

T - λεμφοκύτταρα με ειδικότητα έναντι πολλών ιών

Αναστασία Καρέλα, Αλέξανδρος Σπυριδωνίδης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ Η απαρχή της κυτταρικής ανοσοθεραπείας προσδιορίζεται στα τέλη της δεκαετίας του 1950 όταν αποδείχθηκε πειραματικά η αντικαρκινική δράση των T-λεμφοκυττάρων και οδήγησε αργότερα στη χορήγηση T-λεμφοκυττάρων για τη θεραπεία αιματολογικών κακοηθειών, μία εφαρμοσμένη πλέον πρακτική για πρόληψη και θεραπεία υποτροπών μετά από αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων. Οι ιογενείς λοιμώξεις είναι ένα από τα κύρια αίτια θνητότητας σε μεταμοσχευμένους ασθενείς και, τα τελευταία χρόνια, αποτελούν πεδίο έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος για την εφαρμογή κυτταρικής ανοσοθεραπείας. Η διαθέσιμη αντι-ική χημειοθεραπεία δεν είναι αποτελεσματική για τους περισσότερους ιούς, δεν προσφέρει μόνιμη προστασία, είναι δαπανηρή και έχει επιπλοκές, όπως τοξικότητα και παραγωγή ανθεκτικών στελεχών του ιού. Η επιλεκτική αποκατάσταση της ανοσίας με μεταφορά ex-vivo παραγόμενων T-λεμφοκυττάρων με ειδικότητα έναντι πολλών ιών έχει διερευνηθεί ως μέθοδος για την αποτελεσματική αντιμετώπιση ιογενών επιπλοκών μετά τη μεταμόσχευση. Αρκετές αρχικές μελέτες συνέβαλλαν στην κατανόηση της αποτελεσματικότητας της T-κυτταρικής θεραπείας και στην σταδιακή ανάπτυξη απλουστευμένων πρωτοκόλλων για την κατασκευή ενός αποδοτικού θεραπευτικού προϊόντος. Πρόσφατα έγινε κλινική εφαρμογή χορήγησης ειδικών έναντι τριών ιών T-λεμφοκυττάρων από τρίτες κυτταρικών σειρών (third-party) και ειδικών έναντι πέντε ιών T-λεμφοκυττάρων του δότη, με ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Παρ' όλο που πολλά εμπόδια πρέπει ακόμα να υπερνικηθούν, έχουν γίνει σημαντικότερες πρόοδοι τα τελευταία χρόνια για την ανάπτυξη αποτελεσματικών ανοσοθεραπειών των ιογενών επιπλοκών με τη χρήση ειδικών αντι-ικών T-λεμφοκυττάρων.

Haema 2016; 7(1): 37-44 Copyright EAE

Εισαγωγή

Η κυτταρική ανοσοθεραπεία αποτελεί ένα πεδίο έντονου επιστημονικού ενδιαφέροντος και δυναμικής έρευνας στην ογκολογία και αιματολογία, επιδιώκοντας την εφαρμογή των πειραματικών ευρημάτων στην καθημερινή θεραπευτική πρακτική.

Η θεραπευτική δράση των T-λεμφοκυττάρων

Η αντικαρκινική δράση των ανοσοποιητικών κυττάρων ήταν η πρώτη ιδιότητά τους που μελετήθηκε στα πλαίσια της θεραπευτικής τους εφαρμογής. Το 1957, ο

Barnes ανέδειξε πειραματικά ότι τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος δρουν εναντίον των καρκινικών κυττάρων¹. Οι παρατηρήσεις αυτές σε ζωικά μοντέλα, οδήγησαν στην πειραματική χορήγηση λεμφοκυττάρων σε ασθενείς με λευχαιμία περί τα τέλη της δεκαετίας του 1960²⁻⁴. Η ανοσοθεραπεία με T-λεμφοκύτταρα έναντι κακοηθειών συνδέεται άμεσα με την αλλογενή μεταμόσχευση μυελού των οστών (αλλο-MMO) και με το φαινόμενο μοσχεύματος εναντίον λευχαιμίας όπου T-λεμφοκύτταρα ενέχουν προστατευτικό ρόλο στην υποτροπή της νόσου⁵. Μετά τον πρώτο ασθενή που έλαβε ανοσοθεραπεία με T-λεμφοκύτταρα λόγω υποτροπής της νόσου μετά από αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων, στις αρχές του 1990⁶ διαπιστώθηκε η αποτελεσματικότητα της συγκεκριμένης μεθόδου και σε ασθενείς με χρόνια μυελογενή λευχαιμία^{7,8}. Η έγχυση T-λεμφοκυττάρων (τροποποιημένων ή μη) αποτελεί πλέον μια εφαρμοσμένη αντικαρκινική ανοσολογική θεραπευτική προσέγγιση⁹.

Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών, Τ.Κ. 265 04 Ρίο
Συγγραφέας υπεύθυνος για επικοινωνία: Αλέξανδρος Σπυριδωνίδης,
e-mail: spyridonidis@upatras.gr

Η ανάγκη ανάπτυξης T-λεμφοκυττάρων με ειδικότητα έναντι ιών για την αντιμετώπιση ιογενών λοιμώξεων σε μεταμοσχευμένους ασθενείς

Η υποτροπή της αρχικής νόσου αποτελεί ένα μόνο από τα προβλήματα της άλλο-ΜΜΟ. Οι ιογενείς λοιμώξεις αποτελούν σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνητότητας σε μεταμοσχευμένους και βαριά ανοσοκατασταλμένους ασθενείς^{10,11}. Το ένα τρίτο των θανάτων μετά από άλλο-ΜΜΟ έχει σχετιστεί με ιογενείς λοιμώξεις¹². Ειδικά, μετά από απλοταυτόσημη μεταμόσχευση όπου χρησιμοποιείται ισχυρή ανοσοκαταστολή ή αφαίρεση των T-κυττάρων από το μόσχευμα, οι ιογενείς λοιμώξεις αποτελούν ένα από τα κύρια αίτια θνητότητας. Συγκεκριμένα, αναζωπύρωση ή λοίμωξη με ερπητοϊούς, όπως ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV), ο ιός Epstein-Barr (EBV), ο αδενοϊός (Adv), και ο ιός BK (BKV), μεταξύ άλλων ιών, αποτελούν συχνές, δυνητικά θανατηφόρες επιπλοκές μετά την άλλο-ΜΜΟ¹³. Η αντι-ικική φαρμακοθεραπεία δεν είναι αποτελεσματική για τους περισσότερους ιούς, δεν προσφέρει μόνιμη προστασία, είναι δαπανηρή και μπορεί να έχει επιπλοκές, όπως τοξικότητα και παραγωγή ανθεκτικών στελεχών του ιού¹⁴. Ένα σημαντικό ποσοστό CMV αναζωπυρώσεων είναι ανθεκτικό στην αντι-ικική θεραπεία, η οποία με τη σειρά της συνεπάγεται αρκετές ανεπιθύμητες ενέργειες όπως ουδετεροπενία και νεφρική ανεπάρκεια. Ο κίνδυνος CMV αναζωπύρωσης είναι μεγαλύτερος σε CMV θετικούς ξενιστές με CMV αρνητικούς δότες καθώς δεν υπάρχουν κύτταρα με ειδική για τον ιό ανοσία στο χορηγούμενο μόσχευμα^{15,16}. Η EBV επανενεργοποίηση μετά από άλλο-ΜΜΟ μπορεί να οδηγήσει σε λεμφοϋπερπλαστική νόσο. Στην περίπτωση αυτή τα κακοήγη κύτταρα είναι έντονα ανοσογενετικά, εκφράζοντας σε μεγάλο βαθμό EBV-ειδικά αντιγόνα και κατ'επέκταση, αποτελούν δυνητικά εύκολους στόχους για τα T-λεμφοκύτταρα¹⁷. Όσον αφορά τον ιό BK, μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν ικανοποιητικές θεραπείες για τη σοβαρή BK-αιμορραγική κυστίτιδα και τη BK-νεφροπάθεια¹⁰.

Οι πρώτες πειραματικές προσεγγίσεις στη δημιουργία ειδικών αντί-ικίων T-λεμφοκυττάρων

Η επιλεκτική αποκατάσταση της ανοσίας με μεταφορά ex-vivo παραγόμενων αντικών T-κυττάρων έχει διερευνηθεί ως μια αποτελεσματική μέθοδος για την πρόληψη ή τη θεραπεία ιογενών λοιμώξεων μετά τη μεταμόσχευση. Ο Riddell et al ήταν οι πρώτοι οι οποίοι προέβησαν στην κλινική χορήγηση ex vivo παραγόμενων CMV-ειδικών T-λεμφοκυττάρων, η οποία είχε ως αποτέλεσμα τον έλεγχο CMV λοίμωξης¹⁸. Μετέπειτα, οι Rooney και Heslop et al παρήγαγαν EBV-ειδικά T-λεμφοκύτταρα που αποδεί-

χθηκαν αποτελεσματικά για τον έλεγχο της EBV μετα-μεταμοσχευτικής λεμφοϋπερπλαστικής νόσου¹⁹.

Παράγοντες δημιουργίας αποτελεσματικών ειδικών αντι-ικίων T-λεμφοκυττάρων

Αυτές οι πρώιμες κλινικές μελέτες, συνέβαλαν στην κατανόηση των βασικών παραμέτρων που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τη δημιουργία αποτελεσματικών T-κυτταρικών θεραπειών²⁰, όπως:

1. Επιλογή συγκεκριμένων αντιγόνων. Τα αντιγόνα-στόχοι που πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κυτταρικές θεραπείες πρέπει να έχουν ισχυρή αντιγονικότητα, ειδικότητα και έκφραση.

2. Παραγωγή T-κυττάρων με συγκεκριμένο φαινότυπο και με υψηλή ειδικότητα έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων. Σημαντική εξέλιξη σε αυτό τον τομέα αποτελεί η ανάπτυξη πρωτοκόλλων παραγωγής δενδριτικών κυττάρων σε κλινική κλίμακα τα οποία είναι ικανά για την επιλογή και την έκπτυξη T-κυττάρων υψηλής ειδικότητας²¹. Είναι πλέον σαφές ότι το τελικό T-κυτταρικό προϊόν θα πρέπει να περιέχει όχι μόνο CD8+ αλλά και CD4+ T-λεμφοκύτταρα καθώς και κεντρικά κύτταρα μνήμης (central memory subsets, Tcm) για την επίτευξη και τη διατήρηση του in vivo θεραπευτικού αποτελέσματος^{22,23}. Η ανακάλυψη νέων κυτταροκινών, όπως της IL-15, έχει διευκολύνει τη διαφοροποίηση των T-λεμφοκυττάρων προς αυτούς τους φαινοτύπους.

3. Η προετοιμασία του ασθενούς. Αρκετές κλινικές μελέτες κατέδειξαν ότι η in vivo έκπτυξη των χορηγούμενων T-λεμφοκυττάρων εξαρτάται από το ανοσολογικό προφίλ του ασθενούς. Για παράδειγμα, τα TIL (tumor infiltrating lymphocytes) είναι πιο αποδοτικά όταν εγχέονται σε λεμφοπενικό περιβάλλον που επιτυγχάνεται μετά από λεμφοαφανιστικό σχήμα χημειοθεραπείας²⁴.

4. Η γενετική τροποποίηση των T-λεμφοκυττάρων. Τα επιτεύγματα στη μεταφορά γονιδίων, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης αποτελεσματικών ιικών φορέων για το μετασχηματισμό των T-λεμφοκυττάρων, οδήγησε στη δυνατότητα δημιουργίας γενετικά τροποποιημένων T-λεμφοκυττάρων ικανών να ανταπεξέρχονται αποτελεσματικά σε μηχανισμούς διαφυγής, όπως της παραγωγής ανοσοκατασταλτικών κυτταροκινών (π.χ. TGF-β)²⁵.

5. Η απλουστευμένη παρασκευή των κυττάρων. Οι GMP εγκαταστάσεις που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη προηγμένων κυτταρικών θεραπειών (advanced cellular therapies) έχουν υψηλό κόστος δημιουργίας και συντήρησης. Τα τελευταία χρόνια αναπτύσσονται διαδικασίες παρασκευής T-λεμφοκυττάρων ολοένα και περισσότερο αυτοματοποιημένες, αποδοτικές και κλειστού τύπου, κάτι που στο μέλλον θα οδηγήσει και στη δυνατότητα παραγωγής κυτταρικών θεραπειών σε μεσαίας κλί-

μακας νοσοκομεία. Οι κλειστοί θάλαμοι εργασιών ειδικών συνθηκών (Glove Box με ISO-14644-1:5) ή οι κλειστοί επωαστές GREX αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα προόδου προς αυτή την κατεύθυνση²⁷.

Μεθοδολογίες παραγωγής αντι-ικών T-λεμφοκυττάρων

Επί του παρόντος, τρεις τεχνολογίες είναι διαθέσιμες για την παραγωγή αντι-ικών κυτταροτοξικών T-κυττάρων (CTLs) για κλινική χρήση, αλλά όλες έχουν σημαντικούς περιορισμούς. Πρώτον, η μαγνητική απομόνωση με χρήση πολυμερών HLA-πεπτιδίου είναι ταχεία, αλλά περιορίζεται σε ορισμένους HLA απλότυπους, σε συγκεκριμένα εμπορικά διαθέσιμα HLA πεπτίδια και δεν μπορεί να επιλέξει CD4+ κύτταρα²⁸. Δεύτερον, η τεχνολογία δέσμευσης IFN- γ εκκρινόντων κυττάρων μπορεί να απομονώσει T-κύτταρα με μία μόνο αντιγονική ειδικότητα και, όπως και στην πρώτη περίπτωση, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιλογή T-κυττάρων από δότες που δεν έχουν εκτεθεί προηγουμένως στον ιό²⁹. Παρότι αυτές οι τεχνικές άμεσης απομόνωσης ειδικών T κυττάρων είναι GMP-συμβατές μεθοδολογίες, η ευρύτερη χρήση τους περιορίζεται επίσης, τόσο από το γεγονός ότι απαιτούνται μεγάλες ποσότητες αίματος, όσο και από τον ελάχιστο αριθμό κυκλοφορούντων ειδικών T-κυττάρων για τους περισσότερους ιούς στους δότες^{28,29}.

Τρίτον, αντι-ικά κυτταροτοξικά T κύτταρα (CTLs) μπορούν να παραχθούν ex-vivo με επαναλαμβανόμενη αντιγονική διέγερση T-κυττάρων του δότη με αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα³⁰⁻³². Η συγκεκριμένη τεχνολογία έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συχνότητας στην καλλιέργεια των ειδικών έναντι αντιγόνων T-κυττάρων με αντίστοιχη μείωση στη συχνότητα εμφάνισης των μη ειδικών T-κυττάρων (Εικόνα 1). Αυτή η τελευταία τεχνολογία έχει το πλεονέκτημα ότι επιτρέπει την παραγωγή αντι-ικών CTLs με ειδικότητα εναντίον πολλών ιών (mutlivirus)³³⁻³⁶. Αν και η ανοσοθεραπεία με μεταφορά ex-vivo παραγόμενων αντι-ικών CTLs έχει αποδειχθεί ασφαλής και αποτελεσματική, είμαστε ακόμη πολύ

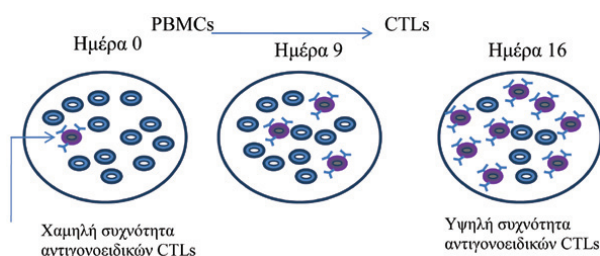
μακριά από την τακτική παραγωγή αυτών των κυττάρων για κλινική χρήση. Οι τρέχουσες διαδικασίες παραγωγής είναι πολύπλοκες, απαιτούν μολυσματικό υλικό του ιού ή ικούς φορείς κλινικής ποιότητας και παρατεταμένη in vitro καλλιέργεια³⁰⁻³⁶. Ειδικά, η παρατεταμένη (10-12 εβδομάδες) ex vivo παρασκευή καθιστά τα CTLs πρακτικά «μη διαθέσιμα» για την αντιμετώπιση ιογενών λοιμώξεων που βρίσκονται σε έξαρση και η θεραπεία επείγει. Επίσης, η επαναληψιμότητα παραμένει ένα πρόβλημα. Αρκετοί παράγοντες θα μπορούσαν να επηρεάσουν την επιτυχή ενεργοποίηση λειτουργικών CTLs, όπως α) η μη αποτελεσματική παρουσίαση του αντιγόνου από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, β) η χαμηλή συχνότητα των πρόδρομων αντιγόνο-ειδικών T κυττάρων από δότες που δεν έχουν προσβληθεί ποτέ από τον ιό, γ) το μη κατάλληλο περιβάλλον κυττοκινών στην καλλιέργεια και δ) η αναστολή έκπτυξης των CTLs από άλλα κύτταρα στην καλλιέργεια, όπως ρυθμιστικά T-κύτταρα. Η ευρύτερη εφαρμογή χορήγησης αντι-ικών CTLs απαιτεί την ανάπτυξη απλούστερων πρωτοκόλλων³⁷.

Πράγματι, αρχικά για τη δημιουργία αντιγονικά διεγερμένων T-λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήθηκαν μετασχηματισμένα B-λεμφοκύτταρα με διαγονιδιακούς EBV-φορείς³⁸. Κατόπιν για την ανοσοδιέγερση των T-λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήθηκαν ιικοί φορείς, ικές πρωτεΐνες και πεπτίδια. Κάθε μία από τις προαναφερθείσες μεθόδους έχει τα πλεονεκτήματα και τους περιορισμούς της.

Οι ιοί και οι ιικοί φορείς, επιτρέπουν την ταυτόχρονη παρουσίαση πολλών αντιγόνων από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα με διάφορους μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένης της παρουσίασης δομικών πρωτεϊνών για αναγνώριση από τα CD4+ και ενδοκυττάρων πρωτεϊνών για αναγνώριση από τα CD8+ κύτταρα. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος απαιτεί επαρκή τροπισμό από τον ιό, η επιλοίμωξη μπορεί να επηρεάσει την αντιγονοπαρουσιαστική λειτουργία και ταυτόχρονα γείρονται θέματα ασφάλειας με τη χρησιμοποίηση ιών με διατηρημένη την ικανότητα πολλαπλασιασμού.

Όσον αφορά τις ικές πρωτεΐνες είναι ασφαλέστερες και παράγονται εύκολα, αλλά είναι λιγότερο αποδοτικές στην αντιγονοπαρουσίαση τύπου I. Προκειμένου να αποφευχθεί η χρήση μολυσματικού υλικού ή ικών φορέων για την ενεργοποίηση των T κυττάρων, εμπορικά διαθέσιμα, επικαλυπτόμενα 15μερή πεπτιδίων (permixes) που επικαλύπτουν πιθανούς CD8+ και CD4+ επίτοπους ικών αντιγόνων μπορούν να είναι μία πολλά υποσχόμενη εναλλακτική τεχνική για αντιγονική διέγερση και δημιουργία T-λεμφοκυττάρων με ειδικότητα έναντι πολλαπλών ιών³⁹.

Το ενδιαφέρον των ερευνητών στράφηκε στη ανάπτυξη απλούστερων πρωτοκόλλων για τη δημιουργία αντι-ικών CTLs. Το 2011 δημοσιεύτηκε από τον Gerdemann et al, ένα πρωτόκολλο συμβατό με μεθοδολογία σωστής παρασκευαστικής πρακτικής (GMP) για τη δημιουργία



Εικόνα 1. Ex-vivo παραγωγή αντι-ικών CTLs με επαναλαμβανόμενη αντιγονική διέγερση T-κυττάρων.

CTLs με ειδικότητα έναντι τριών ιών: EBV, CMV και Adv. Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δενδριτικά κύτταρα μετασχηματισμένα με πλασμιδιακό DNA που κωδικοποιεί LMP2, EBNA1 και BZLF1 (EBV), Hexon and Penton (Adv) και pp65 και IE1 (CMV) ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs). Η παραγωγή των ειδικών CTLs έναντι τριών ιών (EBV, CMV και Adv) έγινε παρουσία IL-4 και IL-7 σε ειδικούς επωαστές GREX με μειωμένο κόστος και σε σύντομο διάστημα 10 ημερών⁴⁰. Το 2012 ανακοινώθηκε από τους Σπυριδωνίδη και συν. μια απλή, ταχεία (9 ημέρες) GMP-συμβατή μεθοδολογία χωρίς τη χρήση μολυσματικού υλικού για την ανάπτυξη σε μία ενιαία καλλιέργεια ενός πολλαπλά-αντιικού (multivirus) CTL πληθυσμού με ειδικότητα εναντίων τεσσάρων ιών EBV, CMV, Adv και BK⁴¹. Στη μελέτη αυτή, ώριμα δενδριτικά κύτταρα (DC) επωάστηκαν με 15μερή πεπτιδίων (permixes) που καλύπτουν αμινικές αλληλουχίες αντιγονικών περιοχών του CMV, EBV, Adenovirus και BK, είτε μεμονωμένα ή σε συνδυασμό (Mix). Ο συνδυασμός IL-7, IL-15, και χαμηλής δόσης IL-2 επιλέχθηκε ως ο βέλτιστος συνδυασμός κυττοκινών για τη δημιουργία των αντιγονο-ειδικών CTL. Τα αντι-ικά CTLs αναγνωρίστηκαν με κυτταρομετρία ροής βάσει της ικανότητάς τους να παράγουν IFN-γ, TNF-α, ή/και IL-2, μετά από ειδική αντιγονοδιέγερση. Ειδικά εναντίον των τεσσάρων ιών CD4+ και CD8+ CTLs επάχθηκαν επιτυχώς στο σύνολο των δοτών που ελέγχθηκαν (Εικόνα 2Α). Τα αντι-ικά CTLs διατήρησαν φαινότυπο κυττάρων κεντρικής μνήμης ενώ μόνο ένα μικρό υποσύνολο έδειξε δείκτες τερματικής διαφοροποίησης ή γήρανσης (Εικόνα 2Β). Το παραπάνω πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία και για την παραγωγή αντι-CMV CTLs σε κλινική κλίμακα σε επωαστή GREX (Εικόνα 2Γ).

Κλινική εφαρμογή T-λεμφοκυττάρων με ειδικότητα έναντι πολλαπλών ιών για την αντιμετώπιση ιογενών λοιμώξεων

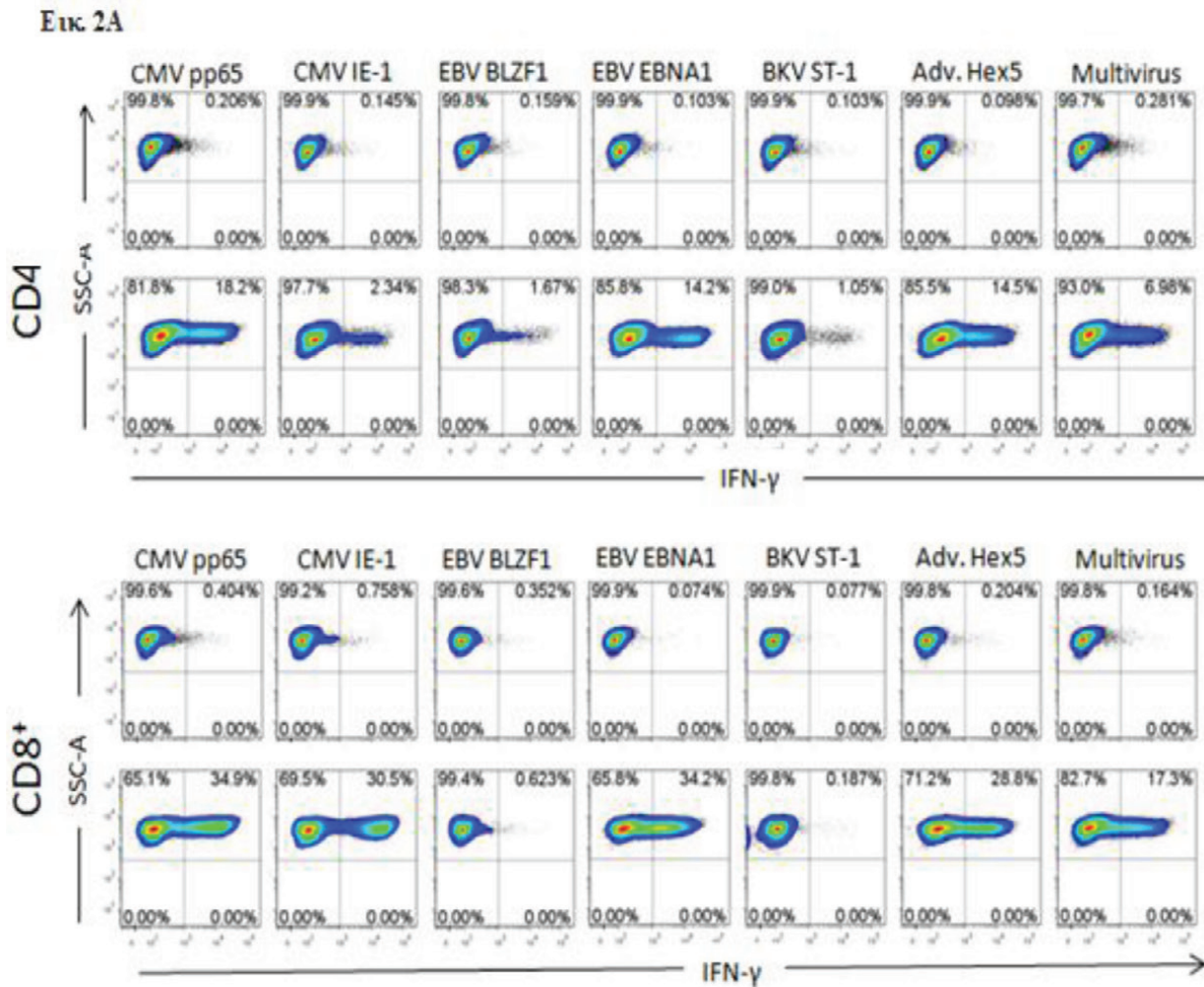
Πολλά εργαστήρια ανά τον κόσμο ασχολούνται με την παραγωγή ειδικών T-λεμφοκυττάρων είτε για την πρόληψη, είτε για τη θεραπεία ιογενών λοιμώξεων μετά από μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων ή συμπαγών οργάνων⁴²⁻⁴⁵. Είναι σημαντικό να τονιστεί, ότι ακόμη και πολύ μικρός αριθμός ειδικών T-λεμφοκυττάρων της τάξης του 10^3 /kg είναι ικανός να ελέγξει μια ιογενή λοίμωξη όταν εγχυθεί in vivo²⁹. Το 2013 δημοσιεύτηκε μια πολύ ενδιαφέρουσα πολυκεντρική μελέτη που παρουσίασε τη χρησιμοποίηση “third-party” πολύ-αντιικών (multivirus) CTL πληθυσμών για την αντιμετώπιση σοβαρών ιογενών λοιμώξεων μετά από άλλο-MMO. Η χρησιμοποίηση “third-party” αποθηκευμένων T-λεμφοκυττάρων παρέχει εξαιρετικές δυνατότητες για την ευρύτερη χρήση ειδικών αντι-ικών T-λεμφοκυττάρων καθώς ανταπεξέρ-

χεται διαφόρων περιορισμών της δημιουργίας εξατομικευμένων κυτταρικών σειρών από ξεχωριστά ζευγάρια δοτών-ασθενών, όπως η χρονοβόρα διαδικασία, το κόστος και η δυσκολία της δημιουργίας τέτοιων κυττάρων από μη ανοσοποιημένους δότες. Στην προαναφερθείσα μελέτη, κατασκευάστηκε μία τράπεζα από 32 κυτταρικές σειρές από άτομα με κοινούς HLA πολυμορφισμούς και ανοσία στους EBV, CMV και Adv. Συνολικά 18 σειρές χορηγήθηκαν σε ασθενείς με σοβαρές, ανθεκτικές ιογενείς λοιμώξεις από τους προαναφερθέντες ιούς μετά από άλλο-MMO. Η πλήρης ή μερική ανταπόκριση μετά από 6 εβδομάδες από τη χορήγηση των κυττάρων ήταν 74% στο σύνολο των ασθενών και των ιών-στόχων. Συγκεκριμένα, το ποσοστό ανταπόκρισης ήταν 73,9% για CMV λοίμωξη, 77,8% για λοίμωξη με Adv και 66,7% για EBV λοίμωξη. Δεν παρατηρήθηκαν άμεσα με την έγχυση των κυττάρων σχετιζόμενες ανεπιθύμητες ενέργειες και το φαινόμενο μοσχεύματος κατά ξενιστή παρουσιάστηκε μόνο σε 2 από τους 50 συμμετέχοντες. Οι μικρές αυτές κυτταρικές τράπεζες που χρησιμοποιήθηκαν αποδείχθηκαν αποτελεσματικές ακόμα και όταν υπήρχε μια μοναδική σχετική HLA αντιστοιχία με τον ασθενή, με την προϋπόθεση ότι το συγκεκριμένο HLA αλληλόμορφο αντιπροσώπευε σχετιζόμενο με τον ιό αντιγόνο⁴⁶.

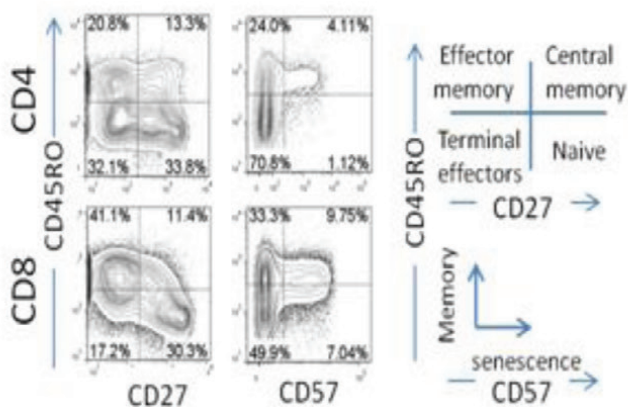
Ένα νέο πρωτόκολλο παραγωγής CTLs πολλαπλής ειδικότητας ελέγχθηκε πρόσφατα σε κλινική μελέτη φάσης I. Το καινοτόμο αυτό πρωτόκολλο επιτρέπει την ταχεία έκπτυξη μίας κυτταρικής σειράς T-κυττάρων που δύναται να στοχεύει ταυτόχρονα 5 ιούς (Adv, CMV, EBV, BKV και HHV6). Η νέα στρατηγική περιλαμβάνει την απ' ευθείας διέγερση των PBMCs με μείγμα 15μερών πεπτιδίων και την καλλιέργειά τους σε GREX βιοαντιδραστήρες για 9-11 ημέρες, σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με IL-4 και IL-7. Το καινούριο πρωτόκολλο είναι οικονομικότερο, καθώς αποφεύγει τη χρήση ιών και ιικών φορέων, απλούστερο, εφόσον αποδίδει CTLs πενταπλής ειδικότητας με μία μόνο διέγερση, σε μία μόνο καλλιέργεια και τέλος ταχύτερο, καθώς μειώνει τον χρόνο παραγωγής των CTLs σε μόλις 10 ημέρες. Τα CTLs χορηγήθηκαν σε 11 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε αλλογενή μεταμόσχευση προφυλακτικά αλλά και ως θεραπεία για μία ή περισσότερες ενεργείς λοιμώξεις και φάνηκαν ασφαλή αλλά και αποτελεσματικά επάγοντας ανοσολογική απόκριση στο 94% των περιπτώσεων⁴⁷.

Θεραπευτικό και οικονομικό όφελος από τη χρήση αντι-ικών T-λεμφοκυττάρων

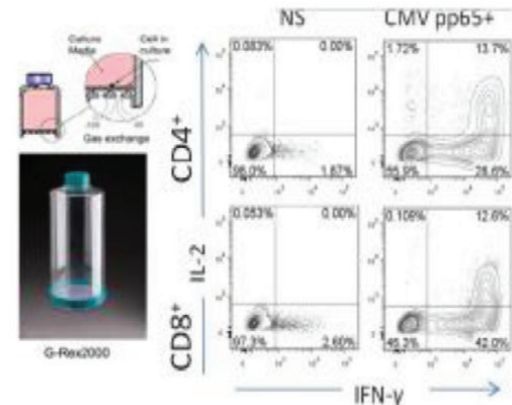
Τέλος, αξίζει να αναφερθεί η δυνατότητα χορήγησης ειδικών έναντι πολλαπλών ιών CTLs και ως προφυλακτική θεραπεία σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε άλλο-MMO για την έγκαιρη πρόληψη ιογενών λοιμώξεων. Και ενώ ίσως το κόστος φαντάζει απαγορευτικό για τη



Εικ. 2Β



Εικ. 2Γ



Εικόνα 2. (Α) Τα αντι-ικά CTLs (CD4+ και CD8+) αναγνωρίστηκαν με κυτταρομετρία ροής με την ικανότητά τους να παράγουν IFNγ μετά από ειδική αντιγονοδιέγερση (κάτω σειρές). Οι πάνω σειρές δείχνουν την μη ειδική ενεργότητα που παρουσιάζεται στην καλλιέργεια. Η ειδικότητα των CTLs έναντι κάθε ιού αναγράφεται στην εικόνα. Τα multivirus καταδεικνύουν CTLs που δείχνουν ειδικότητα έναντι των τεσσάρων ιών (CMV, EBV, Adv, BK). (Β) Φαινοτυπική ανάλυση των αντιικών (multivirus) CTLs. (Γ) Ανάπτυξη ειδικών αντι-CMV CTLs σε μεγάλη κλίμακα σε επωαστή GREX.

χρήση μιας τόσο ακριβά παρασκευαζόμενης κυτταρικής θεραπείας ως προληπτικό μέσο, η πρόσφατη ανάλυση της Jain et al, 2014, καταδεικνύει αντίθετα αποτελέσματα. Η παρούσα μελέτη αφορούσε στη χορήγηση ειδικών αντι-CMV CTLs ως πρόληψη για την CMV ενεργοποίηση σε μεταμοσχευμένους ασθενείς. Η τρέχουσα δαπάνη για την παρασκευή ειδικών αντι-CMV CTLs σύμφωνα με τους κανόνες GMP ανέρχεται σε 10.000\$. Ωστόσο αν λάβει κανείς υπόψη του το κόστος της αντι-ιικής αγωγής και της ενδονοσοκομειακής νοσηλείας, το οποίο υπολογίζεται σε πάνω από 50.000\$, ακόμα και αν η αποτελεσματικότητα της προφυλακτικής χορήγησης ειδικών CTLs περιοριστεί στο 50% αυτή θα εξακολουθούσε να αποτελεί την πιο οικονομική επιλογή⁴⁸. Ανεξαρτήτως οικονομικών δεδομένων και περιορισμών, η δυνατότητα να προληφθούν οι ιογενείς λοιμώξεις μέσω ειδικών CTLs παρέχει νέα προοπτική για αλλογενείς μεταμοσχεύσεις

αιμοποιητικών κυττάρων με λιγότερες επιπλοκές.

Επίλογος

Συνοψίζοντας η κυτταρική ανοσοθεραπεία αποτελεί ένα δυναμικό πεδίο εντατικής έρευνας στην αιματολογία. Παρόλο που πολλά εμπόδια ακόμα πρέπει να υπερνικηθούν για να φτάσουμε στην ευρεία εφαρμογή της, η κυτταρική ανοσοθεραπεία των ιογενών επιπλοκών έχει φτάσει σε ένα επεκτεινόμενο επίπεδο εφαρμογής και αποδοτικότητας. Προς το παρόν, λίγοι μόνο ασθενείς έχουν πρόσβαση σε αυτές τις πολλά υποσχόμενες θεραπείες. Η χορηγούμενη T-κυτταρική θεραπεία θα πρέπει να γίνει ακόμα πιο προσιτή, απλή και αποδοτική. Η προοπτική για την εφαρμογή ασφαλούς και αποδοτικής κυτταρικής θεραπείας απαιτεί στενή συνεργασία μεταξύ βασικών ερευνητών και κλινικών ιατρών.

Multi-virus specific T-cells

by Anastasia Karela, Alexandros Spyridonidis

Bone Marrow Transplantation Unit, University General Hospital of Patras, Rio, Greece

ABSTRACT: The notion that immunocompetent cells are capable of mediating an antitumor effect was first validated experimentally in late 1950s. These findings led to the therapeutic infusion of antitumor specific T-lymphocytes to treat hematologic malignancies, for example donor lymphocyte infusions for relapse after allogeneic stem cells transplant (HSCT). Besides relapse, viral infections consist a major and potential fatal complication after HSCT. Antiviral chemotherapy is not universally effective, is expensive and carries its own complications, like organ toxicity and generation of resistant virus strains. The use of multi-virus specific T-cells for the treatment of viral infections is an emerging field of research. Early clinical trials have helped to understand the hallmarks of T-cell therapies and provided critical insights to the manufacturing of a therapeutically robust product. Recently, very encouraging results in treating severe post-transplantation viral infections have been reported with virus-specific T cells, from third-party or the stem cell donors, targeting 3 to 5 viruses. Although many hurdles remain unresolved, the use of multi-virus specific T-cells has now reached a stage of increasing feasibility and efficacy.

Βιβλιογραφία

1. Barnes DW, Loutit JF. Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow. II. Br J Haematol. 1957;3:241–252.
2. Mathe G, Amiel JL, Schwarzenberg L, et al. Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results. Cancer Res. 1965;25:1525–1531.
3. Schwarzenberg L, Mathe G, Schneider M, et al. Attempted adoptive immunotherapy of acute leukaemia by leucocyte transfusions. Lancet. 1966;2:365–368.
4. Nadler SH, Moore GE. Immunotherapy of malignant disease. Arch Surg. 1969;99:376–381.
5. Barrett J, Bollard CM. T-cell therapy for cancer. Immunotherapy. 2012; 4:347–350.
6. Slavin S, Naparstek E, Nagler A, et al. Allogeneic cell therapy for relapsed leukemia after bone marrow transplantation with donor peripheral blood lymphocytes. Exp Hematol. 1995;23:1553–1562.
7. Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. Blood. 1990;76:2462.
8. Faber LM, Van Der Hoeven J, Goulmy E, et al. Recognition of clonogenic leukemic cells, remission bone marrow and HLA-identical donor bone marrow by CD8+ or CD4+ minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. J Clin Invest. 1995;96:877–883.
9. Alexandros Spyridonidis, Maria Liga, A long road of T-cells to cure cancer: from adoptive immunotherapy with unspecific cellular products to donor lymphocyte infusions and

- transfer of engineered tumor-specific T-cells, *Am J Blood Res* 2012;2:98-110.
10. Moss P, Rickinson A. Cellular immunotherapy for viral infection after HSC transplantation. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:9-20.
 11. Wingard JR, Hsu J, Hiemenz JW. Hematopoietic stem cell transplantation: an overview of infection risks and epidemiology. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2011;25:101-116.
 12. Kennedy-Nasser AA, Bollard CM, Myers GD, et al. Comparable outcome of alternative donor and matched sibling donor hematopoietic stem cell transplant for children with acute lymphoblastic leukemia in first or second remission using alemtuzumab in a myeloablative conditioning regimen. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14:1245-1252.
 13. Verdeguer A, de Heredia CD, Gonzalez M, et al. Observational prospective study of viral infections in children undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation: a 3- year GETMON experience. *Bone Marrow Transplant*. 2011;46:119-124.
 14. Hantz S, Garnier-Geoffroy F, Mazon MC, et al. Drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:2628-2640.
 15. Ljungman P. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: viral status. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007; 20:209-217.
 16. Ljungman P, Brand R, Einsele H, Frassoni F, Niederwieser D, Cordonnier C. Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: an EBMTmegafile analysis. *Blood*. 2003;102:4255-4260.
 17. Moss P, Rickinson A. Cellular immunotherapy for viral infection after HSC transplantation. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:9-20.
 18. Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, et al. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science*. 1992;257:238-241.
 19. Heslop HE, Slobod KS, Pule MA, et al. Long-term outcome of EBV-specific T cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood*. 2010; 115:925-935.
 20. Spyridonidis A. Cellular immunotherapy for cancer. Past, present, future, memo 2012; 5:81-84.
 21. Gerdemann U, Katari U, Christin AS, et al. Cytotoxic T lymphocytes simultaneously targeting multiple tumor-associated antigens to treat EBV negative lymphoma. *Mol Ther*. 2011;19:2258-2268.
 22. Riddell SR, Greenberg PD. Principles for adoptive T cell therapy of human viral diseases. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:545-586.
 23. Berger C, Jensen MC, Lansdorp PM, et al. Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *J Clin Invest*. 2008;118:294-305.
 24. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med*. 2011;17:1290-1297.
 25. Bollard CM, Rossig C, Calonge MJ, et al. Adapting a transforming growth factor beta-related tumor protection strategy to enhance antitumor immunity. *Blood*. 2002; 99:3179-3187.
 26. Σπυριδωνίδης Α. Οι αρχές των GCP (Good Clinical Practice) και GMP (Good Manufacturing Practice) στην Αιματολογία: Νέες διατάξεις της Ευρωπαϊκής Ένωσης Haema, 2009; 12(Suppl 2):274-282.
 27. Lapteva N, Vera FJ. Optimization Manufacture of Virus- and Tumor-Specific T Cells, *Stem Cells International Volume 2011, Article ID 434392, 8 pages doi:10.4061/2011/434392*.
 28. Cobbold M, Khan N, Pourgheysari B, et al. Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J Exp Med*. 2005;202:379-386.
 29. Feuchtinger T, Lang P, Hamprecht K, Schumm M, Greil J, Jahn G, Niethammer D, Einsele H. Isolation and expansion of human adenovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells according to IFN-gamma secretion for adjuvant immunotherapy. *Exp Hematol*. 2004;32:282-289.
 30. Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, Li CR, Agha ME, Greenberg PD. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science*. 1992;257:238-241.
 31. Peggs KS, Verfuether S, Pizzey A, Chow SL, Thomson K, Mackinnon S. Cytomegalovirus-specific T cell immunotherapy promotes restoration of durable functional antiviral immunity following allogeneic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*. 2009;49:1851-1860.
 32. Jedema I, van de Meent M, Pots J, Kester MG, van der Beek MT, Falkenburg JH. Successful generation of primary virus-specific and anti-tumor T-cell responses from the naive donor T-cell repertoire is determined by the balance between antigen-specific precursor T cells and regulatory T cells. *Haematologica*. 2011;96:1204-1212.
 33. Hanley PJ, Shaffer DR, Cruz CR, et al. Expansion of T cells targeting multiple antigens of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and adenovirus to provide broad antiviral specificity after stem cell transplantation. *Cytotherapy*. 2011;13:976-986.
 34. Leen AM, Myers GD, Sili U, et al. Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals. *Nat Med*. 2006;12:1160-1166.
 35. Leen AM, Christin A, Myers GD, et al. Cytotoxic T lymphocyte therapy with donor T cells prevents and treats adenovirus and Epstein-Barr virus infections after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood*. 2009;114:4283-4292.
 36. Gerdemann U, Christin AS, Vera JF, et al. Nucleofection of DCs to generate Multivirus-specific T cells for prevention or treatment of viral infections in the immunocompromised host. *Mol Ther*. 2009;17:1616-1625.
 37. Gerdemann U, Keirnan JM, Katari UL, et al. Rapidly generated multivirus-specific cytotoxic T lymphocytes for the prophylaxis and treatment of viral infections. *Mol Ther*. 2012;20:1622-1632.
 38. Wiesner M, Zentz C, Hammer MH, et al. Selection of CMV-specific CD8+ and CD4+ T cells by mini-EBV-transformed B cell lines. *Eur J Immunol*. 2005; 35:2110-2121.

39. Moosmann A, Hammerschmidt W, Kolb H-J. Virus-specific T cells for therapy – Approaches, problems, solutions, *EJCB*-50582; 2011.
40. Gerdemann U, Vera JF, Rooney CM, Leen AM. Generation of Multivirus-specific T Cells to Prevent/treat Viral Infections after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant. *J Vis Exp*. 2011; e2736, doi:10.3791/2736.
41. Spyridonidis A, Muranski P, Kerkar Kazushi Tanimoto S, Hensel FN, Melenhorst JJ, Barrett AJ. Improved Strategy for Rapid Generation of Quadrivirus-Specific CD8+ and CD4+ Cytotoxic T Lymphocytes (CTLs) for Adoptive Transfer After Stem Cell Transplantation (SCT), 54th ASH Annual Meeting and Exposition.
42. Leen AM, Myers GD, Sili U, et al. Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals. *Nat Med*. 2006; 12:1160–1166.
43. Peggs KS, Verfuere S, Chow C et al. Adoptive cellular therapy for cytomegalovirus following allogeneic stem cell transplantation: toxicity and efficacy. *Blood*. 2005; 104, Abstract 191.
44. Hanley PJ, Cruz CR, Savoldo B, et al. Functionally active virus-specific T cells that target CMV, adenovirus, and EBV can be expanded from naive T cell populations in cord blood and will target a range of viral epitopes. *Blood* 2009; 114:1958–1967.
45. Bao L, Cowan M, Dunham K, et al. Adoptive immunotherapy with CMV specific cytotoxic T lymphocytes for stem cell transplant patients with refractory CMV Infections, *J Immunother*. 2012; 35:293–298. doi: 10.1097/CJI.0b013e31824300a2.
46. MA Leen, Bollard MC, Mendizabal MA, et al. Multicenter study of banked third-party virus-specific T cells to treat severe viral infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2013; 121.
47. Papadopoulou A, Gerdemann U, Katari UL, et al. Activity of broad-spectrum T cells as treatment for AdV, EBV, CMV, BKV, and HHV6 infections after HSCT. *Sci Transl Med*. 2014;6:242ra83.
48. Jain AN, Lu K, Ito S, et al. The clinical and financial burden of pre-emptive management of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation—implications for preventative treatment approaches. *Cytherapy*. 2014; 16: 927e933.