

21. Buněčná terapie – virus-specifické lymfocyty (VSL)

Tomáš Kabut, Barbora Weinbergerová, Robert Pytlík, Daniel Lysák, Jan Starý, Irena Koutná, Jiří Mayer

21.1. Teoretické východisko

Reaktivace virových infekcí po alogenní transplantaci krvetvorných kmenových buněk je frekventní a často závažnou komplikací s vysokou morbiditou a mortalitou. Klinicky nejvýznamnější z hlediska incidence i svých důsledků je zejména reaktivace cytomegaloviru (CMV), která postihuje až 80 % pacientů, a viru Epstein-Barrové (EBV) postihující až 60 % pacientů. Můžeme se setkat i s méně častými reaktivacemi viry herpes simplex 1 a 2 (HSV1 a 2), BK viru (BKV), adenoviru (AdV) aj. Hlavním patofyziologickým mechanismem reaktivace těchto virových onemocnění je absence dostatečné virus specifické buněčné imunity, která je potlačena zejména podáváním imunosupresivní léčby v rámci prevence reakce štěpu proti hostiteli (GvHD). V prostředí nedostatečné imunitní kontroly dochází k reaktivaci latentních infekcí (přítomnost virémie bez poškození cílového orgánu), které mohou dále progredovat do pokročilejších fází onemocnění s vysokou mortalitou (CMV nemoc, EBV-asociované potransplantační lymfoproliferativní onemocnění aj.). V případě rozvoje reaktivace je v současnosti standardem preemptivní léčba virostatiky (CMV, HSV, VZV) nebo terapie anti-CD20 protilátkou rituximabem (EBV), jenž má předejít rozvoji pokročilých fází onemocnění. K dlouhodobé a definitivní léčebné odpovědi je ale nezbytná obnova specifické buněčné imunity. Zejména u pacientů s kombinací více rizikových faktorů (např. přítomnost GvHD a její léčba, kortikoterapie, potransplantační cyklofosfamid nebo ATG v profylaxi GvHD, HLA neshoda aj.) může být nepřítomnost funkční specifické imunity protrahovaná a u části těchto pacientů se můžeme setkat s opakovanými refrakterními/rezistentními reaktivacemi a častější progresí do pokročilejší choroby. Opakovaná preemptivní léčba je u těchto pacientů navíc zatížena vysokou mírou sekundárních komplikací, nutností opakovaných hospitalizací, významným růstem nákladů na řešení těchto komplikací a zejména zvýšenou mortalitou.

21.2. Popis léčebné metody a přípravku VSL

Adoptivní T-buněčná imunoterapie s podáním dárcovských virus specifických T-lymfocytů (VSL) je metodou moderní terapie, jenž v případě indikovaných imunokompromitovaných pacientů s virovými infekcemi může vést k obnově specifické buněčné imunity s dosažením dlouhodobé virologické i klinické léčebné odpovědi. Po podání dárcovských VSL pacientovi

dochází jednak k přímému antivirotickému účinku podaných virus specifických cytotoxických T-lymfocytů, tak i k dlouhodobější komplexní obnově paměťové i efektorové virus specifické imunity.

Terapie spočívá v podání nativní infúze VSL, jež jako svou léčivou složku obsahuje CD4+ a CD8+cirkulující paměťové T lymfocyty získané z leukaferetického separátu krevních mononukleárů z periferní krve dárce pomocí imunomagnetické selekce s využitím bioreaktoru CliniMACS Prodigy. Získaná nativní buněčná suspenze o objemu 4-10 ml obsahuje T-lymfocyty, B-lymfocyty, NK buňky, monocyty a erytrocyty v suspenzním roztoku tvořeném fyziologickým roztokem a lidským albuminem. Minimální obsah specifických T-lymfocytů (součet CD4+ IFN g+ a CD8+ IFN g+ lymfocytů) v přípravku se liší dle konkrétního typu VSL (CMV, EBV, AdV aj.) a jsou stejně jako další kvalitativní buněčné parametry (celkové množství bílých krvinek, viabilita, příměs ostatních krevních elementů) dány protokolem výrobce. Přípravek je podáván v nativní formě s expirací do 48h.

21.3. Výroba VSL a výběr dárce

Léčivý přípravek je vyráběn individuálně pro konkrétního pacienta schváleným výrobcem s povolením k výrobě VSL vydaným Státním ústavem pro kontrolu léčiv (SÚKL), a to v režimu správné výrobní praxe dle platné legislativy České republiky o léčivech. Výroba je vázána na specializované laboratoře – čisté prostory s nejvyšším stupněm čistoty A, jejichž provoz je dozorován v plném rozsahu SÚKL.

Pro přípravu VSL je vhodnému dobrovolnému dárci (viz níže) na separátoru krevních buněk odebrána frakce krevních mononukleárních buněk. Nativní buňky jsou následně zpracovány ve zpracovatelském zařízení. V procesu výroby je zahrnuta technologie CCS (Cytokine Capture System) a obsahuje 2 základní kroky. Po stimulaci peptivátorem (směsice oligomerů peptidu virového imunodominantního antigenu příslušného viru - CMV, EBV, BKV, AdV) dochází k aktivaci paměťových CD4+ a CD8+ T-lymfocytů, která se projeví sekrecí molekul interferonu γ (IFN γ), který je na povrchu aktivované buňky zachycen pomocí CCS. V dalším kroku je na zachycený IFN γ na povrchu aktivovaných T-lymfocytů navázaná primární protilátka a ta je dále vázána sekundární protilátkou konjugovanou s magnetickou částicí. Takto označené buňky jsou vychytány v indukovaném magnetickém poli bioreaktoru. Cílové buňky jsou odseparovány, promyty a sterilně uloženy v transfúzním vaku určenému k finálnímu použití. Ke každému léčivému přípravku je vydán analytický certifikát, který prokazuje bezinfekčnost a sterilitu léčivého přípravku ve vztahu k dárci a příjemci a přesně definuje buněčné populace s ohledem na jejich kvantitu a kvalitu směrem k účinnosti přípravku.

Dárce pro výrobu VSL může být buď původní dárce kmenových krvetvorných buněk pro pacienta (většinou sourozenec pacienta) nebo jakýkoliv jiný (příbuzný či nepříbuzný) dobrovolný dárce s HLA shodou nejméně 1/10. Tento dárce musí mít přítomny cirkulující aloreaktivní T-lymfocyty v periferní krvi pro daný virus (dvojí CD3 a IFN g pozitivita >0.1% z celkového počtu CD3+ buněk po stimulaci peptivátorem, který bude použit pro výrobu VSL) a zároveň splňovat kritéria pro výběr dárců periferních krvetvorných buněk pro účely alogenní transplantace.

21.4. Indikace terapie virus specifickými lymfocyty

- **Cytomegalovirus:**

Terapie CMV-VSL je indikována u pacientů po alogenní transplantaci krvetvorných buněk s refrakterní/recidivující CMV reaktivací nebo s rozvinutou CMV nemocí, kteří nereagují na standardní terapii virostatiky anebo jsou k této léčbě nevhodní z důvodu toxicity.

- **Epstein-Barrové virus:**

Terapie EBV-VSL je indikována u pacientů po alogenní transplantaci krvetvorných buněk s reaktivací EBV infekce nebo s EBV-asociovanou potransplantační lymfoproliferativní chorobou (EBV-PTLD), kteří nereagují na standardní preemptivní terapii rituximabem a nebo je u nich tato léčba nevhodná, například z důvodu vysokého rizika infekčních komplikací při dalším zintenzivnění imunosuprese anti-CD-20 protilátkou.

- **BK virus:**

Terapie BKV-VSL je indikována u pacientů po alogenní transplantaci krvetvorných buněk s hemoragickou cystitidou způsobenou BK virem, u nichž není dosaženo léčebného efektu kombinací podpůrné léčby s cidofovirem anebo k terapii cidofovirem nejsou vhodné, případně antivirotikum není k dispozici.

- **Adenovirus:**

Terapie AdV-VSL je indikována u pacientů po alogenní transplantaci krvetvorných buněk s enterokolitidou, hemoragickou cystitidou nebo hepatitidou a selháváním štěpu způsobenými AdV virem, u nichž není dosaženo léčebného efektu kombinací podpůrné léčby s cidofovirem anebo k terapii cidofovirem nejsou vhodné, případně antivirotikum není k dispozici.

21.5. Účinnost a bezpečnost VSL

V současné době je k dispozici řada publikovaných výsledků nerandomizovaných klinických studií s klinickou a virologickou odpovědí u 74 – 93 % pacientů (CMV, EBV). Dominantně se jednalo o pacienty s refrakterním nebo rekurentním virovým onemocněním, kde pomocí standardní léčby nebylo dosaženo léčebné odpovědi. U pacientů v těchto analýzách došlo k poklesu virové nálože v periferní krvi s dlouhodobou negativitou. Často byla rovněž dokumentována expanze a dlouhodobá perzistence VSL. Na základě těchto zkušeností je použití adoptivní buněčné terapie virus specifickými T-lymfocyty součástí aktuálně platných mezinárodních doporučení Evropské skupiny pro transplantace krvetvorných buněk (European Society for Blood and Marrow Transplantation; EBMT), Evropské konference o infekcích u leukémie (European Conference on Infections in Leukaemia; ECIL) a Americké společnosti pro transplantace a buněčnou terapii (American Society of Transplantation and Cellular Therapy; ASTCT). V souvislosti s hodnocením VSL je rovněž nezbytné uvést, že použití VSL je vázané na úzkou a zároveň velice heterogenní skupinu specifických pacientů a povaha individuálně připravovaného přípravku pro konkrétního pacienta limituje jeho hodnocení ve velkých randomizovaných hodnoceních.

Stran bezpečnosti VSL nebyly v publikovaných analýzách zaznamenány žádné neočekávané nebo vážné nežádoucí účinky spojené s jejich podáním. Přípravky VSL připravené na přístroji CliniMACS Prodigy byly obecně dobře tolerovány. Teoreticky nejobávanější specifickou komplikací podání VSL je vznik nebo reaktivace akutní nebo chronické GvHD, jenž může být způsobena reziduálními CD8+ IFN g-lymfocyty na základě HLA neshody mezi dárce VSL a pacientem. Ve větších souborech pacientů po léčbě VSL bylo riziko akutní GvHD pozorováno ve 3-18 %, ale u méně než 10 % všech případů šlo o vážnější formu GvHD (stupeň 3 nebo 4). Většina popisovaných nových či reaktivovaných GvHD po podání VSL připravených na přístroji CliniMACS Prodigy byla kožních, dobře reagujících na topické steroidy. Vzhledem k provázanosti patofyziologie rozvoje reaktivace virových onemocnění se vznikem GvHD nelze zároveň zjistit, nakolik se na vzniku těchto případů GvHD podílely jiné faktory než podání VSL (snížení imunosupresivní medikace aj.).

21.6. Režim úhrady

Léčba VSL nemá v současnosti stanovenou úhradu z veřejného zdravotního pojištění. U každého pacienta je třeba žádat o schválení revizního lékaře příslušné zdravotní pojišťovny na základě §16/19.

21.7. Literatura

1. Ottaviano G, Chiesa R, Feuchtinger T, et al. Adoptive T Cell Therapy Strategies for Viral Infections in Patients Receiving Haematopoietic Stem Cell Transplantation. *Cells*. 2019 Jan 14;8(1):47.
2. Papadopoulou A, Alvanou M, Karavalakis G, et al. Pathogen-specific T Cells: Targeting Old Enemies and New Invaders in Transplantation and Beyond. *Hemasphere*. 2023 Jan 9;7(1):e809.
3. Shafat MS, Mehra V, Peggs KS, Roddie C. Cellular Therapeutic Approaches to Cytomegalovirus Infection Following Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*. 2020 Jul 31;11:1694.
4. Kaeuferle, T., Krauss, R., Blaeschke, F., et al. Strategies of adoptive T -cell transfer to treat refractory viral infections post allogeneic stem cell transplantation. *J Hematol Oncol* 12, 13 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0701-1>
5. Ljungman P, de la Camara R, Robin C, et al. 2017 European Conference on Infections in Leukaemia group. Guidelines for the management of cytomegalovirus infection in patients with haematological malignancies and after stem cell transplantation from the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 7). *Lancet Infect Dis*. 2019 Aug;19(8):e260-e272.
6. Ljungman P, Styczynski J, Einsele H. Viral Infections. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M, et al., editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. 7th edition. Cham (CH): Springer; 2019. Chapter 38. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553936/?report=classic> doi: 10.1007/978-3-030-02278-5_38
7. Yong MK, Shigle TL, Kim YJ, et al. American Society for Transplantation and Cellular Therapy Series: #4 - Cytomegalovirus treatment and management of resistant or refractory infections after hematopoietic cell transplantation. *Transplant Cell Ther*. 2021 Dec;27(12):957-967.
8. Styczynski J, van der Velden W, Fox CP, et al. Sixth European Conference on Infections in Leukemia, a joint venture of the Infectious Diseases Working Party of the European Society of Blood and Marrow Transplantation (EBMT-IDWP), the Infectious Diseases Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC-IDG), the International Immunocompromised Host Society (ICHS) and the European Leukemia Net (ELN). Management of Epstein-Barr Virus infections and post-transplant lymphoproliferative disorders in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Sixth European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-6) guidelines. *Haematologica*. 2016 Jul;101(7):803-11.