerdings ist dieser Ansatz häufig mit einem erhöhten Risiko des Transplantatversagens verbunden. Rituximab, ein zytolytischer monoklonaler anti-CD20-Antikörper, gilt nach den Ergebnissen mehrerer klinischer Phase-II-Studien zusammen mit Immunsuppressionsreduktion heute als Standardtherapie bei einer Vielzahl von CD20-positiven B-Zellmalignomen, einschließlich EBV-assoziiertes Lymphome².

Zu den lebensbedrohlichen viralen Komplikationen in nicht-transplantierten immunsupprimierten und immundefizienten Patienten zählt die progressive multifokale Leukenzephalopathie (engl. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy, PML), verursacht durch das humane Polyomavirus Typ-2 (HPyV-2, JCPyV, JCV). Zu den Risikogruppen zählen insbesondere Patienten, die mit dem Humanes Immundefizienz-Virus (HIV) infiziert sind, eine lymphoproliferative Erkrankung haben, sowie Patienten, die eine immunsuppressive Therapie z. B. aufgrund einer Autoimmunerkrankung (z. B. Multiple Sklerose) erhalten. Es gibt derzeit keine etablierten Behandlungsmöglichkeiten, um das Fortschreiten dieser Krankheit zu stoppen oder zu verlangsamen. Das Outcome hängt dabei im Wesentlichen davon ab, wie schnell die körpereigene Immunantwort, die bei PML-Patienten in der Regel beeinträchtigt ist, wiederhergestellt werden kann¹⁵.

Während der Coronavirus-Pandemie 2019 lernten wir,

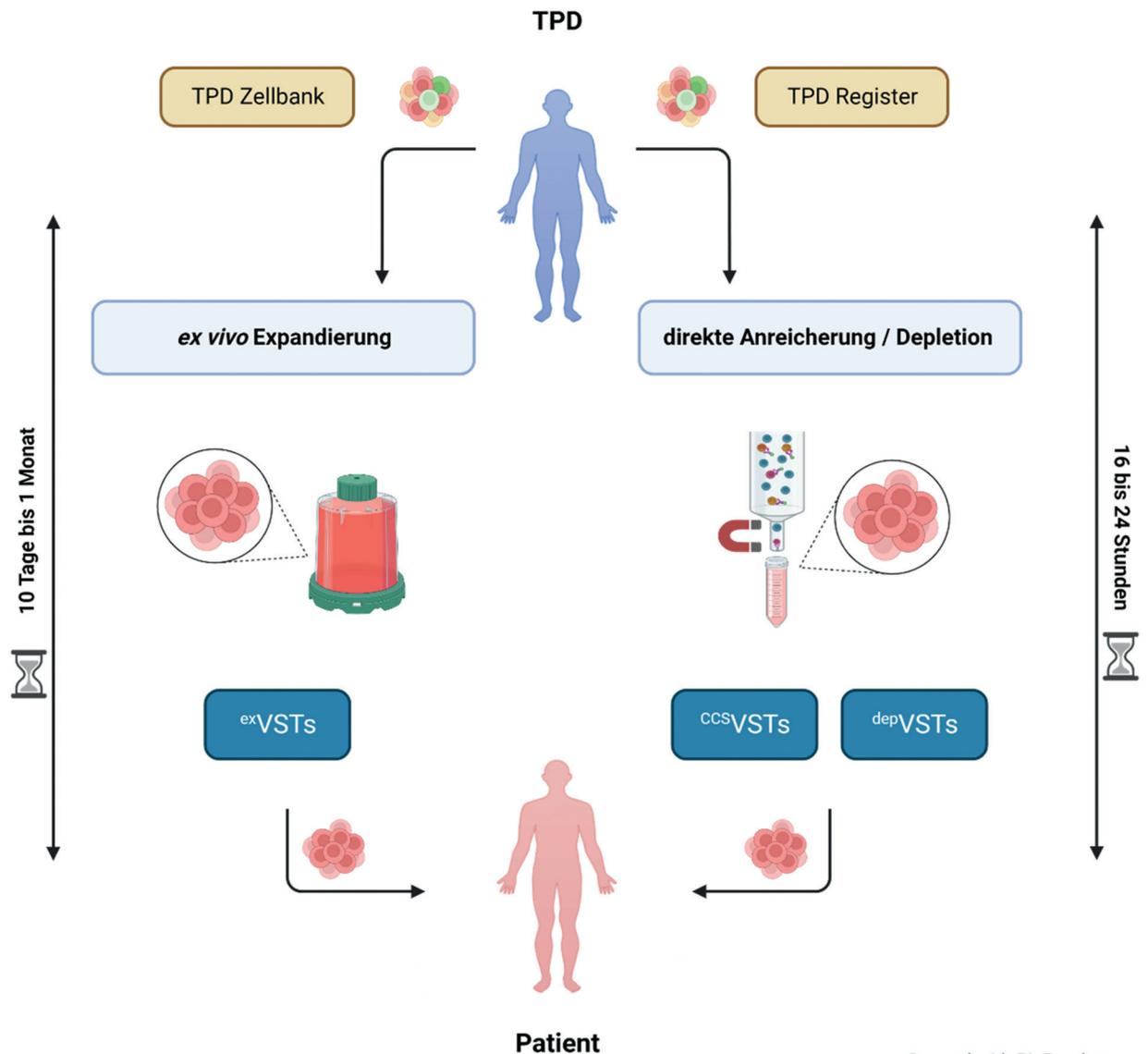
dass Virusinfektionen durch SARS-CoV-2 (engl. Severe-Acute-Respiratory-Syndrome-Coronavirus-Type-2) hauptsächlich in immungeschwächten Personen zu schweren Verläufen und/oder Spätfolgen der Coronavirus-Krankheit-2019 (engl. Coronavirus Disease 2019, COVID-19) führen können^{16,17}. Diese Patienten zeigten in der Regel eine Lymphopenie, eine Störung des T-Zellkompartiments und eine Erschöpfung der CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen^{18–21}.

Aufgrund der zunehmend auftretenden Resistenzen und der erheblichen Nebenwirkungen der First-Line- und Second-Line-Therapien wird intensiv nach Alternativbehandlungen und Präventionsmöglichkeiten viraler Infektionen und Reaktivierungen gesucht^{6,22,23}. Der adoptive Transfer virusspezifischer T-Zellen (VSTs) stellt hierbei eine effektive Therapie dar^{24–26}.

Da für Patienten, die ein allogenes Nabelschnurblut-Transplantat (engl. Cord Blood, CB), ein solides Organ oder ein Transplantat von einem seronegativen Spender erhalten, der Spender in der Regel nicht als T-Zell-Spender zur Verfügung steht oder geeignet ist, gewinnen T-Zell-Produkte von verwandten und unverwandten Third-Party-Spendern (engl. Third-Party Donor, TPD) immer mehr an Bedeutung.

HERSTELLUNG UND ANWENDUNG ANTIVIRALER T-ZELLEN

In nichtmanipulierten Spenderlymphozyten (engl. Donor Lymphocyte Infusion, DLI) von seropositiven HSZT-Spendern ist der Anteil an VSTs im Vergleich zum Anteil alloreaktiver naiver T-Zellen gering. Bei der Verabreichung einer DLI besteht daher ein hohes Risiko der Entwicklung einer Graft-versus-Host Erkrankung (engl. Graft-versus-Host Disease, GvHD)²⁷. Aus diesem Grund werden zur Generierung von VST-Präparaten zunehmend Verfahren eingesetzt, die eine gezielte Anreicherung virusspezifischer Gedächtnis T-Zellen oder die Depletion naiver T-Zellen ermöglichen^{28–34}. Um eine gute Wirksamkeit mit möglichst geringem GvHD Risiko zu erreichen, wird eine hohe Übereinstimmung in den Humanen-Leukozyten-Antigen-(HLA) Merkmalen zwischen Empfänger und Spender angestrebt. Dabei werden vorzugsweise Stammzellspender, Familienspender und unverwandte Spender in die engere Auswahl einbezogen, welche eine Übereinstimmung von mindestens $\geq 3/6$ HLA-Merkmalen (HLA-A,-B, -DR) zum Patienten besitzen^{26,35–40}. Klinische Studien und Behandlungsergebnisse zur adoptiven T-Zell-Therapie zeigen, dass der Transfer von VSTs eines gesunden immunkompetenten seropositiven Spenders neben der



Created with BioRender.com

Abbildung 1: Verfahren der GMP-konformen Herstellung von Third-Party VSTs. Zur GMP (engl. Good Manufacturing Practice) -konformen Herstellung virus-spezifischer T-Zellen (VSTs) aus dem peripheren Blut (Leukapherese oder Vollblut) eines verwandten oder unverwandten Third-Party Spenders (engl. Third-Party Donor, TPD) wurden Verfahren zur *ex vivo* Expandierung (*exVSTs*), zur direkten Anreicherung mittels CCS (engl. Cytokine Capture System) Interferon- (IFN) gamma (*CCSVSTs*), und zur Depletion der naiven T-Zellen (*depVSTs*) etabliert. TPD Register und TPD Zellbanken ermöglichen die schnelle Bereitstellung von VSTs für die individuell auf den Patienten abgestimmte klinische Anwendung. Bei der Herstellung von *exVSTs* werden mono- oder multivirusspezifische T-Zellen durch die Stimulation mit einem oder mehreren Antigen/en über eine Expandierungsdauer von zehn Tagen bis zu einem Monat generiert. TPD Zellbanken mit kryokonservierten *exVSTs* wurden etabliert um den *exVST* Bereitstellungsprozess zu beschleunigen. Die Herstellung von *CCSVSTs* mittels CCS IFN-gamma erlaubt die direkte Anreicherung mono- oder multivirusspezifischer T-Zellen nach kurzer Stimulation mit einem oder mehreren Antigen/en innerhalb von 12–16 Stunden nach Leukapherese. Bei der direkten Depletion werden naive T-Zellen aus dem peripheren Blut innerhalb von 16 bis 24 Stunden nach Leukapherese depletiert um gleichzeitig T-Zellen mit breiter antiviraler Spezifität im Produkt anzureichern.

direkten Eliminierung der infizierten Zellen eine beschleunigte und verstärkte Rekonstitution der zellulären Immunantwort des Patienten ermöglicht^{24,36,40–50}. Die Etablierung zeitsparender Protokolle zur Spenderidentifizierung und zur Bereitstellung klinisch anwendbarer VSTs sind ein wichtiger Aspekt, um die schnelle und effektive Behandlung im immungeschwächten Patienten zu ermöglichen.

Im Folgenden werden die Herstellung und der Einsatz von T-Zell-Produkten von verwandten oder unverwandten TPDs für die klinische Anwendung durch (1) *ex vivo* Expandierung (*exVSTs*), (2) magnetischer Anreicherung mittels CCS (engl. Cytokine Capture System) Interferon- (IFN) gamma (*CCSVSTs*) und (3) Depletion der naiven T-Zellen (*depVSTs*) näher beschrieben (**Abbildung 1**). Für alle

drei Verfahren sind die Seropositivität des Spenders (für Viren mit verfügbaren serologischen Tests), eine ausreichende Ausgangsfrequenz der entsprechenden virus-spezifischen zentralen Gedächtnis-T-Zellen (eng. Central Memory T cells, T_{CM}) und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (eng. Effector Memory T cells, T_{EM}) im peripheren Blut des potenziellen T-Zell-Spenders Voraussetzung.

HERSTELLUNG UND KLINISCHE ANWENDUNG VON $exVSTs$

Zur Generierung mono- oder multivirusspezifischer $CD4^+$ und/oder $CD8^+$ T-Zellen mittels *ex vivo* Expandierung werden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (eng. Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs) als Ausgangsmaterial verwendet^{24,47,51–54}. Die Verwendung von Peptidpools als Stimulanz ist eine attraktive Option zur Herstellung der $exVSTs$, da diese in guter Herstellungspraxis- (eng. Good Manufacturing Practice, GMP) Qualität kommerziell verfügbar sind und die Generierung von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen mit hoher Spezifität für mehrere Epitope des gewünschten viralen Antigens ermöglichen^{30,34,47,54,55}. Durch die Optimierung der Kulturbedingungen, z. B. mittels Verwendung von geeigneten Zytokinkombinationen (insbesondere Interleukin (IL)-7 und -15) und Bioreaktoren, konnten unter anderem die Expansionsdauer von einem bis drei Monaten auf sieben bis zwölf Tage reduziert und die Ausbeute der generierten $exVSTs$ gesteigert werden^{47,51,54–57}.

Um den $exVST$ Bereitstellungsprozess insbesondere hinsichtlich des Zeitrahmens zu verbessern, wurden in klinischen Zentren Zellbanken mit kryokonservierten mono- und multivirusspezifischen T-Zell-Produkten (u. a. spezifisch für CMV, EBV, AdV, HHV6 und BKPyV) unter Verwendung von unverwandten TPDs etabliert^{48,54,58,59}. Die Auswahl der T-Zell-Produkte aus TPD Zellbanken erfolgte dabei anhand der HLA-Typisierung und der Virusspezifität.

Erste erfolgreiche Ergebnisse der adoptiven T-Zell-Therapie wurden u. a. mit $exVSTs$ gesunder TPDs bei der Prophylaxe und Therapie von EBV-assoziiertes PTLD und der manifesten CMV-Infektion nach Transplantation erzielt^{37,44,46,48,54,60,61}. Klinische Studien, die $exVSTs$ aus diesen TPD Zellbanken für die Prophylaxe und die Behandlung von immunsupprimierten HSZT- und SOT-Patienten verwendeten, zeigten Ansprechraten von $> 60\%$ auf alle untersuchten Viren^{44,48,54,57,61–65}. So konnte in der Studie von Jiang et al. (2022) bei der Behandlung von 30 HSZT-Patienten mit bis zu vier $exVST$ -Infusio-

nen in 94 % der Patienten ein vollständiges Ansprechen (eng. Complete Response, CR) gezeigt werden. Von den 28 Patienten, die eine CR erreichten, blieben 23 während der gesamten Nachbeobachtungszeit PCR-negativ ($n=9$) oder unter der Bestimmungsgrenze ($n=14$). Drei Patienten, die wegen einer EBV-bedingten lymphoproliferativen Störung nach Transplantation behandelt wurden, erreichten eine anhaltende CR. Dabei waren die Infusionen gut verträglich und die Raten von akuter GvHD (aGvHD) und chronischer GvHD (cGvHD) lagen bei 13 % bzw. 23 %. Kürzlich konnte die Gruppe um Richard O'Reilley in einer Phase-I/II-Studie mit 67 Patienten mit CMV-Virämie oder CMV-Erkrankungen nach HSZT durch den adoptiven Transfer von CMVpp65- (eng. phosphoprotein 65) spezifischen T-Zellen aus einer TPD Zellbank ein CR von 64 % erreichen⁴⁸. Außerdem hatten Patienten, die auf CMVpp65-spezifische $exVSTs$ ansprachen, ein verbessertes Gesamtüberleben. In einer retrospektiven Kohortenstudie führte die Behandlung von 145 Patienten mit $exVSTs$ gegen AdV, BKPyV, CMV und/oder EBV zu einem klinischen Ansprechen in ca. 65 % der Patienten⁴⁰. Es konnten außerdem keine signifikanten Unterschiede zwischen der Behandlung mit $exVSTs$ des Stammzellspenders (klinisches Ansprechen von 66 %) oder eines TPDs (klinisches Ansprechen von 63 %) festgestellt werden.

Neben der Behandlung von Virusinfektionen bei Patienten nach Transplantation wurden außerdem klinische Erfolge mit $exVSTs$ bei der Behandlung virusbedingter Erkrankungen außerhalb des Transplantationsumfelds erzielt. Im Jahr 2018 rückte die Therapie mit allogenen T-Zellen als Behandlungsoption für die PML, die durch eine JCPyV-Infektion verursacht wird, verstärkt in den Fokus. Muf-tuoglu und Kollegen behandelten drei PML-Patienten (32, 35 und 73 Jahre) mit spezifischen T-Zellen gegen BKPyV, einem dem JCPyV nahe verwandten Virus. Die T-Zell-Produkte wurden von Fremdspendern generiert, wobei die Patienten insgesamt zwei bis vier T-Zell-Infusionen erhielten⁶⁶. Bei allen Patienten kam es nach der ersten Behandlung zu einem Rückgang der JCPyV-Viruslast im Liquor. Was die klinischen Symptome anbelangt, so kam es bei zwei der drei Patienten zu einer deutlichen Verringerung oder vollständigen Remission der neurologischen Symptome. Eine erste klinische Pilotstudie zur Behandlung der PML mit kreuzreaktiven BKPyV-spezifischen T-Zellen wurde von Cortese und Kollegen im August 2021 publiziert⁶⁷. Nach einem Screening von insgesamt 26 Patienten wurden schließlich zwölf PML-Patienten mit BKPyV-spezifischen $exVSTs$ behandelt, die von Verwandten ersten Grades gespendet wurden. Ein Jahr nach Beginn der Behandlung waren sieben der zwölf Patienten noch am Leben. Diese Daten deuten auf eine hohe Wirksamkeit der

adoptiven Immuntherapie mit e^x VSTs bei der PML hin, die mit einer deutlichen Verbesserung der Symptome bei der Mehrheit der behandelten Patienten verbunden war.

Im Zuge der COVID-19-Pandemie konnte weiterhin gezeigt werden, dass Defekte in der T-Zell-vermittelten Immunität gegen SARS-CoV-2 mit einem erhöhten Risiko einer schweren COVID-19-Erkrankung, anhaltender Virusausscheidung und dem Auftreten von besorgniserregenden Varianten (engl. Variants of Concern, VoC) in Verbindung steht. Um diesem entgegenzuwirken hat die Gruppe um Ann Leen am Baylor Institut eine TPD Zellbank mit polyklonalen e^x VSTs mit Aktivität gegen mehrere klinisch-relevante SARS-CoV-2-Varianten (einschließlich "delta" und "omicron"), gewonnen aus dem peripheren Blut von 16 gesunden rekonvaleszenten Spendern, angelegt⁶⁸. Der klinische Einsatz der HLA-(teil-)passenden, kryokonservierten SARS-CoV-2-spezifischen T-Zellen erfolgte zunächst an vier hospitalisierten Patienten. Die Expandierung und Persistenz SARS-CoV-2-reaktiver T-Zellen nach Infusion wurde erfolgreich für bis zu sechs Monate gezeigt. Zusammenfassend zeigte sich der Transfer von e^x VSTs aus TPDs als sicher und erfolgreich in der Prophylaxe und Behandlung von viralen Infektionen.

HERSTELLUNG UND KLINISCHE ANWENDUNG VON CCSVSTs

Die Herstellung von CCSVSTs mittels CCS IFN-gamma erlaubt die Anreicherung funktioneller mono- oder multivirusspezifischer CD4⁺ und/oder CD8⁺ T-Zellen unter Verwendung von Peptidpools innerhalb von zwölf bis 16 Stunden nach Leukapherese und hat sich inzwischen in Europa als Verfahren für die Gewinnung klinisch einsetzbarer virusspezifischer T-Zellen etabliert. Bei der Herstellung von CCSVSTs ist die Ausgangsfrequenz der virusspezifischen Gedächtnis-T-Zellen – wie bei den e^x VSTs auch – ein wichtiges Kriterium der Spenderauswahl, da Ausbeute und Reinheit des T-Zellprodukts entscheidend von dieser abhängen^{28,69,70}.

Um die Rekrutierung von T-Zell-Spendern zu erleichtern und zu beschleunigen, wurde 2013 erstmals ein Register für unverwandte Fremdspender, „alloCELL“, etabliert (www.alloCELL.org)^{28,71}. Das Register umfasst derzeit > 4.500 HLA-typisierte TPDs, deren antivirales Gedächtnis T-Zell-Repertoire umfassend charakterisiert wurde (u. a. CMV, EBV, AdV, HHV6, BKPyV, und JCPyV). Seit 2020 wurde das Register während der COVID-19-Pandemie um > 1.000 rekonvaleszente COVID-19-TPDs erweitert. Die schnelle Verfügbarkeit dieser Fremdspender und

die Etablierung des CCS IFN-gamma Prozesses zur Herstellung mono- und multivirusspezifischer T-Zell-Produkte hat den Einsatz der virusspezifischen T-Zellen in den letzten Jahren erheblich beschleunigt. Bislang wurden an der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH), einem der größten CCSVST -Herstellungszentren in Deutschland, über 500 CCSVST -Präparate, davon 18 % multivirusspezifisch, zur klinischen Anwendung hergestellt. In 85 % der Fälle wurde ein Familienspender oder ein unverwandter TPD des alloCELL Registers rekrutiert. Damit stellt das alloCELL Register insbesondere für Patienten ohne geeigneten Transplantatspender oder Transplantationshistorie eine vielversprechende Alternative dar. Im Rahmen einer klinischen Phase-Ib/II-Studie an HSZT-Patienten mit rezidivierten/refraktären (r/r) CMV-Infektionen, in der CCSVST eingesetzt wurden, erfolgte die Etablierung eines TPD Registers, auf der Grundlage von HLA-Genotypisierung und serologischen Markern, das insgesamt 263 gesunde Blutspender umfasste. Dieses TPD Register ermöglichte die schnelle Bereitstellung der CCSVSTs vom am besten geeigneten T-Zell-Spender⁷². Insgesamt stellen TPD Register durch die rasche Verfügbarkeit von T-Zellen eines geeigneten Spenders ein wichtiges Werkzeug bei der adoptiven Immuntherapie virusbedingter Erkrankungen in immunsupprimierten oder immundefizienten Patienten dar.

In zahlreichen Studien und Case Reports konnte die Wirksamkeit der CCSVSTs von HLA-(teil-) passenden TPDs mit Ansprechraten von ca. 80 % CR und partiellem Ansprechen (engl. Partial Response, PR), sowie Verträglichkeit und Sicherheit gezeigt werden^{36,42,43,45,49,50,73–75}. Die applizierten Dosen an CCSVSTs vom TPD zeigen eine breite Streuung, ohne dass bisher eine klare Dosis-Wirkungs-Beziehung etabliert werden konnte. Um das Risiko einer GvHD so gering wie möglich zu halten, wird die obere Grenze der T-Zell-Dosis, abhängig von der HLA-Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger, meist unterhalb der Schwelle gehalten, die als Grenze für die Gabe nichtselektionierter allogener T-Zellen (DLI) ohne Immunsuppression im Rahmen der HSZT akzeptiert ist (5×10^5 CD3⁺ T-Zellen/kg Körpergewicht (KG) für $\geq 9/10$ HLA-idente und $2,5 \times 10^4$ CD3⁺ T-Zellen/kg KG für $< 9/10$ HLA-idente Spender)^{24,76}. Ein unterer Schwellenwert wurde bisher nicht etabliert, da bereits wenige hundert Zellen klinisch wirksam waren^{24,77}.

In einer Studie von Feuchtinger et al. (2010) wurden 2/18 Patienten, die ein Nabelschnurbluttransplantat erhalten hatten, mit CCSVSTs von HLA-(teil-)passenden TPDs behandelt⁷³. Zur Isolierung der CCSVSTs wurde das CCS IFN-gamma Verfahren nach kurzer *in vitro* Stimulation

mit dem viralen CMVpp65 Protein angewendet. Trotz einer geringen Dosis CCS-angereicherter CMVpp65-spezifischer T-Zellen von 21×10^3 CD3/kg KG wurde die *in vivo* Expandierung der ^{CCSVSTs} und die Eliminierung von CMV bei einem Patienten gezeigt. Außerdem wurde weder das Auftreten einer GvHD noch die Verschlechterung einer bestehenden GvHD beobachtet. Von den 20 eingeschlossenen Patienten der Studie von Barba et al. (2022) erhielten fünf Patienten CMV-spezifische ^{CCSVSTs} vom Stammzellspender und 15 Patienten CMV-spezifische ^{CCSVSTs} vom verwandten oder unverwandten TPD. Insgesamt 14 Patienten sprachen auf den Transfer der CMV-spezifischen ^{CCSVST} erfolgreich an⁷². Die Wirksamkeit AdV-spezifischer ^{CCSVSTs} wurde in der Arbeit von Quasim et al. gezeigt^{75,78}. Hierbei wurden zwei HSZT-Patienten, die eine AdV-Infektion entwickelten, mit ^{CCSVSTs} von TPDs behandelt. Sechs Wochen nach Transfer wurden in beiden Patienten AdV-spezifische T-Zellen nachgewiesen, wobei die Wiederherstellung der zellulären Immunität eindeutig den AdV-spezifischen T-Zellen des TPD zugeordnet werden konnte. Die Ergebnisse zum adoptiven Transfer EBV-spezifischer ^{CCSVSTs} für eine Kohorte von 37 Patienten mit EBV-Reaktivierung oder EBV-induzierten lymphoproliferativen Erkrankungen im Rahmen einer HSZT oder SOT, von denen die meisten von unverwandten Spendern aus dem TPD Register alloCELL stammten, zeigte das Potenzial und die Sicherheit einer personalisierten adoptiven Immuntherapie mit EBV-spezifischen ^{CCSVSTs} gesunder TPDs³⁶. Eine schwere Komplikation nach SOT ist die PTLD mit Beteiligung des zentralen Nervensystems (ZNS). Aufgrund der schlechten Prognose der ZNS-PTLD und des Mangels an EBV-spezifischen T-Zellen im Blut erhielt ein Patient EBV-spezifische ^{CCSVSTs} von einem 5/10 HLA-passenden unverwandten TPD als Konsolidierungsbehandlung⁴⁹. Das T-Zell-Rezeptor- (engl. T-Cell Receptor, TCR) Profiling mittels NGS (engl. Next-Generation-Sequencing) verifizierte die Persistenz und Expandierung der vom Spender stammenden EBV-spezifischen T-Zell-Klone und die Epitopausbreitung auf unverwandte EBV-Antigene. Dies deutet auf eine beginnende endogene T-Zell-Generierung hin, welche durch den Nachweis von T-Zell-Klonen des Empfängers im NGS-TCR-Profil bestätigt wurde. Die Wirksamkeit der ^{CCSVSTs} eines geeigneten TPDs wurde in weiteren Case Reports von Patienten mit EBV-assoziierten Erkrankungen erfolgreich gezeigt. Unter anderem kam es bei einem Patienten mit anhaltender Remission einer chronisch aktiven EBV-Infektion zu einer drastischen Verbesserung des Allgemeinzustandes nach Transfer EBV-spezifischer ^{CCSVSTs}⁷⁹. Weiterhin wurden erstmals ^{CCSVSTs} bei der Behandlung glatter Muskeltumore nach Transplantationen (engl. Post-Transplant Smooth Muscle

Tumor, PTSMT), einer EBV-assoziierten Neoplasie, erfolgreich eingesetzt. Dabei konnte die Expandierung der EBV-spezifischen T-Zellen *in vivo* und eine Verringerung der EBV-Virämie festgestellt werden. Diese Daten deuten ebenfalls auf ^{CCSVSTs} gesunder TPDs als eine sichere und wirksame Therapieoption bei der Behandlung von PTSMT-Patienten hin⁴². Der derzeit vielversprechendste therapeutische Ansatz zur Behandlung der PML könnte die Verwendung allogener virusspezifischer T-Zellen sein. Die Patienten sind in der Regel ohne Transplantationshistorie und daher auf einen geeigneten verwandten oder unverwandten TPD angewiesen. Da JCPyV und BKPyV eine große Sequenzhomologie in bestimmten viralen Proteinen zeigen, insbesondere das Kapsidprotein Virus Protein 1 (VP1) und das sogenannte große T-Antigen (engl. Large T, LT), besteht eine Kreuzreaktivität für JCPyV- und BKPyV-spezifische T-Zellen, was den Einsatz beider Spezifitäten unter GMP ermöglicht. Da bis vor kurzem keine JCPyV-spezifischen Peptidpools in GMP-Qualität verfügbar waren, wurden Patienten mit PML bzw. JCPyV Körnerzellen-Neuronopathie (engl. Granule Cell Neuronopathy, GCN) an unserem und anderen Zentren zunächst erfolgreich mit BKPyV-spezifischen ^{CCSVSTs} behandelt^{41,43,50}. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die adoptive Immuntherapie mit ^{CCSVSTs} aus TPDs die klinische Manifestierung der Viren wirksam verhindern kann, ohne dass es zu akuter Toxizität oder einem erhöhten Risiko einer GvHD kommt.

HERSTELLUNG UND KLINISCHE ANWENDUNG VON ^{dePVSTs}

Naive T-Zellen haben ein breites TCR-Repertoire und daher ein höheres Alloreaktivitätspotential als Gedächtnis-T-Zell-Fractionen. Unter der Annahme, dass naive T-Zellen hauptsächlich für die Entwicklung einer GvHD verantwortlich sind, wurden Methoden entwickelt, um die naiven T-Zellen in T-Zell-Produkten zu depletieren und gleichzeitig die Aktivität der antiviralen CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen zu erhalten^{32,33,80}. Dieses Verfahren ist insbesondere geeignet, um T-Zellen mit breiter antiviraler Spezifität anzureichern sowie T-Zell-Produkte mit Wirksamkeit gegen klinisch relevante Viren, für die immundominante Epitope (noch) nicht bekannt oder nicht in GMP-Qualität verfügbar sind, zu generieren. Die immunmagnetische CD45RA-Depletion wird in vielen klinischen Zentren als etabliertes Verfahren zur Depletion naiver CD45RA-positiver Zellen eingesetzt. Bei diesem Verfahren werden periphere Blutzellen mit einem CD45RA-MicroBead-Reagenz in GMP-Qualität spezifisch markiert und die CD45RA-markierten naiven Zellen

anschließend durch immunmagnetische Separation entfernt³³. Die CD45RA-Depletion zeigte starke spenderabhängige Unterschiede hinsichtlich des Phänotyps und der Funktionalität virusspezifischer Gedächtnis-T-Zellen. Allerdings konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten ^{dep}VSTs serologisch-positiver TPDs funktionelle Gedächtnis-T-Zellen gegen verschiedene Virusspezifitäten (u. a. CMV, EBV und AdV) aufweisen^{32,81–83}. CD45RA-depletierte Produkte werden hauptsächlich als Prophylaxe vor, mit oder nach HSZT verwendet und werden im Regelfall unmittelbar nach CD34-Selektion von verwandten oder haploidenten Stammzellspendern hergestellt^{33,82,83}. Durch die mehrfache Gabe von ^{dep}VSTs von einem verwandten oder unverwandten Stammzellspender konnte das Risiko von Virusinfektionen in den ersten 100 Tagen nach HSZT reduziert werden⁸⁴. Bis heute sind erst wenige Studien bekannt, bei denen ^{dep}VSTs aus Blut eines gesunden TPD hergestellt und klinisch zur Behandlung viraler Komplikationen in immungeschwächten Patienten analog zu ^{ex}VSTs oder ^{CCSV}VSTs eingesetzt wurden.

2019 wurde erstmals der adoptive Transfer von ^{dep}VSTs von haploidenten CMV-seropositiven Spendern als eine sichere und effektive Methode zur Behandlung von immungeschwächten Patienten ohne Transplantationshistorie mit CMV-Erkrankung und Toxizität gegenüber konventionellen Therapien beschrieben⁸⁵. In den ^{dep}VST-behandelten Patienten wurde eine dauerhafte Viruskontrolle mit nachweisbaren CMV-spezifischen T-Zellen selbst Jahre nach Transfer beobachtet. Diese Eigenschaften und der Prozess der CD45RA-Depletion wurden auch bei der jüngsten COVID-19-Pandemie genutzt. In einer klinischen Phase-I/II-Studie wurden ^{dep}VSTs, die von rekonvaleszenten Spendern isoliert wurden und SARS-CoV-2-spezifische T-Zellen enthielten, klinisch eingesetzt^{86,87}. Diese Studie fand zu einem Zeitpunkt statt, als immun-dominante Antigene des Virus, die für VST-Präparation mittels CCS IFN-gamma oder *ex vivo* Expandierungsstrategien notwendig sind, noch nicht bekannt waren und ein entsprechender Impfstoff gegen das Virus ebenfalls noch in der Entwicklungsphase war. In der Studie wurden neun Patienten mit Lungenentzündung und/oder Lymphopenie, die mindestens eine HLA-Übereinstimmung zum Spenders aufwiesen, erfolgreich mit ^{dep}VSTs behandelt. Insgesamt erhielten die Patienten eine Zelldosis von 1×10^5 , 5×10^5 oder 1×10^6 Zellen/kg KG. Alle Patienten sprachen auf die Therapie an und zeigten eine Verbesserung ihres klinischen Zustandes innerhalb von sechs Tagen nach Transfer. Ebenfalls konnte die Herstellung einer SARS-CoV-2-spezifischen T-Zell-Immunität zwei Wochen nach ^{dep}VST Transfer nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Studie belegen die sichere

und wirksame Behandlung von COVID-19-Patienten mit mäßigen/schweren Symptomen mit CD45RA-negativen Gedächtnis T-Zellen von rekonvaleszenten, HLA-(teil-)passenden, unverwandten TPDs.

Um die Herstellung und klinische Anwendung der ^{dep}VSTs noch weiter zu verbessern und den Nutzen dieser T-Zell-Produkte zu maximieren, beschäftigen sich aktuelle Arbeiten mit der Optimierung des Herstellungsprozesses (Spenderauswahl) und der Behandlung (Zelldosis). Schließlich könnte dieser Ansatz, der in der Vergangenheit erfolgreich bei HSZT-Patienten eingesetzt wurde, auch hinsichtlich einer schnellen und wirksamen Behandlungsmöglichkeit bei zukünftigen Pandemien eine wichtige Rolle spielen.

PERSPEKTIVEN UND ZUSAMMENFASSUNG

Zusammengefasst hat sich der adoptive Transfer von VSTs verwandter oder unverwandter TPDs in den letzten Jahren als erfolgreiche immuntherapeutische Methode zur Behandlung Pathogen-assoziiierter Erkrankungen bei immunsupprimierten und immundefizienten Patienten mit und ohne Transplantationshistorie erwiesen. Etablierte TPD Register und Zellbanken ermöglichen die schnelle Bereitstellung von VSTs für die individuell auf den Patienten abgestimmte klinische Anwendung. Durch den weiteren Ausbau von TPD Registern und Zellbanken unter Einbeziehung zusätzlicher Pathogene und Antigene und der Erweiterung des potenziellen Spenderpools können in kürzerer Zeit mehr passende Spender gefunden werden und deutlich mehr Patienten von dieser Therapie profitieren. Insgesamt wurden bislang keine signifikanten Unterschiede im klinischen Ansprechen oder dem Sicherheitsprofil zwischen VSTs vom Stammzellspender und vom TPD beschrieben. Einige Daten deuten darauf hin, dass VSTs von TPDs möglicherweise ausreichen, um die Virusinfektion bei Patienten nach HSZT zu kontrollieren bis eine Immunrekonstitution eintritt, obwohl VSTs vom TPD – abhängig von der HLA-Übereinstimmung – möglicherweise schneller abgebaut werden als VSTs vom HSZT. Um VSTs von verwandten und unverwandten TPDs hinsichtlich ihrer schützenden und langanhaltenden Effektorfunktionen zu untersuchen und zu verbessern sind genaue Analysen in Bezug auf protektive HLA-Kompatibilitäten, T-Zell-Mengen pro Transfer und der Effektivitätssteigerung, wie z. B. durch mehrfache Gabe notwendig. Ein detailliertes Monitoring der Viruslast und der Frequenz an VSTs im Patienten vor und nach adoptivem Transfer ist zur genauen Bestimmung des Einflusses lang- und kurz-

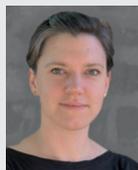
lebiger T-Zell-Subpopulationen und deren Entwicklung nach Transfer im Patienten von besonderer Bedeutung.

In zukünftigen Pandemien könnten TPD Register und Zellbanken eine essentielle Plattform für die Herstellung und therapeutische Anwendung von funktionell wirksamen VSTs sein. Um die klinische Anwendung dieser T-Zell-Produkte zu verbessern, werden etablierte Verfahren zur Herstellung unter den Gesichtspunkten Sensitivität, Reproduzierbarkeit, Reinheit, Funktionalität und Persistenz ständig optimiert und weiterentwickelt.

Die Autoren



Dr. rer. nat. Sabine Tischer-Zimmermann
Institut für Transfusionsmedizin und Transplantat Engineering
Medizinische Hochschule Hannover
tischer-zimmermann.sabine@mh-hannover.de



Dr. rer. nat. Agnes Bonifacius
Institut für Transfusionsmedizin und Transplantat Engineering
Medizinische Hochschule Hannover
bonifacius.agnes@mh-hannover.de



Prof. Dr. med. Rainer Blasczyk
Institut für Transfusionsmedizin und Transplantat Engineering
Medizinische Hochschule Hannover
blasczyk.rainer@mh-hannover.de



Prof. Dr. med. Britta Maecker-Kolhoff
Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
Medizinische Hochschule Hannover
maecker.britta@mh-hannover.de



Prof. Dr. rer. nat. Britta Eiz-Vesper
Institut für Transfusionsmedizin und Transplantat Engineering
Medizinische Hochschule Hannover
eiz-vesper.britta@mh-hannover.de

Die Literaturhinweise zu diesem Artikel finden Sie im Internet zum Download unter: www.drk-haemotherapie.de